

海洋生物に由来する細菌の系統分類学的研究

東京大学大学院農学生命化学研究科
応用生命工学専攻
平成10年度博士課程入学
氏名 倉橋 みどり
指導教官名 横田 明

目 次

第 1 章 緒論	1
第 1 節 背景	1
1－1－1 海洋細菌に関する研究の背景	1
1－1－2 海洋生物の消化管内細菌に関する研究の背景	2
第 2 節 本研究の目的	3
第 2 章 海洋生物より分離された細菌の分類学的特性	5
第 1 節 材料と方法	5
2－1－1 分離源海洋生物の採集	5
2－1－2 分離方法及び培養方法	11
2－1－3 16S rDNA 部分塩基配列の決定	13
第 2 節 結果	18
第 3 節 考察	21
第 3 章 16S rDNA による新規性の高い分離株の分類学的評価	27
第 1 節 方法	27
3－1－1 16S rDNA 塩基配列の決定	27
3－1－2 系統樹の作成	33
3－1－3 Distance matrix の作成	33
第 2 節 結果	34
3－2－1 <i>Alteromonas</i> group	34
3－2－2 <i>Rhodobacter</i> group	41
3－2－3 <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i> group	46

第3節 考察	54
3-3-1 16S rDNA 塩基配列による各株の新属の可能性	54
3-3-2 16S rDNA 部分塩基配列の妥当性	58
第4章 新規性の高い分離株の分類学的位置	61
第1節 方法	61
4-1-1 形態観察	61
4-1-2 生理・生化学的分析	62
4-1-3 化学分類学的分析	63
4-1-4 分子系統学的解析	66
4-1-5 PCR による puf 遺伝子の探索	68
第2節 結果	72
4-2-1 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 について	72
4-2-2 MKT110 について	84
4-2-3 MKT95 について	87
4-2-4 MKT84, 94 について	90
第3節 考察	100
第5章 総括	117
謝辞	120
文献	121

第 1 章 緒論

第 1 節 背景

1-1-1 海洋細菌に関する研究の背景

海洋細菌の定義に関しては、現在のところ定まったものではなく、本研究では、「海洋に存在していて、増殖している細菌」ととらえることにする。

地球表面積の約 7 割は海洋であり、地球上で細菌が誕生した場所も海洋であると考えられ、近年、細菌研究者の目も海洋に向けられつつある。そもそも海洋微生物に関して最初に体系的に研究されたのは、ZoBell（1946）による功績であるとされている。その後は、細菌それ自体の分類学、生態学、生理・生化学的の視点と海洋細菌が海洋の諸過程で担う役割を理解していく視点からの研究が続けられている。現在、海洋微生物に関して Nature や Science などによく取り上げられる話題は、地球規模の物質循環と海洋微生物の関わりについてである（Kolber ら, 2001）。一方、細菌分類研究者を驚かせたのは、今までに知られていた細菌の大きさの数百倍もある細菌が相次いで海洋から発見されたことである（Schulz, 1999）。また、細菌探索の目的から、これまで未開拓であった深海底にも潜水するようになり、その結果熱水噴出孔生物群集に関わる細菌の研究報告も多く出されるようになってきている。

海水中の有機物デトリタスは、マリンスノーと称されるように海底に沈んでいくか、浮力を得て海水表面に浮かびあがる。したがって、一般的には、海底泥や海洋表面における細菌の分離、調査が盛んに行われ、遺伝子技術の進歩とともに、次々に新しい細菌が報告されているのが現状である。

1—1—2 海洋生物の消化管内細菌に関する研究の背景

海洋生物の消化管内細菌に関する研究は、一つには、魚介類の養殖に関連して、餌料、魚病、抗生物質の観点から、その細菌叢とその変動要因が研究されている（Sugita ら, 1996）。これまで行われてきた魚介類消化管内細菌叢の研究においては、細菌の分類、同定が属レベルに留まっているものが多かった。また、分子遺伝学的手法を用いずに細菌の分類、同定が行われていた時期の報告には、誤分類、誤同定と考えられるものも少なくない。

また、消化管内細菌に関するもう一つの観点は、海洋より生理活性物質を探索する過程において、生理活性物質を直接生産する細菌とその宿主海洋生物の共生関係を明らかにする研究である。そして、その生態的な相互作用や意義、生理的な機能や機構について研究がなされてきている（Sawabe ら, 1998）。しかし、その対象となっている海洋生物が、産業上の重要種であったり、すでに飼育方法が確立されている種、観賞用とされ入手の容易な種に偏っている。そのために、分離されてくる細菌もごく一部の分類群に限られているのが現状である。

したがって、海洋生物の体内を細菌探索のフィールドとした研究は、これまでにほとんど報告されておらず、未開拓分野と推察される。この身近であり、大きな細菌探索のフィールドが、細菌分類研究者にこれまで見過ごされてきた要因には、海洋生物に由来する細菌の分類を行うには、まず、その海洋生物の分類・同定にある程度通じていなければならないということも制約となっていた可能性がある。

第2節 本研究の目的

近年、生物の種多様性に関する研究は、多方面から積極的に取り組まれている。なぜなら、種の多様性を明らかにすることは、人間本来の潜在的な興味であると同時に、「多様」であることの重要性が再認識されてきたからである。一方、細菌に関しては、我々人類が分離し培養に成功したものは、実際に地球上に生存しているであろうと推定される細菌の1%にすぎないという見識もある(Rodon ら, 1999)。この数字を裏付けるような証拠が、環境中の DNA 断片を分析したり(Schleper ら, 1997)、蛍光プローブを用いる(Aznar ら, 1994)など、培養によらない解析手法の発展にともない、次々に提示されつつある。そして、その多様性は、これまでに考えられていたものをはるかに凌ぐであろうこともまた明らかになりつつある。

本研究では、未知領域の細菌を分離し、培養することを目的とする。分子レベルの解析が発展するなかで、敢えて分離、培養に重点を置いた主な理由は、遺伝子資源の確保にある。世界の製造の中心が中国などに急速に移行し、これまで製造したものを輸出することで発展していた我が国の経済は、先行きが全く不透明になっている。いうまでもなく、我が国は資源にも乏しく、そのうえ製造物の輸出量が激減するとなれば、将来を見据えた時、今、遺伝子資源を確保してことは急務であり、重要課題のひとつである。従って、この課題は国策としても支持されている。

現在、細菌の分離、培養は、大きく2つの方向からアプローチされている。ひとつは、VBNC (Viable but nonculturable) である。すなわち、生きているが培養困難な状態にある微生物を詳細に研究する事によって、VBNC 状態から culturable な状態へ転換させる方法を開発しようとするものである。現時点では、まだ研究段階である。もう一つは、探索フィールド

の開拓である。微生物の発見以来、多くの熱心な研究者たちによって、地球上のおよそ考えうるあらゆるフィールドがターゲットになってきた。そこで現在では、極地域の冷水域や深海底の熱水噴出孔など、人類がこれまで容易に接近することのできなかった極限環境にまで踏み込み、そこから新規性の高い細菌を探索していく方向に向っている。好熱菌や好冷菌が発見され、それらから得られた酵素類には、すでに産業的に利用されているものもある。

ところで身近な環境は、本当に探索し尽くしたのだろうか。本研究では、海洋に棲息する生物の体内が、細菌群にとって大きな niche であると推察し、身近な海洋生物の内臓を新規バクテリア探索のフロンティアと位置付け、その多様性を明らかにすることを目的とした。

第2章 海洋生物より分離された細菌の分類学的特性

第1節 材料と方法

2-1-1 分離源海洋生物の採集

(1) 採集地 (図 2-1)

東京都大島、東京都三宅島、神奈川県三浦市三崎、千葉県富津、千葉県館山市坂田、静岡県沼津市西浦大瀬崎、東京湾、駿河湾。

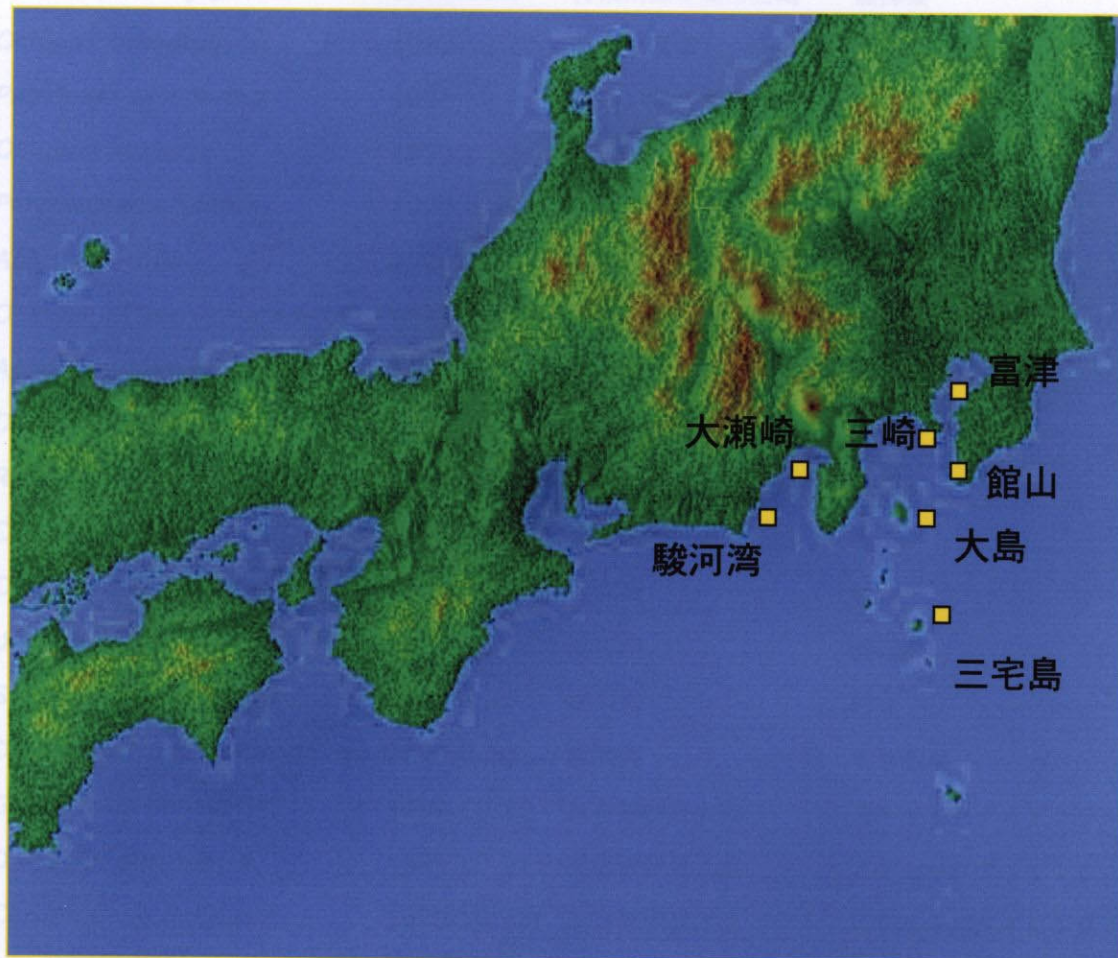
(2) 採集方法 (表 2-1)

- ① 干潮時の海岸にて、岩に付着している海洋生物を採集。
- ② スキューバダイビングによって、水深5～20メートルの海底や岩に付着している海洋生物を採集。
- ③ 東京大学海洋研究所の淡青丸に乗船し、釣り竿、たもあみ、採泥機を用いて採集。

(3) 採集生物 (表 2-2) (図 2-2, 3)

主に軟体動物の後鰓類を採集したが、他に魚類、甲殻類、腔腸動物、節足動物、原索動物のそれぞれから1～2種類の海洋生物を採集した。

採集した海洋生物の学名	採集日	採集場所	採集方法
<i>Acanthopleura japonica</i>	1999.10.6	静岡県浜松市西浦大瀬崎	スキューバダイビング



<i>Onchidium verruculatum</i> (6)	1999.10.29	東京都伊豆大島	スキューバダイビング
<i>Omphalius pfeifferi</i>	1999		観察
<i>Argus sparsus</i>	1999.11.19	千葉県館山市富田	観察
<i>Elysia ornata</i>	1999.11.28	東京都伊豆三宅島	スキューバダイビング
Unidentified	2000.5.14	静岡県浜松市西浦大瀬	スキューバダイビング
<i>Hemiodoris japonica</i>	2000.5.15	静岡県浜松市西浦大瀬	スキューバダイビング

図 2-1 分離源海洋生物採集地

表 2-1 細菌分離源海洋生物の採集日時、採集場所、採集方法

採集した海洋生物の学名	採集日	採集場所	採集方法
<i>Acanthopleura japonica</i>	1998.10.6	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Octopus ocellatus</i>	1998.12.1	千葉県富津	釣り
<i>Patelloida saccharina</i>	1998.12.7	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Octopus vulgaris</i>	1999.2.23	不明	魚市場にて購入
<i>Peronia verruculatum</i>	1999.4.2	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Aplysia kurodai</i>	1999.4.2	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Onchidium verruculatum</i> (A)	1999.4.2	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Actinia equina</i>	1999.4.3	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Dardanus arrosor</i>	1999.4.19	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Reishia clavigera</i>	1999.4.19	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Cellana toreuma</i>	1999.4.19	神奈川県三浦市三崎	磯採集
<i>Cypselurus agoo agoo</i>	1999.6.25	東京湾	釣り
Unidentified	1999.6.29	駿河湾	採泥機
<i>Stephanolepis cirrhiifer</i>	1999.6.29	駿河湾	釣り
<i>Dactylometra pacifica</i>	1999.6.30	駿河湾	たもあみ
<i>Glossodoris pallida</i>	1999.10.23	東京都伊豆大島	スキューバダイビング
<i>Dolabella auricularia</i>	1999.10.23	東京都伊豆大島	スキューバダイビング
<i>Chromodoris tinctoria</i>	1999.10.23	東京都伊豆大島	スキューバダイビング
<i>Onchidium verruculatum</i> (B)	1999.10.23	東京都伊豆大島	スキューバダイビング
<i>Omphalius pfeifferi</i>	1999.11.23	千葉県館山市坂田	磯採集
<i>Argus speciosus</i>	1999.11.23	千葉県館山市坂田	磯採集
<i>Elysia ornata</i>	1999.11.28	東京都伊豆三宅島	スキューバダイビング
Unidentified	2000.5.14	静岡県沼津市西浦大瀬	スキューバダイビング
<i>Homoiodoris japonica</i>	2000.5.15	静岡県沼津市西浦大瀬	スキューバダイビング

表 2-2 採集した海洋生物の上位分類群と標準和名

	学 名	標準和名
軟体動物門 MOLLUSCA	<i>Homoiodoris japonica</i> *	ヤマトウミウシ
	<i>Elysia ornata</i> *	コノハミドリガイ
	<i>Argus speciosus</i> *	クモガタウミウシ
	<i>Chromodoris tinctoria</i> *	サラサウミウシ
	<i>Dolabella auricularia</i> *	タツナミガイ
	<i>Glossodoris pallida</i> *	シロタエウミウシ
	<i>Aplysia kurodai</i> *	アメフラシ
	<i>Onchidium verruculatum</i> *	イソアワモチ
	<i>Peronia japonica</i>	ヒザラガイ
	<i>Patelloida saccharina</i>	ウノアシガイ
	<i>Cellana toreuma</i>	ヨメガカサガイ
	<i>Octopus ocellatus</i>	イイダコ
	<i>Omphalius pfeifferi</i>	バテイラ
	<i>Reishia clavigera</i>	イボニシ
魚類 PISCES	<i>Octopus vulgaris</i>	マダコ
	<i>Cypselurus agoo agoo</i>	トビウオ
節足動物門 ARTHROPODA	<i>Stephanolepis cirrifer</i>	カワハギ
	<i>Dardanus arrosor</i>	ヨコスジヤドカリ
	Unidentified	カニの一種（深海より採集）
原索動物 PROTOCHORDATA	Unidentified	ホヤの一種
腔腸動物 COELENTERATA	<i>Dactylometra pacifica</i>	アカクラゲ
	<i>Actinia equina</i>	ウメボシイソギンチャク

*後鰓類

アメフラシ
Aplysia kurodai



東海大学出版会「海洋生物ガイドブック」より

クモガタウミウシ
Argus speciosus



東海大学出版会「海洋生物ガイドブック」より

コノハミドリガイ
Elysia ornata



東海大学出版会「海洋生物ガイドブック」より

図 2-2 本研究で採集したウミウシ写真 1

サラサウミウシ

Chromodoris tinctoria



東海大学出版会「海洋生物ガイドブック」より

シロタエウミウシ

Glossodoris pallida



TBSブリタニカ「ウミウシガイドブック」より

タツナミガイ

Dolabella auricularia



TBSブリタニカ「ウミウシガイドブック」より

図 2-3 本研究で採集したウミウシ写真 2

2-1-2 分離方法及び培養方法

採集した海洋生物は、採集現場または採集後クーラーボックスにて速やかに研究室まで持ち帰り、体表を滅菌した生理食塩水（0.85%）で素早く洗った。滅菌したピンセット、はさみを用いて解剖し、内臓を取り出した。取り出した内臓を滅菌済の乳鉢で磨碎し、内臓量のおよそ 10 倍量の滅菌希釈人工海水（表 2-3）に懸濁し菌液とした。さらに滅菌希釈人工海水を用いて、順次 6 段階まで 10 倍希釈を繰り返し、菌液を調製した。それぞれの希釈段階の菌液 0.1ml ずつを Marine 2216（Difco）（表 2-4）平板培地上に塗抹し、23℃にて 2~10 日間培養した。培地上に認められるようになった独立したコロニーを再度、塗抹法で純化した。分離・培養した細菌の一部については、滅菌した 10%の DMSO（Dimethylsulfoxide）溶液に懸濁して、-80℃にて冷凍保存した。

表 2-3 Marine 2216の組成

Composition per liter	
NaCl	19.45g
Agar	15.0g
MgCl ₂	8.8g
Peptone	5.0g
Na ₂ SO ₃	3.24g
CaCl ₂	1.8g
Yeast extract	1.0g
KCl	0.55g
NaHCO ₃	0.16g
Ferric citrate	0.1g
KBr	0.08g
SrCl ₂	0.03g
H ₃ BO ₃	0.02g
Na ₂ HPO ₄	8.0mg
Na ₂ SiO ₃	4.0mg
NaF	2.4mg
NH ₄ NO ₃	1.6mg
pH7.6±0.2 at 25°C	

表 2-4 人工海水の組成

Composition per liter	
NaCl	27.5g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.38g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.78g
KCl	0.72g
NaHCO ₃	0.2g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.4g

2-1-3 16S rDNA 部分塩基配列の決定

直接塩基配列決定法で行った。

① DNA の調製

DNA の調製は、平石法に従った (1992)。被検菌の対数増殖培養液を用意し、遠心 (12,000rpm 5 分) して上澄を捨てる。菌体のペレットを滅菌水に懸濁して洗浄する。proteinase K (Sigma, 1mg/ml) 溶液、BL buffer* を加えて混和し、60℃のウォーターバスで 20 分間インキュベートする。proteinase を失活させるために、沸騰水に 5 分間つける。室温にもどしてから、遠心分離 (12,000rpm 5 分) をして、上澄を DNA 溶液とした。

BL buffer*

	終濃度
Tris (pH8.0)	40mM
Tween 20	1%
Nonidet P-40 (Boehringer Mannheim)	0.2%
EDTA	0.2mM

② PCR による 16S rDNA の増幅と精製

プライマー 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, the same sequence as positions 8 to 27) [*Escherichia coli* numbering system of Brosius ら. (1978)] と 1510R (5'-GGCTACCTTGTTACGA, complementary to position 1510 to 1495) を用いて、16S rDNA を増幅した。サーマルサイクラーは、TaKaRa PCR Thermal Cycle MP または、HYBAID PCR

Express を使用した。反応液組成（表 2-5）と反応条件（図 2-4）を示した。反応終了後、得られた PCR 産物を TAE1.0%アガロースゲルにて電気泳動し、同時に泳動したサイズマーカーと比較して PCR 産物の大きさが目的のものと一致することを確認した。確認後、PCR 産物を Purification Kit (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)を使用し、そのプロトコールに従って精製した。

表 2-5 PCR 反応液組成

10 × PCR buffer	5 μl
dNTP mix	5 μl
Primer 8F (3 μM)	5 μl
Primer 1510R (3 μM)	5 μl
Template DNA (80 μg / ml)	5 μl
Taq polymerase (SIGMA)	0.3 μl
H ₂ O	24.7 μl
total	50 μl

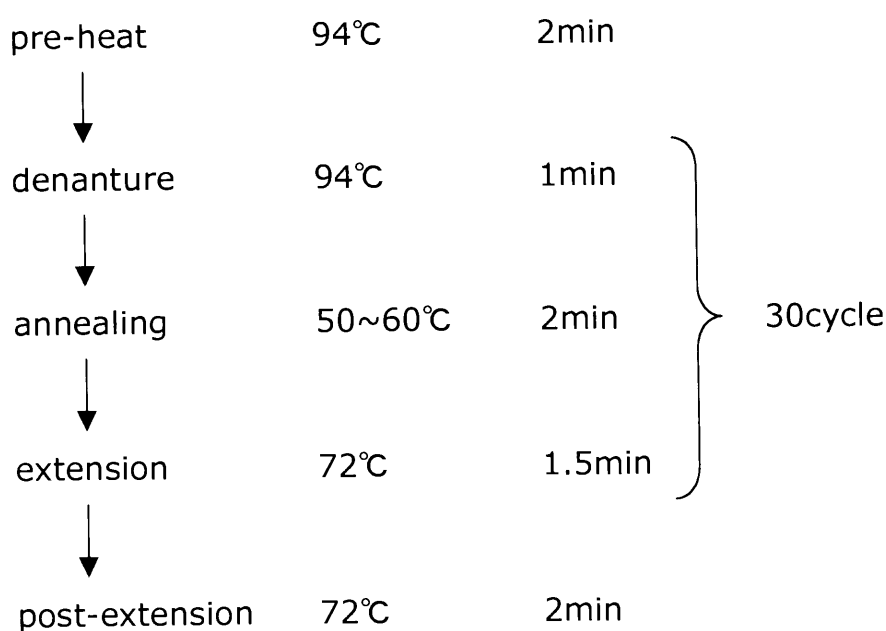


図 2-4 PCR 反応条件

③サイクル・シーケンシング反応（16S rDNA 部分塩基配列）

プライマー 8F と 1510R で増幅させた PCR 産物を鋳型 DNA とし、サイクル・シーケンシング反応液にはプライマー 926F (5'-AAACTCAAATGAATTGACGG, the same sequence as position 907 to 926)を供した。BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (株式会社パーキンエルマージャパン) を用いて反応を行った。サーマルサイクラーは、PCR Thermal Cycle MP (TaKaRa) または、PCR Express (HYBAID) を使用した。反応液組成（表 2-6）と反応条件（図 2-5）を示した。反応終了後、シーケンス反応物を CENTRI-SEP スピンカラム (PRINCETON SEPARATIONS, INC.)を用いそのプロトコールに従って精製、ドライアップした。

表 2-6 Cycle sequencing 反応液組成

Pre-mixture	4.0 μ l	
926F preimer (3 μ M)	0.5 μ l	
Template DNA (100 μ g/ml)	2.0 μ l	(200ng)
H ₂ O	3.5 μ l	
total	10.0 μ l	

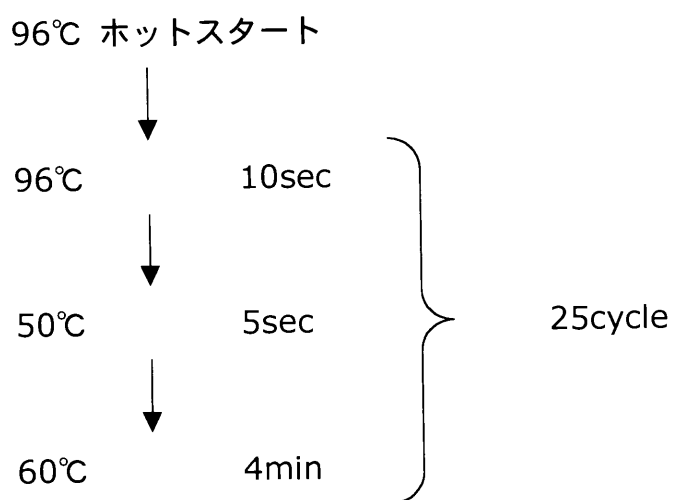


図 2-5 Cycle sequencing 反応条件

④シーケンス反応物の電気泳動と検出

精製し、ドライアップしたシーケンス反応物に 10 μ l の Template Suppression Reagent (株式会社パーキンエルマージャパン) を加え、チ

ューブを指ではじいてよく混合させた。95℃、2 分間加熱し、直後に氷上に
て急冷しサンプルとした。ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (株式会社
パーキンエルマージャパン) を用いて電気泳動と DNA の検出を行い、解析
ソフト Sequence Analysis (株式会社パーキンエルマージャパン)にて自動
解析を行った。電気泳動では、ポリマーは POP6(株式会社パーキンエルマ
ージャパン)、Capillaries は 61cm × 50μm(株式会社パーキンエルマ
ージャパン)を使用した。

⑤配列解析

得られた 16S rDNA 部分塩基配列のデータは、NCBI(National Center
for Biotechnology Information) のデータベースに問い合わせ、相同性検
索プログラム BLAST を用いて検索を実行した。

第 2 節 結果

21 種類の海洋生物から、116 株の細菌を分離した（表 2-7）。分離した細菌の 16S rDNA の後半約 500bp の部分塩基配列による相同性検索に基づいて同定した結果、*Proteobacteria* 74 株、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group 12 株、*Bacillus/Clostridium* group 2 株、*Actinobacteria* 2 株であり、1 株は酵母の *Saccharomycotina* であった（表 2-8）。16S rDNA の既知種との塩基配列相同性が 95%以下であったのは、116 株の分離株のうち 17 株であった。16S rDNA の塩基配列を基に、NJ 法によって作成した系統樹では、分離された 17 株は、*Alteromonas* group (8 株)、*Rhodobacter* group (4 株)、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (5 株)の 3 つの細菌グループにわかれた。

