

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学専攻自然環境コース

平成 18 年度

修士論文

海洋から単離された緑膿菌の系統的位置付け

Phylogenetic Position of *Pseudomonas aeruginosa*

Isolated from Ocean

2006 年 3 月修了

指導教員 木暮一啓 教授

46737 和田 耕一郎

目次

序章	1
第一章 天然環境からの緑膿菌の単離と同定	5
第二章 海洋から単離された緑膿菌の系統的位置づけ	13
第三章 総合考察	31
引用文献	60
謝辞	68

序章

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は非発酵性の好気性細菌で、単一の極性べん毛による運動性を有するグラム陰性桿菌である (齊藤と山口, 1996)。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は the genus *Pseudomonas* Migula の type strain として位置付けられてきたが、Palleroni らによる DNA-DNA hybridization や rRNA-DNA hybridization による分類が行われ、*Pseudomonas* 属の RNA グループ I に位置する菌種に分類された (Palleroni *et al.*, 1973)。1980 年頃から始まったリボソーム RNA の遺伝子配列を用いた系統分類学による位置づけでは、 γ -proteobacteria の *Pseudomonas* 属に区分された (Woese, C.R. 1987, Laguerre, G. *et al.*, 1994, Moore, E.R.B., *et al.*, 1996)。*Pseudomonas* 属の一般的な形態・生理学的な特徴としては、上記のように、好気性環境下に発育し、単一または複数の極性べん毛による運動性を有するグラム陰性桿菌の代表的な菌群であることで知られていたが、分子生物学手法の発展により DNA や RNA を用いた系統分類法と菌種の同定法が多く使われるようになり、現在 *Pseudomonas* 属として分類されているのが 161 種と亜種 8 種である (齊藤と山口 1996, <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>)。さらに近年では *Pseudomonas* 属の中でも人間社会に密接な関係のある重要菌種 (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae* の 4 菌種) の全ゲノム塩基配列が解読された。これらの 4 菌種は植物の病原性、微生物分解能を持ち、さらに臨床から分離される (*P. syringae* 除く) という共通の特質は持っているがヒトへの病原性を持っているのは *P. aeruginosa* のみであり、緑膿菌が医学上重要な研究材料になっている理由でもある。

緑膿菌がよく知られている理由のひとつはヒトへの病原性のためである。一般的に緑膿菌は病原性が弱く、健康な人では感染することは稀であるが、臨床現場において免疫不全症 (嚢胞性線維症や HIV) や術後などの易感染性宿主に対して感染症を引き起こす日和見感染症の原因菌となる (Secko 2005, 齊藤と山口 1996)。また薬剤耐性機構を獲得しやすい性質を持ち、緑膿菌感染症を難治性疾患にしている。院内感染症の起因菌として MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) や腸球菌 (ex. VRE: vancomycin-resistant

Enterococci) などの多剤耐性菌が知られているが、緑膿菌もまた院内感染症の起因菌として重要視されている (Watanabe 2000, 齊藤と山口 1996)。多くの基質を利用して増殖が可能であるとともに、biofilm を形成して様々な物質表面を覆うため、院内環境や蒸留水中でも生育可能にし、衛生的にも問題視されている (Penna *et al.*, 2002)。その他にも病原性の発現と Quorum Sensing との関連 (Rumbaugh *et al.*, 2000) や薬剤耐性機構獲得のメカニズムなど医学・衛生学上の研究材料として非常に研究の蓄積が多い細菌である。

緑膿菌は医学研究においてのみでなく、高い生分解能を持ち、多種にわたる化学合成有機物を分解することが可能であることからバイオレメディエーションに役立つ細菌であることや脱窒を担う細菌であることも注目に値する (Chaerun *et al.*, 2004, Freedman *et al.*, 2004, Ju & Trivedi 1992, Chen *et al.*, 2003)。また緑膿菌は臨床現場のみならず、淡水、土壌、植物や動物など極めて多様な環境から分離されており、その適応能の高さを示している。この適応能の高さの要因の一つは緑膿菌のゲノムサイズと考えられている。緑膿菌のゲノムサイズは 6.3Mbp であり、他の細菌のゲノムサイズ(*Bacillus subtilis*, 4.2 Mbp; *Synechocystis*, 3.6 Mbp; *Escherichia coli*, 4.6 Mbp; and *Mycobacterium tuberculosis*, 4.4Mbp) に比べて大きい。そしてこのゲノム内にある多様な遺伝子が多様な環境への適応に関連している (Stover *et al.*, 2000)。

では、緑膿菌の全ての株はどのような環境下でも生育できる性質を兼ね備えているのだろうか。それとも特別な遺伝的特徴を持つ株だけがある環境下に生育できるのだろうか。Foghtらはガソリンが混入した淡水から分離した緑膿菌と臨床現場から分離された緑膿菌を、ガソリンを加えた培養条件と 16S-23S rDNA のスペーサー領域 (ITS) の塩基配列で比較した。ガソリン分離株はガソリン存在下で顕著な増殖を示したが、臨床分離株は増殖不可能であった。しかし、ITS 塩基配列の比較では区別できなかったと報告している (Foght *et al.*, 1996)。Römlingらは Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)を用いて臨床現場で高い頻度で分離される菌株と淡水環境で高い頻度で分離される緑膿菌が同じタイプであることを報告している (Römling *et al.*, 1994)。Rahmeらは動物と植物から分離された緑膿菌はどちらも潜在

的に病原性を持つと報告している (Rahme *et al.*, 1995)。また遺伝子を用いた研究からも分離環境の違いによって遺伝的タイプは区別できないという知見も出されている (Kiewitz & Tümmler 2000, Ruimy *et al.*, 2001, Pirnay *et al.*, 2002, Spencer *et al.*, 2003)。Enterobacteria の遺伝的タイプを調べた研究ではある環境には特有の遺伝的タイプのものが生育するという知見があるが (Selender & Musser 1990, Whittam 1996)、緑膿菌の場合、生育環境の違いと遺伝的特徴は関連しないのだろうか。

これまで、緑膿菌は陸域、淡水などの環境から分離されてきたが、河川や排水の影響がある沿岸域を除いて海洋域からの報告はなかった (Robertson *et al.*, 1983, Yoshpe-purer *et al.*, 1987, Bhattacharya *et al.*, 2000, Chaerun 2004)。1995 年、田上らは北太平洋、亜熱帯太平洋、インド洋、南極海の海域から 48kDa の溶存タンパク質を検出し、そのタンパク質が表層から深層まで偏在していることを発見した。またそのタンパク質の N 末端のアミノ酸配列 (GTVTTDGADIVIKT) を Data Bank of JAPAN (DDBJ) を通して BLAST 検索した結果、緑膿菌が持つ porinP と完全一致し、この発見は緑膿菌が海洋に広範な分布域を持っている可能性を示唆した (Tanoue *et al.*, 1995 and 1996, Yamada *et al.*, 2003)。2003 年、木全らによる海洋環境からの緑膿菌の単離報告 (Kimata *et al.*, 2003) に続き、2004 年に N.H.Khan らは黒潮域の南側からの緑膿菌の単離に成功した (Khan *et al.*, in press)。これが海洋の外洋域から緑膿菌が分離されたという初めての報告である。これによって緑膿菌は陸圏、淡水のみならず、地球表面の 7 割を覆う海洋に広く分布する可能性が出てきた。この発見は、生物の進化という視点から興味深い課題を提供している。通常、ひとつの“種”がある環境に適応するために変異を蓄積し別種に分化するプロセスを繰り返した結果が、多様性を生み、この地球上における様々な生物の存在を招いている。しかし緑膿菌という生物は同一の“種”にあり続けながら他の生物に例を見ないほど多様な環境に侵入、分布し、生育していることになる。ではこれを可能にさせている生物的特性は何であろうか。その遺伝子構造に他の細菌あるいは生物群には見られないような特徴があるのだろうか。逆にその分布が限定されているような生物とはどのように異なっているのだろうか。このような課

