

海洋から単離された緑膿菌の系統的位置づけ

2006年3月 環境学専攻 自然環境コース 46737 和田 耕一郎

指導教官 木暮 一啓教授

キーワード；緑膿菌、系統解析

1. 研究背景

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は日和見感染や院内感染の原因菌としてしばしば大きな問題を起こす細菌である。またこの菌はその優れた適応能と遺伝的多様性により、土壌や淡水域、植物や動物など、幅広い生育環境を持っているが、海洋からの分離報告はない。

1995年、Tanoueらは外洋域にそのN末端アミノ酸配列が緑膿菌のPorinと一致するタンパクが分布することを発見し、海洋に緑膿菌が存在する可能性を示唆した。その後Kimataら(2004)、N. H. Khanら(2006, in press)は海洋から緑膿菌の単離に成功した。では海洋の緑膿菌はどのような起源を持ち、陸や淡水域、あるいは臨床分離株とどのような系統関係にあるのだろうか。本研究は、いくつかの遺伝子(16S rDNA, 23S rDNA, ITS1, *gyrB*, *oprD*, *mexB*, *fliC*)の塩基配列を比較することで海洋分離株の系統的位置づけを明らかにすることを目的とした。

2. 研究手法

東京大学海洋研究所研究船淡青丸 KT04-9次航海(2005年5月)において海水試料の採集を行った。海水をNucleoporeフィルター上で濾過後、それを選択培地上で培養し、分離した。16S rDNAの塩基配列によって緑膿菌と同定された株から、DNeasyキット(QuiaGen)を用いてDNA抽出を行った。DNA抽出物をテンプレートDNAとして対象遺伝子のプライマー(16S rDNA, 23S rDNA, ITS1, *gyrB*, *oprD*, *mexB*, *fliC*)を用いてPCR増幅反応を行った。PCR産物をExo-SAP(USB)によって精製した後、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いてDye Termination反応を行った。塩基配列解析はABI 3130 シークエンサー(Applied Biosystems)を用いて行った。海洋分離株、淡水分離株、臨床分離株、イルカ分離株、東京湾分離株を試料菌株として用いた。塩基配列データをCLUSTAL Wを用いて多重整列し、Neighbor-Joining法を用いて系統樹を推定した。系統樹のクレードの信頼性はブートストラップ検定法(1000反復)によって算定した。各遺伝子の塩基配列の d_S , d_N , d_N/d_S 比と株間の塩基置換率(%)は、Jukes-Cantorモデルを用いて算定した。

3. 結果

16S, 23S rDNAに基づく系統樹では海洋分離株がまとまりを形成するが、クレードのブートストラップ値が低いため、クレードの信頼性に欠けた。ITS1の系統樹では海洋分離株と東京湾分離株が混在しているグループの形成が見られた。*gyrB*の系統樹では海洋分離

株が2つのグループ (Group. I, Group. II 以降G. I, G. IIと標記) にわかれ、淡水分離株、臨床分離株も独自のグループを形成した。また起源の異なる株が混在しているグループも見られた。保存的な遺伝子を組み合わせた系統樹では海洋分離株のクレードが2つ (G. I, G. II) 形成され、この2つのクレードは*gyrB*の系統樹で見られた2つのグループと一致した。また淡水分離株、臨床分離株のクレードも形成された。*mexB*の系統樹ではクレードの形成は見られなかった。*oprD*の系統樹では海洋分離株 (G. II)、臨床分離株、淡水分離株のクレードとしてわかれたが、分離源の異なる菌株が混在していた。*fliC*の系統樹では海洋分離株と淡水分離株がクレードを形成したが、ブートストラップ値は低く、また海洋分離株と臨床分離株が混在するクレードも見られた。機能遺伝子を組み合わせた系統樹では分離源の異なる菌株間で系統的な違いが見られた。 ds , d_N , d_N/ds 比と各遺伝子の変異の蓄積率から系統解析に適した遺伝子を推定した結果、*gyrB*遺伝子と*oprD*遺伝子が系統関係をより精確に表わしている可能性が高かった。そこで*gyrB*と*oprD*遺伝子を組み合わせた系統樹を作成したところ、海洋分離株の2グループ (G. I, G. II) が有意なブートストラップ値のもと形成された。また淡水分離株、臨床分離株のクレードも形成された。

4. 考察

緑膿菌は陸、淡水、海水、動植物体と、その分布範囲が極めて広い生物である。このため、進化の過程でこの菌がどのような環境にどのように分布を広げていったのか、それぞれに特有の機能がどのような変異を遂げたのか、さらにこの菌のどのような特性がそれを可能にしたのかが興味深い課題である。本研究は外洋からの初めての分離株が得られたことをきっかけに、これらの疑問に答えることを目指して行なわれた。

海洋分離株、淡水分離株、イルカからの分離株、臨床分離株を対象に系統解析を行なった結果、遺伝子に応じて異なる樹形が得られた。 ds , d_N , d_N/ds 比と株間の塩基置換率 (%) の検討の結果、*gyrB*遺伝子と*oprD*遺伝子が今回の目的に比較的適した遺伝子であることがわかった。さらに信頼性の高い系統樹を得るために保存的な遺伝子を組み合わせた結果、海洋分離株が系統的に独自のグループ(G. I, G. II)を形成することがわかった。一方、機能遺伝子を組み合わせた系統樹からもこれらのグループの存在が確認され、海洋には系統的に独自の緑膿菌が分布していると結論づけられた。