表 2-7 分離株と分離源海洋生物

分離株 No. (MKT)	分離源海洋生物
1,2,3,4,11,12	<i>Acanthopleura japonica</i>
13,14,15	<i>Octopus ocellatus</i>
16,17,18	<i>Patelloida saccharina</i>
19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,32,33,34,35	<i>Octopus vulgaris</i>
36,37,38*,39,49	<i>Onchidium verruculatum</i> †
40,41,42,43,44*,45,46,47,48	<i>Aplysia kurodai</i> †
52,53,54,55,56,57	<i>Dardanus arrosor</i>
66,67	<i>Reishia clavigera</i>
58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,71,72	<i>Cellana toreuma</i>
73,77	<i>Cypselurus agoo agoo</i>
74	Unidentified
75,76	<i>Stephanolepis cirrhifer</i>
78,79,80,81,82*,83,96,97,101,102,103,104,105	<i>Onchidium deamelli</i> †
84*,95*	<i>Glossodoris pallida</i> †
85,86*,87*,88,89*,90,91,92*,98,99,100	<i>Dolabella auricularia</i> †
93*,94*	<i>Chromodoris tinctoria</i> †
106*,107*,108	<i>Omphalius pfeifferi</i>
109*	<i>Argus speciosus</i> †
110*	<i>Elysia ornata</i> †
111*,112*,113,114,15	Unidentified
116	<i>Homoiodoris japonica</i> †

* Similarity value of the16S rDNA partial sequence was less than 94%

† 後鰓類

表 2-7 分離株と分離源海洋生物

分離株 No. (MKT)	分離源海洋生物
1,2,3,4,11,12	<i>Acanthopleura japonica</i>
13,14,15	<i>Octopus ocellatus</i>
16,17,18	<i>Patelloida saccharina</i>
19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,32,33,34,35	<i>Octopus vulgaris</i>
36,37,38*,39,49	<i>Onchidium verruculatum</i> †
40,41,42,43,44*,45,46,47,48	<i>Aplysia kurodai</i> †
52,53,54,55,56,57	<i>Dardanus arrosor</i>
66,67	<i>Reishia clavigera</i>
58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,71,72	<i>Cellana toreuma</i>
73,77	<i>Cypselurus agoo agoo</i>
74	Unidentified
75,76	<i>Stephanolepis cirrhifer</i>
78,79,80,81,82*,83,96,97,101,102,103,104,105	<i>Onchidium deamelli</i> †
84*,95*	<i>Glossodoris pallida</i> †
85,86*,87*,88,89*,90,91,92*,98,99,100	<i>Dolabella auricularia</i> †
93*,94*	<i>Chromodoris tinctoria</i> †
106*,107*,108	<i>Omphalius pfeifferi</i>
109*	<i>Argus speciosus</i> †
110*	<i>Elysia ornata</i> †
111*,112*,113,114,15	Unidentified
116	<i>Homoiodoris japonica</i> †

* Similarity value of the16S rDNA partial sequence was less than 94%

† 後鰓類

第3節 考察

分離した株の 16S rDNA 部分塩基配列による BLAST 検索の結果を表 2-9 に、まとめた結果を表 2-8 と図 2-6 に示した。分離菌株の 30～40% を *Vibrio* 属が占めた。本研究で用いた分離用培地 Marine 2216 は、海洋細菌の分離に一般的に用いられており、特定の性質を持つ細菌の選択用培地ではないが、それでもこの培地により分離菌株が選択的に分離されてくることは避けられない。しかし、そのことを考慮しても尚、海水中から分離される細菌に比較して、海洋生物から分離される細菌には、*Vibrio* 属の割合が高いことが明らかとなった。

16S rDNA 部分塩基配列による相同性検索の結果、116 株の分離株のうち 17 株もが、既知種との相同性が 95%以下であり、新規性が高い株（新属となる可能性がある）であった。また、その 17 株の内訳も、 α -*Proteobacteria* 4 株、 γ -*Proteobacteria* 8 株、CFB(*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) グループ 5 株と多様性が認められた。以上のことは、我々の当初の予想を遥かに上回る結果であり、海洋生物の内臓における細菌の種多様性が明らかとなった。

次に、分離した細菌と分離源海洋生物との関連について考察する。本研究では、海洋生物の内臓から細菌を分離したが、その由来は、海水、底泥、餌などが考えられる。細菌と分離源海洋生物との関係については、ひとつには、たまたま海洋生物体内にそれらの細菌が侵入してきたに過ぎず、なんらの相互作用もない場合と、外部環境に由来した細菌が海洋生物の内臓環境に適応し、生理学的な相互作用を通して、体内で増殖している場合とが推察できる。本研究で分離した細菌は、そのいずれの場合もあり得るが、表に示したとおり、軟体動物の後鰓類から、新規性の高い細菌株が高率で分離された

ことは、細菌と分離源海洋生物との間になんらかの相互作用が存在し、生物濃縮がおきていることが示唆される。後鰓類の移動能力は極めて低く、その食性は、藻類食性のものと、カイメン、コケムシ、群体ボヤ、サンゴ、ヒドロ虫など固着性生物を餌とする肉食性の種がいるが、いずれのタイプにおいてもその餌のスペクトルは極めて狭い。コアラがユーカリの葉だけを摂餌するように、餌に対する競争力の弱い生物は、その生き残りのために、他の生物が消化することのできない餌だけを専門的に食べることは、一般に知られている。そしてコアラでも研究されているように、消化器官にある種の細菌を共生させることにより、他の生物が消化できない餌を消化している例も多数知られている。したがって、後鰓類の食性に細菌が関わっている可能性は十分に考えられる。また、後鰓類の生体防御についても、細菌の関連を推察することができる。後鰓類は、簡単に表現するなら、「貝殻を捨てた貝」である。その後鰓類の、貝殻に替わる生体防御機構として、化学防御物質を生産することが知られている。その化学防御物質は、後鰓類自身で生合成するものや、餌が元来もっていた化学防御物質をそのまま利用するもの、餌由来の化学防御物質に化学修飾を加えて利用しているものが知られている。一方、テトロドトキシンやシガトキシンで広く認知されているように、海産生物が有する毒性物質を、微生物が生産している場合もある。したがって、後鰓類の生体防御に細菌が作用を及ぼしていることも容易に推察される。

予備実験として扱った、後鰓類以外の分離源生物と細菌について気付いた点を述べる。本研究では、軟体動物の他にも、PISCES 魚類、ARTHROPODA 節足動物、PROTOCHORDATA 原索動物、COELENTERATA 腔腸動物、ECHINODERMATA 棘皮動物、各 1~2 種類から細菌分離の予備実験を試みた。その結果、腔腸動物以外の海洋生物種からは、少なくとも 10^6 /g（内臓

湿重量)の細菌が分離された。一方、腔腸動物の *Actinia equina* (ウメボシイソギンチャク)、*Haliplanella lineata* (タテジマイソギンチャク)、*Anthopleura japonica* (ヨロイイソギンチャク)、*Dactylometra pacifica* (アカクラゲ) の 4 種類の腔腸動物を生体ごと(腸がないため)ホモジネートし、細菌の分離を試みたところ、いずれの種においても Marine 2216 寒天培地上に細菌の増殖は全く認められなかった。これらの生物種はいずれも刺胞細胞を有しており、刺胞細胞に含有されている毒液が抗菌物質として作用したことも推察された。また軟体動物 *Cephalopoda* (頭足類) の *Octopus ocellatus* (イイダコ) から、酵母の *Debaryomyces hansenii* の近縁株が優占的に分離された。*Octopus vulgaris* (マダコ)、*Paroctopus dofleini* (ミズダコ)からは、分離されてこなかったことから、*Debaryomyces hansenii* 近縁株と *Octopus ocellatus* (イイダコ)との生理、生態学的な関係が示唆された。

表 2-9 16S rDNA 部分塩基配列によるBLAST検索の結果

MKT No.	比較塩基数 (bp)	近縁既知種	相同性値(%)	所属する上位分類群
1	434	<i>Cytophaga diffluens</i>	97	CFB group
2	428	<i>Vibrio rumoence</i>	97	γ - Proteobacteria
3	464	<i>Vibrio mediterranei</i>	99	γ - Proteobacteria
4	456	<i>Shewanella colwelliana</i>	96	γ - Proteobacteria
12	439	<i>Methylobacterium rhodesian</i>	97	α - Proteobacteria
13	393	<i>Vibrio mediterranei</i>	99	γ - Proteobacteria
14	351	<i>Debaryomyces hansenii</i>	95	Saccharomycotina
15	332	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
16	308	<i>Vibrio splendidus</i>	100	γ - Proteobacteria
17	1441	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	98	CFB group
18	1439	<i>Polaribacter franzmannii</i>	96	CFB group
22	426	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	99	γ - Proteobacteria
23	409	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
24	411	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	98	γ - Proteobacteria
25	437	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
26	338	<i>Hyphomicrobium indicum</i>	99	γ - Proteobacteria
27	395	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
28	410	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	98	γ - Proteobacteria
32	409	<i>Enterococcus seriolicida</i>	98	Bacillus/Clostridium group
33	407	<i>Vibrio fisheri</i>	99	γ - Proteobacteria
34	389	<i>Enterococcus seriolicida</i>	98	Bacillus/Clostridium group
37	481	<i>Shewanella colwelliana</i>	97	γ - Proteobacteria
39	485	<i>Cellulophaga lytica</i>	99	CFB group
40	530	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
41	535	<i>Pseudoalteromonas gracilicola</i>	99	γ - Proteobacteria
42	541	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
43	527	<i>Vibrio lentus</i>	97	γ - Proteobacteria
45	519	<i>Shewanella colwelliana</i>	98	γ - Proteobacteria
46	493	<i>Polaribacter franzmannii</i>	98	CFB group
47	1438	<i>Tenacibaculum ovolyticus</i>	96	CFB group
48	482	<i>Vibrio lentus</i>	99	γ - Proteobacteria
49	536	<i>Shewanella colwelliana</i>	98	γ - Proteobacteria
52	528	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
53	511	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	99	γ - Proteobacteria
54	531	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	99	γ - Proteobacteria
55	461	<i>Vibrio splendidus</i>	98	γ - Proteobacteria
56	528	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
57	319	<i>Vibrio wodanis</i>	98	γ - Proteobacteria
58	530	<i>Vibrio wodanis</i>	99	γ - Proteobacteria
59	530	<i>Cytophaga diffluens</i>	98	CFB group
60	521	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
61	525	<i>Vibrio tapetis</i>	99	γ - Proteobacteria
62	517	<i>Vibrio wodanis</i>	99	γ - Proteobacteria
63	523	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	100	γ - Proteobacteria
64	515	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
65	451	<i>Vibrio tapetis</i>	98	γ - Proteobacteria
66	507	<i>Vibrio lentus</i>	97	γ - Proteobacteria
67	447	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria
68	460	<i>Vibrio fisheri</i>	98	γ - Proteobacteria
69	462	<i>Vibrio splendidus</i>	97	γ - Proteobacteria

MKT No.	比較塩基数 (bp)	近縁既知種	相同性値 (%)	所属する上位分類群
70	515	<i>Vibrio scopthalmi</i>	98	γ - Proteobacteria
71	517	<i>Vibrio splendidus</i>	97	γ - Proteobacteria
72	515	<i>Vibrio scopthalmi</i>	98	γ - Proteobacteria
73	524	<i>Mycobacterium frederiks</i>	99	Actinobacteria
74	469	<i>Vibrio tapetis</i>	99	γ - Proteobacteria
75	535	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	98	Actinobacteria
76	543	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99	α - Proteobacteria
77	518	<i>Vibrio campbellii</i>	99	γ - Proteobacteria
78	529	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	98	γ - Proteobacteria
79	519	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	98	γ - Proteobacteria
81	537	<i>Vibrio harveyi</i> strain	99	γ - Proteobacteria
83	529	<i>Vibrio harveyi</i> strain	99	γ - Proteobacteria
85	526	<i>Vibrio shiloi</i>	99	γ - Proteobacteria
96	524	<i>Vibrio harveyi</i>	100	γ - Proteobacteria
98	528	<i>Vibrio harveyi</i>	98	γ - Proteobacteria
101	506	<i>Vibrio harveyi</i>	99	γ - Proteobacteria
103	526	<i>Vibrio harveyi</i>	99	γ - Proteobacteria
104	520	<i>Vibrio harveyi</i>	99	γ - Proteobacteria
105	529	<i>Vibrio harveyi</i>	99	γ - Proteobacteria
108	507	<i>Shewanella colwelliana</i>	97	γ - Proteobacteria
113	522	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	99	γ - Proteobacteria
114	523	<i>Vibrio splendidus</i>	96	γ - Proteobacteria
115	520	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	99	γ - Proteobacteria
116	516	<i>Vibrio aestuarianus</i>	99	γ - Proteobacteria

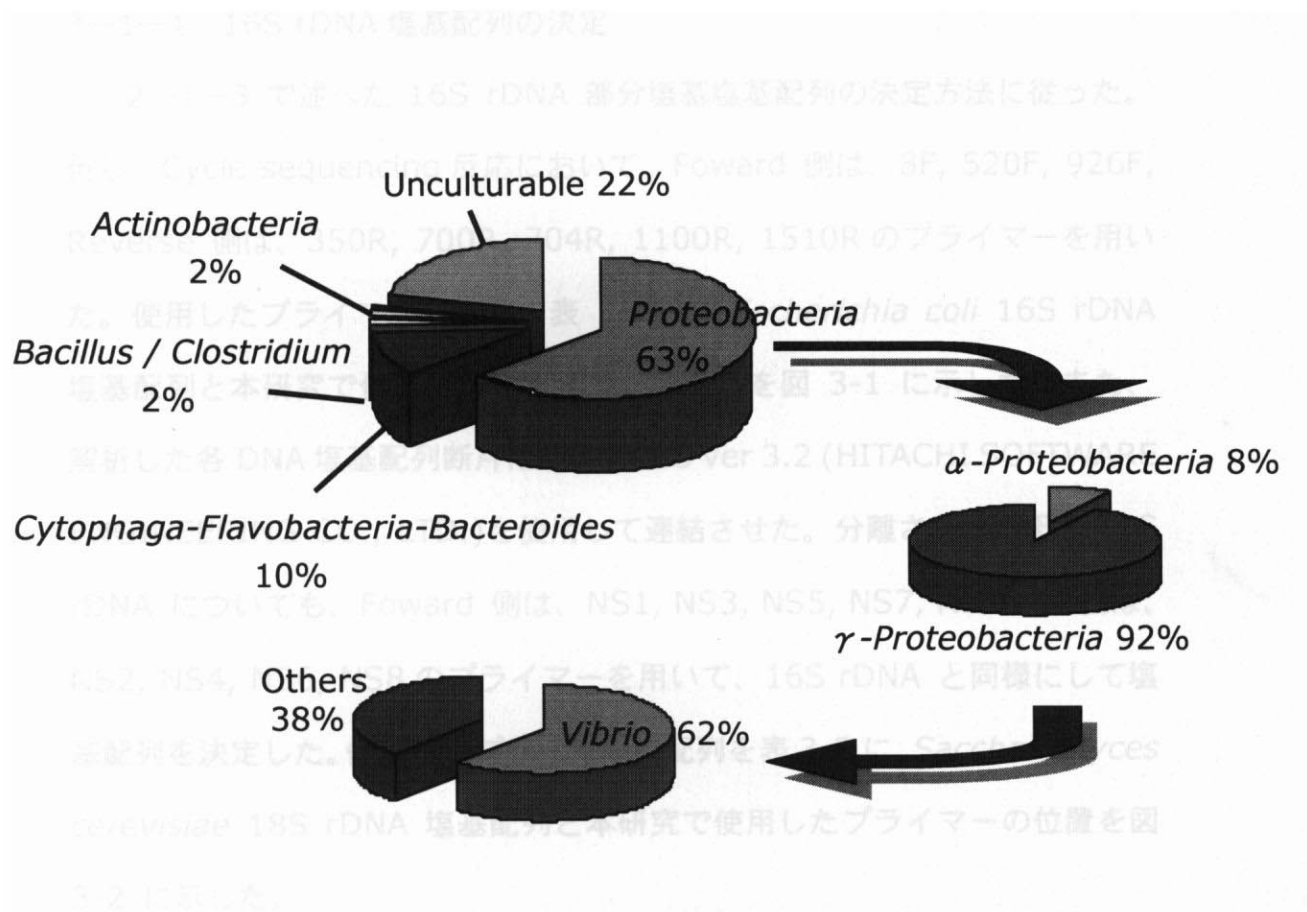


図 2-6 分離株の内訳

第3章 16S rDNA による新規性の高い分離株の分類学的評価

第1節 方法

3-1-1 16S rDNA 塩基配列の決定

2-1-3 で述べた 16S rDNA 部分塩基塩基配列の決定方法に従った。但し、Cycle sequencing 反応において、Forward 側は、8F, 520F, 926F, Reverse 側は、350R, 700R, 704R, 1100R, 1510R のプライマーを用いた。使用したプライマーの配列を表 3-1 に、*Escherichia coli* 16S rDNA 塩基配列と本研究で使したプライマーの位置を図 3-1 に示した。また、解析した各 DNA 塩基配列断片は、DNASIS ver 3.2 (HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD.)を使用して連結させた。分離された酵母の 18S rDNA についても、Forward 側は、NS1, NS3, NS5, NS7, Reverse 側は、NS2, NS4, NS6, NS8 のプライマーを用いて、16S rDNA と同様にして塩基配列を決定した。使用したプライマーの配列を表 3-2 に、*Saccharomyces cerevisiae* 18S rDNA 塩基配列と本研究で使したプライマーの位置を図 3-2 に示した。

表 3-1 16S rDNA のPCR増幅に使用したプライマー

				プライマー長 (mer)	G+C (%)
Forward					
8F	5'	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	3'	20	50.0
10F	5'	AGT TTG ATC CTG GCT C	3'	16	50.0
20F	5'	GAT TTT GAT CCT GGC TCA	3'	18	44.4
520F	5'	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	3'	18	61.1
926F	5'	AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG	3'	20	40.0
1400F	5'	TGT ACA CAC CGC CCG	3'	15	66.7
Reverse					
350R	5'	CTG CTG CCT CCC GTA	3'	15	66.7
5r0R	5'	GTA TTA CCG CGG CTG CTG	3'	18	61.1
700R	5'	TCT ACG CAT TTC ACC GCT AC	3'	20	50.0
704R	5'	TCT ACG CAT TTC ACC	3'	15	46.7
800R	5'	CTA CCA GGG TAT CTA ATC	3'	18	44.4
920R	5'	CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT	3'	20	35.0
1100R	5'	GGG TTG CGC TCG TTG	3'	15	66.7
1110R	5'	AGG GTT GCG CTC GTT G	3'	16	62.5
1240R	5'	CAT TGT AGC ACG TGT GTA	3'	18	44.4
1400R	5'	CGG TGT GTA CAA GGC CC	3'	17	64.7
1510R	5'	GGC TAC CTT GTT ACG A	3'	16	50.0

表 3-2 18S rDNA のPCR増幅に使用したプライマー

				プライマー長 (mer)	G+C (%)
Forward					
NS1	5'	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	3'	19	42.1
NS3	5'	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC	3'	21	66.7
NS5	5'	AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G	3'	22	36.4
NS7	5'	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC	3'	24	50.0
Reverse					
NS2	5'	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	3'	21	66.7
NS4	5'	CTT CCG CAA TTC CTT TAA GTT	3'	21	38.1
NS6	5'	GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC	3'	24	50.0
NS8	5'	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	3'	20	60.0

図 3-1 16S rDNA 増幅 に用いたプライマー位置

10	20	30	40	50	60
aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa					
8F					
70	80	90	100	110	120
gtcgaacggt aacaggaagc agcttgctgc tttgctgacg agtggcggac gggtagta					
130	140	150	160	170	180
tgtctgggaa actgcctgat ggagggggat aactactgga aacggtagct aataccgcat					
190	200	210	220	230	240
aacgtcgcaa gcacaaagag ggggacctta gggcctcttg ccatcgcatg tgcccagatg					
250	260	270	280	290	300
ggattagcta gtaggtgggg taacgggtca cctaggcgac gatccctagc tggctctgaga					
310	320	330	340	350	360
ggatgaccag caacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg					
370	380	390	400	410	420
ggaatattgc acaatgggag caagcctgat gcagccatgc ngcgtgtatg aagaaggcct					
430	440	450	460	470	480
tcgggttgta aagtactttc agcggggagg aaggaggtaa agttaatacc tttgctcatt					
490	500	510	520	530	540
gacgttacc gcagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccggc taatacggag					
520F					
550	560	570	580	590	600
ggtgcaagcg ttaatcgga ttactgggag taaagcgac gcaggcggtt tgtaagtca					
610	620	630	640	650	660
gatgtgaaat cccggggctc aacctgggaa ctgcatctga tactggcaag cttgagtctc					
670	680	690	700	710	720
gtagaggggg gtagaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc					
700R					
730	740	750	760	770	780
ggtggcgaag gcggccccct ggacgaagac tgacgctcag gtgcgaaagc gtggggagca					
790	800	810	820	830	840
aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaagcat gtcgacttgg aggttgtgcc					

850	860	870	880	890	900
cttgaggcgt	ggcttccgga	nntaacgcgt	taagtcgacc	gcctggggag	tacggccgca
910	920	930	940	950	960
aggtt	aaac tcaaatgaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggtggagcat	gtggtttaat
	926F				
970	980	990	1000	1010	1020
tcgatgcaac	gcgaagaacc	ttacctggtc	ttgacatcca	cggaagtttt	cagagatgag
1030	1040	1050	1060	1070	1080
aatgtgcctt	cgggaaccgt	gagacaggtg	ctgcatggct	gtcgtcagct	cgtgttgtga
1090	1100	1110	1120	1130	1140
aatgttgggt	taagtccgc	aacgagcgca	acccttatcc	tttgttgcca	gcggtccggc
		1100R			
1150	1160	1170	1180	1190	1200
cgggaactca	aaggagactg	ccagtgataa	actggaggaa	ggtggggatg	acgtcaagtc
1210	1220	1230	1240	1250	1260
atcatggccc	ttacgaccag	ggctacacac	gtgctacaat	ggcgcataca	aagagaagcg
1270	1280	1290	1300	1310	1320
acctcgcgag	agcaagcgga	cctcataaag	tgcgtcgtag	tccggattgg	agtctgcaac
1330	1340	1350	1360	1370	1380
tcgactccat	gaagtcggaa	tcgctagtaa	tcgtggatca	gaatgccacg	gtgaatacgt
1390	1400	1410	1420	1430	1440
tcccgggcct	tgtacacacc	gcccgtcaca	ccatgggagt	gggttgcaaa	agaagtaggt
1450	1460	1470	1480	1490	1500
agcttaacct	tcgggagggc	gcttaccact	ttgtgattca	tgactgggggt	gaagt
					tcgtaa
1510	1520	1530	1540	1550	1560
caaggt	aaacc	gtaggggaac
1510R					

図 3-2 18S rDNA 増幅 に用いたプライマー位置

10	20	30	40	50	60
tatctggttg	atcctgccag	tagtcatatg	cttgtctc	aa	agattaagcc
			NS1		atgcatgtct
70	80	90	100	110	120
aagtataagc	aatttataca	gtgaaactgc	gaatggctca	ttaaatacgt	tatcgtttat
130	140	150	160	170	180
ttgatagttc	ctttactaca	tgttataacc	gtggtaattc	tagagcta	aatcatgcttaa
190	200	210	220	230	240
aatctcgacc	ctttggaaga	gatgtattta	ttagataaaa	aatcaatgtc	ttcggactct
250	260	270	280	290	300
ttgatgattc	ataataactt	ttcgaatcgc	atggccttgt	gctggcgatg	gttcattcaa
310	320	330	340	350	360
atttctgccc	tatcaacttt	cgatggtagg	atagtggcct	accatggttt	caacgggtaa
370	380	390	400	410	420
cggggaataa	gggttcgatt	ccggagaggg	agcctgagaa	acggctacca	catccaagga
430	440	450	460	470	480
aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatcct	aattcaggga	ggtagtgaca	ataaataacg
490	500	510	520	530	540
atacagggcc	cattcgggtc	ttgtaattgg	aatgagtaca	atgtaaatac	cttaacgagg
550	560	570	580	590	600
aacaattgga	gggcaagtct	ggtgccagca	gccgcggtaa	ttccagctcc	aatagcggtat
	NS2		NS3		
610	620	630	640	650	660
attaaagttg	ttgcagttaa	aaagctcgta	gttgaacttt	gggcccggtt	ggccgggtccg
670	680	690	700	710	720
atTTTTTtctg	gtactggatt	tccaacgggg	cctttccttc	tggctaacct	tgagtccttg
730	740	750	760	770	780
tggctcttgg	cgaaccagga	cttttacttt	gaaaaaatta	gagtgttcaa	agcaggcgta
790	800	810	820	830	840
ttgctcgaat	atattagcat	ggaataatag	aataggacgt	ttggttctat	tttgttggtt
850	860	870	880	890	900
tctaggacca	tcgtaatgat	taataggac	ggtcgggggc	atcggtattc	aattgtcgag

910	920	930	940	950	960
gtgaaattct	tggatttatt	gaagactaac	tactgcgaaa	gcatttgcca	aggacgtttt
970	980	990	1000	1010	1020
cattaatcaa	gaacgaaagt	taggggatcg	aagatgatct	ggtaccgtcg	tagtcttaac
1030	1040	1050	1060	1070	1080
cataaactat	gccgactaga	tcgggtggtg	tttttttaat	gacccactcg	gtaccttacg
1090	1100	1110	1120	1130	1140
agaaatcaaa	gtctttgggt	tctgggggga	gtatggtcgc	aaggctgaaa	ctta aaggaa
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ttgacggaag	ggcaccacta	ggagtggagc	ctgcggctaa	tttgactcaa	cacggggaaa
NS4					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ctcaccaggt	ccagacacaa	taaggattga	cagattgaga	gctctttctt	gattttgtgg
1270	1280	1290	1300	1310	1320
gtggtggtgc	atggccgttt	ctcagttggt	ggagtgattt	gtctgcttaa	ttgcgataac
1330	1340	1350	1360	1370	1380
gaacgagacc	ttaacctact	aaatagtgg	gctagcattt	gctggttatc	cacttcttag
1390	1400	1410	1420	1430	1440
agggactatc	ggtttcaagc	cgatggaagt	ttgaggcaat	aacaggctctg	tgatgccctt
			NS6		NS7
1450	1460	1470	1480	1490	1500
agaacgttct	gggccgcacg	cgcgctacac	tgacggagcc	agcgagtcta	accttggccg
1510	1520	1530	1540	1550	1560
agaggtcttg	gtaatcttgt	gaaactccgt	cgtgctgggg	atagagcatt	gtaattattg
1570	1580	1590	1600	1610	1620
ctcttcaacg	aggaattcct	agtaagcgca	agtcacacgc	ttgcgttgat	tacgtccctg
1630	1640	1650	1660	1670	1680
ccctttgtac	acaccgcccg	tcgctagtac	cgattgaatg	gcttagtgag	gcctcaggat
1690	1700	1710	1720	1730	1740
ctgcttagag	aagggggcaa	ctccatctca	gagcggagaa	tttggacaaa	cttggtcatt
1750	1760	1770	1780	1790	1800
tagaggaact	aaaagtcgta	acaaggtt	tc cgtaggtgaa	cctgcggaag	gatcatta..
		NS8			