題に答える上で緑膿菌は非常におもしろいモデル生物である。

この課題について考察するに先立ち、海洋株の生理的、系統的特徴を知る必要がある。Khan ら (Khan *et al.* in press) は緑膿菌の外洋での存在を報じる論文の中で、PFGE によるゲノタイプ判別を行った。この結果から海洋に特異的なグループがあることを示すとともに、臨床分離株と海洋分離株の培養実験を行い、いずれの株も海洋環境と同じ条件下で増殖を示すが、海洋分離株がより増殖能が高いことを示した。この知見は、緑膿菌は潜在的に多様な環境下で生育できる能力を持っているものの、海洋環境には異なるゲノタイプを持つ緑膿菌が存在する可能性を示している。では海洋分離株は他の環境に生育する緑膿菌と異なる遺伝的タイプを持つのだろうか。さらに、もしそうだとしたら、海洋の緑膿菌は陸あるいは淡水、臨床株などどのような系統関係にあるのだろうか。

本研究では新たな天然環境からの分離株、海洋環境からの分離株を用いて海洋分離株の系統的位置づけを行うことを目的とした。二つの側面から、従来の研究とは異なるアプローチを用いている。第一に、これまでの主な研究手法である PFGE や Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) によるゲノム全体の比較や遺伝子レベルの解析では、解析に用いる塩基配列の情報が十分でなかったと考えられる。このため、本研究では、保存性の高い遺伝子 (16S & 23S rDNA, ITS1, *gyrB*) と機能遺伝子 (*oprD*, *fliC*, *mexB*) を合わせて7つの遺伝子を用いることで系統解析の分解能を高め、種内の系統関係を推測した。第二に、解析に使う株の分離源が限定されている場合、緑膿菌全体の種内系統を表すのは難しい。本研究では、沿岸、淡水、臨床株に加え、世界で初めて分離された外洋分離株およびイルカからの分離株を用いて解析を行った。これにより、地球上のほぼ全ての環境からの株を揃えて解析することを狙った。

第一章 天然環境からの緑膿菌の単離と同定

【 海洋からの緑膿菌の単離 】

海洋からの緑膿菌の単離は木全らによって 2000 年に東京大学海洋研究所研究船淡青丸 KT-00-12 次航海 (2000 年 9 月 6 日から 12 日) での東京湾の 5 点の採水地点 (図 1) で行われた。その結果、4 点から緑膿菌の単離に成功した (Kimata *et al.*, 2004)。また Khan らは 2003 年に東京大学海洋研究所研究船淡青丸 KT-03-5 次航海と KT-03-7 次航海で東京湾から 300km 沖にあり、黒潮の南側の海域の採水地点 S2 (図 2) で緑膿菌の単離に成功した (Khan *et al.* in press)。これまでに沿岸域からの緑膿菌の単離報告はある (Yoshpe-purer *et al.*, 1987, Bhattacharya *et al.*, 2000) が外洋域からの単離報告はなく、一般的に緑膿菌は海洋に生息できないと考えられてきたが、これは必ずしもきちんとした検討に基づく結論とは言えない。この意味で、この報告が覆しうる可能性は大きい。しかし緑膿菌が外洋域から単離されたという報告は Khan らの知見以外になく、緑膿菌が海洋に生息していることをより確かな事実をするためには、再度同じ海域からの単離を行うか、分子生物学的な手法を用いることによってその存在を確かめる必要がある。本章の実験の目的は緑膿菌を分離することにより、この細菌が海洋に分布しているということを確認することである。

【 リクゼン型イシイルカからの緑膿菌の単離と同定 】

海洋中の細菌の動態としてこれまでに free-living 態やマリンスノーなどの溶解性有機物 (DOM) やプランクトンに付着している状態の細菌が報告されている (Cole 1982, Huq *et al.*, 1983, Alldredge *et al.*, 1988, Chowdhury *et al.*, 1997, Kiorboe *et al.*, 2003, Grossart *et al.* 2005)。2003 年に木全ら、2006 年に Khan らによって海洋から緑膿菌の単離が報告されたが、これらはいずれも海水を濾過後、培地上においたフィルター上で増殖する株を単離しているため、海洋中でこの菌がどのような状態で存在しているかわかっていない。海洋細菌の大部分は free-living の状態にあるので、緑膿菌もそのように単独で浮遊状態で存在しているのかもしれない。その一方で、緑膿菌はいわゆるバイオフィルムの形成菌として知られており、

マリンスノーなどの懸濁態有機物の上に付着している可能性がある。さらに、この菌はヒトを含めた動植物の病原細菌でもあるため、海洋生物を宿主としていることも考えられる。海洋からの分離の報告が殆どないために、これらについては全く知見がない。

ここでは海洋哺乳動物がいわゆる“保菌者”となっているかどうかを調べるために検討を行った。これまで、地引網に巻き込まれた Atlantic Bottled-Nosed Dolphin が背びれと尾びれに擦り傷をつくり、その部分から緑膿菌に感染しその感染が原因で死亡したという報告 (Diamond SS, 1979) やクジラ目哺乳類が *Pseudomonas* 属を含む細菌による肺炎を起こすという報告 (Sweeney, Ridgway, 1975) がある。これらの知見は、海洋の哺乳動物が人間同様緑膿菌に感染、発病する可能性を示唆している。そこで本章では岩手県大槌湾沖で捕獲されたリクゼン型イシイルカの死体から緑膿菌の単離を試み、いくつかの器官 (表 4) から単離に成功したことを報告する。

材料および方法

【 海洋からの試料の採集 】

海洋からの緑膿菌の単離は東京大学海洋研究所研究船淡青丸 KT-04-9 次航海 (2004 年 5 月日から日) において行った。試料海水の採水地点は図 1、図 2 に示した。表面海水は滅菌済みのバケツを用いて採水を行い、表層以深はエタノール滅菌したニスキンロゼット採水器 (CTD 付き: Conductivity, Temperature, Depth をリアルタイムで測定可能) により採水した。各採水地点の深度と試料海水の濾過量を表 1 に示した。単離方法は木全らの方法と Khan らの方法を組み合わせて行った。用いた培地の組成は表 2 に示した。試料海水を孔径 0.22 μm Nucleopore filter (Nucleopore) をセットした濾過器 (Nalgen) に注ぎ、その filter を NA (Nutrient broth Agar), NAC (Nalidixic Acid, Cetrimide), CKNA (Cetrimide, Kanamycin, Nalidixic Acid) 培地上に置いて 25°C で培養した。出現したコロニーを CKNA 培地に移し、42°C で培養した。その条件下で増殖可能なコロニーを取り出し、NA 培地に移して継代培養を行った後、-85°C で保管した。これら一連の単離作業においてコンタミネーションの排除に細心の注意を払

った。

【イルカからの試料採集】

2004年5月13日、岩手県大槌湾の国際沿岸海洋研究センターにおいてリクゼン型イシイルカの死体を解剖した。解剖したイルカは解剖日の約一ヶ月前に捕獲され、解剖日の一週間前まで -20°C で保存されていたものを解凍した状態であった。

試料から採取した部分は、表4に示した。採取方法はディスポーザブルプラスチック製白金耳でこすり、すぐに空シャーレに移して滅菌海水 $100\mu\text{l}$ を加えて攪拌した。その懸濁液をNAC培地上に塗抹した後、室温で培養した。単一コロニーを取り出し、CKNA培地上に移し、 42°C で培養した。この条件下で発現した単一コロニーを取り出し、NAC培地上で継代培養した後に -80°C で保管した。

【DNAサンプルの抽出】

-85°C の保管菌株をNA培地に塗抹し、 35°C で一晩振とう培養した後、出現したコロニーの中から単一コロニーを取り出し、DifcoTM Nutrient Broth (BD)に加えた。培養した菌液を遠心沈殿により集菌し、DNeasy kit (Quiagen)を用いてDNAを抽出した。

【16S rDNA 遺伝子の塩基配列解析による同定】

〈Polymerase chain reaction (PCR)〉

PCR増幅反応は表に記述した16S rDNA専用プライマーを用いて $200\mu\text{l}$ のmicrocentrifuge tube内で行った。PCR反応液(最終反応液量は $25\mu\text{l}$)は $10\times\text{Z-Taq}^{\text{TM}}$ buffer $2.5\mu\text{l}$ 、 2.5mM dNTPs 混合液 (dGTP, dTTP, dATP, dCTP) $2.0\mu\text{l}$ 、FP $0.5\mu\text{l}$ 、RP $0.5\mu\text{l}$ 、Z-Taq polymerase (Takara) $0.25\mu\text{l}$ 、滅菌蒸留水 $18.75\mu\text{l}$ 、テンプレートDNA $0.5\mu\text{l}$ を含む。用いたプライマーは全てシグマ アルドリッチ ジャパン(株)から購入した。全てのPCR増幅反応はMJ RESERCH PTC-200 サーマルサイクラー (BIO-RAD)を用いて行った。PCR産物は、1.0%