G. Iは2005年5月に太平洋S1とS2の表層から単離された菌株からなり、一方G. IIには同時期に同じ測点S2の表層、および2003年にやはり測点S1とS2から単離された株、そして東京湾から単離された株が混在している。このように、海には少なくとも二つのグループが共存していることが明らかになり、それぞれの起源、相互の関係などについて今後の検討が必要と考える。

今回の結果はさらにイルカ分離株、淡水分離株、臨床分離株の相互の関係もそれぞれ独自のクラスターを作ることを示している。さらにデータを積み重ねることにより、緑膿菌が地球上にどのように広がってきたかを明らかにする研究へと展開させたい。

Phylogenetic Position of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Ocean

March 2006, Institute of Environmental Studies,

Course of Natural Environmental Studies

46737, WADA Koichiro

Supervisor; Professor, KOGURE Kazuhiro

Keywords; *Pseudomonas aeruginosa*, Phylogenetic relationship

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen, causing serious nosocomial infections in immunocompromised hosts, such as cystic fibrosis patients. It has also been isolated from various natural environments, including fresh water, soil, plants and animals. In 1995, Tanoue et al. reported the wide distribution of a porin corresponding to OprP of this bacterium as a dissolved protein in the ocean. This finding raised an intriguing hypothesis that *P. aeruginosa* may be commonly present in the ocean. Recently, we succeeded to isolate *P. aeruginosa* repeatedly from several stations in open ocean in the Pacific Ocean (Khan et al. in press). The question of this work was to clarify the phylogenetic relationship among strains of *P. aeruginosa* of various origins. I sequenced several genes (16S rDNA, 23S rDNA, ITS1, *gyrB*, *mexB*, *oprD*, and *fliC*) among strains from fresh water, clinical, dolphin and marine environments.

2. Materials and Methods

Strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from stations in the Pacific Ocean during the cruise of R/V Tansei-Maru (KT-04-9). The sea water samples were filtrated through Nucleopore filter (pore size, 0.22 μ m), which was cultured on selective media. After identification by 16S rDNA sequence, the DNA was extracted from the isolates by using DNeasy kit (Quiagen) and PCR amplification targeting 16S rDNA, 23S rDNA, ITS1, *gyrB*, *mexB*, *oprD*, *fliC* genes, were carried out. The PCR products were purified by Exo-SAP (USB) and reacted with Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) for dye termination. After that, the reactants were sequenced by ABI 3130 Auto sequencer (Applied Biosystems) and sequence data were analyzed by Mega v3.1. Phylogenetic trees were constructed with the Neighbor-Joining method. Bootstrap values were calculated for 1,000 trees. In addition, isolates from fresh water, clinical, dolphin and Tokyo bay were analyzed. The number of synonymous nucleotide substitutions per 100 synonymous sites (d_s), the number of non-synonymous nucleotide substitutions per 100 non-synonymous sites (d_N), and the portion of d_N/d_s (%) were calculated by using Mega v3.1.

3. Results

From the trees based on 16S, 23S rDNA, the group of marine strains was formed but the scores of bootstrap were low totally and the trees lacked the reliability. Marine and Tokyo bay strains The mixed group of marine and Tokyo bay strains was formed in the tree based on ITS1. As for the tree based on *gyrB*, the group of marine strains (Group. I, Group. II) was separated from the groups of fresh water and clinical, while the mixed group of fresh water, clinical, marine strain was formed. The clades of G. I and G. II were formed in consensus tree based on conservative genes (16S, 23S rDNA, ITS1, *gyrB*), which correspond to the tree based on *gyrB*. The groups of fresh water and clinical strains were also formed in this tree. No clades were appeared in the tree based on *mexB*. The clade of G. II was appeared and separated from the clades of fresh water and clinical strains in the tree based *oprD* and the mixed clades of various strains were also formed. The marine strains and fresh water strains formed the clades separately, but the reliability of the internal branch was low due to the low scores of bootstrap in the tree based on *fliC*. The phylogenetic differences between the marine strains from other strains were appeared in the consensus tree of functional genes (*mexB*, *oprD*, and *fliC*). The estimations of d_S , d_N , the portion of d_N/d_S and Mean nucleotide substitution (%) between strains revealed the suitability of the gene for the phylogenetic analysis and the results were *gyrB* and *oprD* for the analysis. The tree based on *gyrB* and *oprD* was constructed and the 2 groups (G. I & G. II) of marine strains were formed under the high scores of bootstrap, which correspond to the groups of the trees above-mentioned.

4. Discussion

The isolation of *P. aeruginosa* from marine environments implies that this bacterium may be present in every part of the Earth. Then how did this bacterium spread into new environments? How functionally diverse do they during the process of evolution? What makes it possible for this bacterium to have such wide habitats? This work was intended to answer these questions.

First, the phylogenetic analyses using multiple genes indicate the presence of two distinct clusters (G. I & G. II) among marine isolates. Therefore, it is concluded that there are group of strains uniquely present in marine environments. The two groups are composed of strains isolated from S1, S2 in the Pacific Ocean from the different cruises. Other strains from freshwater, dolphin and clinical sources also tended to make unique clusters, indicating that phylogenetically slightly different strains had appeared in each habitat during the course of evolution. Further detailed works will clarify the details of the evolutionally process of this unique bacterium.