3-1-2 系統樹の作成

本研究で得られた 16S rDNA 部分塩基配列データの相同性検索の結果、既知種との相同性が 95%以下であった分離株 17 株について、16S rDNA 塩基配列データを DNA データベースにて比較検索し、近縁既知種の 16S rDNA 塩基配列のデータを入手した。多重アライメントと系統樹の作成は、CLUSTAL W ver. 1.8 (Thompson ら, 1994) を用いて行った。CLUSTAL W は、進化距離の計算には、Knuc values (Kimura, 1980) を使用し、また、系統樹作成には距離行列法のひとつである近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) を、また系統樹の信頼性の統計学的評価法としては、ブーツ・ストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いている。本研究では、ブーツ・ストラップ法の無作為抽出を 1000 回行った。

3-1-3 Distance matrix の作成

得られた系統樹を基に、distance を比較すべき既知種を選定し、必要な 16S rDNA 塩基配列データを DNA データベースより入手した。CLUSTAL W ver. 1.8 (Thompson ら, 1994) にて多重アライメントを行った後、Se-AI ver.1 (andrew.rambaut.@zoo.ox.ac.uk) を用いて DNA サイズをそろえ、PAUP ver.4.0 (Sinauer Associates, Inc. Publishers) を使用して、Distance matrix を作成した。

第2節 結果

3-2-1 *Alteromonas* group

MKT92 : BLAST による相同性検索の結果、MKT92 は *Proteobacteria* の gamma subclass に属し、*Thalassomonas* との 16S rDNA の相同性は 94%であった。近縁株との 1438bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果、*Thalassomonas viridans*^T(AJ294748)と最も高い相同性値、95.0%を示した(表 3-3)。また、系統樹においては(図 3-3)、*Thalassomonas* 属、*Colwellia* 属と単系統群を形成し、この単系統群は、100%のブーツストラップ値で支持された。MKT92 の電子顕微鏡写真を図 3-4, 3-5 に示した。

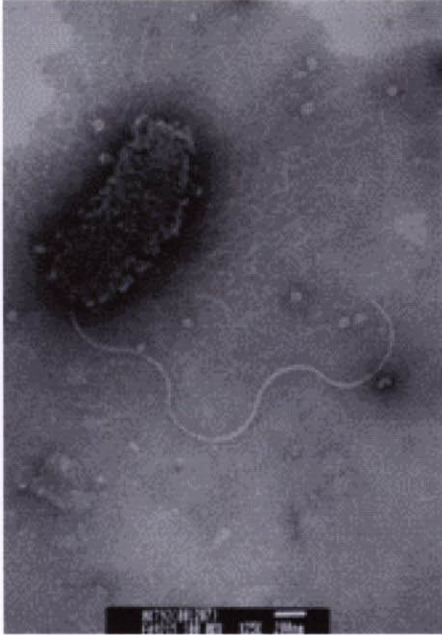


図 3-4 MKT92の電顕写真。
25000倍。
スケールバーは、200nm。
鞭毛が認められる。

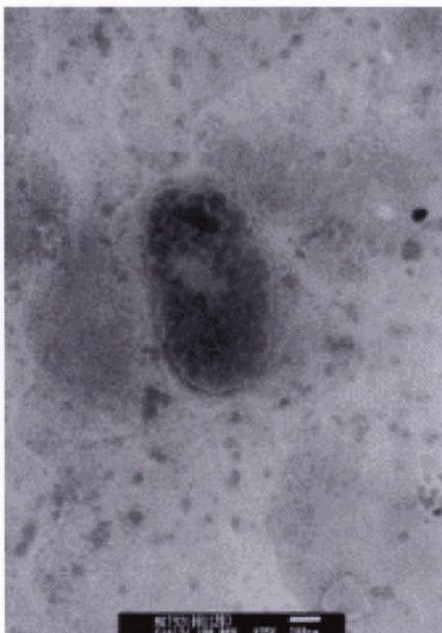


図 3-5 MKT92の電顕写真。
25000倍。
スケールバーは、200nm。
細胞内に顆粒が認められる。

MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 : BLAST の相同性検索の結果、この 6 株は *Proteobacteria* の gamma subclass に属し、*Thalassomonas*, *Glaciecola*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* との 16S rDNA の相同性は、89~91%であった。近縁株との 1381bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果、*Alteromonas macleodii*(Y18228)と最も高い相同性値、90.8%を示した(表 3-4)。系統樹上でも、*Glaciecola*, *Alteromonas* と単系統群を形成した(図 3-3)。また、この 6 株はまとめて単系統群を形成し、100%のブーツストラップ値で支持された。この 6 株は、異種または同種の別個体の海洋生物から分離されたにもかかわらず、非常に高い相同性を示した。

MKT110 : BLAST の相同性検索の結果、MKT110 は、*Proteobacteria* の gamma subclass に属し、*Pseudomonas andersonii* と 90%, *Marinobacter* 属と 89%の相同値を示した。近縁株との 1350bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果、*Pseudomonas andersonii*(AF291818)と最も高い相同性値、90.2%を示した(表 3-5)。系統樹では、*Pseudomonas* 属、*Marinobacter* 属とクラスターを形成した(図 3-3)。

NJ method

1157 bp
0.01 K nuc
└───┘

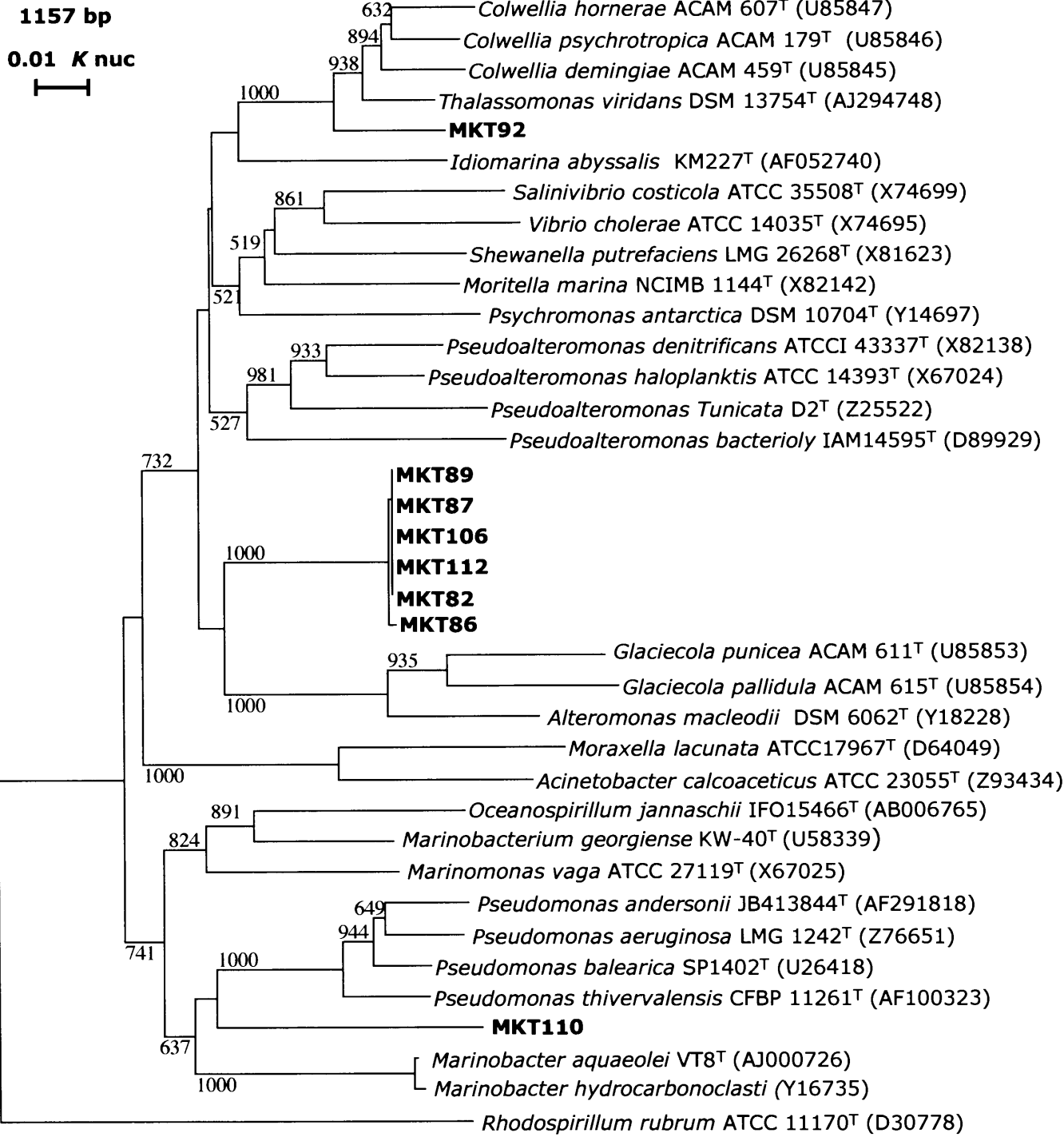


図 3-3 *Alteromonas* group 系統樹

表 3-3 MKT92 Distance matrix

		% Similarity									
strain											
		MKT92									
MKT92		100.0									
<i>Thalassomonas viridans</i> ^T (AJ294748)		95.0									
<i>Idiomarina abyssalis</i> ^T (AF052740)		90.6	90.7								
<i>Idiomarina zobelii</i> ^T (AF052741)		90.7	90.7	96.9							
<i>Colwellia rossensis</i> ^T (U14581)		93.6	94.0	89.8	89.8						
<i>Colwellia maris</i> ^T (AB002630)		94.3	94.5	90.2	90.2	98.1					
<i>Colwellia psychrotropica</i> ^T (U85846)		93.8	94.6	89.8	89.8	97.1	97.2				
<i>Colwellia psychroerythraea</i> ^T (AF001375)		93.8	95.1	90.6	90.7	97.6	97.7	98.6			
<i>Colwellia hornerae</i> ^T (U85847)		93.7	94.4	89.7	89.9	96.3	97.0	96.0	96.6		
<i>Colwellia demingiae</i> ^T (U85845)		93.6	95.0	90.1	90.2	96.3	96.8	96.5	97.3	95.6	100.0

表 3-4 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 Distance matrix

		% Similarity					
strain		MKT82	MKT86	MKT87	MKT89	MKT106	MKT112
MKT82		100.0					
MKT86		99.4					
MKT87		99.8	99.6				
MKT89		99.9	99.3	99.9			
MKT106		99.9	99.4	99.9	99.8		
MKT112		99.4	100.0	99.6	99.3	99.4	
<i>Glaciecola punicea</i> ^T (U85853)		87.8	88.0	87.6	87.6	87.5	87.8
<i>Glaciecola pallidula</i> ^T (U85854)		89.0	89.0	89.3	89.1	89.0	88.8
<i>Alteromonas macleodii</i> ^T (Y18228)		90.8	90.6	90.8	90.7	90.8	90.5
							91.1
							93.0
							100.0
	<i>Glaciecola punicea</i> ^T (U85853)						
	<i>Glaciecola pallidula</i> ^T (U85854)						
	<i>Alteromonas macleodii</i> ^T (Y18228)						

表 3-5 MKT110 Distance matrix

		% Similarity									
strain											
MKT110		100.0									
Marinobacter aquaeolei ^T (AJ000726)		89.4									
Marinobacter hydrocarbonocla ^T (AB021372)		89.4	100.0								
Marinomonas vaga ^T (X67025)		89.1	89.2	89.2							
Marinobacterium georgiense ^T (U58339)		87.9	89.6	89.6	91.5						
Oceanospirillum jannaschii ^T (AB006765)		88.4	88.5	88.5	90.5	92.5					
Pseudomonas balearica ^T (U26418)		90.1	91.0	91.0	89.5	90.3	88.9				
Pseudomonas andersonii ^T (AF291818)		90.2	89.7	89.7	87.8	89.9	89.4	96.4			
Pseudomonas thivervalensis ^T (AF100323)		89.3	91.1	91.1	89.6	90.5	88.8	96.2	95.2		
Pseudomonas aeruginosa ^T (Z76651)		90.1	89.7	89.7	89.2	90.8	89.2	96.8	95.8	95.5	100.0

3—2—2 *Rhodobacter* group

MKT107 : BLAST の相同性検索の結果、MKT107 は *Proteobacteria* の alpha subclass に属し、相同性は [*Ruegeria*] *gelatinovorans*, *Sulfitobacter mediterraneus*, *Sulfitobacter pontiacus* のいずれとも 94% であった。近縁株との 1371bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Silicibacter lacuscaerulens*^T(U77644)と最も高い相同性値、95.6%を示し、 [*Ruegeria*] *gelatinovorans*^T(D88523) (93.8%), *Sulfitobacter mediterraneus*^T(Y17387) (95.0%), *Sulfitobacter pontiacus*^T (Y13155) (94.7%), *Antarctobacter heliothermus*^T (Y11552) (94.7%), *Sagittula stellata*^T (U58356) (94.1%)であった (表 3-6)。また、系統樹においては、*Antarctobacter* 属、*Sagittula* 属と単系統群を形成した (図 3-6)。

MKT95 : BLAST の相同性検索の結果、MKT95 は *Proteobacteria* の alpha subclass に属し、相同性は [*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *atlantica* のいずれとも 96%であった。近縁株との 1371bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Roseobacter litoralis*^T(X78312)と最も高い相同性値、96.9%を示し、*Roseobacter gallaeciensis*^T(Y13244) (95.9%)、*Ruegeria atlantica*^T(D88527) (93.9%)、*Ruegeria algicola*^T(X78315) (95.9%)であった (表 3-6)。系統樹上では、 [*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *algicola* と単系統群を形成した (図 3-6)。

MKT84, MKT94 : この 2 株は、異種の海洋生物から分離されたにもかかわらず、2 株間の 16S rDNA の相同性は 100% であった。BLAST の相同性検索の結果、MKT84, 94 は *Proteobacteria* の alpha subclass に属し、相同性は [*Stappia*] *stellulatum* と [*Roseibium*] *denhamense* のいずれとも 94%であった。近縁株との 1337bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した

結果は、*Stappia agregata*^T(D88520)と最も高い相同性値、94.7%を示し、
[*Stappia*] *stellulata*^T(D88525) (92.3%) 、 [*Roseibium*]
denhamense^T(D85832) (93.4%)であった（表 3-7）。 系統樹上も、
Stappia 属と単系統群を形成した（図 3-6）。

NJ method

1146 bp

0.02 K nuc

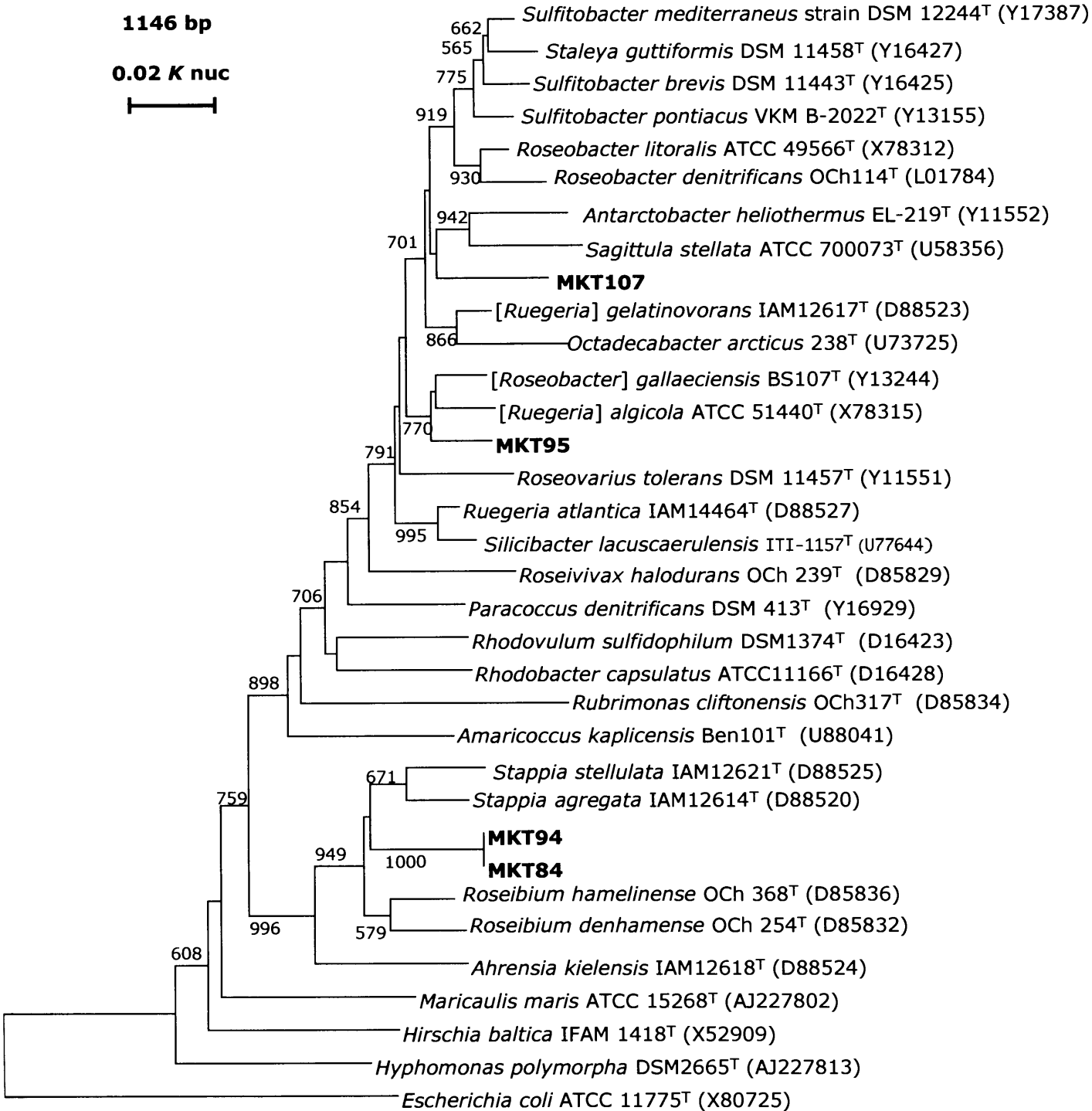
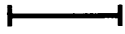


図 3-6 *Rhodobacter* group 系統樹

表 3-7 MKT84, 94 Distance matrix

		% Similarity						
strain		MKT84	MKT94	<i>Stappia aggregata</i> ^T (D88520)	<i>[Stappia] stellulata</i> ^T (D88525)	<i>Roseibium hamelinense</i> ^T (D85836)	<i>[Roseibium] denhamense</i> ^T (D85832)	<i>Ahrensia kielensis</i> ^T (D88524)
	MKT84	100.0						
	MKT94	100.0						
	<i>Stappia aggregata</i> ^T (D88520)	94.7	94.7					
	<i>[Stappia] stellulata</i> ^T (D88525)	92.3	92.3	94.8				
	<i>Roseibium hamelinense</i> ^T (D85836)	94.2	94.2	96.7	93.2			
	<i>[Roseibium] denhamense</i> ^T (D85832)	93.4	93.4	95.9	92.1	97.2		
	<i>Ahrensia kielensis</i> ^T (D88524)	91.0	91.0	90.9	91.2	91.1	90.4	100.0

3—2—3 *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group

MKT38 : BLAST の相同性検索の結果、MKT38 は CFB プループに属し、*Gelidibacter algens* との 16S rDNA の相同性は 90%であった。近縁株との 1443bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Cytophaga marinoflava*(AF203475)と最も高い相同性値、89.6%を示し、*Gelidibacter algens*^T(U62914) (88.8%), *Zobellia galactanivorans*^T (AF208293) (88.4%), *Zobellia uliginosa*^T (M62799) (88.4%), *Cytophaga marinoflava* (AF203475) (89.6%)であった (表 3-8)。また、系統樹においては、*Zobellia*、*[Cytophaga] marinoflava* と単系統群を形成した (図 3-7)。

MKT93 : BLAST の相同性検索の結果、MKT93 は CFB プループに属し、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属いずれとも 94%の相同性であった。近縁株との 1443bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Tenacibaculum maritimum*^T(M64629)と最も高い相同性値、92.2%を示した (表 3-9)。また、系統樹においても、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属、*Psychroserpens* 属と単系統群を形成した (図 3-7)。

MKT44 : BLAST の相同性検索の結果、MKT44 は CFB プループに属し、相同性は*[Cytophaga] fermentans* と 96%であった。近縁株との 1443bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*[Cytophaga] fermentans*^T(M58766)と最も高い相同性値、93.5%を示した (表 3-10)。系統樹上でも*[Cytophaga] fermentans* と単系統群を形成し、この単系統群は、96%のブーツストラップ値で支持された (図 3-8)。

MKT109 : BLAST の相同性検索の結果、MKT109 は CFB プループに属し、相同性は*Persicobacter diffluens* と 91%であった。近縁株との 1445bp の

16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Persicobacter diffluens* (M58765) と最も高い相同性値、90.4%を示した（表 3-11）。系統樹上でも *Persicobacter diffluens* と単系統群を形成し、この単系統群は、92%のブーティストラップ値で支持された（図 3-8）。

MKT111 : BLAST の相同性検索の結果、MKT111 は CFB プループに属し、相同性は *Flammeovirga aprica* と 92%であった。近縁株との 1270bp の 16S rDNA 塩基配列を比較した結果は、*Flammeovirga aprica* と最も高い相同性値、92.9%を示した（表 3-12）。系統樹上でも *Flammeovirga aprica* と単系統群を形成し、この単系統群は、100%のブーティストラップ値で支持された（図 3-8）。

NJ method

1083 bp
0.02 K nuc
└───┘

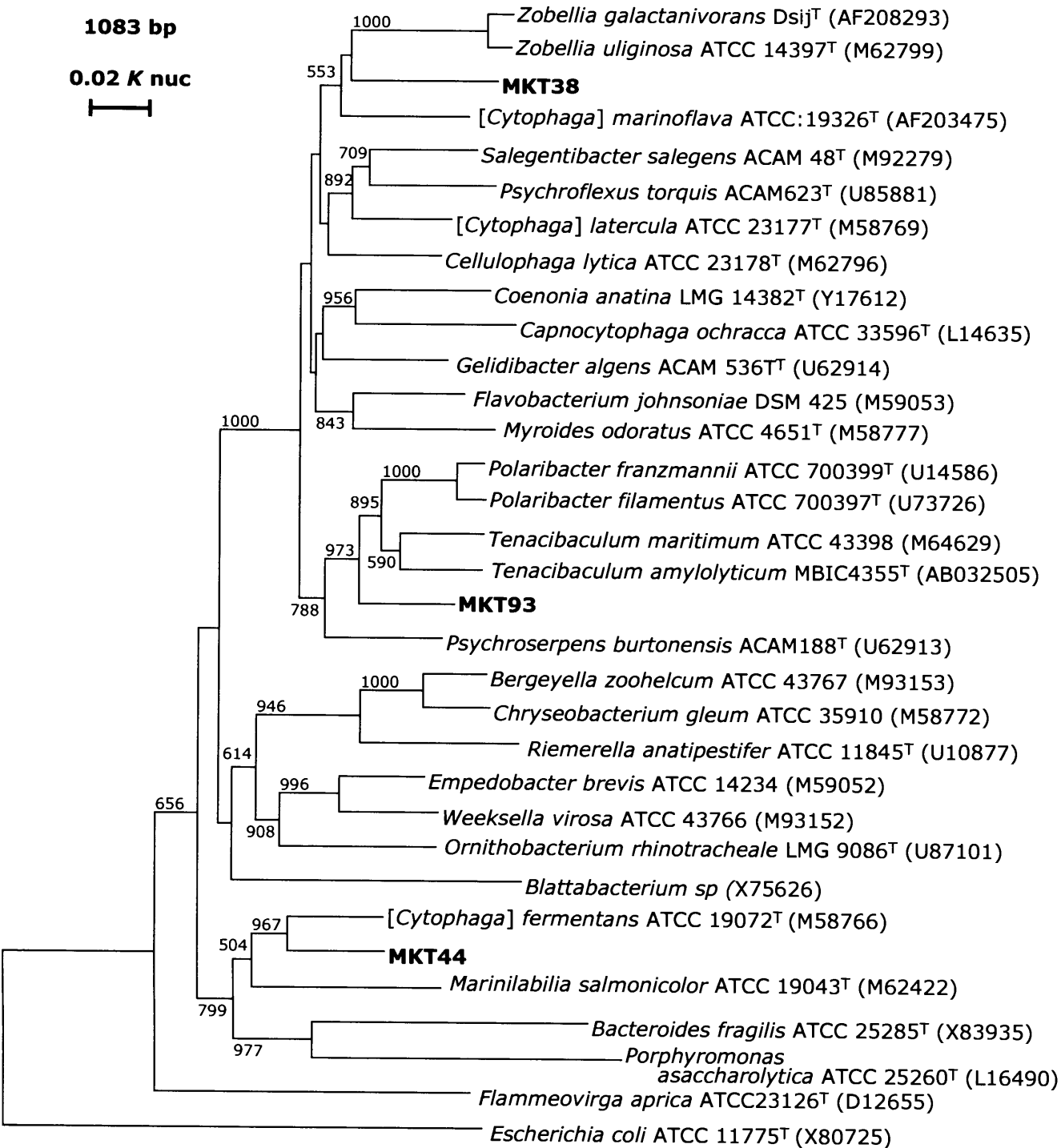


図 3-7 CFB group 1 系統樹

表 3-9 MKT92 Distance matrix

		% Similarity									
strain											
		MKT93	Polaribacter filamentus ^T (U73726)	Polaribacter irgensii ^T (M61002)	Polaribacter franzmannii ^T (U14586)	Polaribacter glomeratus ^T (M58775)	Tenacibaculum mesophilum ^T (AB032501)	Tenacibaculum maritimum ^T (M64629)	Tenacibaculum ovolyticum ^T (AB032508)	Tenacibaculum amyolyticum ^T (AB032505)	Psychroserpens burtonensis ^T (U62913)
MKT93		100.0									
Polaribacter filamentus ^T (U73726)		91.1									
Polaribacter irgensii ^T (M61002)		91.0	96.5								
Polaribacter franzmannii ^T (U14586)		91.9	97.6	96.5							
Polaribacter glomeratus ^T (M58775)		91.3	98.7	97.4	97.6						
Tenacibaculum mesophilum ^T (AB032501)		91.4	91.3	92.0	91.7	92.1					
Tenacibaculum maritimum ^T (M64629)		92.2	92.8	93.2	93.2	93.3	94.8				
Tenacibaculum ovolyticum ^T (AB032508)		90.9	92.4	92.4	93.0	93.1	95.5	93.3			
Tenacibaculum amyolyticum ^T (AB032505)		92.1	91.0	91.5	91.4	92.0	95.5	92.5	94.4		
Psychroserpens burtonensis ^T (U62913)		91.2	89.3	90.1	89.6	89.9	89.1	89.3	89.9	88.9	100.0