Agarose1600 (和光純薬工業 (株))を用いて電気泳動を行い、ethidium bromide 染色によりバンドの有無を確認した。また 500bp size marker (Takara)を用いて増幅断片長を推定した。16S rDNA 専用プライマーの塩基配列は表 5 に示し、PCR 増幅の反応温度、反応時間については第四章で記述する。

〈16S rDNA 塩基配列の解読〉

PCR 産物を Shrimp Alkaline Phosphatase (BOEHRINGER MANNHEIM)と Exonuclease I (USB)を用いて、37℃ 15 分間、続いて 80℃ 20 分間反応させることにより余剰の dNTPs とプライマーを除去し、精製した。その後 BigDye™ Terminator Ver3.01 Readt Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて、製品付属の説明書に沿って反応試薬の調整と反応時間および温度を設定し Dye Termination 反応を行った。Dye Termination 後、125mM EDTA (pH8.0)と混合試薬 (3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と 100% エタノールを 2:50 で混合)を加えて精製を行い、最後にエタノールで反応産物を沈殿・採集した。採集した反応産物に HDF (Applied Biosystems)を加えた後、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により泳動を行い、16S rDNA 塩基配列を決定した。

〈16S rDNA 塩基配列の解析〉

塩基配列のデータの確認と編集をする上で Edit View ver.1.0.1 (Applied Biosystems)または ATGC ver.4.0(GENETYX)を用いた。得られた塩基配列の泳動図から明瞭でない領域を削除し、Auto Assembler ver.2.1 (Applied Biosystems)または ATGC ver.4 を用いて前後のプライマーから得られた 2 つの塩基配列を結合して最終的な 16S rDNA の塩基配列を得た。得られた塩基配列を FASTA フォーマットに変換し、Web 上で公開されているデータベース National Center of Biotechnology Information (NCBI) にある Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて得られた塩基配列の相同性を検索し、最も相同性の高い菌種を試料菌株の菌種として同定した。

第一節 結果

【海洋からの単離と同定】

同定の結果、海洋から単離に成功した緑膿菌株数を表 3 に示した。太平洋の S1 地点の表層から 7 菌株、同地点の深度 1490m から 2 菌株、S2 地点表層から 11 菌株の単離に成功した。得られた菌株を 16S rDNA 塩基配列による同定をした結果、データベースにある塩基配列と十分に相関性が高いことから緑膿菌であると同定した。

【イルカからの単離と同定】

採取したイルカの器官と単離した菌株数を表 4 にまとめた。42℃、CKNA 培地上で培養し、増殖したコロニーを単離した結果、表皮から 3 菌株、鼻腔から 3 菌株、腸上部から 1 菌株を単離に成功した。7 菌株を 16S rDNA 塩基配列による同定を行った結果、データベースにある塩基配列と十分に相関性の高いことから緑膿菌であると同定した。

第二節 考察

【海洋からの単離と同定】

本実験結果、Khan らが試料採集を行った地点で同じ方法を用いて緑膿菌を単離できた (Khan *et al.* in press)。S2 地点 (図 2) は黒潮の南側に位置する外洋域であり、この海域からの再度の単離は人為的な影響の及ばない海洋に緑膿菌が分布している可能性を支持した。しかし、黒潮中軸の S3、およびその北側の S4 からは単離ができなかった。Khan らも 2003 年の航海で同様に結果を得ている。これには以下の可能性がある。第一に、海洋では緑膿菌が均一にではなく、むしろスポット的に分布している。第二に、緑膿菌は比較的均一に分布しているが、培養可能なものは不均一分布している。第三に、今回用いた方法では、Cetrimide、Kanamycin、Nalidixic acid の三種類の抗菌性物質に耐性の菌のみが分離される。これらの抗菌性物質に対して異なるレベルの感受性を持つ緑膿菌 (Ndip.RN *et al.* 2005, Khan *et al.* in press) が海洋に不均一に混在している。第四に、一般に緑膿菌の分布密度が低

い。これらの可能性を実際に検証していくには、今回採用した分離方法のみではなく、海水から直接 DNA を抽出し、緑膿菌に特異的な何らかのプローブを用いてその存在を調べることが有効であろう (Trebesius *et al.* 2000)。さらに、緑膿菌が生きているが培養できない状態、いわゆる VNC (Viable but Non culturable)状態に陥るか否か (Oliver 2005)、陥る場合にはどのような条件でそうなるかを明らかにすることも検討すべきであろう。東京湾において DVC-FA (Direct Viable Count – Fluorescent Antibody)法によって行われた細菌の計数値が培養法に比べて大きいことは VNC 状態を支持しているが (Kimata *et al.* 2004)、実際に貧栄養状態、海水塩分環境の条件下で細菌を培養し、活性を調べることでこれらの可能性をさらに検討することができる。

本実験では NA(Nutrient Agar), NAC (Nalidixic acid, Cetrimide), CKNA(Cetrimide, Kanamycin, Nalidixic acid)の三つの培地を用いて緑膿菌の分離を試みた。NA 培地はいわゆる一般従属栄養細菌用の培地であり、できるだけ多くの種類の細菌の分離を意図して開発されたものである。これに対し、NAC 培地、CKNA には抗菌物質が添加されており、それに応じて選択性が強まる。今回の分離作業では、結果的に NA 培地より NAC 培地の方がより簡便に単一コロニーを得ることができた。環境中には他の微生物も多く存在しているため NA 培地のよりに選択性のない培地を使った場合には緑膿菌の単離は難しい。NAC 培地は NA 培地に比べてより選択性が強く、生じるコロニー数も少なかった。一方、CKNA 培地は緑膿菌をより選択的に単離するための新しい培地として Kodaka らによって開発され、従来から用いられてきた緑膿菌の選択培地 (CET agar, NAC agar Mac Conkey agr, PASA agar)より選択性が高かったと報告されている(Kodaka *et al.*, 2003)。この培地は本実験で NAC 培地よりさらに選択性の強い培地として、NA, NAC 培地に出現したコロニーの簡便な同定方法として用いたが、CKNA 培地に 42°Cで増殖したコロニーは 16S rDNA 塩基配列による同定の結果、すべて緑膿菌だった。このことから CKNA 培地は緑膿菌に対して選択性が高いことがわかった。しかしながら、緑膿菌に対する選択性は加えられた抗菌物質によるものなので、たとえ耐性がある菌に対してもこれらの物質が増殖阻害的に働く可能性は排除できない。今回はこ

の要因がどの程度のバイアスを生んでいるかを検証することはできなかった。また緑膿菌は 42°C で増殖可能である (Hoadley *et al.*, 1972, Oberhofer, T.R. 1981) が、海洋環境に適した細菌が急激な温度変化による影響をどの程度受けているか、そのバイアスについても検証することができなかった。こうしたことから全体の緑膿菌群集を捉えるためには選択培地だけではなく、NA 培地のような非選択的な一般培地も併用することが重要である (K.Fonsekca *et al.* 1986)。また、その意味もあり、今回の結果から海洋での緑膿菌の分布について量的な議論は難しいと判断した。

緑膿菌の同定は、こうした選択培地上での増殖、培養温度、コロニーの色や増殖速度および 16S rRNA 塩基配列を用いた。しかし *Pseudomonas* 属における 16S rRNA 塩基配列の系統分類では分解能が低く、必ずしも近縁種と区別することはできない (Yamamoto *et al.*, 2000, Tayeb.L *et al.* 2005)。本研究では、第四章で記述するように、*rrn* オペロン以外の遺伝子(*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*, ITS1)の塩基配列を解析している。このため、16S rRNA 塩基配列による同定だけではなく、単離株が緑膿菌であることは疑いないと考える。

本研究で確認された海洋からの緑膿菌の単離は実質的に、木全ら、Khan ら (Kimata *et al.*, 2004, Khan *et al.*, in press) に続くもので、いずれも同じ研究室の報告によるものである。緑膿菌が果たして海洋に生息しうる生物的性質を持っているのか、既知の陸あるいは淡水域の分離株、あるいは臨床分離株とどのように違うかについては今後さらに検討が必要である。ただし、現時点では以下の事実が海洋での存在を裏付ける。第一に、Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) を用いた Genotyping によって海洋単離株と臨床分離株、淡水分離株、動物分離株を比較した結果、海水単離株は特異的なグループを形成する (Khan *et al.*, in press)。第二に、海洋単離株は塩分を高く調製した人工海水やイオン交換水中で臨床分離株や淡水分離株に比べて生存率が高い (Khan *et al.* in press)。第三に、海洋細菌が Na⁺イオンを用いて行うエネルギー生産と関わっている Na⁺-locating NADH: quinone oxidoreductase をコードする遺伝子 (*nqr*)を緑膿菌は持っている (<http://www.pseudomonas.com/>)。第四に、近縁種である *Pseudomonas* 属が海洋に分布している。以上のことから緑膿菌が海洋環境に生育

できない根拠はないと考えられる。

【イルカからの単離と同定】

緑膿菌 7 菌株の単離に成功したが、解剖したイルカは解剖日の約一ヶ月前に捕獲され、解剖日の一週間前まで -20°C で保存されていたものを解凍した状態であったことからコンタミネーションの可能性は拭いきれない。しかし、海洋環境中に棲息している海洋哺乳類から直接、単離することは困難である。またこの実験は、緑膿菌の種内の遺伝子変異の程度を明らかにし、そこから相互の系統関係を明らかにするための試料細菌の採集であり、その意味ではこの実験は成功したと言える。イルカから単離した緑膿菌の意味は引き続いて行った系統関係の結果を踏まえて第二章に記述する。

第二章 海洋から単離された緑膿菌の系統的位置づけ

緑膿菌は淡水、土壌、植物や動物などの生物体、臨床など多様な環境から分離報告があることからその生態的分布は非常に広い。緑膿菌が持つ多様な環境に対する高い適応能は緑膿菌が持つゲノムサイズの大きさに由来している (Stover *et al.*, 2000)。緑膿菌のゲノムサイズ (6.3-Mbp) は他の細菌 (*Bacillus subtilis*, 4.2 Mbp; *Synechocystis*, 3.6 Mbp; *Escherichia coli*, 4.6 Mbp; and *Mycobacterium tuberculosis*, 4.4Mbp) に比べて大きく、そのゲノム内に多様な遺伝子を持ち、それらが多様な有機物の輸送、代謝、利用による増殖、多数の鉄シデロフォアによる取込み機構、そして酵素や抗菌剤などの物質を細胞外へ輸送する RND 排出機構を担っている。また緑膿菌は環境変化に対するセンサー因子や転写調節因子に関わる遺伝子が緑膿菌の遺伝子内で高い割合を占めている。こうした遺伝子の多様性と遺伝的特徴が緑膿菌に高い適応能を与えている。つまり、どのような環境から分離された緑膿菌であれ、保存性の高いゲノム構造が持っていることにより他の環境に適応できるのである。しかし、例として臨床現場で薬剤耐性を獲得した分離菌株と天然環境中からの分離菌株を比較した時、その遺伝的特徴や遺伝子の塩基配列に違いはないのだろうか？つまり、生育環境の違いと緑膿菌の遺伝的特徴や遺伝子の塩基配列には関連があるのかという疑問が湧く。この疑問に対してゲノム構造の比較、遺伝子の塩基配列の比較、そして病原性など生理的な特徴の比較など異なる視点から研究が行われている。ゲノム全体を比較した研究で Spencer らは CF 患者から分離された緑膿菌のゲノムとすでに解明された PAO1 のゲノムを比較した結果、緑膿菌のゲノム構造について非常に保存性の高い遺伝子の間に変異の高い遺伝子が組み込まれているという構造的特徴を持っていることを明らかにし、またそのゲノム構造は分離源の異なる株間で非常に保存的であると報告している (Spencer *et al.*, 2003)。Schmidt らもまた遺伝解析に用いられる対照菌株 PAO と CF 患者や淡水中から分離される菌株 C を用いて *Spe I* 制限酵素による PFGE のゲルパターンと遺伝子マップ作成によって比較した結果、緑膿菌のゲノム構造は変異の多い部分が挿入されており、モザイク状のゲノム構造を有しているが、遺伝子の順序やゲノム全体の構造は、高い保存性を持っている (Schmidt *et al.*,

1996)。Ruimy らは 3 つの異なる分離源から得られた菌株 (異なる疾患患者の病巣から分離された菌株 2 種と淡水分離株 1 種) を Random amplified polymorphic DNA (RAPD) によるバンドパターンの結果、疾患の違いによって菌株の遺伝的タイプに違いはなく、また淡水と臨床の菌株間にも系統的な違いはなかった (Ruimy *et al.*, 2001)。上述のようにゲノム構造について緑膿菌の種内では保存性が高いとされているが、遺伝子の塩基配列の比較では Kiewitz と Tummler が臨床分離株と淡水分離株を 6 つの遺伝子を用いてその遺伝子の多様性を比較した結果、分離源の違いによる塩基配列の違いはなく、遺伝子レベルでも保存性は高いと報告している (Kiewitz & Tummler, 2000)。また Pirnay らは臨床や淡水など異なる環境から分離された菌株間で外膜タンパク質をコードする 3 つの遺伝子 (*oprI*, *oprL*, *oprD*) の塩基配列、血清型、AFLP、pyoverdine 型という 4 つの方法で比較することにより、緑膿菌の群集構造を調べた結果、緑膿菌は頻繁に遺伝子組み換えを起こし、流行株のクローンが多様な環境に生育していると報告している (Pirnay *et al.*, 2002)。また Römling らも CF 患者から最も頻繁に分離されるクローン株 (28%) が淡水中からも頻繁に分離される菌株 (21%) と一致すると報告している (Römling *et al.*, 1994)。生理的特徴に関しても Alonso らによる報告によると、オイルが混在する土壌分離菌株と臨床分離菌株はどちらも病原性を示し、生分解能も持つことから生理的な機能に違いはないと結論づけている (Alonso *et al.*,)。これらの研究から緑膿菌は比較的安定したゲノム構造の中に多種多様な遺伝子を持つが、分離源による遺伝的タイプに違いはなく、また高い頻度で遺伝子組み換えを起こし、流行株のクローン株が臨床や淡水、土壌などの多様な環境に生育しているという緑膿菌の遺伝的特徴が見えてくる。つまり、従来の知見は分離源の違いによる系統的な違いはないとしている。本研究では、Kimata ら、Khan らによって初めて分離された海洋分離菌株を新しい天然環境分離株として用いてその系統的な位置づけを明らかにすることを目的としている (Kimata *et al.*, 2004, Khan *et al.*, in press)。Khan らは海洋単離株を用いて Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) による Genotyping で行った結果、海洋分離株が特異的なゲルパターンを示すことから海洋に特異的であり、同じ遺伝的タイプを持つグループが分布している可能性を示唆し

たが (Khan *et al.*, in press) 、未だにその系統的な位置づけは解明されていない。緑膿菌の新たな生態的ニッチとして海洋分離株が発見され、臨床や淡水など従来から報告されてきた生態的ニッチを持つ菌株とどのような系統的な関係にあるのか非常に興味深い。

また多様な環境から分離された緑膿菌の系統的な関係を明らかにすることによって緑膿菌が多様な環境へ分布していった進化の過程について知ることができるのではないだろうか。緑膿菌のようにひとつの種が異なる環境に生育しながらも分化せずにひとつの種であり続けるのはなぜ可能なのだろうか、それをもたらす遺伝的特徴とは何だろうか。こうした疑問に対して多様な生育環境を持つ緑膿菌は地球上で他に例のないモデル生物である。本研究では海洋、沿岸、淡水、イルカ、臨床から分離された菌株を用いて 16S rRNA, 23S rRNA, *gyrB*, ITS1, *oprD*, *fliC*, *mexB* 遺伝子の塩基配列の比較から海洋分離株の系統的な位置づけを推定した。本研究で種内間の系統解析に用いた 7 つの遺伝子について下記に述べる。

16S rRNA は small-subunit (SSU) rRNA のひとつであり、非常に保存性の高い塩基配列を持つ。16S rRNA は、菌種の同定や分類、系統関係を調べる上で広く用いられているが (Woese, C.R. *et al.*, 1975, Weisburg *et al.*, 1991, Anzai *et al.*, 2000) 、16S rRNA 塩基配列が非常に保存的な遺伝子であるため *Pseudomonas* 属内の系統分類でさえ、分解能が低いために *gyrB*, *rpoD*, *rpoB* など他の遺伝子を系統分類や同定のバイオマーカーとして用いる新しい方法が提案されている (Yamamoto *et al.*, 1998, Tayeb *et al.*, 2005) 。本研究は緑膿菌の種内間レベルの系統解析を行うため、16S rDNA 塩基配列のみでは非常に分解能が低くなると推測される。同じ *rrn* オペロンのひとつである 23S rDNA 塩基配列を用いることで系統解析の分解能を高めた。