NJ method

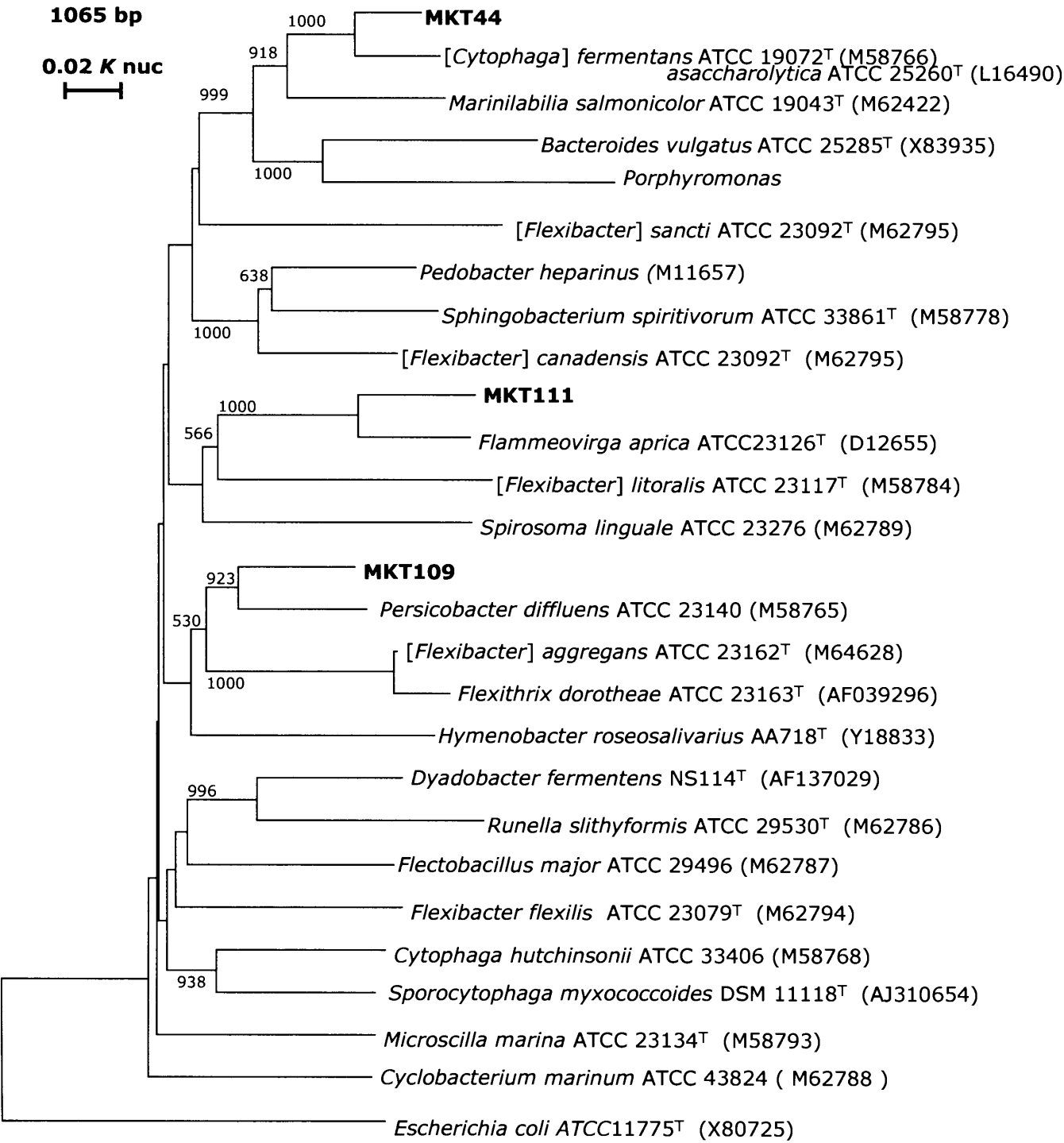


図 3-8 CFB group 2 系統樹

表 3-10 MKT44 Distance matrix

		% Similarity									
strain	MKT44	<i>Cytophaga fermentans</i> ^T (M58766)	100.0								
		<i>Marinilabilia salmonicolor</i> ^T (M62422)	93.5								
		<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ^T (L16490)	89.0	90.3							
		<i>Porphyromonas endodontalis</i> ^T (L16491)	79.7	81.2	81.4						
		<i>Prevotella heparinolytica</i> ^T (L16487)	83.0	83.6	83.7	88.8					
		<i>Prevotella zoogloeiformans</i> ^T (L16488)	81.5	81.7	82.8	80.3	81.7				
		<i>Bacteroides fragilis</i> ^T (X83935)	80.9	81.3	82.3	80.6	81.0	96.6			
		<i>Bacteroides vulgatus</i> ^T (M58762)	83.4	83.3	83.3	81.8	82.5	90.3	89.9		
			81.6	81.7	83.0	81.6	82.7	91.3	90.9	90.8	100.0

表 3-11 MKT109 Distance matrix

strain	% Similarity			
	MKT109	<i>Persicobacter diffluens</i> (M58765)	<i>Flexithrix dorotheae</i> ^T (AF039296)	<i>Flexibacter aggregans</i> ^T (M64628)
MKT109	100.0			
<i>Persicobacter diffluens</i> (M58765)	90.4			
<i>Flexithrix dorotheae</i> ^T (AF039296)	84.4	85.5		
<i>Flexibacter aggregans</i> ^T (M64628)	85.8	86.7	98.6	100.0

表 3-2 MKT111 Distance matrix

strain	% Similarity			
	MKT111	<i>Spirosoma linguale</i> (M62789)	<i>Flammeovirga aprica</i> ^T (D12655)	<i>Flexibacter litoralis</i> ^T (M58784)
MKT111	100.0			
<i>Spirosoma linguale</i> (M62789)	81.4			
<i>Flammeovirga aprica</i> ^T (D12655)	92.9	79.9		
<i>Flexibacter litoralis</i> ^T (M58784)	82.0	80.9	81.9	100.0

第 3 節 考察

3—3—1 16S rDNA 塩基配列による各株の新属の可能性

Alteromonas group

MKT92 : 図 3-3 の系統樹に示されているとおり、MKT92 は、*Colwellia* 属と *Thalassomonas* 属 (Macian ら、2001) で形成する単系統群の姉妹群に位置している。*Thalassomonas* 属は現在のところ 1 属 1 種である。*Thalassomonas viridans* と *Colwellia psychroerythraea* の 16S rDNA 塩基配列を比較した場合の相同性値はいずれとも 95.1%、MKT92 と *Thalassomonas viridans* との相同性値は 95.0%であり、ほぼ同様の距離であった。それぞれの単系統性も高いブーツストラップ値で支持されており、MKT92 が *Proteobacteria* の gamma subclass に属する新属新種である可能性は非常に高い。

MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 : この 6 株間の相同性は、極めて高い値を示し(99.4~99.9%)、その単系統性は 100%のブーツストラップ値で支持された。一方、近縁株との 16S rDNA 塩基配列比較による相同性値の最も高い値でも、*Alteromonas macleodii*(Y18228)との 90.8%に過ぎなかった。したがって、この 6 株はまとめて、*Proteobacteria* の gamma subclass に属する新属新種である可能性が非常に高い。

MKT110 : 図 3-3 の系統樹に示したとおり、MKT110 は、*Pseudomonas* 属、*Marinobacter* 属と単系統群を形成し、その中間に位置した。*Pseudomonas andersonii* との 16S rDNA 塩基配列比較による相同性値は 90.2%、*Marinobacter* 属とは、89.4%であり、その分子系統的な距離は十分に離れており、MKT110 は、*Proteobacteria* の gamma subclass に属する新属新種である可能性が非常に高い。

Rhodobacter group

MKT107 : MKT107 は系統樹上では、現在のところいずれも 1 属 1 種からなる *Antarctobacter* 属と *Sagittula* 属とで形成される単系統群の姉妹群に位置する。*Antarctobacter* 属 と *Sagittula* 属との 16S rDNA 塩基配列比較による相同性値は 93.5%であり、MKT107 との *Antarctobacter* 属 の相同性値は 94.7%である。しかし、一方、MKT107 と近縁株との 16S rDNA 塩基配列を比較にすると、系統樹上では多少離れた *Silicibacter lacuscaerulens*(U77644)と最も高い相同性値、95.6%を示した。このことは、これらの周辺株の 16S rDNA 遺伝子距離は比較的接近しており、新たな株の発見により容易に系統関係が組みかわる可能性を示唆している。従って、MKT107 の新規性については、表現形質も含めて慎重に評価する必要がある。

MKT95 : MKT95 は、[*Roseobacter*] *gallaeciensis* (square brackets indicate a misnamed organism), [*Ruegeria*] *algicola* と単系統群を形成した。*Roseobacter* 属は、Shiba (1991)により提唱された属であり、タイプ種は *R. litoralis* である。また、*Ruegeria* 属は、Uchino ら (1999)によって提案された属で、タイプ種は *R. atlantica* である。その後、それらに近縁な新しい株が次々に報告されたことにより、*Roseobacter* 属、*Ruegeria* 属の単系統性が崩壊し、[*Roseobacter*] *gallaeciensis* と [*Ruegeria*] *algicola* は、再分類の必要がでてきた。そこで、MKT95 と [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と [*Ruegeria*] *algicola* を合わせて、新属を提案していく。

MKT84, MKT94 : この 2 株間の 16S rDNA の相同性は、100%であり、その単系統性は 100%のブーツストラップ値で支持された。系統樹上では、

Stappia 属の姉妹群の位置を占め、*Stappia agregata*^T(D88520)との相同性値は 94.7%であった。MKT84, 94 は、*Proteobacteria* の alpha subclass に属する新属新種である可能性が非常に高い。

Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group

MKT38 : MKT38 は、系統樹上では、*Zobellia* 属、[*Cytophaga*] *marinoflava* と単系統群を形成したが、近縁株との 16S rDNA 塩基配列を比較した結果では、*Cytophaga marinoflava* と最も高い相同性値、89.6%を示した。しかし、いずれの株との相同性値も 90%以下であり、分子遺伝学的な距離が十分に離れている。したがって、MKT38 は CFB グループの新属新種である可能性が非常に高い。

MKT93 : MKT93 は、系統樹上でも明らかなように *Polaribacter* 属 (Gosink ら、1998)、*Tenacibaculum* 属 (Suzuki ら、2001)、*Psychroserpens* 属との単系統群を形成し、いずれとも 90~92%の相同性値を示したことから、MKT93 は CFB グループの新属新種である可能性が非常に高い。

MKT44 : MKT44 は、系統樹上では、[*Cytophaga*] *fermentans* と現在 1 属 1 種である *Marinilabilia* 属と単系統群を形成した。MKT44 と [*Cytophaga*] *fermentans* との 16S rDNA 塩基配列による相同性値は、93.5%であり、*Marinilabilia* 属とは 89.0%であったので、MKT44 は、CFB グループの新属新種である可能性が非常に高い。一方、*Cytophaga* 属のタイプ種は、*C. hutchinsonii* (established by Winogradsky in 1929)であるが、分子系統上、[*Cytophaga*] *fermentans* とは非常に離れて位置する。したがって、[*Cytophaga*] *fermentans* は、再分類の必要がある。

[*Cytophaga*] *fermentans* と MKT44 とをまとめて新属とする可能性も含め、再検討する必要がある。

MKT111 : MKT111 は、系統樹上で *Flammeovirga aprica* と単系統群を形成し、100%のブーツストラップ値で支持された。*Flammeovirga aprica* との 16S rDNA 塩基配列による相同性値は、92.9%であり、その分子系統的な距離は十分に離れているので、CFB グループの新属新種である可能性が非常に高い。

MKT109 : 109 は、系統樹上で *Persicobacter diffluens* と単系統群を形成し、92%のブーツストラップ値で支持された。*Persicobacter diffluens* との 16S rDNA 塩基配列による相同性値は、91.0%であり、その分子系統的な距離は十分に離れているので、CFB グループの新属新種である可能性が非常に高い。

3—3—2 16S rDNA 部分塩基配列の妥当性

本研究では、分離した株すべてについて、まず第一に 16S rDNA の後半部分のおよそ 3 分の 1（一般に variable region とされている）にあたる 450~500bp の部分塩基配列を決定し、BLAST による既知種との相同性検索をおこなった。その結果、相同性値が 95%以下であった株を選出し、16S rDNA 全塩基配列を決定するという方法を採用した。この手順が、新規バクテリア探索に適當であるかどうかをみきわめるために、部分塩基配列と全塩基配列の両 BLAST 検索結果を比較した（表 3-13）。部分塩基配列を比較した場合と全塩基配列を比較した場合とで、BLAST 検索によるもっともスコアの高かった株が、一致したのは、11 株中 MKT38, MKT84, MKT94, MKT107 の 4 株であった。その相同性値を比較してみると、MKT38, 84, 94 では、部分塩基配列での相同性値より全塩基配列での相同性値の方が、数パーセント低かった。すなわち、16S rDNA の保存性が高いとされていた前半部分と中間部分の塩基配列の方が、後半部分よりむしろ多様性が高かったことを意味している。BLAST 検索でもっともスコアの高かった株が、部分塩基配列、全塩基配列で一致していなかった株の場合でも、8 株中 5 株は、全塩基配列を比較した場合の方が、相同性値が数パーセントその値が低くなっており、逆に部分塩基配列比較では 95%以上（96%）であった。MKT82,86,87,89,106,112 においては、部分塩基配列比較の結果が 96%、全塩基配列比較では 91%であった。同様に、MKT110 では 96%が 90%、MKT84,94 では 97%が 94%になっている。このような事例から考察すると、16S rDNA 後半部分の塩基配列比較の結果より、95%以下であった株を新規性の高い株として選出したことは適當であったが、逆に、16S rDNA 後半部分塩基配列比較の結果が 95%以上であったとして、選出しなかった

株のなかには、全塩基配列を比較すべき株が含まれていた可能性がある。この原因として考えられるのは、BLAST 検索による相同性検索では、「ギャップを入れずに高い類似性を与えるような部分塩基対を複数求める」方法で類似性を評価している点があげられる。これは、BLAST 検索では膨大な数の塩基配列を比較する必要から、その計算時間を短縮する目的で採用されている方法である。また、16S rDNA の variable region は、後半部分に限られておらず、その位置は、分類群によって異なっている可能性もある。従って、本実験での手法は、今後改変して用いることにより、さらに効率のよいスクリーニングが可能となることが示唆された。

表 3-13 16S rDNA 部分塩基配列、全塩基配列のBLAST検索結果

MKT No.	比較した塩基 配列の長さ	BLST検索でもっともスコアの高かった株	similarity %
38	477	<i>Gelidibacter algens</i>	95
	1447	<i>Gelidibacter algens</i>	90
44	478	<i>Flexibacter echinica</i>	96
	1436	<i>Cytophaga salmonicolor</i>	88
93	453	<i>Microscilla furvescens</i>	93
	1468	<i>Polaribacter franzmannii</i>	91
109	467	<i>Flexibacter litoralis</i>	88
	1443	<i>Cytophaga diffluens</i>	91
111	452	<i>Hafnia alvei</i>	94
	1427	<i>Cytophaga aprica</i>	93
82,86,87,89,106,112	466	<i>Colwellia psychroerythraea</i>	96
	1419	<i>Thalassomonas viridans</i>	91
92	456	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	93
	1436	<i>Thalassomonas viridans</i>	94
110	451	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	96
	1437	<i>Pseudomonas andersonii</i>	90
84,94	461	<i>Agrobacterium stellulatum</i>	97
	1411	<i>Agrobacterium stellulatum</i>	94
95	457	<i>Ruegeria atlantica</i>	96
	1397	<i>Ruegeria atlantica</i>	96
107	476	<i>Sulfitobacter mediterraneus</i>	93
	1386	<i>Sulfitobacter mediterraneu</i>	94

第4章 新規性の高い分離株の分類学的位置

第1節 方法

4-1-1 形態観察

①肉眼観察

菌液を Marine 2216 (Difco) 平板培地に塗抹した後、シャーレの蓋を下に向け、23℃で 2~10 日間培養し、その間平板培地上に出現したコロニーの形、色などを観察する。

②光学顕微鏡による観察

Marine 2216 (Difco) 培地を用い、23℃にて、2 日間培養し、菌体の運動の有無、細胞形態、細胞の大きさについて、位相差顕微鏡 (OPTIPHOT, Nikon) を使用して、1000 倍で(100×10)観察した。

③電子顕微鏡観察

Marine 2216 (Difco) 培地を用い、23℃にて、2 日間培養した菌体を、1%(wt/vol)リンタングステン酸溶液でネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡 JEOL1210 を用いて、鞭毛の様子を観察した。

4-1-2 生理・生化学的分析

①嫌気条件下での生育

Marine 2216 (Difco) 培地に菌体を塗沫し、23℃にて、好気条件下と嫌気条件下のそれぞれで培養し、その生育を比較観察する。嫌気培養は、三菱ガス化学のアネロパックシステムを利用し、そのプロトコール方法に従った。

②カタラーゼ活性

Marine 2216 (Difco) 培地を用い、23℃にて、2 日間培養した菌体をスライドガラスに塗沫し、菌体上に 3%過酸化水素を 1 滴滴下した。酸素の泡の出現を観察した。

③各種の生理的性状

炭素源、窒素源の利用性、生体高分子、有機化合物の分解性、酵素活性などについては、臨床分離株の同定を目的に市販されている簡易同定キット、バイオテスト（栄研化学）を活用した。

4-1-3 化学分類学的分析

①呼吸系キノン分子種

抽出 : Marine 2216 (Difco) 培地を用い、23℃にて、2 日間培養した菌体を遠心分離によって集菌し、凍結乾燥した。乾燥菌体 200mg をクロロホルム-メタノール(2:1, v/v) 混液に加え、遮光して2 時間スターラーで攪拌した。ろ紙を用いて菌体を濾過し、ろ液を回収する。残渣の菌体にもう一度クロロホルム-メタノール混液を加えて、同様に抽出、濾過し、ろ液を回収し、1 度目の抽出液と合わせた。ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固させ、残渣にアセトンを加えて抽出し、0.2ml 程度まで再度濃縮乾固した。

精製 : アセトン可溶画分をシリカゲル TLC (Merck 社, Kiesel-gel60F254) を用いて展開した。展開溶媒は、ヘキサン-ジエチルエーテル(85:15, v/v) を用いた。キノンの標準試料としては市販のユビキノンを、メナキノンの標準試料としてはビタミン K₁ をそれぞれ使用した。展開後、TLC を乾燥させ、短波長紫外線ライトを照射してバンドを確認した。標準試料と比較し、キノンと考えられるスポットをかきとった。アセトンを加えてキノンを溶出させ、低速遠心分離をおこない上清を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。残渣に、少量のアセトンを加えて溶出させ、キノンサンプルとした。

分子種の同定 : HPLC (VP, SHIMADZU) には、逆相 ODS 系のカラムを用い、移動相としてメタノール-イソプロパノール (2:1, v/v) を用いた。波長 270nm の UV 吸収で検出し、標準試料のクロマトグラム上のピーク保持時間と比較して、サンプルのキノン分子種を同定した。データの解析は、CLASS-VP データシステムを使用した。

②菌体脂肪酸組成

ヒューレットパッカード社製のガスクロマトグラフシステム、MIDI 法に従って、菌体脂肪酸組成を分析した。

まず、プロトコールに従って、アルカリ鹼化用試薬、メチル化試薬、抽出用試薬、洗浄用試薬を調製した。約 40mg の湿菌体をループでかきとり、キャップつき試験管の底に入れた。

加水分解 : アルカリ鹼化用試薬を 1.0ml 加え、キャップをしっかりとしめ、ボルテックスで混合し、100℃にて 5 分間保った。ウォーターバスより取り出して、ゆっくりと冷ました。ボルテックスで混合し、100℃にて 25 分間保った。ウォーターバスより取り出して、水道水で冷ました。

メチル化 : メチル化試薬を 2.0ml 加え、キャップをしっかりとしめ、ボルテックスで混合し、80℃にて 10 分間保った。ウォーターバスより取り出して、水道水で素早く冷した。

抽出 : 抽出用試薬を 1.25ml 入れる。キャップをしっかりとしめ、上下を逆さにしながら 10 分間ゆるやかに混合した。下層をパスツールで取り去った。

洗浄 : 洗浄用試薬を 3.0ml 加え、キャップをしっかりとしめ、上下を逆さにしながら 5 分間ゆるやかに混合させた。この溶媒の上層 3 分の 2 を、そのままガスクロマトグラフィーの分析試料とした。

ガスクロ : ChemStation (Agilent Technologies) を使用し、データは、解析用ソフト Sherlock を用いた。

③G+C 含量

DNA の調製 : Marine 2216 培地で, 23℃にて培養し、対数増殖期中期にある菌体を供して、Saito and Miura 法 (Saito ら、1963)に従って調製した。

熱変性処理 : 350~500 $\mu\text{g/ml}$ になるように DNA 水溶液濃度を調製した。この溶液 25 μl を 100℃にて 10 分間過熱したのち、氷上で急冷し、熱変性させた。

ヌクレアーゼ処理 : 20 μl の P1 ヌクレアーゼ溶液を加え、37℃、2 時間保温した。

アルカリファスファターゼ処理 : 20 μl のアルカリホスファターゼ溶液を加え、37℃、一晩保温し、HPLC に供するサンプルとした。この処理は、対照としてヤマサ GC キットのヤマサ標品も同時に反応させた。

HPLC : 反応液 10 μl を HPLC で測定した。条件は以下に示す。

カラム…Cosmosil 5C 18-AR (ナカライテスク)

カラム温度…40℃

移動相…0.2M リン酸二水素アンモニウム-アセトニトリル (40:1)

流速…1.0 ml / min

波長…270 nm

4-1-4 分子系統学的分析

16S rDNA 塩基配列の決定方法、Distance matrix の作成方法、系統樹の作成方法については、第 3 章に述べたとおりである。MKT82, 86, 87, 106, 112 については、形態、生理・生化学的性質、化学分類学的性質、16S rDNA 塩基配列について、6 株間でほとんど差異がみられなかった。そこで 16S rDNA 塩基配列でもっとも差異の大きかった MKT87 と MKT112 間で、DNA-DNA 相同性試験を行い、同種であるかどうかを見極めた。試験方法は、MKT87 をプローブ DNA とし、蛍光検出によるマイクロプレート法(Ezaki ら 1989) に従った。以下に、その手順の概要を述べる。

DNA-DNA 相同性試験

DNA の調製 : ネガティブコントロールとして用いた *Escherichia coli* IAM 12119⁺、MKT87, MKT112, それぞれの株について、濃度 100 μ g/ml、純度 $OD_{260} / OD_{280} \geq 1.8$ の値を満たす DNA を必要量抽出し調製した。

プローブ DNA のフォトビオチンによる標識 : プローブとした MKT87 については、濃度 1000 μ g/ml、純度 $OD_{260} / OD_{280} \geq 1.8$ の値を満たすように DNA を調製し、そのうち必要量をフォトビオチンで標識した。

ターゲット DNA のマイクロプレートへの固定 : 各株を熱変性により一本鎖にして、マイクロプレート上に 5 ウェルずつ固定し乾燥させた。また、ハイブリダイゼーションの直前にプレハイブリダイゼーションを行った。

プローブ DNA とターゲット DNA のハイブリダイゼーション : マイクロプレートに固定されているターゲット DNA に、熱変性させた MKT87 の DNA を加えて、一定時間ハイブリダイゼーションを行った。未反応のプローブ DNA を取り除くために、SSC (3M NaCl, 0.3M trisodium citrate) 溶液

で洗浄をおこなった。

フォトビオチンとストレプトアビジンの結合： マイクロプレートにストレプトアビジン酵素溶液を加えて、フォトビオチンと反応させた。

蛍光基質の添加と定量： 各ウェルに DMSO に溶解させた蛍光基質(4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside)を加え、マイクロプレートリーダー(Multi-Well Plate Reader 4000, PerSeptive Biosystems)を用いて一定時間ごとに、3 回ずつ蛍光強度を測定した。

データの解析： 5 つのウェルのうち、最大値と最小値を除いて、残り 3 株の平均をとり、さらにプレートリーダー 3 回分の測定値の平均値を採用した。MKT87 の DNA を固定したウェルの蛍光強度を 100%とし、*Escherichia coli* の値を 0%として計算した。

$$\text{相同性 (\%)} = (\text{目的株の測定値} - \text{Escherichia coli の測定値}) \div (\text{MKT89 の測定値} - \text{Escherichia coli の測定値}) \times 100$$

4-1-5 PCR による *puf* 遺伝子の探索

MKT84, 94 は、系統樹上で *Stappia* 属と単系統群を形成した。*Stappia stellulata*⁺ は、光合成細菌の光反応中心複合体タンパク質の L, M サブユニットをコードする遺伝子 (*pufL*, *pufM*) をもつことが報告されている (Uchino ら,1998)。またこの近縁グループには光合成をすることが報告されている株が複数存在するので、MKT84, 94, 95, 107 についても PCR によって、*pufL*, *pufM* 遺伝子の増幅を試みた。Forward 側は、8F, 520F, 926F, Reverse 側は、350R, 700R, 704R, 1100R, 1510R のプライマーを用いた。使用したプライマーの配列を表 4-1,2 に、*Rhodobacter capsulatus* の *puf* 遺伝子塩基配列と本研究で使したプライマーの位置を図 4-1 に示した。PCR 反応液組成は、2-1-3 で述べたとおりである。PCR 反応条件は、図 4-2 に示した。