種内間の系統関係を比較した研究として Cladera らによる *P. stutzeri* を用いた研究が興味深い。*P. stutzeri* は緑膿菌と同じく非常に幅広い生育環境を持っており、試料菌株として臨床分離株や淡水や海水、土壌、排水、ガソリンなど多様な環境から分離された株を用いて 7 つの遺伝子 (16S rDNA, ITS1, *gyrB*, *rpoD*, *catA*, *nahH*, *nosZ*) の系統的比較を行った。結果として *nahH* 遺伝子を除く各々の遺伝子に基づく系統樹が十分に一致し、その中でも ITS1 に基づく系統樹は遺伝子型の違いを明瞭に表わしており、5 つの遺伝子 (16S rDNA, *gyrB*, *rpoD*,

catA, *nosZ*)に基づくコンセンサス系統樹と十分に一致するほど分解能が高いことがわかった (Cladera *et al.*, 2004)。ITS1 (internal transcribed spacer region1) は 16S rDNA と 23S rDNA の間に位置するスペーサー領域で tRNA をコードしている。ITS1 塩基配列は rDNA 塩基配列より変異速度が速く変化に富んでいるため、*Pseudomonas* 属の種間系統の比較にも用いられる (Cardinale *et al.*, 2004)。

gyrB 遺伝子は保存性の高い塩基配列を持つハウスキーピング遺伝子のひとつであり、*gyrB* 遺伝子がコードする DNA Gyrase は弛緩型 DNA に負の超らせんを導入する酵素で染色体の転写や鋳型形成に関わっている (Watt *et al.*, 1994)。DNA gyrase B subunit (*gyrB*)も ITS1 と同様に系統解析に頻繁に用いられる。Yamamoto らは *gyrB* を用いて *P. putida* 種内の系統解析を行った結果、rDNA より高い分解能を持つことがわかった。また *Pseudomonas* 属内の系統分類や同定により適していると報告している (Yamamoto *et al.*, 1998, Yamamoto *et al.*, 2000)。

oprD 遺伝子は外膜タンパク質である OprD をコードする遺伝子である。OprD タンパク質はアミノ酸やペプチド断片の取り込み、抗生物質の通過孔としての役割を担っているが (Trias *et al.*, 1990)、薬剤耐性菌株は OprD タンパク質を失うことで通過孔をなくし、薬剤耐性能を得ている (Angus *et al.*, 1982, Fukuoka *et al.*, 1993)。*oprD* 遺伝子を用いた系統解析で変異度が高く、塩基配列の多様性を示した報告がされている (Pirmary *et al.*, 2002)。

fliC 遺伝子は鞭毛タンパク質をコードするひとつの遺伝子である。鞭毛は運動性、走化性を担う機能を持ち、細胞への吸着、侵入を促進させることで感染症を引き起こす病原因子である。緑膿菌の鞭毛タンパク質には a-タイプ、b-タイプの 2 種類存在し、分子量や特異的なポリクローナル抗体反応によって違いがある。a-タイプは 45 から 52kDa まで多様な分子量を持つのに比べて、b-タイプは 53kDa とどの菌株も一様な分子量を持っていることが知られている。標準菌株である PAO1 は b-タイプである。鞭毛タンパク質のタイプはその遺伝子を見ることでもその違いがわかり、その主な部分を占める *fliC* 遺伝子を調べることによって容易に判別できる (Ansorg *et al.*, 1978, Allison *et al.*, 1985, Brimer & Montie, 1998)。しか

し、両タイプの塩基配列の比較では高い相同性を持つため、系統解析にも用いられている (Spangenberg *et al.*, 1996, Kiewitz *et al.*, 2000)。また臨床分離株と環境分離株の遺伝的差異は病原因子など変異度の高い遺伝子領域で決められているという報告からも *fliC* 遺伝子は病原性に関わる遺伝子であり、本研究の系統解析に適していると考えられる (Finnan *et al.*, 2004, Wolfgang *et al.*, 2003)。

mexB 遺伝子は緑膿菌が持つ薬剤耐性機構のメカニズムのひとつである薬剤排出ポンプをコードしている約 3000 塩基から成る遺伝子である。この排出ポンプは MexAB-OprM がひとつとなって resistance-nodulation-cell division (RND)としての役割を持つ。MexB タンパク質は内膜に存在し、プロトン駆動力によって異物を押し出す役割を持ち、MexA タンパク質は内膜に結びついたりポタンパク質であり、膜融合タンパク質として異物輸送に欠かせないものである。OprM は異物の排出チャンネルとしての役割を持つ外膜タンパク質である。また MexAB-OprM タンパク質をコードする遺伝子の変異は薬剤に対する感受性に密接な関係があることが知られている (Li *et al.*, 1995, Paulsen *et al.*, 1996, Okamoto *et al.*, 2001)。このことから臨床、淡水、海洋という生育環境の違いが薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に反映しているのではないかと推測した。以上の 7 つの遺伝子を用いることで従来の研究より系統解析の遺伝子数は多く、緑膿菌の系統的關係をより確かに推測できると考えられる。また分離源の異なる菌株ごとに塩基置換数を求めることで、分離源の違いによる進化過程の違いについて議論する。

材料と方法

【 試料細菌 】

解析に用いた緑膿菌の試料番号とその採集地 (採集年月日) を表 6 に示した。

【 DNA サンプルの調整 】

-85℃の保管菌株を NA 培地に塗抹し、35℃で一晩振とう培養した後、出現したコロニーの

内から単一コロニーを取り出し、Difco™ Nutrient Broth (BD)に加えた。培養した菌液を遠心沈殿により集菌し、DNeasy kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。試料菌株について表6に示した。

【23S rDNA、*mexB* 遺伝子専用プライマーの設計】

23S rRNAは緑膿菌ゲノム上に4コピー存在するが、その中のひとつの塩基配列をWeb上で緑膿菌の全ゲノム塩基配列を公開しているPseudomonas Genome Project (<http://www.pseudomonas.com/>)から引用し、緑膿菌に特異的でTm値が55-65の間になる20mer前後の配列をデータベースNational Center of Biotechnology Information (NCBI)にあるNucleotide-nucleotide BLAST (blastn)を用いて特定した。23S rRNA塩基配列の上流にあるプライマーをフォワードプライマー(以下、FPと示す)とし、全長約3000塩基中から約1200塩基を増幅できるようにFPとTm値が合う20mer前後の特異的な配列を下流の塩基配列から特定した。このプライマーをリバースプライマー(以下、RPと示す)とした。

mexB 遺伝子も23S rRNAと同様にPseudomonas Genome Projectから塩基配列を引用した。*mexB* 遺伝子は保存的なrRNA塩基配列と異なり、機能遺伝子であることから塩基配列の変異速度が比較的速いと一般的に考えられる。そのため、*mexB* 塩基配列の中でも変異が比較的少ないと考えられる領域を他のPseudomonas属が持つ*mexB*(または類似の遺伝子)と比較することで調べた。その領域内でTm値が55-65の間になる20mer前後の配列を上述のデータベースから特定し、この配列をFPとした。そして全長約3000塩基中から約1200塩基を増幅できるようにTm値が合う20mer前後の配列を特定し、RPとした。

【 Polymerase Chain Reaction (PCR) 】

PCR増幅反応は表5に記述したプライマーを用いて200 μ lのmicrocentrifuge tube内で行った。PCR反応液(最終反応液量は25 μ l)は10 \times Z-Taq™ buffer 2.5 μ l、2.5mM dNTPs混合液(dGTP, dTTP, dATP, dCTP) 2.0 μ l、FP 0.5 μ l、RP 0.5 μ l、Z-Taq polymerase (Takara) 0.25 μ l、滅