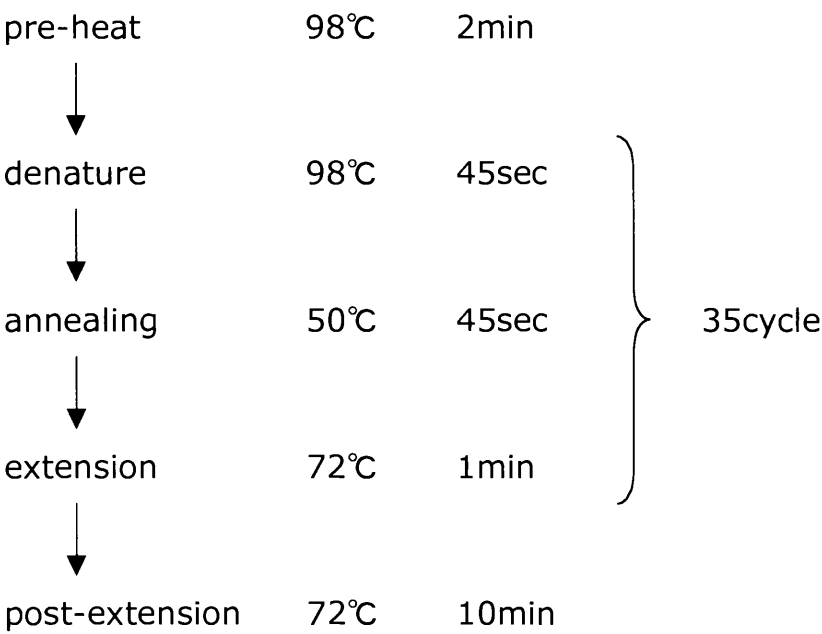


図 4-2 PCR 反応条件

表 4-1 *puf* L遺伝子 のPCR増幅に用いたプライマー

				プライマー長 (mer)	G+C (%)
Forward					
1F	5'	TTC GAC TTC TGG GT	3'	14	50
2F	5'	TAT GTC GGC TTC TTC GG	3'	17	52.9
3F	5'	GGC TAT TCG ATC GG	3'	14	57.1
Reverse					
3R	5'	CCG ATC GAA TAG CC	3'	14	57.1
4R	5'	CCA CCA GTT CCA CCA	3'	15	60

表 4-2 *puf* M遺伝子 のPCR増幅に用いたプライマー

				プライマー長 (mer)	G+C (%)
Forward					
1F	5'	ATG GCT GAG TAT CA	3'	14	42.9
2F	5'	CAG ATC GGG CCG ATC TA	3'	17	58.8
Reverse					
3R	5'	AAG CCC ATC GTC CAG CGC CAG AA	3'	23	60.9
4R	5'	CCA GAC GTA CCA GTT GTC	3'	18	55.6

図 4-1 *puf*遺伝子増幅 に用いたプライマー位置

puf L: 1~841, *puf* M 842~1765

```

      10          20          30          40          50          60
atggcctttgc tcagcttcga acgaaaatac cgtgtgccgg gcggcacctt gattggcggg

      70          80          90          100         110         120
agccttttctg acttctgggt cggacccttc tatgtcgggt tcttcggggt caccaccatc
    2F          2R          2F          2R

      130         140         150         160         170         180
ttcttcgcca cgctcggcct tttgcttata ctttggggag ccgcgatgca gggcacgtgg

      190         200         210         220         230         240
aacccccaat tgatctccat ctttcgcgcg ccggtggaaa atggtctgaa cgtggcagcc

      250         260         270         280         290         300
ctggacaagg gcggtctttg gcaggtcatc accgtctgcg cgacggggcg cttctgcagc

      310         320         330         340         350         360
tggtgctctgc gtgaagtcga aatctgccgc aagctcggca tcgggttcca cattccggtg

      370         380         390         400         410         420
gccttctcga tggcgatctt tgcctatctg accctcgtcg tgatccgtcc gatgatgatg

      430         440         450         460         470         480
gggtcgtggg gctacgcctt cccgtatggg atctggacgc acctcgactg ggtgtcgaac

      490         500         510         520         530         540
accggctaca cctacggtaa cttccactac aaccggttcc acatgctggg catcagcctg

      550         560         570         580         590         600
ttcttcacca ccgcctgggc gctggcgatg cacgggggtc tggtcctttc ggccgccaac

      610         620         630         640         650         660
ccggtcaaag gcaagacgat gcggacgccg gaccacgagg acacctactt ccgtgacctc

      670         680         690         700         710         720
atgggctatt cggtcggcac gctcggcatc caccgcctcg gcctgctgct cgcgctgaac
    3F          3R

      730         740         750         760         770         780
gcggtgttct ggtcggcctg ctgcatgctc gtctcgggga ccatctactt cgatctgtgg

      790         800         810         820         830         840
agtgaactggg ggtactgggt ggtgaacatg ccgttctggg ctgacatggc aggaggcatc
                                4R

      850         860         870         880         890         900
aatggctgag tatcagaact tctttaacca ggttcaggtc gccggcgcgc ccgaaatggg
    1F

      910         920         930         940         950         960
cctcaaggaa gacgtcgaca cttcgaacg gacgcctgcg gggatgttca acatcctcgg

```

970 980 990 1000 1010 1020
ctggatgggg aacgcccaga tggggccgat ctatctcggc atcgccggca ccgtctcgtc
2F 2R
1030 1040 1050 1060 1070 1080
ggccttcggc gcggcctggt tcttcaccat cgggtgtgtg tactggtatc aggcggggtt
1090 1100 1110 1120 1130 1140
cgatcccttc atcttcatgc gggatctggt cttcttcagt ctggagccgc cgccggccga
1150 1160 1170 1180 1190 1200
atacggctct gccatcgcgc cgctgaaaca ggggtggtgtc tggcagatcg cctcgtctct
1210 1220 1230 1240 1250 1260
catggcgatc tcggtcattg cctggtgggt ccgtgtctac acccgcgccg accagctcgg
1270 1280 1290 1300 1310 1320
catgggcaag cacatggcct gggctttcct ctcggcgatc tggctgtggt cggttctcgg
1330 1340 1350 1360 1370 1380
cttctggcgc ccgatcctga tggggctcct gagcgttgct ccgccctatg gcatcttctc
1390 1400 1410 1420 1430 1440
gcacctcgac tggacgaacc agttctcgct cgaccacggc aacctgttct acaaccggtt
1450 1460 1470 1480 1490 1500
ccacggcctc tcgatcgctg ccctctacgg ctcggcgctc ctgttcgcca tgcacggcgc
1510 1520 1530 1540 1550 1560
gaccatcctt gcggtgacct gtttcggcgg cgaacgcgag ctggaacaga tcgttgacct
1570 1580 1590 1600 1610 1620
cgggaccgct tcggaacgcg ccgccctgtt ctggcgctgg acgatgggct tcaacgccac
3R
1630 1640 1650 1660 1670 1680
catggaaggc atccaccgct gggcgatctg gatggccgtg atggtgacgc tgaccgggtg
1690 1700 1710 1720 1730 1740
tatcggcac ctgctctcgg gcaccgttgt cgacaactgg tatgtctgg cgcaagtcca
4R
1750 1760 1770 1780 1790 1800
cggctacgcc cccgtgacct cgtaa..... ..

第2節 結果

4-2-1 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 について

[形態的特徴]

コロニー形態については、6 株ともに、Marine 2216 寒天培地上、23℃で3~5日培養すると、なめらかな表面の白色、円形のコロニーを形成した（図4-3）。細胞形態は6株ともに直線状または多少曲った桿状で、細胞の大きさは、短径 $0.7 \sim 0.9 \mu\text{m}$ × 長径 $1.5 \sim 1.9 \mu\text{m}$ であった。また、運動性が確認された。電顕写真により、6 株ともに、極べん毛を有することが明らかとなった（図4-4）。

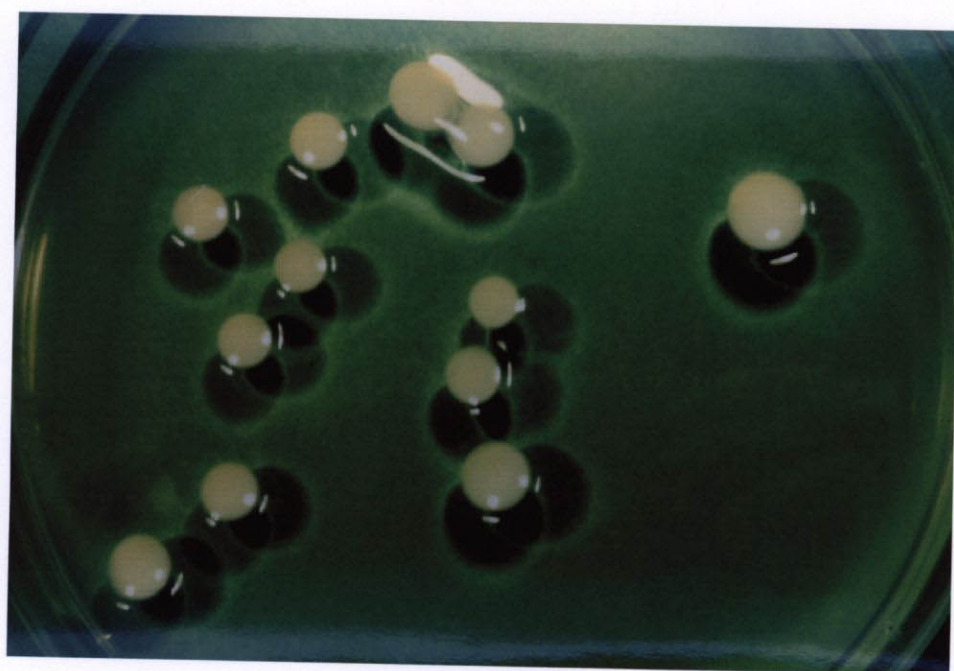
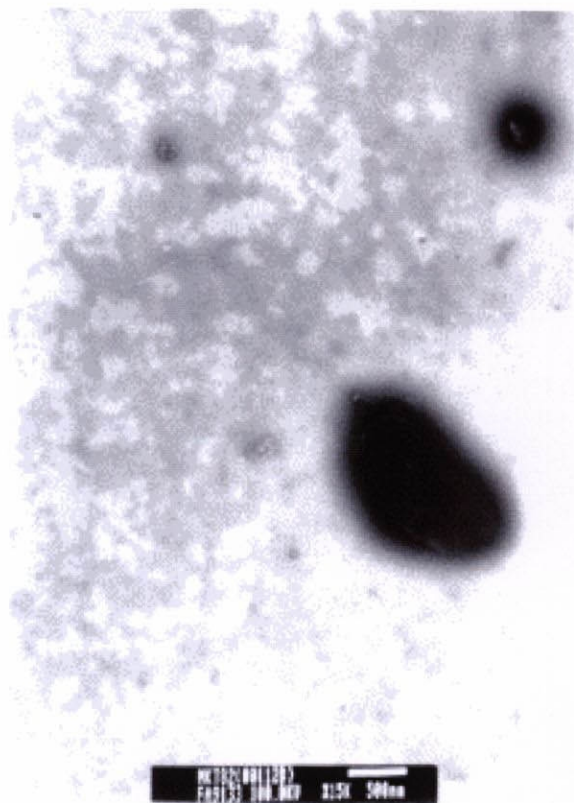
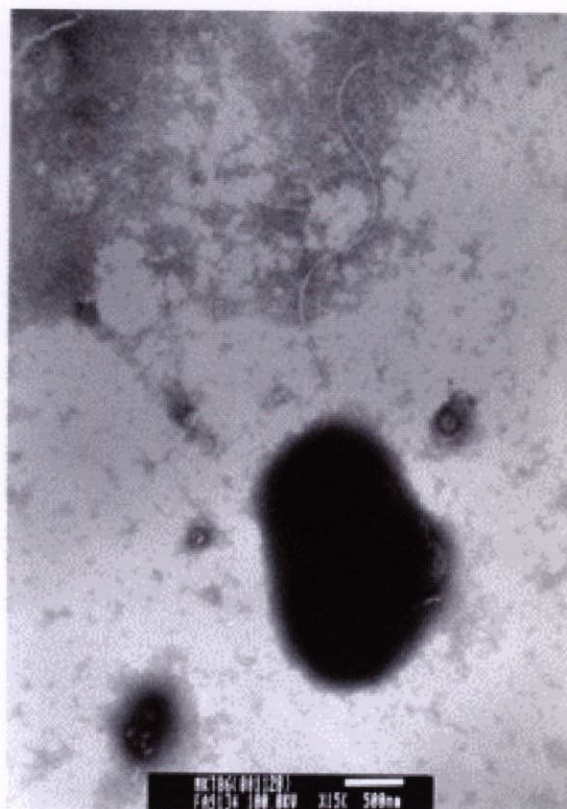


図 4-3 MKT82 コロニー

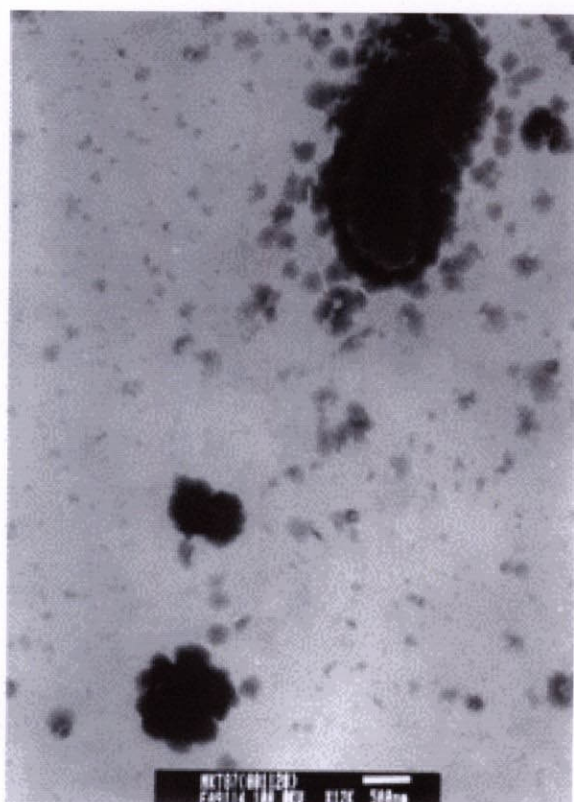
A



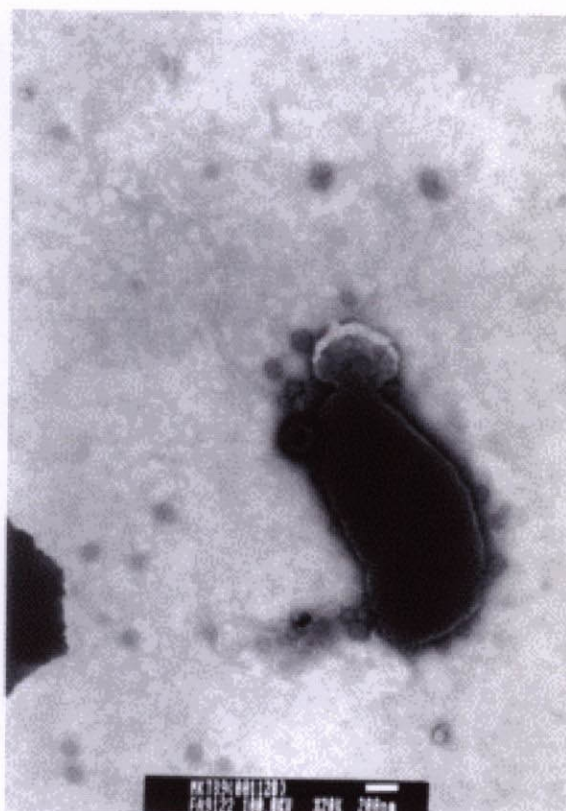
B



C



D



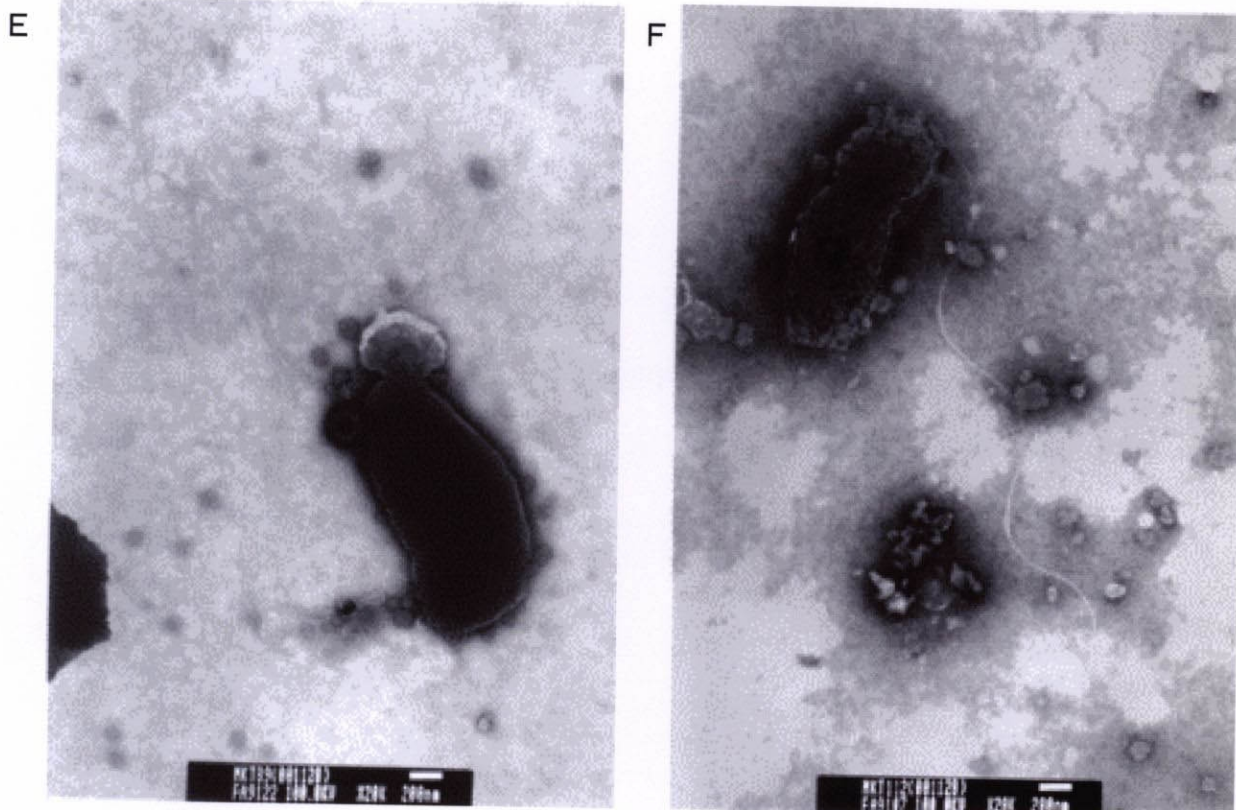


図 4-4 各株の電子顕微鏡写真

A:MKT82, B:MKT86, C:MKT87, D:MKT89, E:MKT106, F:MKT112

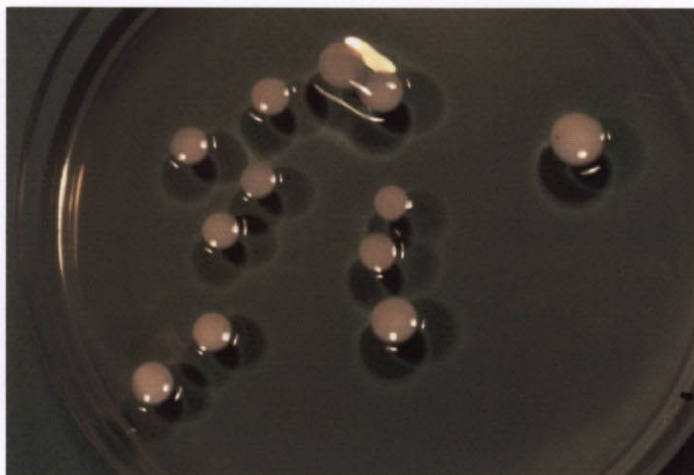
[生理・生化学的特徴]

6 株ともに、Marine 2216 寒天培地上、23℃で 5 日程度培養を続けると、コロニーを中心として寒天培地表面上にへこみができる（図 4-5）。3 週間～1 ヶ月程度培養を続けると、シャーレの寒天培地は、完全に液体状になることが観察された。このことから、MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 には、寒天を加水分解して液状化する特徴があると考えられた。ガスパックによる、嫌気性試験の結果は、いずれも陰性であり、MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 は絶対好気性細菌であることが明かとなった。カタラーゼ活性は、6 株ともに、陽性を示した。バイオテストによる各種の生理的性状については、表 4-3 にまとめた。フラクトースの利用性に関してのみ 6 株間で相違が認められ、すなわち MKT106 は陰性であったが、その他 5 株は陽性であった。

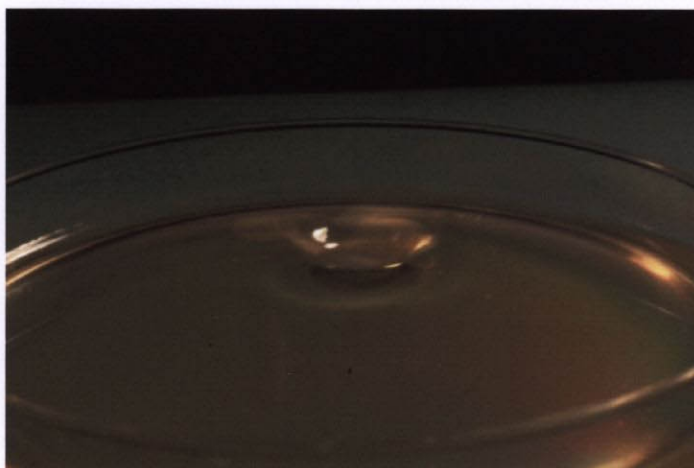
[化学分類学的特徴]

キノン分子種は、6 株いずれも、Q8 が確認された。G+C 含量は、MKT82 (49.5 mol%), MKT86 (50.1 mol%), MKT87 (49.7 mol%), MKT89 (49.4 mol%), MKT106 (49.6 mol%), MKT112 (48.7 mol%) であった。脂肪酸組成は、MKT82, 86, 87, 106, 112 では、ほぼ同様に、16:1 ω 7c, 16:0, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 6c が、主な脂肪酸であった。MIDI の結果を表 4-5 に示した。MKT89 では、他の 5 株には全く検出されなかった anteiso 17:1 ω 9c(23.4 mol%) が最も大きな割合を占め、それ以外は、他の 5 株と同様の脂肪酸組成であった。このことは、MKT89 の電子顕微鏡観察で、いくつかの菌体において、細胞外に紐状物質を放出しているのが観察されたことと関係しているかもしれない（図 4-6）。6 株の化学分類学的特徴を表 4-5 にまとめた。

Marine 2216, 23℃
3 日間培養。



Marine 2216, 23℃
1 週間培養。
寒天培地が分解されて、へこみが観察された。



Marine 2216, 23℃
2 週間培養。
寒天培地が全体的に、
液状化してきた。

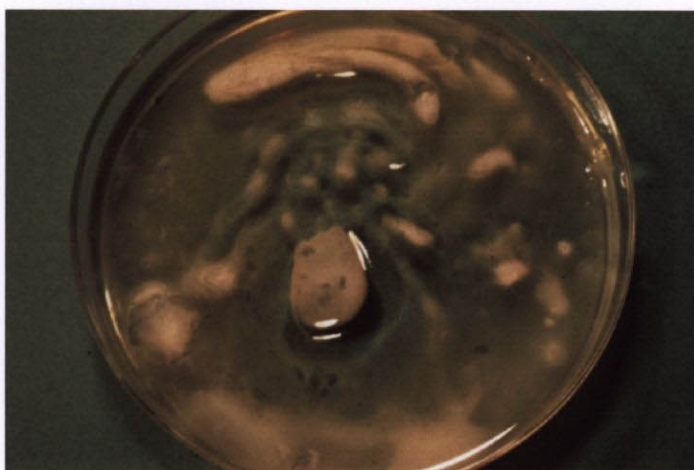


図 4-5 MKT82 による寒天の液化

表 4-3 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 の生理性状試験結果

	MKT82	MKT86	MKT87	MKT89	MKT106	MKT112
Production of						
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
β -Galactosidase	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of						
Gelatin	-	-	-	-	-	-
Agar	++	++	++	++	++	++
Arginine	-	-	-	-	-	-
Aesculin	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-
Utilization of						
Citrate	-	-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-

表 4-5 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 の化学分類学的性状

Strain	Quinone	Non-polar Fatty acid	G+C
MKT82	Q8	16:1 ω 7c(26.1), 16:0(23.7), 18:1 ω 7c(13.8), 18:1 ω 6c(14.6)	49.5
MKT86	Q8	16:1 ω 7c(21.7), 16:0(22.4), 18:1 ω 7c(18.1), 18:1 ω 6c(9.0)	50.1
MKT87	Q8	16:1 ω 7c(32.2), 16:0(24.2), 18:1 ω 7c(17.4), 18:1 ω 6c(4.4)	49.7
MKT89	Q8	anteiso 17:1 ω 9c(23.4), 16:1 ω 7c(18.9), 16:0(17.1), 18:1 ω 7c(8.7), 18:1 ω 6c(9.1)	49.4
MKT106	Q8	16:1 ω 7c(25.5), 16:0(28.7), 18:1 ω 7c(15.3), 18:1 ω 6c(12.2)	49.6
MKT112	Q8	16:1 ω 7c(25.6), 16:0(25.4), 18:1 ω 7c(16.31), 18:1 ω 6c(8.1)	48.7

表 4-4-1 MKT82 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.675	12:0	6.08
7.200	14:0	2.99
9.554	16:1 ISO I	4.68
9.787	16:0 ISO	5.54
10.105	16:1 ω 7c	26.09
10.409	16:0	23.72
13.592	18:1 ω 7c	13.80
13.652	18:1 ω 6c	14.58
13.899	18:0	2.53

表 4-4-2 MKT86 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.674	12:0	6.52
6.675	14:0 ISO	3.14
7.198	14:0	2.63
9.557	16:1 ISO I	4.11
9.787	16:0 ISO	8.69
10.105	16:1 ω 7c	21.66
10.409	16:0	22.4
13.285	18:0 ISO	1.79
13.592	18:1 ω 7c	18.07
13.652	18:1 ω 6c	9.02
13.901	18:0	1.98

表 4-4-3 MKT87 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.675	12:0	7.51
6.678	14:0 ISO	1.30
7.199	14:0	4.06
9.554	12:0 ALDE?	5.44
9.788	16:0 ISO	3.51
10.105	16:1 ω 7c	32.18
10.409	16:0	24.16
13.591	18:1 ω 7c	17.42
13.654	18:1 ω 6c	4.41

表4-4-4 MKT89 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.675	12:0	6.80
6.678	14:0 ISO	1.36
7.199	14:0	1.94
9.556	16:1 ISO I	5.36
9.788	16:0 ISO	4.16
10.166	16:1 ω 7c	17.95
10.409	16:0	17.10
11.325	ANTEISO 17:1 ω 9c	23.36
12.239	16:1 2OH	2.93
13.590	18:1 ω 7c	8.68
13.651	18:1 ω 6c	9.08
13.903	18:0	1.29

表 4-4-5 MKT106 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.675	12:0	6.50
9.556	16:1 ISO I	4.44
9.787	16:0 ISO	4.36
10.104	16:1 ω 7c	25.48
10.408	16:0	28.68
13.590	18:1 ω 7c	15.31
13.652	18:1 ω 6c	12.06
13.902	18:0	3.16

表4-4-6 MKT112 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.675	12:0	7.03
7.197	14:0	3.96
9.557	16:1 ISO I	4.83
9.787	16:0 ISO	4.51
10.104	16:1 ω 7c	25.64
10.408	16:0	25.42
13.590	18:1 ω 7c	16.31
13.651	18:1 ω 6c	8.14
13.899	18:0	4.16

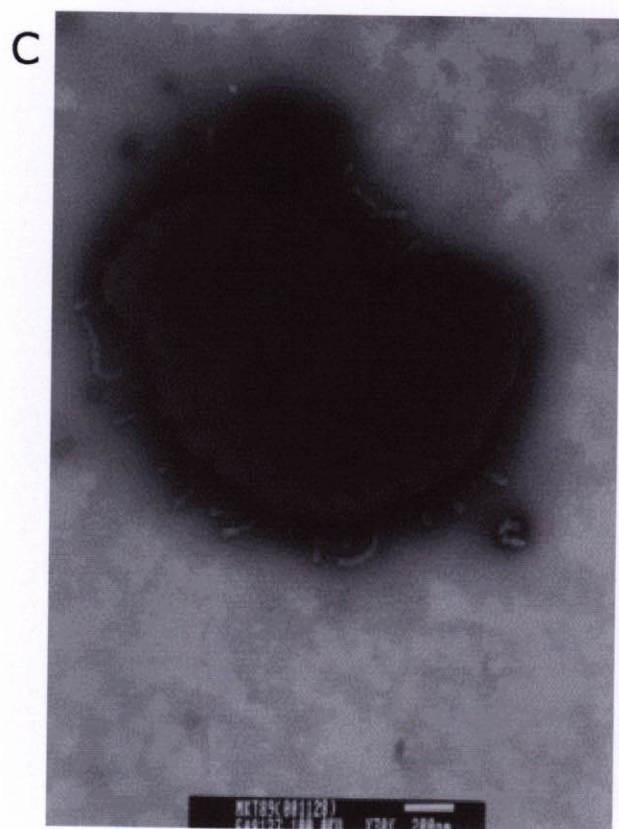
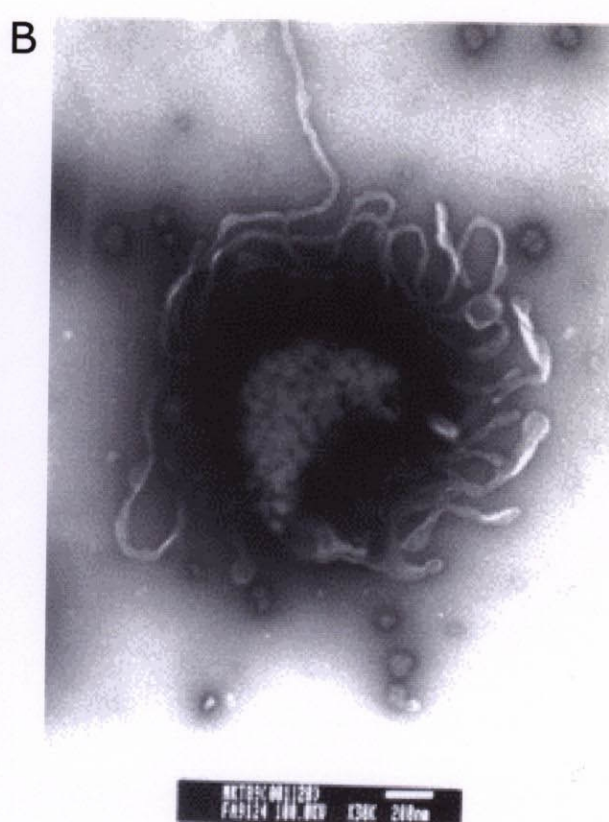
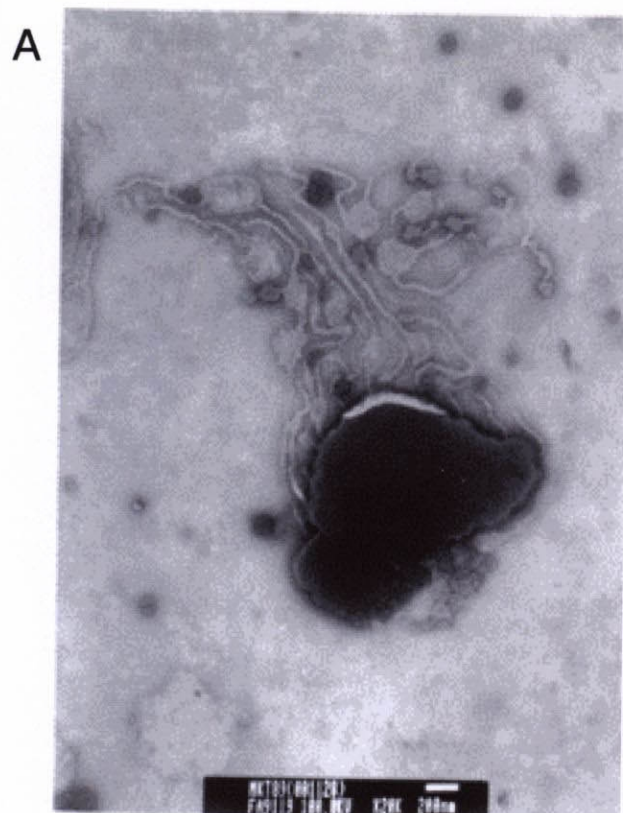


図 4-6 MKT89の電顕写真

A: 20000倍。スケールバーは200nm

B,C: 20000倍。スケールバーは200nm

[DNA-DNA 相同性試験]

MKT87 をプローブとしたときの、MKT87 と MKT112 の DNA-DNA 相
同値は、75.6%であり、P/N 値（プローブ DNA の測定値/ネガティブコント
ロールの測定値）は、10.3 であった。この P/N 数値は、ネガティブコント
ロールとして、*E. coli* を用いたことが適当であったことを示している。測定経過
を図 4-7 に示した。

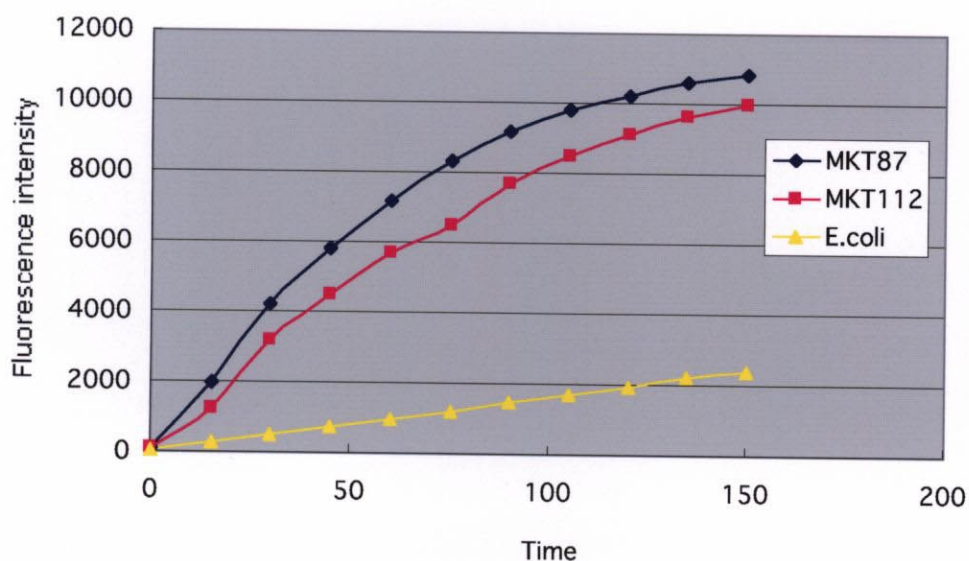


図 4-7 DNA-DNA hybridization (p:MKT87)

4-2-2 MKT110 について

[形態的特徴]

コロニー形態については、Marine 2216 寒天培地上、23℃で 3~5 日培養すると、薄く広がる無色のコロニーを形成した。細胞形態は桿状で、細胞の大きさは、短径 $0.4\sim0.6\mu\text{m}$ × 長径 $1.8\sim2.2\mu\text{m}$ であった。1000 倍の光学顕微鏡では、細胞内に顆粒状のものが 2 つ観察された。運動性は確認されなかった。

[生理・生化学的特徴]

ガスパックによる、嫌気性試験の結果は、いずれも陰性であった。カタラーゼ活性は、陽性を示した。バイオテストによる各種の生理的性状については、表 4-6 にまとめた。

[化学分類学的特徴]

キノン分子種は、キノン Q9, Q8 が確認され、その比率は概ね 8 : 2 であった。G+C 含量は、49.4 mol% であった。脂肪酸は、16:1 ω 7c が 50% 以上を占め、16:0 は 16% 検出された。MIDI の結果を表 4-7 に示した。

表 4-6 MKT110 の生理性状試験

		MKT110
Production of	Oxidase	+
	Catalase	+
	β -Galactosidase	-
	Lysine decarboxylase	-
	Ornithine decarboxylase	-
Hydrolysis of	Gelatin	-
	Agar	-
	Arginine	-
	Aesculin	+
	Urea	+
Utilization of	Citrate	-
	Malonate	-
	Glucose	w
	Sucrose	w
	Xylose	w
	Mannose	-
	Mannitol	w
	Arabinose	-
	Fructose	w
	Maltose	-
	Rhamnose	-
	Sorbitol	-

表 4-7 MKT110 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.142	10:0 3OH	3.24
6.446	12:0 3OH	2.43
7.194	14:0	7.18
9.547	16:1 ISO I	3.30
10.099	16:1 ω 7c	55.89
10.401	16:0	16.39
13.580	18:1 ω 7c	10.66

4-2-3 MKT95 について

[形態的特徴]

細胞形態は球～短桿状で、細胞の大きさは、短径 $0.9\sim 1.2\mu\text{m}$ × 長径 $1.0\sim 1.3\mu\text{m}$ であった。コロニー形態については、Marine 2216 寒天培地上、 23°C で 3～5 日培養すると、コロニー中央部が周辺部より数ミリ盛り上がる、無色のコロニーを形成した。しかし、継代培養を繰り返すうちに、その特徴的なコロニーは観察されなくなり、無色の円形のコロニーを形成するようになった。運動性が確認された。

[生理・生化学的特徴]

ガスパックによる、嫌気性試験の結果は、いずれも陰性であった。カタラーゼ活性は、陽性を示した。NaCl 0%では、生育が確認されなかった。バイオテストによる各種の生理的性状については、表 4-8 にまとめた。

[化学分類学的特徴]

キノン分子種は、キノン Q10 が認められた。G+C 含量は、62.5 mol% であった。脂肪酸は、 $18:1\omega 7c$ が 80%以上を占めた。MIDI の結果を表 4-9 に示した。

[*puf* 遺伝子の PCR] (図 4-8～図 4-13)

puf 遺伝子 PCR のためのプライマー組み合わせとして、*pufL* 1F / *pufL* 3R, *pufL* 1F / *pufL* 4R, *pufM* 1F / *pufM* 3R, *pufM* 1F / *pufM* 4R, *pufM* 2F / *pufM* 4R, *pufL* 1F / *pufM* 4R のいずれの場合も、PCR 産物は認められなかった。

表 4-8 MKT95 の生理性状試験

		MKT95
Production of	Oxidase	+
	Catalase	+
	β -Galactosidase	-
	Lysine decarboxylase	w
	Ornithine decarboxylase	w
Hydrolysis of	Gelatin	+
	Agar	-
	Arginine	+
	Aesculin	-
	Urea	-
Utilization of	Citrate	+
	Malonate	w
	Glucose	+
	Sucrose	+
	Xylose	+
	Mannose	w
	Mannitol	w
	Arabinose	w
	Fructose	w
	Maltose	w
	Rhamnose	w
	Sorbitol	-

表 4-9 MKT95 脂肪酸組成

Retention Time	Peak Name	Percent
4.141	10:0 3OH	1.68
4.488	unknown	2.83
6.447	12:0 3OH	2.70
10.402	16:0	4.15
12.543	16:0 2OH	3.70
13.586	18:1 ω 7c	81.68

4-2-4 MKT84,94 について

[形態的特徴]

コロニー形態については、2 株ともに、Marine 2216 寒天培地上、23℃で 3~5 日培養すると、なめらかな表面の緑茶色、円形のコロニーを形成し、その質感は、スライム状であった。この緑茶色は、培養条件によっては、脱色することも観察された（図 4-14）。細胞形態は 2 株ともに長めの桿状で、細胞の大きさは、短径 $0.7 \sim 0.9 \mu\text{m}$ × 長径 $3.5 \sim 4.0 \mu\text{m}$ であった。運動性は確認されなかった。

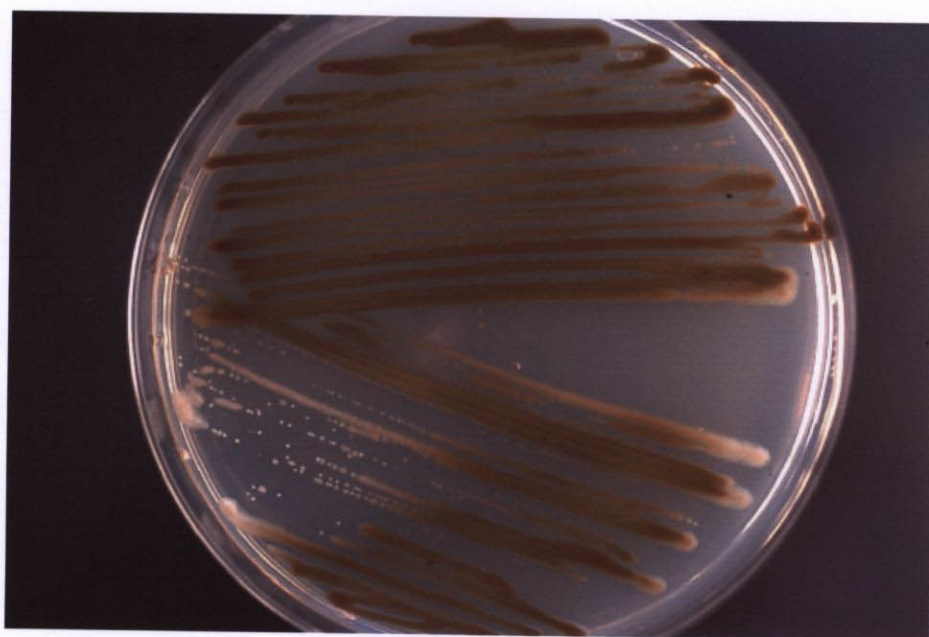


図 4-14 Marine 2216 培地上に生育した MKT84

[生理・生化学的特徴]

ガスパックによる、嫌気性試験の結果は、いずれも陰性であった。カタラーゼ活性は、いずれも陽性を示した。NaCl 0%では、2 株とも生育が確認されなかった。バイオテストによる各種の生理的性状については、表 4-10 にまとめた。MKT84 と MKT94 は、他の性状は一致したが、オキシダーゼの生産性について、MKT84 が陰性、MKT94 が陽性を示し、ゼラチンの加水分解性では MKT84 が陰性、MKT94 が陽性、そしてマンノースの利用性では MKT84 が陽性、MKT94 が陰性を示した。

[化学分類学的特徴]

キノン分子種は、いずれもキノン Q10 が認められた。G+C 含量は、MKT84 が 52.7 mol%で、MKT94 が 52.0 mol%であった。主な脂肪酸は、MKT84 では、18:1 ω 7c が 78.6%であり、MKT94 でも、18:1 ω 7c が 77.4%を占めた。一方、割り合いは 10%以下ではあったが、19:0 CYCLO ω 8c が、MKT84 では、6.9%、MKT94 では 8.9%検出された。MIDI の結果を表 4-11,12 に示した。

[*puf* 遺伝子の PCR] (図 4-8～図 4-13)

puf 遺伝子 PCR のためのプライマー組み合わせとして、*pufM* 1F / *pufM* 3R, *pufM* 1F / *pufM* 4R では、MKT84, 94 とともに目的の大きさのバンドが確認されたが、それ以外にも複数のバンドが同時にみられた。また、*pufL* 1F / *pufM* 4R の組み合わせでは、MKT84 については、目的の大きさのバンドが確認されたが、それ以外にも複数のバンドが同時にみられた。一方、MKT94 では複数のバンドが見られたが、目的のバンドは確認できなかった。*pufL* 1F

/ *pufL* 3R, *pufL* 1F / *pufL* 4R, *pufM* 2F / *pufM* 4R の場合は、MKT84,
94 いずれにも PCR 産物は認められなかった。

表 4-10 MKT84, 94 の生理性状試験

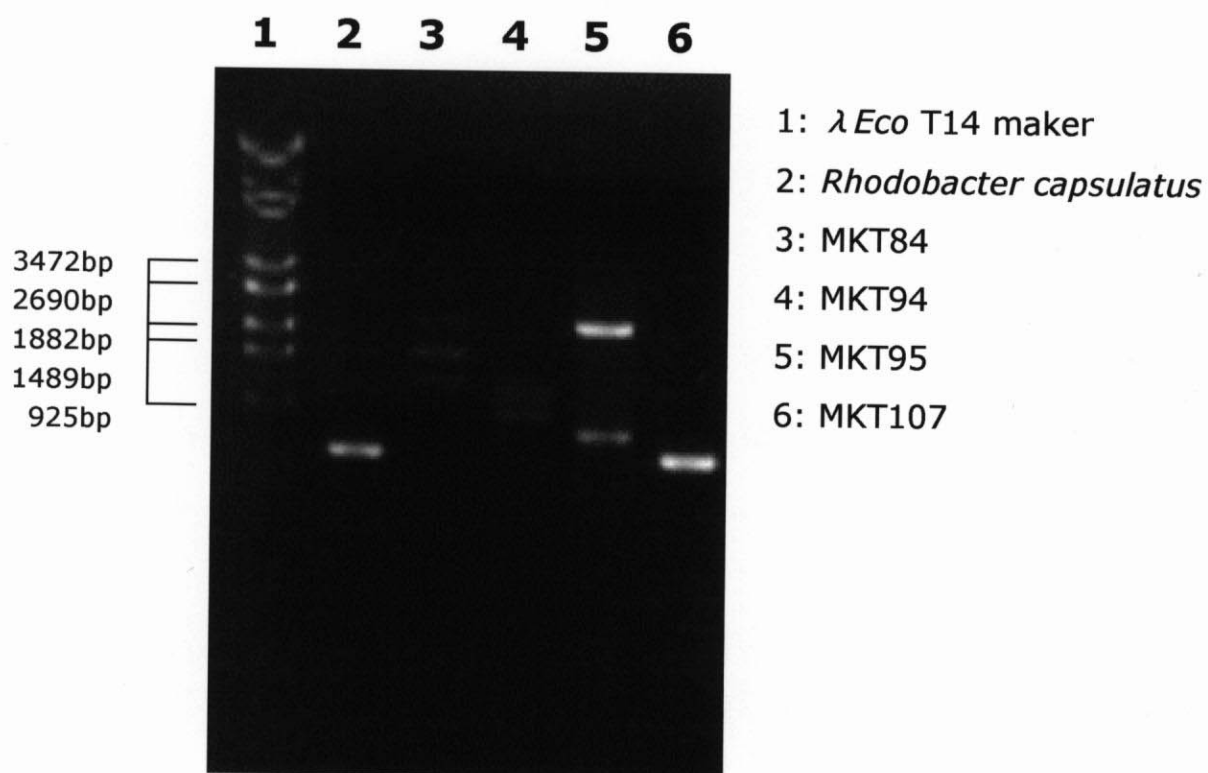
		MKT84	MKT94
Production of	Oxidase	-	+
	Catalase	+	+
	β -Galactosidase	+	+
	Lysine decarboxylase	-	-
	Ornithine decarboxylase	-	-
Hydrolysis of	Gelatin	-	+
	Agar	-	-
	Arginine	-	-
	Aesculin	-	-
	Urea	-	-
Utilization of	Citrate	-	-
	Malonate	-	-
	Glucose	+	+
	Sucrose	-	-
	Xylose	-	-
	Mannose	+	-
	Mannitol	-	-
	Arabinose	w	w
	Fructose	-	-
	Maltose	+	+
	Rhamnose	-	-
	Sorbitol	-	-

表 4-11 MKT84 脂肪酸組成

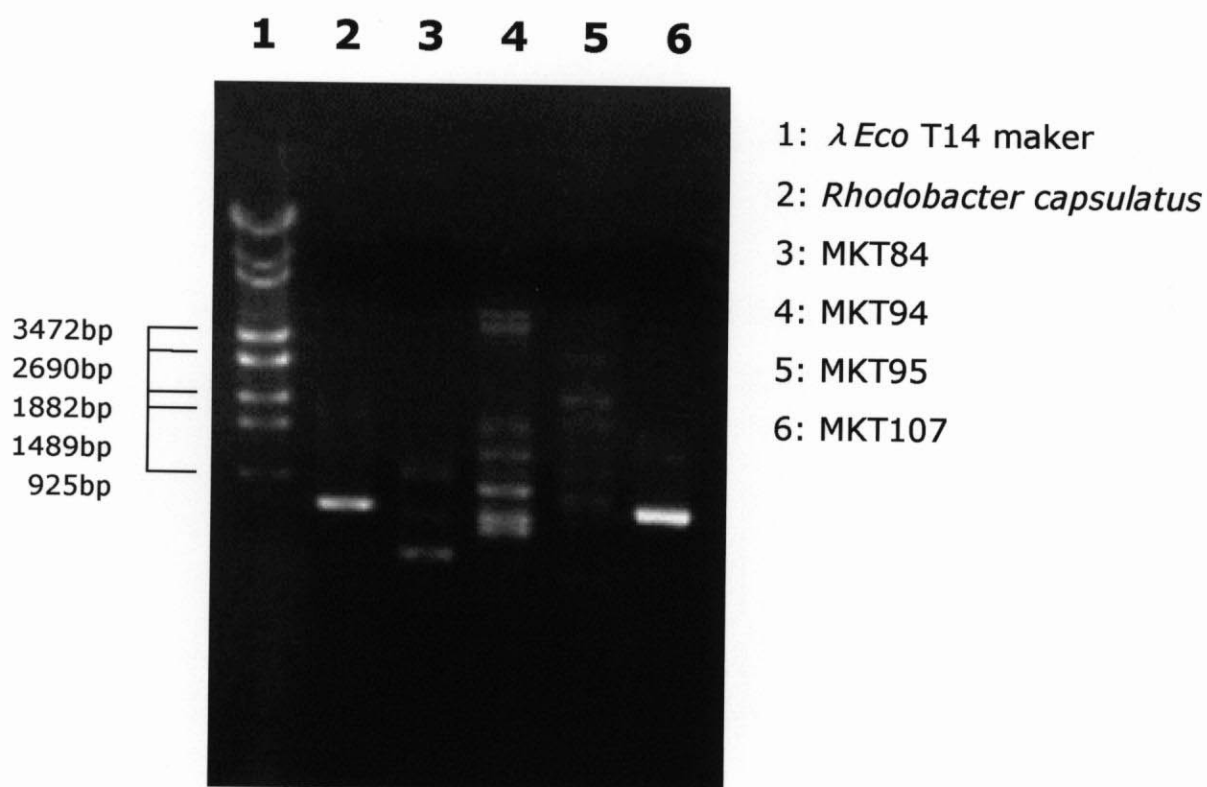
Retention Time	Peak Name	Percent
9.549	16:1 ISO I	1.89
10.100	16:1 ω 7c	1.65
10.402	16:0	3.61
13.586	18:1 ω 7c	78.58
13.849	18:0	1.63
15.474	19:0 CYCLO ω 8C	6.90

表 4-12 MKT94 脂肪酸組成

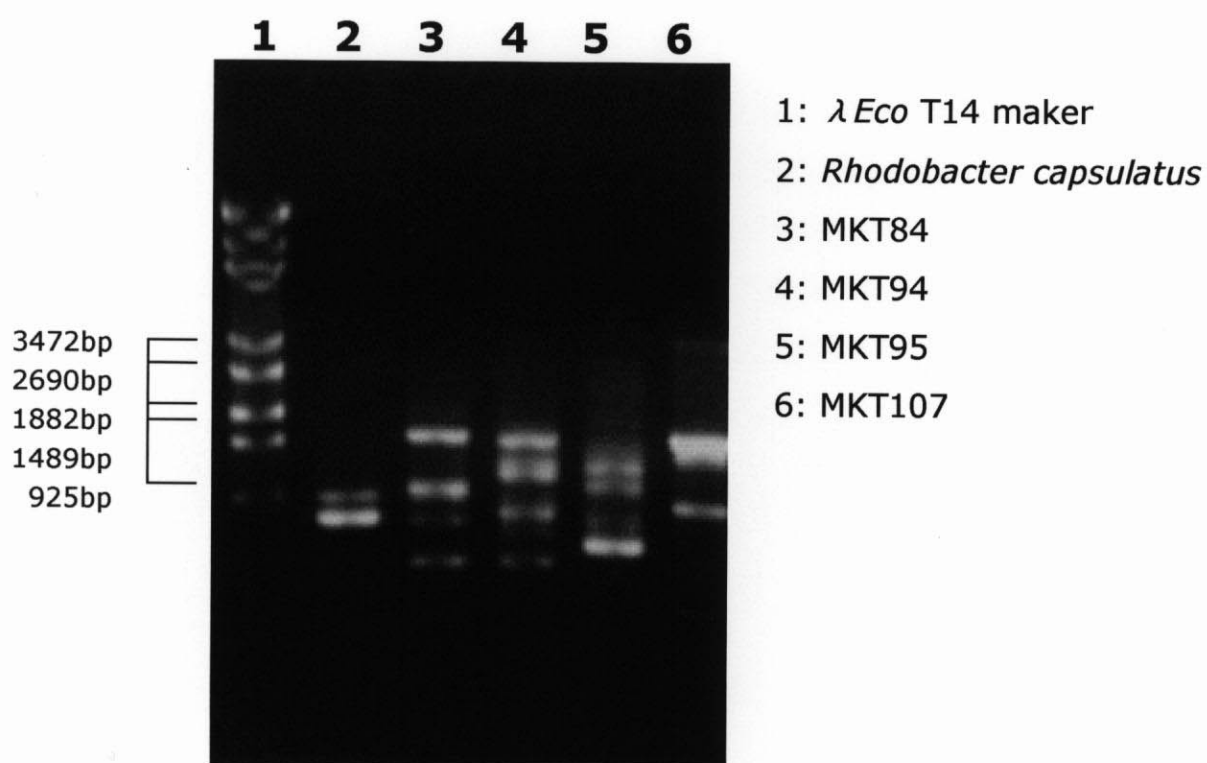
Retention Time	Peak Name	Percent
9.547	16:1 ISO I	2.10
10.100	16:1 ω 7c	1.72
10.402	16:0	3.51
13.588	18:1 ω 7c	77.35
13.894	18:0	1.44
15.474	19:0 CYCLO ω 8C	8.88