菌蒸留水 18.75 μ l、テンプレート DNA 0.5 μ lを含む。用いたプライマーは全てシグマ アルドリッチ ジャパン(株)から購入した。全ての PCR 増幅反応は MJ RESERCH PTC-200 サーマルサイクラー (BIO-RAD)を用いて行った。16S rDNA の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。23S rDNA の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 52 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。ITS1 の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 50 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。*gyrB* 遺伝子の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 62 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。*fliC* 遺伝子の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 53 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。*mexB* 遺伝子の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。*oprD* 遺伝子の PCR 増幅反応プログラムは熱変性 98 $^{\circ}$ C 1 秒間、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 10 秒間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 20 秒間を 29 サイクルとした。PCR 産物は、1.0% Agarose1600 (和光純薬工業 (株))を用いて電気泳動を行い、ethidium bromide 染色によりバンドの有無を確認した。また 500bp size marker (Takara)を用いて増幅断片長を推定した。

【 塩基配列の解読 】

PCR 産物を Shrimp Alkaline Phosphatase (BOEHRINGER MANNHEIM)と Exonuclease I (USB)を用いて、37 $^{\circ}$ C 15 分間、続いて 80 $^{\circ}$ C 20 分間反応させることにより余剰の dNTP 混合液とプライマーを除去し、精製した。その後 BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて、製品付属の説明書に沿って反応試薬の調整と反応時間および温度を設定し Dye Termination 反応を行った。Dye Termination 後、125mM EDTA (Wako) (pH8.0)と混合試薬 (3M 酢酸ナトリウム (Wako) (pH5.2) と 100% エタノールを 2 : 50 で混合)を加えて精製を行い、最後にエタノールで反応産物を沈殿・採集した。採集した反応産

物に HDF (Applied Biosystems)を加えた後、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により泳動を行い、塩基配列を決定した。

【 コンピュータ解析 】

得られた塩基配列のデータの確認と編集をする上で Edit View ver.1.0.1 (Applied Biosystems) または ATGC ver.4.0 (GENETYX)を用いた。得られた塩基配列の泳動図から明瞭でない領域を削除し、Auto Assembler ver.2.1 (Applied Biosystems)または ATGC ver.4 を用いて前後のプライマーから得られた 2 つの塩基配列を結合して最終的な塩基配列を得た。得られた塩基配列を FASTA 形式 (テキストファイル保存時に拡張子を xxx.fasta、xxx.fast、xxx.fas にする) に変換する。FASTA 形式ファイルを MEGA ver.3.1 (windows 版フリーソフトウェア)にある CLUSTAL W プログラムを用いてマルチプルアライメント(多重置換配列)を行った。系統樹推定法は MEGA ver.3.1 を用いて Neighbor-Joining 法 (以下、N-J 法と示す)による解析を行い、系統樹を作成した (Saitou & Nei 1987)。確率モデルとして Kimura の 2 パラメーターモデルを用いてトランジション置換 (ピリミジンどうし ($T \leftrightarrow C$), あるいはプリンどうし ($A \leftrightarrow G$)) とトランスバージョン置換 (ピリミジン-プリン間 ($T, C \leftrightarrow A, G$))の両方を塩基置換確率に加えた (Kimura 1980)。またギャップは完全に欠失したものとして削除し、コドンは 1、2、3 位のすべてのサイトと非コードサイトを含めた。N-J 法に基づく系統樹の信頼性を調べるためにブートストラップ検定法を用いて 1000 回反復を行い、そのブートストラップ値を算定した。また自然選択圧の影響を考慮した系統解析として同義置換のみを用いた系統樹も Jukes-Cantor モデルを用いて作成した (Jukes & Cantor 1969)。系統樹の内部枝には 1000 回中 500 回以上確かであるブートストラップ値のみをのせた。1000 回中 500 回未満のブートストラップ値は内部枝の信頼性に欠けると言える。外郡として、データベース National Center of Biotechnology Information (NCBI)上で公開されている緑膿菌の近縁種 (*Pseudomonas* 属)の塩基配列を引用し、アライメントデータに加えた。

表 7 で示した d_s (100 同義置換サイトにおける同義塩基置換数)と d_N (100 非同義置換サイト

における非同義塩基置換数)は Jukes-Cantor モデルを用いて行った (Kiewitz & Tümmler 2000 参照)。これらの値から求められる d_N/d_S 比は、自然選択圧の影響の指標であり、この指標を用いて緑膿菌の種内系統解析により適している遺伝子を推定する。遺伝子ごとの菌株間の平均塩基置換率 (Mean nucleotide substitutions among pairs of strains) を求めることで、その遺伝子が塩基置換を受けやすい遺伝子かどうか調べた。また表 8 にある *gyrB* 遺伝子の Polymorphic site に関するデータも同様に MEGA ver.3.1 を用いて算定した。分離源ごとに塩基置換数を求めることで生育環境の違いによって塩基置換の受けやすさの傾向があるのではないかと、それを調べた。また分離源ごとに *gyrB* 遺伝子の同義置換数と非同義置換数を求め、生育環境の違いが反映されるか調べた。

〈コンセンサス系統樹の作成〉

いくつかの遺伝子の塩基配列を総合した系統樹を作成することにより、系統関係をより鮮明に分解能の高い解析ができる。得られた遺伝子の塩基配列をアライメントした後、比較する塩基配列を抜き出し、他の遺伝子の塩基配列につないでいき、上記と同様に MEGA ver.3.1 を用いてアライメントと N-J 法による解析を行い、コンセンサス系統樹を作成した。

第一節 結果

【23S rDNA、*mexB* 遺伝子専用プライマーの設計】

23S rDNA 専用プライマーを用いた PCR と電気泳動の結果、バンドパターンが約 1200 塩基部分にあることからプライマーの設計通りに PCR 増幅されたことがわかった (図 3)。この PCR 結果から緑膿菌以外の細菌ではバンドは PCR 増幅されなかった。

mexB 遺伝子専用プライマーを用いた PCR と電気泳動の結果、バンドパターンが約 1200 塩基部分にあることからプライマーの設計通りに PCR 増幅されたことがわかった (図 4)。

【 16S rDNA に基づく系統樹 】

16S rDNA に基づく系統樹から海洋単離株、臨床分離株、淡水分離株、イルカ分離株が系統樹内で混在した (図 5)。

【 23S rDNA に基づく系統樹 】

16S rDNA と同様に海洋単離株、臨床分離株、淡水分離株、イルカ分離株が系統樹内で混在しているが、大きく 3 つのクレードに分かれた (図 6)。ひとつのクレードには測点 N-2, 深度 200m (表 6) から分離された海洋分離株 PAR-3 のみで、他の 2 つのクレードのどちらにも海洋分離株は含まれたが、測点による海洋分離株のまとまりはない。淡水分離株と臨床分離株はそれぞれ別のクレードに含まれた。

【 *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹 (塩基置換すべて)】

ブートストラップ値によるクレードの信頼性から大きく 2 つのクレードが形成され、臨床分離株のクレード (PAR-109, PAR-99, PAR-105, PAR-111, PAR-110, PAR-23, PAR-24-1, PAR-101, PAR-108, PAR-107) とその他の分離株が混在した (図 7)。しかし、クレードの信頼性は低い。海洋単離株のグループ Group. I (PAR-242, PAR-241, PAR-235, PAR-240)、Group. II (PAR-31, PAR-37, PAR-30, PAR-5-1, PAR-47, PAR-226, PAR-29, PAR-25, PAR-33, PAR-8, PAR-224) が形成された。Group. II の中に東京湾単離株 PAR-12-1 が含まれている。Group. I に含まれる菌株はすべて測点 S-1 から分離されたものであった。Group. II に含まれる菌株は S-1: PAR-5-1, PAR-226 (深度 1490m), S-2: PAR-8, PAR-25, PAR-29, PAR-30, PAR-31, PAR-33, PAR-37, PAR-47, PAR-224 から分離されたものであった。Group. I は測点によるまとまりを形成したが、Group. II は測点によるまとまりや採水時期によるまとまりはなかった。傾向として分離源が同じ菌株どうしが隣り合い、系統的に近い位置にあることがわかった。イルカ分離株 (PAR-244, PAR-255, PAR-240) どうしが近い系統関係を示した。

【 *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹 (同義置換のみ)】

選択圧の影響を考慮した同義置換のみの系統樹を作成した (図 8)。ブートストラップ値が低かったが、海洋分離株 Group. I・Group. II、臨床分離株グループ、淡水分離株グループが形成された。Group. I にはさらに測点 S-2 から分離された PAR-238 が含まれ、測点によるまとまりはなくなった。