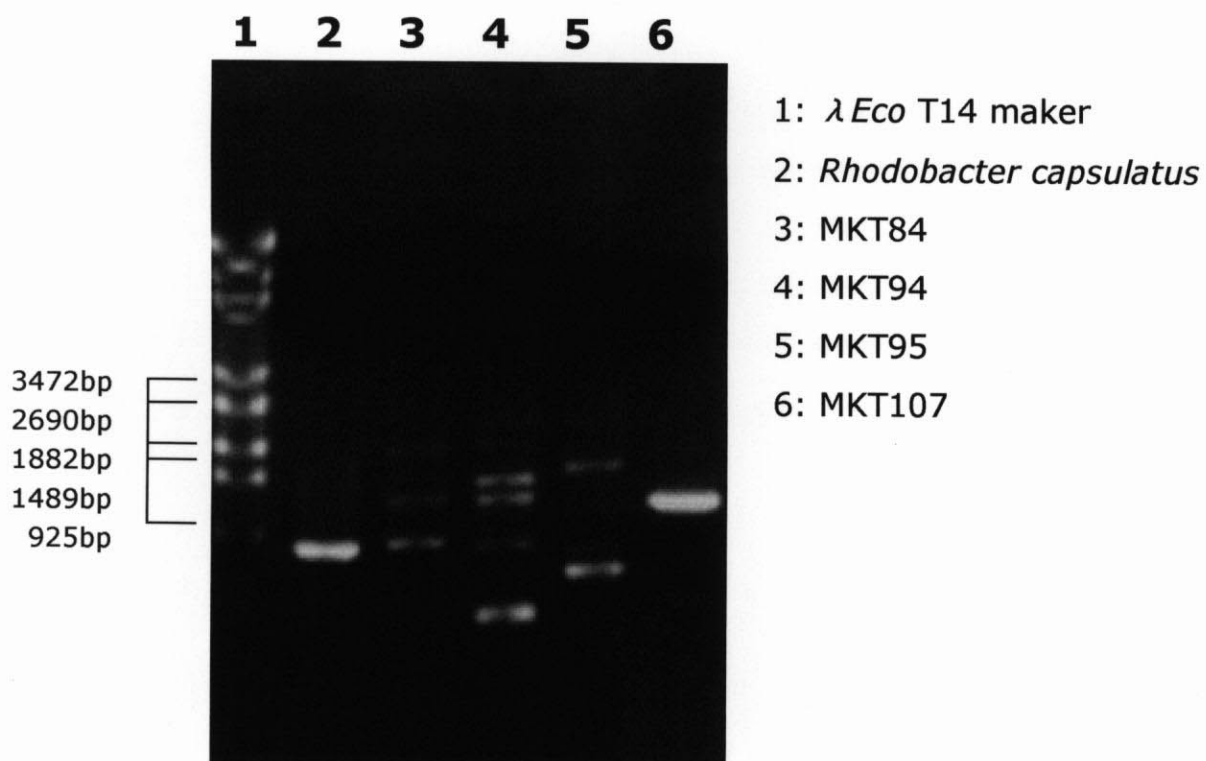
☒ 4-8 *pufL* 1F / *pufL* 3R : 611 bp



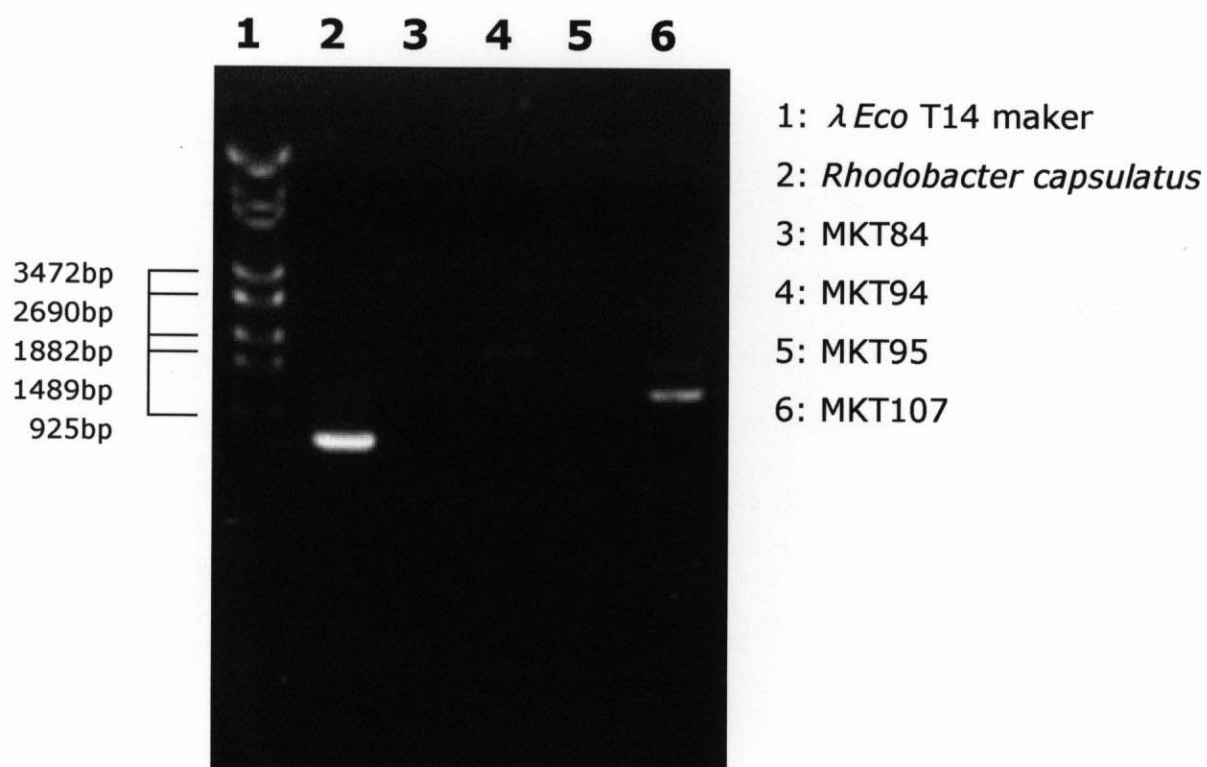
☒ 4-9 *pufL* 1F / *pufL* 4R : 735 bp



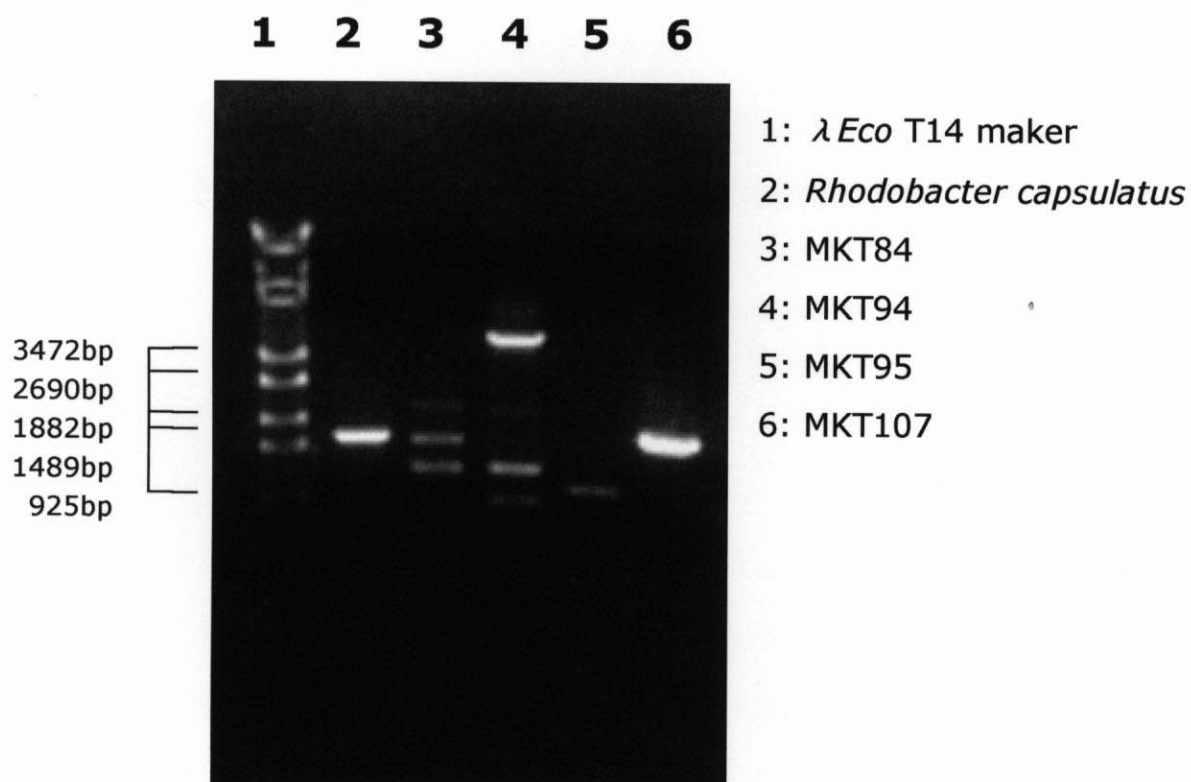
☒ 4-10 *pufM* 1F / *pufM* 3R : 770 bp



☒ 4-11 *pufM* 1F / *pufM* 4R : 888 bp



☒ 4-12 *pufM* 2F / *pufM* 4R : 753bp



☒ 4-13 *pufL* 1F / *pufM* 4R : 1663 bp

[*puf* 遺伝子探索結果のまとめ]

puf 遺伝子の PCR の結果を、図 4-8 ～ 図 4-13 に、電気泳動像で示した。プライマーとして、*pufL* 1F と *pufL* 3R を用いた結果を、図 4-8 に示した。*pufL* 1F と *pufL* 3R 間の塩基数は 611bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドは 1 本のみが認められ、その大きさは、マーカーと比較して適切であった。また、MKT107 の PCR バンドも 1 本のみが認められ、大きさもそれと等しかった。

プライマーとして、*pufL* 1F と *pufL* 4R を用いた結果を、図 4-9 に示した。*pufL* 1F と *pufL* 4R 間の塩基数は 735bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドは 1 本のみで、その大きさは、マーカーと比較して適切であった。また、MKT107 の PCR バンドも 1 本のみが認められ、大きさもそれと等しかった。

プライマーとして、*pufM* 1F と *pufM* 3R を用いた結果を、図 4-10 に示した。*pufM* 1F と *pufM* 3R 間の塩基数は 770bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドの大きさは、マーカーと比較して適切であった。しかし、それよりやや大きい 1000bp 程度の PCR バンドも認められた。また、MKT84, 94, 107 にも 770bp 程度の PCR バンドがみられたが、それ以外にも複数の PCR バンドがみられた。

プライマーとして、*pufM* 1F と *pufM* 4R を用いた結果を、図 4-11 に示した。*pufM* 1F と *pufM* 4R 間の塩基数は 888bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドは 1 本のみが認められ、その大きさは、マーカーと比較して適切であった。MKT84, 94, にも 888bp 程度の PCR バンドがみられたが、それ以外の大きさの PCR バンドも複数みられた。

プライマーとして、*pufM* 2F と *pufM* 4R を用いた結果を、図 4-12

に示した。*pufM* 2F と *pufM* 4R 間の塩基数は 753bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドは 1 本のみが認められ、その大きさは、マーカーと比較して適切であった。この大きさの PCR バンドは、他の株には認められなかった。

プライマーとして、*pufL* 1F と *pufM* 4R を用いた結果を、図 4-13 に示した。*pufM* 1F と *pufM* 4R 間の塩基数は 1663bp であり、*Rodobacter capsulatus* の PCR バンドは 1 本のみが認められ、その大きさは、マーカーと比較して適切であった。MKT84, 107, にも 1663bp 程度の PCR バンドがみられた。MKT84 には、それ以外の大きさの PCR バンドも複数みられたが、MKT107 は、1 バンドのみ認められた。

第3節 考察

新属 *Algivora* の提唱

MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 は、科、門レベルで異なる生物種から分離されたにもかかわらず、16S rDNA 塩基配列では高い相同性を示し、DNA-DNA の相同性値も 75.6%を示した。DNA-DNA 相同性値については、「種は 70% あるいはそれ以上の DNA 相同性値がある菌株を含む」と、国際細菌分類命名委員会の特別部会（1987）で定義がされていることから、これら MKT の 6 株は、同種であると考えられる。一方、この 6 株について 16S rDNA 塩基配列比較によって、その遺伝学的な距離を近縁種と比較してみると、最も近縁と考えられる種 *Alteromonas macleodii* でもその相同性は 90.8%に過ぎなかった。*Alteromonas* は Baumann ら(1972) によって提唱され、その後その種の数が増加していったが、細菌分類学に分子遺伝学的手法が導入されるようになってから、Gauthier ら(1995)によって再分類され、現在は、*Alteromonas macleodii* 1 種よりなる。また、系統樹上では、*Glaciecola* とも単系統群を形成した。*Glaciecola* もやはり、Baumann ら(1998) によって提唱された属であり、大西洋の海水から分離された細菌である。3 属の特徴と相違点を表 4-12 にまとめた。コロニーの色については、MKT が白、*A. macleodii* が無色、*Glaciecola* が赤紫または薄いピンク色という相違があった。生育温度では、*Glaciecola* の分離源が海水であったことから生育温度が低く、25℃以上で生育できない点が、MKT 株との相違である。また、*A. macleodii* は耐塩性があり、NaCl 10%以上で生育できるが、MKT 株では、生育が確認されなかった。MKT 株は、寒天を液状化することが大きな特徴であるが、この性状は *A. macleodii*、*Glaciecola* のいずれにも認められておらず、それに反して *A. macleodii* は

ゼラチンを分解するが、MKT 株はゼラチンを分解しなかった。G+C 含量については、*A. macleodii* が 42 mol%、*Glaciecola* が 39~46 mol%であるのと比較して、MKT 株は 49~50 mol% であり、多少高めであった。これらの相違と分子遺伝学的な隔たりがある一方で、主な脂肪酸組成が、*A. macleodii*, *Glaciecol*, MKT 株のいずれも 16:1 ω 7c と 16:0 であったことは、興味深い。以上のことから、MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 に対して新属 *Algivora* を提唱する。

表 4-12 MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 と近縁属との比較

MKT		A. macleodii		Glaciecola
Known habitats	marine creature	seawater	sea ice	
Pigmentation	White	None		Pink-red or pale pink
Cellular morphology	Curved or straight rods	Straight rods		Curved or straight rods, spiral
Flagella	polar, single	polar, single		(motile)
Growth with 10% NaCl	-	+		-
Salt requirement	+	+		+
Facultatively anaerobic	-	-		-
Growth temperature	Mesophilic	Mesophilic		Psychrophilic, No growth at 25°C
Production of :				
Oxidase	+	+		+
Catalase	+	+		+
β -Galactosidase	+	ND		+
Lysine decarboxylase	-	ND		-
Ornithine decarboxylase	-	ND		-
Hydrolysis of :				
Gelatin	-	+		-
Agar	+	-		-
Arginine	-	V		-
Aesculin	+	ND		V
Urea	-	ND		V
Utilization of :				
Citrate	-	-		-
Malonate	-	ND		-
Glucose	+	+		-
Sucrose	-	+		-
Xylose	+	+		-
Mannose	-	-		-
Mannitol	+	+		-
Arabinose	-	-		-
Fructose	V	+		-
Maltose	+	+		-
Rhamnose	-	-		-
Sorbitol	-	-		-
G+C content (mol%)		49-50	42	39~46
Major fatty acid		16:1 ω 7c, 16:0	16:1 ω 7c, 16:0	16:1 ω 7c, 16:0
16S rDNA distance (%) to MKT		100	91	87~89

以下に新属 *Algivora* を提唱し、*Algivora alubs* sp.nov. を記載する。

Description of *Algivora* gen. nov.

Algivora (Al.gi.vora. L. fem. n. *alga* seaweed; L. v. *vorare* to devour; L. *Algivora* seaweed devouring).

Gram-negative, strictly aerobic and agarlytic bacteria. Cell are rod-shaped and approximately 1.5~1.9 μ m long and 0.7~0.9 μ m wide. They do not form spores and are motile by single polar flagella. No growth without NaCl. Mesophilic. The isolate exhibit oxidase, catalase and β - Galactosidase activity. On the other hand the activity of lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase are not detected. Hydrolysis of agar and aesculin are observed, but hydrolysis of gelatin, arginine and urea are not observed. The major quinone is ubiquinone 8. The predominant cellular fatty acids are saturated and monounsaturated straight-chain fatty acid. The genus is affiliated to the γ -*Proteobacteria* and contains one species, *Algivora alubs*, which is the type species.

Description of *Algivora alubs* sp. nov.

Algivora alubs (alu'vus. L. adj. *alubs* white).

In addition to the characteristics that define the genus, it has the characteristics described below. Strains grow on Marine 2216, and possess colonies which are smooth surface and thin, circular in shape and white color. The strains utilizes glucose, xylose, mannitol,

fructose and maltose, to the contrary they do not utilize citrate, malonate, sucrose, mannose, arabinose, rhamnose and sorbitol. The major fatty acids are 16:1 ω 7c, 16:0, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 6c. The G+C content of the DNA is 49.5 mol%. Isolated from marine mollusca *Onchidium verruculatum*.

新属 *Cochlicola* の提唱

16S rDNA による系統樹において、MKT110 は、*Pseudomonas* 属と *Marinobacter* 属と単系統群を形成した。*Pseudomona* 属は、Migula (1894) によって提唱され、系統的にはまとまっていない 100 以上の種を含んでいた (Palleroni, 1984., Skerman ら, 1989)。その後分子遺伝学的な手法も取り入れられて、徐々に再分類され整理されつつある (Boivin-Jahns ら, 1995., Wilson ら, 1996., Anzai ら, 1997., Whyte ら, 1997., Behrendt ら, 1999.)。しかし、現在においてもいまだ 71 種類が属したままになっており、そのなかには誤分類と考えられるものも少なくない (Nguyen ら, 1999)。したがって、これらのすべての *Pseudomonas* と MKT 株との表現形質を比較して分類することは、あまり適当ではないと判断した。16S rDNA 塩基配列に基づく相同性において MKT110 は、*Pseudomonas andersonii* と最も相同性が高かったが、それでもその値は 90.2%に過ぎず、*Pseudomonas* 属のタイプ種である *Pseudomonas aeruginosa* との相同性値は、90.1%であった。この数値は、MKT110 株と *Pseudomonas* とは分子遺伝学的に、別属に属することを意味している。一方、*Marinobacter* 属は、Gauthier ら (1992) によって提唱された属である。16S rDNA 塩基配列に基づく相同性において MKT110 との相同性は、89.4%であり分子遺伝学的に、別属に属することを意味している。また、この属の特徴は、20%NaCl でも生育できることであり、この点において、MKT110 株とはっきりと区別できる。以上のことから、MKT110 に対して新属 *Cochlicola* を提唱する。

以下に新属 *Cochlicola* を提唱し、*Cochlicola tenuis* sp.nov. を記載する。

Description of *Cochlicola* gen. nov.

Cochlicola (Cochi.li.co'la. L. n. *cochlos* conch, snail; L. n. *incola* inhabitant, dweller; L. fem. n. *Cochlicola* sanil-dweller).

Gram-negative, strictly aerobic bacteria. Cell are rod-shaped and approximately 1.8~2.2 μ m long and 0.4~0.6 μ m wide. They do not form spores and are not motile. No growth without NaCl. Mesophilic. The isolate exhibit oxidase, catalase activity. On the other hand the activity of β - Galactosidase, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase are not detected. Hydrolysis of aesculin and urea are observed, but hydrolysis of gelatin, agar and arginine are not observed. The major quinone is ubiquinone 9 and the minor qinone is ubiquinone 8. The predominant cellular fatty acids are saturated and monounsaturated straight-chain fatty acid. The genus is affiliated to the γ -*Proteobacteria* and contains one species, *Cochlicola tenuis*, which is the type species.

Description of *Cochlicola tenuis* sp. nov.

Cochlicola tenuis (te'nu.is. L. adj. *Tenuis* thin).

In addition to the characteristics that define the genus, it has the characteristics described below. Strains grow on Marine 2216, and possess colonies wich are smooth surface and very thin, circular in shape and none color. Growth is weak on glucose, sucrose, xylose,

mannitol and fructose. They do not utilize citrate, malonate, mannose, arabinose, maltose, and rhamnose and sorbitol. The major fatty acids are 16:1 ω 7c, 16:0. The G+C content of the DNA is 49.4 mol%. Isolated from marine mollusca *Elysia ornata*.

新属 *Glossomonas* の提唱

MKT95 は、系統樹上で [*Ruegeria*] *algicola* (square brackets indicate a misclassified organism), [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と単系統群を形成した。 [*Ruegeria*] *algicola* は、Uchino ら (1998) によって [*Roseobacter*] *algicola* から [*Ruegeria*] *algicola* へ移行された種であるが、もとは、渦鞭毛藻から分離され Lafay ら (1995) によって *Roseobacter* 属の新種として報告された株である。また、 [*Roseobacter*] *gallaeciensis* は、ホタテ貝 *Pecten maximus* から分離され Ruiz-Ponte ら (1998) によって *Roseobacter* 属の新種として報告された株である。その報告のデータと MKT95 について本研究で得られた結果を比較した (表 4-13)。 [*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* は、明らかに *Roseobacter litoralis*, *Roseobacter denitrificans* とその表現形質において隔たりがある。そしてそのいくつかの形質は、むしろ MKT95 と共有されていた。細胞形態は、 *Roseobacter litoralis*, *Roseobacter denitrificans* が桿状または短桿状であるのに対して、 [*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と MKT95 は、短桿状であった。コロニー色は、 *Roseobacter litoralis*, *Roseobacter denitrificans* がピンクから赤であるのに対して、 [*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と MKT95 は、無色または茶色であった。そして生育温度に関しては、 *Roseobacter litoralis*, *Roseobacter denitrificans* が 4℃で生育するが 37℃では生育しないのに対して、 [*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と MKT95 は、4℃で生育しなかったが 37℃では生育した。また、マルトース、スクロースの利用性の点に関しても、この両者は明らかに正反対の結果であった。そして、バクテリオクロロフィル *a* の生産に関しては、 *Roseobacter litoralis*,

Roseobacter denitrificans が生産するのに対して、[*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* は生産しない。一方、MKT95 では、バクテリオクロロフィル *a* の生産に関しての実験は行っていないが、そのコロニー色が無色であったこと、また、PCR による光合成細菌の光反応中心複合体タンパク質の L, M サブユニットをコードする遺伝子 (*pufL*, *pufM*) 探索の結果、それが見つからなかったこと (図 4-8~図 4-13) から、MKT95 もバクテリオクロロフィル *a* を持っていないと推測される。以上のことを総合評価して、[*Ruegeria*] *algicola*, [*Roseobacter*] *gallaeciensis* と MKT95 をまとめて新属 *Glossomonas* を提唱する。

表 4-13 MKT95 と近縁属との比較

	MKT95	[<i>Rugeria</i>](<i>Roseobacter</i>) <i>algicola</i> ATCC 51440T	[<i>Roseobacter</i>] <i>gallaeciensis</i> BS107T	<i>Roseobacter</i> <i>litoralis</i> ATCC 4956T	<i>Roseobacter</i> <i>denitrificans</i> ATCC 33942T
Cell shape	Ovoid rods	Ovoid rods	Ovoid rods	Rods or ovoid rods	Rods or ovoid rods
Colony pigmentation	None	None or brown	Brown	Pink to red	Pink to red
Growth at 4°C	-	-	-	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	-	-
Hydrolysis of:					
Tween80	ND	-	-	+	+
Gelatin	+	+	-	+	+
Requirement for nicotinic acid	ND	-	-	+	+
Utilization of carbon sources:					
Maltose	w	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	-	-
Trehalose	ND	+	+	-	-
Citrate	+	+	-	+	+
Production of bacteriochlorophyll <i>a</i>	(-)	-	-	+	+
G+C content (mol%)	62.5	60	57.6-58.0	56-58.8	59.6

Data of *Roseobacter* from references.
w; weakly positive reaction
ND, not determined.

以下に新属 *Glossomonas* を提唱し、*Glossomonas montanus* sp.nov. を記載する。

Description of *Glossomonas* gen. nov.

Glossomonas (Glo'.sso.monas. Gr. *glosso* tongue; Gr. fem. n. *monas* a unit, mond; M. L. fem. n. *Glossomonas* tongue monad).

Gram-negative, strictly aerobic bacteria. Cell are rod or cocci-shaped and approximately 1.0~1.3 μ m long and 0.9~1.2 μ m wide. They do not form spores and are motile. No growth without NaCl. Mesophilic. The isolate exhibit oxidase, catalase activity. Lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase weakly activities are detected. The activity of β - Galactosidase are not detected. Hydrolysis of gelatin and arginine are observed, but hydrolysis of agar, aesculin and urea are not observed. The major quinone is ubiquinone 10. The predominant cellular fatty acids are saturated and monounsaturated straight-chain fatty acid. The genus is affiliated to the α -*Proteobacteria* and contains three species, *Glossomonas montanus*, which is the type species.

Description of *Glossomonas montanus* sp. nov.

Glossomonas montanus (mon.ta'nus. L. adj. *montanus* mountainous).

In addition to the characteristics that define the genus, it has the characteristics described below. Strains grow on Marine 2216, and

possess colonies which are mountain like surface, circular in shape and none color. The strains utilizes citrate, glucose, sucrose, xylose. Growth is weak on malonate, mannose, mannitol, arabinose, fructose, maltose, rhamnose. They do not utilize sorbitol. The major fatty acids are 18:1 ω 7c. The G+C content of the DNA is 62.5 mol%. Isolated from marine mollusca *Glossodoris pallida*.

新属 *Mucobacter* の提唱

MKT84, 94 は、系統樹上で *Stappia*, *Roseibium* と単系統群を形成した。*Stappia* は、Uchino ら (1998) によって、*Roseibium* は、Suzuki ら (2000) によって提唱された属であり、それらの記載データと MKT84, 94 について本研究で得られた結果を比較した (表 4-14)。第一に、この 3 属はコロニー色がそれぞれ異なっている。すなわち、MKT84,94 は、緑茶色であり、*Stappia* は無色、*Roseibium* はくすんだピンク色である。くすんだピンク色のコロニー色を示す *Roseibium* は、バクテリオクロロフィル *a* の存在が確認されており、無色の *Stappia* では、その存在は認められなかった。MKT84, 94 は PCR による光合成細菌の光反応中心複合体タンパク質の L, M サブユニットをコードする遺伝子 (*pufl*, *puflM*) 探索では、光合成遺伝子の存在に決着をつけることはできなかった。しかし、緑茶色のコロニー色は、バクテリオクロロフィル *a* の存在を強く示唆している。また、*Stappia* は、個々の細胞が星状に集合する性質を持つが、そのような特徴は MKT84, 94 には認められなかった。運動性は、*Stappia*, *Roseibium* では観察されているが、MKT84, 94 では観察されなかった。G+C 含量については、*Stappia* 59 mol%、*Roseibium* 57.6~63.4 mol%であったのに対して、MKT84, 94 は、それらより低い 52.0 mol%と 52.7 mol% であった。さらに、主な脂肪酸は、*Stappia*, *Roseibium*, MKT 株ともに 18:1 であったが、*Stappia* には 3-OH 14:0 が、また MKT84, 94 には、19:0 CYCLO ω 8C が特徴的な脂肪酸として認められた。以上のことを総合評価して、MKT84, 94 に対し、新属 *Mucobacter* を提唱する。

表 4-14 MKT84, 94 と近縁属との比較

	MKT84, 94	Stappia	Roseibium
Colony pigmentation	Brownish-green	None	Opaque and pink
Cell shape	Rods	Rods	Rods
Forming	Not aggregate	Star-shaped	Not aggregate
	aggregata forming		
Motility	-	+	+
Production of			
Catalage	+	+	+
Oxidase	v	+	+
G+C content (mol%)	52.0~52.7	59	57.6~63.4
Major fatty acid	18:1 ω7c	18:1 ω7c	18:1 ω7c
Characteristic fatty acid	19:0 CYCLO ω8C	3-OH 14:0	
16S rDNA distance (%) to MKT	100	94.7	94.2

v ; MKT84 -, MKT94 +

以下に新属 *Mucobacter* を提唱し、*Mucobacter olivaceus* sp.nov. を記載する。

Description of *Mucobacter* gen. nov.

Mucobacter (Mu.co.bac' ter. L. fem. adj. *Mucosa* slimy; N. L. *bacter* masc. Equivalent of Gr.neut. n. bakterion rod or staff; M. L. fem. n. *Mucobacter* slimy rod).

Gram-negative, strictly aerobic. Cell are rod-shaped and approximately 3.5~4.0 μ m long and 0.7~0.9 μ m wide. They do not form spores and are not motile. No growth without NaCl. Mesophilic. The isolate exhibit catalase and β -Galactosidase activity. On the other hand the activity of lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase are not detected. Hydrolysis of agar, arginine, aescelin and urea are not observed. The major quinone is ubiquinone 10. The predominant cellular fatty acids are saturated and monounsaturated straight-chain fatty acid. The genus is affiliated to the α -*Proteobacteria* and contains one species, *Mucobacter olivaceus*, which is the type species.

Description of *Mucobacter olivaceus* sp. nov.

Mucobacter olivaceus (Oliva.ce' us. L. adj. *Olivaceus* olive, olive-green).

In addition to the characteristics that define the genus, it has the characteristics described below. Strains grow on Marine 2216, and

possess colonies which are smooth surface and slimy, circular in shape and brownish green color. The strains utilizes glucose and maltose, to the contrary they do not utilize citrate, malonate, sucrose, xylose, mannitol, fructose, rhamnose and sorbitol. Growth is weak on arabinose. The major fatty acids are 18:1 ω 7c. The G+C content of the DNA is 52.0 mol%. Isolated from marine mollusca *Chromodoris tinctoria*.

第 5 章 総括

遺伝子解析が身近な手法となった今日、細菌分類学においては、かつてない非常な勢いで新規性の高い細菌が日々報告され、新しい分類群も増加の一途をたどっている。そのことを念頭に入れてもなお、海洋生物、とりわけ軟体動物後鰓類の内臓を細菌探索フィールドとした本実験における結果は、当初の予想をはるかに上回ったといえる。

本研究では、21 種類の海洋生物から、116 株の細菌を分離した。分離した細菌の 16S rDNA の部分塩基配列による相同性検索に基づいて解析した結果により、分離株には、*Proteobacteria* 74 株、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group 12 株、*Bacillu-Clostridium* group 2 株、*Actinobacteria* 2 株の細菌が含まれていることが判明した。さらに、その 116 株のうち、新属に属すると考えられる株が、17 株、含まれていることが明かとなった。そして、その 17 株に関しては、16S rDNA の全塩基配列を決定し、それを基に NJ 法によって作成した系統樹では、分離された 17 株が、*Alteromonas* group (8 株), *Rhodobacter* group (4 株), *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (5 株) の 3 つの細菌グループに所属し、それぞれのグループ内で新属を形成する可能性がより高まった。そして、そのうち、10 株に関しては、分子遺伝学的解析に加え、形態学的、生理生化学的、化学分類学的解析を行い、総合的に評価したうえで、4 新属、すなわち *Algivora*, *Cochlicola*, *Glossomonas*, *Mucobacter* を提唱した。

第 2 章の考察で、これらの結果を得た要因として、後鰓類の食性と生体防御についての可能性を示唆した。そして、第 4 章で詳細に分析した結果は、その推論をさらに裏付けた。MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 についてみる

と、16S rDNA の解析から、相互に非常に近縁であることがわかり、さらに分離した 6 つの MKT 株に共通する顕著な特徴として、寒天資化性があることがわかった。一方、その 6 株の分離源となった海洋生物は、軟体動物後鰓類のイソアワモチ *Onchidium verruculatum*、タツナミガイ *Dolabella auricularia*、軟体動物前鰓類のバテイラ *Omphalius pfeifferi*、種は未同定であるが原索動物のホヤであり、分離源生物は、全く別の種、目、門にまたがっていた。このことは、この 4 種類の海洋生物に共通する要因が存在していると考えられる。一般に後鰓類は、カイメン、コケムシ、群体ホヤ、サンゴ、ヒドロ虫などを専門とする肉食性の種が多い。しかし、これらのうち 3 種類の海洋生物の食性は、イソアワモチ、タツナミガイは、藻類食性であり、また、いわゆる巻貝であるバテイラも藻類食性である。藻類食性の海洋生物から、強い寒天資化性を有する細菌が分離されたことは、その海洋生物の消化作用に細菌が関わっていることを強く示唆している。

次ぎに、生体防御について考察した。海洋には、生物由来の毒素が多く存在することが知られている。そしてフグ毒として知られるテトロドトキシンが、実は *Vibrio* や *Pseudomonas* に由来していた事実も解明された。また、赤潮や魚介類の中毒が渦鞭毛藻に起因するという報告も多い。ところで、MKT95 は、[*Roseobacter*] *gallaeciensis*, [*Rugeria*] *algalicola* と近縁であり単系統群を形成することが、16S rDNA の塩基配列の解析より明かとなったが、[*Roseobacter*] *gallaeciensis* の分離源はホタテガイであり、[*Rugeria*] *algalicola* の分離源は、毒素生産性の渦鞭毛藻類である。一方、MKT95 は、軟体動物後鰓類であるシロタエウミウシ *Glossodoris pallida* から分離した。シロタエウミウシは、ウミウシを専門にした肉食性であり、また、Cryptotoxic animal として知られているように、体内に毒素を蓄積し

ている。その由来は、まだ明らかになっていなが、この毒素は、生体防御に役立っていると考えられており、また *Glossodoris pallida* と渦鞭毛藻類の関係についても報告されている (Avila ら、1997)。MKT95 の毒素生産性に関して本研究では触れなかったが、今後それらのことが明らかになれば、後鰓類の生体防御に細菌類が関わっているという推論をさらに進展させることができる。

以上、本研究より、海洋に棲息する生物の体内が、細菌群にとって大きな niche であることが明らかとなった。また、その多様性の高さも非常に高いことが示唆された。したがって今後、遺伝子資源として細菌探索を行う場合、海洋生物の体内は、その探索フィールドとして必須となるであろう。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導をいただきました本学分子細胞生物学研究所、横田明助教授に心より感謝申し上げます。

海洋生物の採集にあたり、御指導をいただきました本学海洋研究所、大和田紘一教授、ならびに本学理学部臨海実験所、関本先生および関藤先生には、深く御礼申し上げます。

電子顕微鏡観察にあたっては、本学分子細胞生物学研究所、平田愛子先生に御指導いただき、謝意を表します。

生化学物質の分析を行うにあたり、持田製薬の石川岳氏、ならびに製品評価技術基盤機構の福永幸代氏には、多大なる御協力をいただき、感謝の念にたえません。

また、本研究を進めていく過程で、終始、御協力と御激励をいただきました、本バイオリソース研究室の皆様、深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、夫、倉橋豊と母、神田ちよにおいは、研究生活全般にわたり惜しみない支援をいただきました。よって、ここに恙無く本論文を書き終えることができましたこと、心より感謝申し上げます。

参考文献

- Anzai, Y., Kudo, Y., Oyaizu, H. (1997).** The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 249-251
- Avila, C., V. J. Paul. (1997).** Chemical ecology of the nudibranch *Glossodoris pallida*: is the location of diet-derived metabolites important for defense? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **150**. 171-180.
- Aznar, R., Ludwig, W., and Shleifer KH. (1994).** Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 330-337.
- Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M., and Allen, R. D. (1972).** Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology.*, **110**, 402-429.
- Baumann, P., Sharee A. McCammon, Janelle L. Brown and Tom A. McMeekin. (1998).** *Glaciecola punicea* gen. nov., sp. nov. and *Glaciecola pallidula* gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 1213-1222.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W. and Seyfarth, W. (1999).** Taxonomic study of bacteria isolated from grasses: proposal of *Pseudomonas graminis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **49**, 297-308.
- Boivin-Jahns, V., Bianchi, A., Ruimy, R., Garcin, J., Daumas, S. and Christen, R. (1995).** Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl Environ Microbiol.*, **61**, 3400-3406.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., and Noller, H. F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4801-4805.

Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 224-229.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.

Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen., R. (1995). Phylogenetic analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genus coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 755-761.

Gauthier, M., LAFAY, B., CHRISTEN, R., FERNANDEZ L., ACQUAVIVA, M., BONIN, P. and BERTRAND, J. C. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 568-576.

Hiraishi, A. (1992). Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 210-213.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*,

16, 111-120.

Kolber, Z. S., Gerald Plumley, F., Lang, A. S., Thomas Beatty, J., Blankenship, R. E., VanDove, C L., Vetriani, C., Koblizek, M., Rathgeber, C. and Falkowski, P. G. (2001). Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*. **292**, 2492-2494.

Lafay, B., Ruimy, R., Rausch, C., Breittmayer, V, Gauthier, M. J. and Christen, R. (1995). *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellata *Prorocentrum lima*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 290-296.

Palleroni, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984, 237^{AL} (Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 237). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg. And J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.

Rodon, M. R., Goodman, R. M., and Handelsman, J. (1999). The Earth's bounty : assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in Biotechnol.*, **17**, 403-409.

Saito, H., and Miura, K. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.

Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. and Christen, R. (1998). *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 573-580.

Schleper, C., Holben, W., and Klenk, HP. (1997). Recovery of crenarchaeotal

ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 321-323.

Schulz, H. N., Brinkhoff, T., Ferdelman, T. G., Hernandez Marine, M., Teske, A. and Jorgensen, B. B. (1999). Dense population of a giant sulfur bacterium in namibian shelf sediments. *Science.*, **284**, 493-495.

Shiba, T. (1991). *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *System. Appl. Microbiol.*, **14**, 140-145.

Sugita, H., Kawasaki, J., Kumazawa, J. and Deguchi, Y. (1996). Production of amylase by the intestinal bacteria of Japanese coastal animals. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 174-178.

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 1639-1652.

Thompson, JD., Higgins, DG., Gibson, TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids res.*, **22**, 4673-4680.

Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A. and Sugiyama J. (1998). Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., comb. nov., *Ruegeria algicola* comb.

nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, **44**, 201-210.

Whyte, L. G., Bourbonniere, L. and Greer, C. W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrophilic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl Environ Microbiol.*, **63**, 3719-3151.

Wilson, A. E., Moore, E. R. and Mohn, W. W. (1996). Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sesquencing batch reactor. *Appl Environ Microbiol.*, **62**, 3146-3151.

Winogradsky., S. (1929). Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la degradation de la cellulose dans le sol. *Ann. Inst. Pasteur(Paris).*, **43**, 549-633.

ZoBell CE (1964). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.*, **10**, 1-49.

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成10年度博士課程 入学
氏 名 倉橋 みどり
指導教官名 横 田 明

論文題目 海洋生物に由来する細菌の系統分類学的研究

● 目的

近年、生物の種多様性に関する研究は、多方面から積極的に取り組まれている。環境中の DNA 断片を分析したり、蛍光プローブを用いるなど、培養によらない解析手法の発展にともない、その多様性が次々に明らかにされている。本研究では、未知領域の細菌を分離し、培養することを目的とする。分離、培養に重点を置いた主な理由は、遺伝子資源の確保にある。

現在、細菌の分離、培養は、大きく 2 つの方向からアプローチされている。ひとつは、生きているが培養困難な状態にある微生物を詳細に研究する事によって、VBNC (Viable but nonculturable) 状態から culturable な状態へ転換させる方法を開発しようとするものである。もう一つは、微生物の発見以来、多くの熱心な研究者たちによって膨大な数の細菌が記載されてきているが、人類がこれまで容易に接近することのできなかつた極限環境などから、新規性の高い細菌を探索していく方向である。しかし身近な環境は、本当に探索しつくしたのだろうか。そこで本研究では、身近な海洋生物の内臓を新規バクテリア探索のフロンティアと位置付け、その多様性を明らかにした。

● 方法

1998 年から 2000 年の間に、東京都、千葉県、神奈川県、静岡県において、磯採集とスキューバダイビングにより、分離源海洋生物として主に軟体動物をサンプリングした。取り出した内臓をホモジネートし、滅菌生理食塩水で希釈し菌液を得た。Marine 培地上、塗抹法にて、23℃で数日間培養し、コロニーを単離し、純粋培養化した。各菌株より DNA を抽出し、16S rDNA の後半約 500bp の部分塩基配列を決定し、相同性検索を行った。その結果、既知種との相同性が 95 % 以下の株を

選出し、16S rDNA の全塩基配列を決定した。その配列データを基に、多重アライメント計算を行い、NJ 法による系統樹を作成した。各株の新規性を明らかにするために、生理・生化学試験と化学分析を行った。生理・生化学試験は、菌液を調製した後、基質分解能や発育試験、糖類の資化性能を観察した。化学分析については、DNA 塩基組成、菌体脂肪酸組成、呼吸鎖キノン分子種の分析を行った。また、必要のある株については、DNA-DNA ハイブリダイゼーション検定も行った。

● 結果

21 種類の海洋生物から、116 株の細菌を分離した。分離した細菌の 16S rDNA の後半約 500bp の部分塩基配列による相同性検索に基づいて同定した結果、*Proteobacteria* 74 株、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group 12 株、*Bacillus/Clostridium* group 2 株、*Actinobacteri* 2 株であり、1 株は酵母の *Saccharomycotina* であった。16S rDNA の既知種との塩基配列相同性が 95%以下であったのは、116 株の分離株のうち 17 株であった。16S rDNA の塩基配列を基に、NJ 法によって作成した系統樹では、分離された 17 株は、*Alteromonas* group (8 株)、*Rhodobacter* group (4 株)、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (5 株)の 3 つの細菌グループにわけられた。

Alteromonas (γ -*Proteobacteria*) group (Fig.1)

MKT92 : *Thalassononas* との 16S rDNA の相同性は、94%であり、*Thalassononas* 属、*Colwellia* 属とクラスターを形成した。MKT92 に対して新属を提唱する。

MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 : この 6 株は、異なる種または同種の別個体の海洋生物から分離されたにもかかわらず、互いに非常に高い相同性を示した。この 6 株と、*Thalassononas* 属、*Glaciecola* 属、*Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属 との 16S rDNA の相同性は、89~91%であった。またこの 6 株で明らかに単系統群を形成した。MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 に対して新属を提唱する。

MKT110 : 16S rDNA の相同性は、*Pseudomonas andersonii* と 90%、*Marinobacter* 属と 89%であり、系統樹上でも、*Pseudomonas* 属、*Marinobacter* 属とクラスターを形成した。MKT110 に対して新属を提唱する。

Rhodobacter (α -*Proteobacteri*) group (Fig.2)

MKT107 : 16S rDNA の相同性は、[*Ruegeria*] *gelatinovorans*, *Sulfitobacter mediterraneu*, *Sulfitobacter pontiacus* のいずれとも 94%であった。系統樹上では、*Antarctobacter* 属、*Sagittula* 属とクラスターを形成した。MKT107 に対して新属を提唱する。

MKT95 : 16S rDNA の相同性は、[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *atlantica* のいずれとも 96%であったが、系統樹上では、[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *algicola* とクラスター形成した。[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *algicola* は誤分類と考えられるので、MKT95 とまとめて新属を提唱する。

MKT84, 94 : この 2 株は、異なる種の海洋生物から分離されたにもかかわらず、2 株間の 16S rDNA の相同性は 100% であった。近縁属との 16S rDNA の相同性は、[*Stappia*] *stellulatum* と [*Roseibium*] *denhamense* のいずれとも 94%であった。MKT89, 94 に対して新属を提唱する。

Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group (Fig.3)

MKT38 : *Gelidibacter algens* との 16S rDNA の相同性は、90%であった。一方、系統樹上では、*Zobellia* 属、[*Cytophaga*] 属とクラスターを形成した。MKT38 に対して新属を提唱する。

MKT93 : 16S rDNA の相同性は、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属いずれとも 94%であり、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属とクラスターを形成し。MKT93 に対して新属を提唱する。

MKT44 : [*Cytophaga*] *fermentans* との 16S rDNA の相同性は、96%であり、系統樹上でも[*Cytophaga*] *fermentans* とクラスターを形成した。[*Cytophaga*] *fermentans* は誤分類と考えられるので、MKT44 とまとめて新属を提唱する。

MKT111 : *Flammeovirga aprica* との 16S rDNA の相同性は、92%であり、系統樹上でも *Flammeovirga aprica* とクラスターを形成した。MKT111 に対して新属を提唱する。

MKT109 : *Persicobacter diffluens* との 16S rDNA の相同性は、91%であり、系統樹上でも *Persicobacter diffluens* とクラスターを形成した。MKT109 に対して新属を提唱する。

●まとめ

身近な海洋生物の内臓から、当初の予想を遥かに超える高率で新規性の高い株が分離され、このフィールドにおけるバクテリアの種多様性に関する分類学上の新たな知見が得られた。

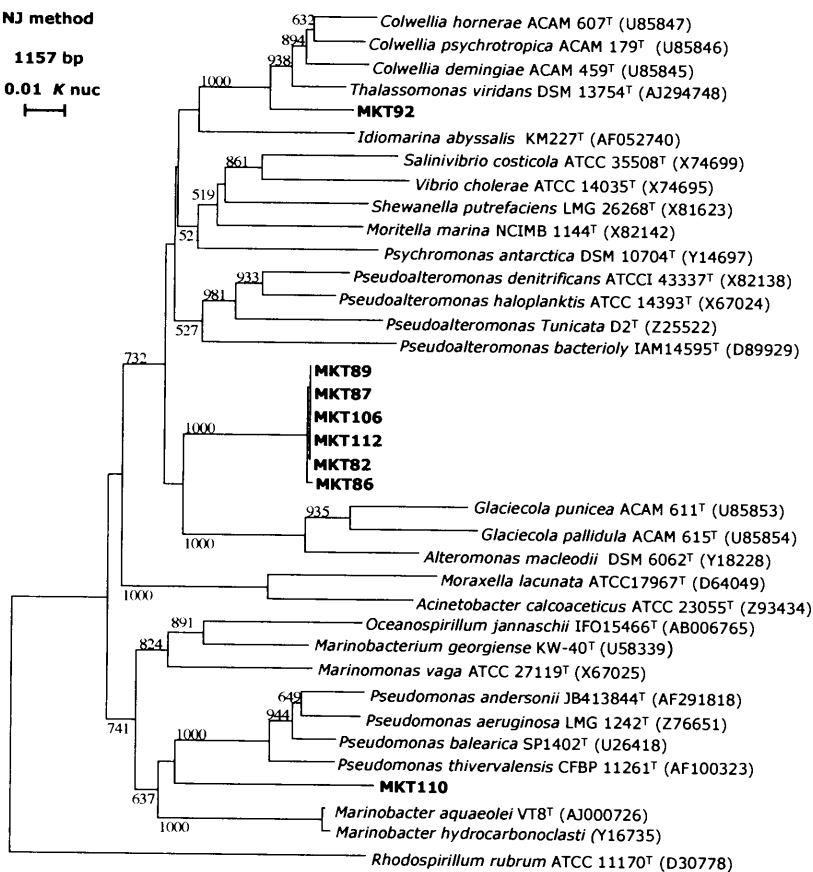


Fig. 1

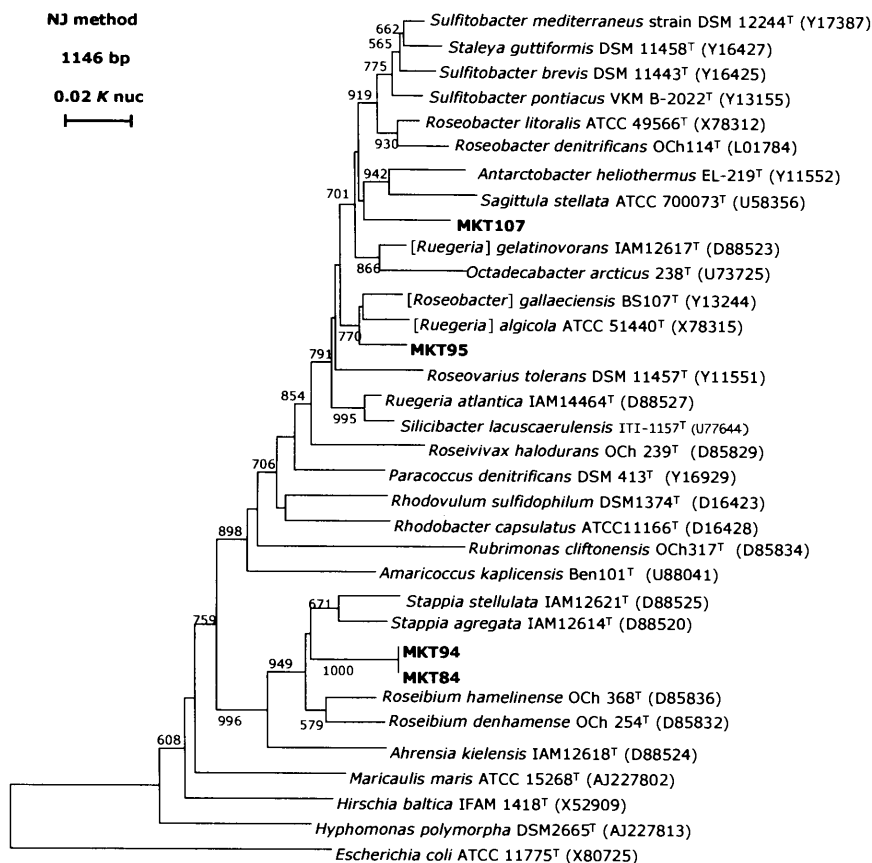


Fig.2

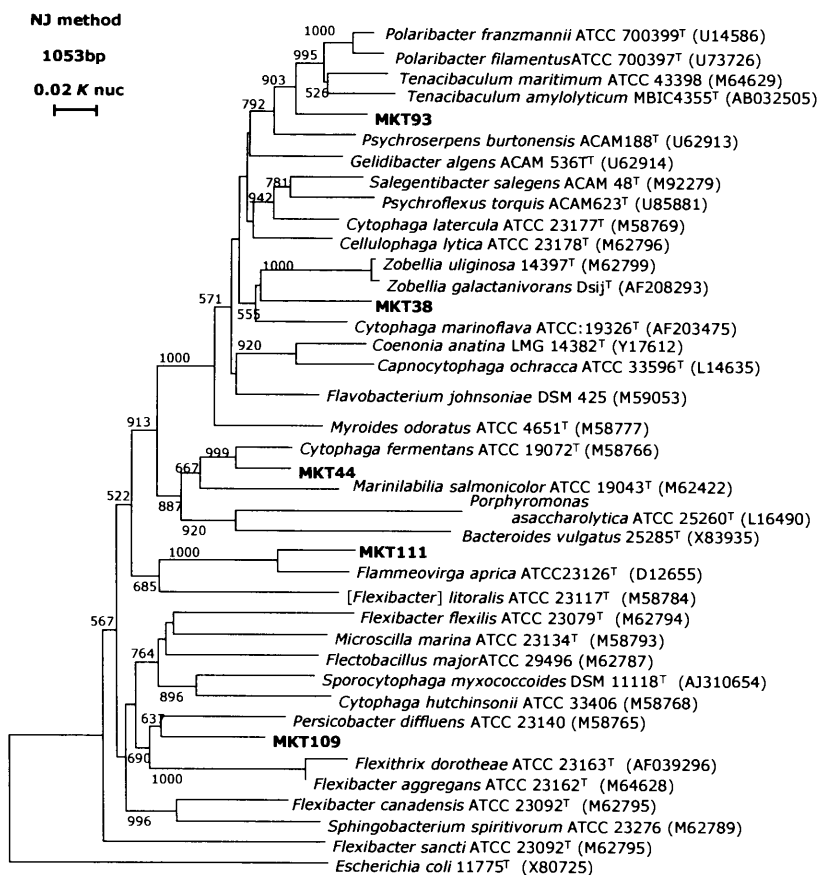


Fig.3