【 ITS1 に基づく系統樹 (塩基置換すべて)】

gyrB 遺伝子の系統樹で見られた海洋分離株 Group. I・Group. II が形成された (図 9)。Group. I と Group. II に含まれる菌株は *gyrB* 遺伝子の系統樹と多少異なるが、Group. I と Group. II 間で菌株の移動はなかった。

【 16S rDNA・23S rDNA・*gyrB*・ITS1 に基づく consensus 系統樹】

16S rDNA・23S rDNA・*gyrB* 遺伝子・ITS1 の consensus 系統樹を作成した結果、各遺伝子単独の系統樹よりブートストラップ値が高く、クレードの信頼性が高まった(図 12)。海洋分離株 Group. I・Group. II、淡水分離株、イルカ分離株のグループが形成され、分離源ごとに異なるグループが形成される可能性を示唆したが、ブートストラップ値が系統的な違いを示せるほど、高くなかった。

【 *oprD* 遺伝子に基づく系統樹 (塩基置換すべて)】

他の遺伝子による系統樹と比較して信頼性の高いクレードを持つ系統樹が作成された (図 13)。海洋分離株 Group. II、臨床分離株、淡水分離株のグループが形成されたが、他の系統樹で目立った海洋分離株 Group. I の形成がなかった。イルカ分離株 (PAR-245, PAR-246) は東京湾分離株 PAR-252 と近い系統関係にある。

【 *fliC* 遺伝子に基づく系統樹 】

信頼性の高いクレードが大きく3つある。このクレードは *flagellin* 遺伝子が持つタイプと一致した (図 15)。本研究で用いた菌株の内、b-タイプの菌株は標準菌株の PAO1 のみであった。残る2つのクレードは a-タイプであり、ひとつのクレードに海洋分離株 Group. I と淡水分離株グループが含まれ、もうひとつのクレードには海洋分離株 Group. II と臨床分離株が含まれた。 *oprD* 遺伝子の系統樹と異なり、Group. I が明瞭に分かれているのに比べ、Group. II には臨床分離株が混在した。イルカ分離株 (PAR-245, PAR-246) は Group. I に近い系統関係を示した。

【 *mexB* 遺伝子に基づく系統樹 】

rDNA の系統樹と同様に海洋単離株、臨床分離株、淡水分離株、イルカ分離株が混在する結果となったが、Group. I に属する海洋分離株がひとまとまりになった (図 16)。

【 *oprD*・*fliC*・*mexB* に基づく系統樹 】

oprD・*fliC*・*mexB* 遺伝子の塩基配列を組み合わせた系統樹を作成した結果、分離源の違いによって各々のグループが形成された (図 17)。海洋分離株 Group. II とイルカ分離株が近い系統関係であった。この解析において Group. I に含まれていた海洋分離株を用いることができなかつたため、Group. I の形成は確認ができなかつた。

【 *gyrB*・*oprD* に基づく consensus 系統樹 】

大きく2つのクレードにわかれ、ひとつのクレードに海洋分離株の2グループ (Group. I, Group. II) が形成され、もう一方には淡水分離株のグループ、臨床分離株のグループが形成された (図 19)。それぞれのクレードはブートストラップ値が高く、クレードの信頼性は高い。イルカ分離株 PAR-245 は海洋分離株 Group. I に含まれた。海洋分離株 PAR-3 は臨床分離株のグループに含まれた。いくつかのグループで他の分離源からの菌株が混在してい

ることが確認できた。また異なる分離源の菌株が混在するクレードも存在した。

【 緑膿菌の遺伝子塩基配列の多様性 】

d_N/d_S 比の結果から、保存性の高い遺伝子の中で最も d_N/d_S 比の値が低かったのは *gyrB* 遺伝子の 0.034 であった (表 7)。ITS1 は最も高く、1.154 であった。16S rDNA の値が 0.667 と 23S rDNA の値 0.333 より高くなった。機能遺伝子では *mexB* と *fliC* 遺伝子がそれぞれ 0.857、0.858 とほぼ同じ値を示し、*oprD* 遺伝子の 0.336 が最も低い値となった。遺伝子ごとの菌株間の平均塩基置換率 (Mean nucleotide substitutions among pairs of strains) では 16S rDNA の値と 23S rDNA の値が 0.1 と同じ値になった。保存性の高い遺伝子の中で *gyrB* 遺伝子が 0.7 と最も高い値を示した。機能遺伝子では *mexB* が 0.8 となり、保存性の高い遺伝子である *gyrB* 遺伝子とほぼ同じ値となった。*mexB* 遺伝子に比べて *oprD*、*fliC* 遺伝子はそれぞれ高い値 (7.7, 11.5) を示した。

【 分離源の違いによる *gyrB* 遺伝子塩基配列情報 】

海洋分離株 22 株間で系統解析に用いた *gyrB* 遺伝子塩基配列の中に 11 の塩基置換があった (表 8)。この塩基置換はすべて同義置換であり、非同義置換はなかった。臨床分離株 15 株間では 16 の塩基置換があり、同義置換数が 16、非同義置換数が 14 であった。淡水分離株 15 株間での塩基置換数が 21 と最も多く、同義置換数が 15、非同義置換数が 6 であった。

第二節 考察

【23S rDNA、*mexB* 遺伝子専用プライマーの設計】

23S rRNA 専用プライマーを用いた PCR 増幅の結果から 23S rRNA 塩基中の 1200 塩基を系統的に比較できることがわかった (図 3)。また選択培地 (NAC, CKNA) を用いて菌株を分離した後、未同定の試料菌株の DNA からこのプライマーを用いて PCR 増幅を行えば、緑膿菌の判別が可能だと考えられる。*mexB* 遺伝子専用プライマーを用いた PCR 増幅の結果か

ら *mexB* 遺伝子の塩基配列中の約 1200 塩基を系統的に比較できることがわかった (図 4)。

【rDNA】

rDNA の株間の平均塩基置換率が 0.1%と低く、他の遺伝子に比べて最も保存性が高いことがわかった (表 7)。そのため、分離源の違いによる系統的な違いは見えなかった。これは 16S rDNA の塩基配列はその中に変異が多い領域を持ち、その領域における遺伝的距離は *gyrB* や *rpoD* 遺伝子のものと一致しない。この領域における塩基置換は系統的な積み重ねではなく、またこの領域以外の塩基配列は非常に塩基置換が少ないため、16S rDNA による系統解析は偏りが生じるという報告からも明らかである (Yamamoto *et al.*, 2000)。23S rDNA を用いることで系統解析の分解能を高められると推測したが、16S rDNA と同様に非常に保存的であった。ただ 16S rDNA の系統樹より比較的、分離源ごとの菌株どうしが近い系統関係を示している。これは d_N/d_S 比からも明らかで、23S rDNA の比が 16S rDNA のものより低いことから系統的な違いをより反映していることがわかった。23S rDNA 塩基配列は 16S rDNA 塩基配列より種内の系統解析に適した遺伝子であると言える。

【*gyrB* 遺伝子】

gyrB 遺伝子の株間の塩基置換率 0.7%は他の保存性の高い遺伝子である rDNA や ITS の値より高いことから変異の蓄積は比較的多い (表 7)。*gyrB* 遺伝子の d_S 値 (0.029)と d_N 値 (0.001) を比較すると d_S 値が高いことから、同義置換数の割合が非同義置換に比べて高い (Yamamoto *et al.*, 1998)。また d_N/d_S 比 0.034 は系統解析に用いた遺伝子の中で最も低い値であることから、選択圧の影響が少ないと考えられる (Cladera *et al.*, 2004)。変異の蓄積数と選択圧の影響から *gyrB* 遺伝子は *rm* オペロンに比べて系統解析に適している (Yamamoto *et al.*, 2000, Cladera *et al.*, 2004)。

gyrB 遺伝子に基づく系統樹からクレードの信頼性は低いが、臨床分離株グループ、海洋単離株のグループ (Group. I・Group. II)、淡水分離株グループ、イルカ分離株グループが

形成され、分離源によって異なる系統関係を持っている可能性を示唆した (図 7)。

選択圧の影響をなるべく小さく評価するために同義置換のみを考慮した *gyrB* 遺伝子の系統樹からも分離源によるグループが現れるが、ブートストラップ値が低く、系統樹の信頼性が両置換を考慮している系統樹に比べて低くなってしまった (図 8)。これは系統的な違いを示すほど十分な同義置換数がないと考えられる (表 7)。

gyrB 遺伝子は緑膿菌の種内系統解析に比較的適しているため、*gyrB* 遺伝子の塩基配列を分離源の異なる菌株間で比較し、塩基置換数について調べた。その結果、淡水分離株の塩基置換数が 21 と多く、それに続いて臨床分離株が 16 であった。海洋単離株の塩基置換数は、11 で沿岸分離株の塩基置換数は 7 であった (淡水: 21 > 臨床: 16 > 海洋: 11 > 沿岸: 7)。非同義置換数 (淡水: 6 > 臨床: 2 > 海: 0=沿岸: 0)と同義置換数 (淡水: 15 > 臨床: 14 > 海洋: 11 > 沿岸: 7) もこの順序で小さくなった。海洋分離株は淡水、臨床分離株に比べて塩基置換の蓄積が少ないということは、分離源によって緑膿菌の進化速度が異なる可能性がある (沿岸分離株数は少ないため、沿岸分離株の塩基置換数が低く見積もられるという偏りが考えられるのでここでは除外した)。この仮説の根拠として第一に海洋環境が化学的、物理的に安定しており、自然選択圧が中立に作用することによる変異株の淘汰、第二に海洋環境は貧栄養であるため世代交代が遅く、変異の蓄積が少ない、第三に淡水や臨床といった環境は常に新しい細菌の流入があり、多様な変異を持つ細菌が現れるために臨床分離株や淡水分離株の塩基の変異を増加させている、と推測する。*gyrB* 遺伝子は保存性が高く、系統解析に適していると言えるが、他の遺伝子では分離源による進化速度が異なる可能性もあり、ひとつの保存性の高い遺伝子だけからでは進化速度についての議論は推測で留まる。他の保存的な遺伝子を用いた系統解析が必要である。

【ITS1】

ITS1 の株間の平均塩基置換率は 0.2% と rDNA の 0.1% より高く、rDNA よりは変異の蓄積が多いことから rDNA より分解能の高い系統樹が得られたと考えられる (表 7)。しかし ITS1

の d_S 値 (0.013) と d_N 値 (0.015) を比べると d_N 値が高い。一般的にアミノ酸の変異を起こす非同義置換は同義置換に比べて Phenotype に大きな影響を持つため、非同義置換は自然選択の影響をより強く受けるが、同義的な変異 (同義置換) は選択圧を受けにくい。そのため進化の過程で、同義塩基置換はアミノ酸の変異を起こす非同義塩基置換より高い頻度で起きているとされ、塩基置換に占める同義置換が多いと考えられている。また系統関係を調べる上で非同義置換は選択圧を受けているため、中立進化に基づく進化過程では非同義置換からは正確な系統的關係を表わすことができないとされ、非同義置換を除外し、同義置換のみを用いて系統解析を行う研究も多い ()。ITS1 の場合、 d_N 値が高く、非同義置換の蓄積が多いことから ITS1 に基づく系統樹は中立な塩基の置換ではなく、偏った系統的關係を表わしていると考えられる。しかし同義置換のみを考慮した ITS1 の系統樹では同義置換数が少ないため、系統的なグループを形成できなかった (図 10)。一方、非同義置換のみを考慮した ITS1 の系統樹は両方の置換を考慮した系統樹と非常に似ていることから ITS1 は非同義置換が同義置換に比べてその影響を系統樹に及ぼしている (図 9, 図 11)。そして非同義置換や両置換を考慮した系統樹からは海洋分離株 Group. I・Group. II とほぼ同一のグループが形成されている。この矛盾は、ITS1 はタンパク質をコードする遺伝子でないため、非同義置換の蓄積に対して選択圧の影響が少なく、ITS1 のすべての塩基置換は中立な進化系統を表わしていると推測する。ITS1 の系統樹が *gyrB* 遺伝子の系統樹と同様のグループを形成したことから、分離源によって異なるグループを形成する可能性を支持した。

【16S rDNA・23S rDNA・*gyrB*・ITS1 に基づく consensus 系統樹】

上記の系統樹の分解能をさらに高めるために保存性の高い遺伝子を組み合わせた consensus 系統樹を作成した (図 12)。この結果、各遺伝子のみの系統樹よりさらに分解能が優れた系統樹が得られた。これは各々の遺伝子が少なからず consensus 系統樹に現れている系統關係を反映していた結果であり、緑膿菌は分離源によって系統的に異なるグループを持つという仮説が考えられる。さらに機能遺伝子の解析からもこの仮説を検証していく。

【*oprD* 遺伝子】

図 13, 図 14 の結果は他の系統樹とほぼ同一のグループ形成を支持した (図 13, 図 14)。また *oprD* 遺伝子の塩基配列の多様性について、株間の平均置換率は 7.7% と *fliC* 遺伝子の次に高い値であったが、 d_N/d_S 比の値は機能遺伝子であるにも関わらず、保存性の高い遺伝子の値と変わらなかった (表 7)。これらのことから、適度な変異の蓄積と d_N/d_S 比の値は系統解析に適した遺伝子の指標になると考えられる。

しかし、系統樹の中には互いに分離源の異なる菌株が混在しているものもあり、*oprD* 遺伝子のみでは分離源によって系統的に異なるグループが形成されているとは断定できない。これは、*oprD* 遺伝子の系統樹は大きく 3 つのクレードに分かれていることとも一致するが、*oprD* 遺伝子のみでは分離源によって系統的な違いはないという Pirnay らの報告と一致する (Pirnay *et al.*, 2002)。

【*mexB* 遺伝子】

mexB の株間の平均塩基置換率は 0.8% と *gyrB* 遺伝子の値に近いことから本研究で用いた *mexB* 遺伝子の塩基配列領域は非常に保存性が高いことがわかった。また d_N/d_S 比は 0.857 と比較的高い値を示していることから、*mexB* 遺伝子は機能遺伝子であるが、系統的な違いを示すほど変異は多くなく、選択圧の影響が大きいいため、系統解析に適していないと考えられる。

【*oprD*・*fliC*・*mexB* 遺伝子に基づく系統樹】

機能遺伝子を組み合わせた consensus 系統樹は分離源によって異なるグループを形成することから、分離源の違いによる系統的に異なるグループが存在していると考えられる。

【*gyrB*・*oprD* 遺伝子に基づく consensus 系統樹】

菌株間の平均塩基置換率 (Mean nucleotide substitutions among pairs of strains) と d_N/d_S 比の

値から *gyrB*, *oprD* が本研究の目的に適した遺伝子であることがわかったことから、これらの遺伝子を組み合わせた系統樹を作成した。この系統樹の結果は、他の系統樹の結果を支持することから上記の仮説を裏付けるデータである。

緑膿菌は分離源による遺伝的タイプは区別できないという従来知見と逆の結論を得た。これは、第一にひとつの遺伝子の塩基配列比較からだけでは系統解析の分解能が低く、精確な系統関係を導けなかった。本研究では塩基配列をつなぎ合わせ、塩基配列の情報量を多くすることでこの結果に到った。またこの結果から変異が極端に多い部分や極端に少ない塩基配列を除けば、ゲノム全体の遺伝子に系統的關係を示す変異は蓄積されていると考えられる。

第二に、従来知見で用いられた試料菌株は臨床分離株と淡水分離株、土壌分離株など物理的に相互に流入することが考えられる場所であることから、これらの分離源に生育する菌株は高い頻度で遺伝子組み換え起こし、クローナルな群集構造が形成されるという結果が得られたのではないか。本研究の海洋分離株は陸域からの影響が少ない外洋域で単離されたものであることから海洋に系統的に独自の緑膿菌がいても不思議はない。しかし、本研究結果から各々のグループの中に他の分離株が混在することや分離源の異なる菌株どうしが複数混在していることから、さらに塩基配列の情報量を増やし、この結果を裏付けていく必要がある。

【イルカ分離株】

図 12、図 17 からイルカ分離株は海洋分離株と系統的に近い関係を持つことがわかった。傷ついたイルカの膿から緑膿菌が分離されたという報告からも緑膿菌はイルカを宿主とすることが可能であり、海洋においてイルカなどの海洋哺乳類が緑膿菌の保菌者である可能性が考えられる (Diamond SS, 1979)。しかし、本研究は未だ推測であり、イルカ分離株が少ないことや生存しているイルカからの分離株でないこと、イルカ以外の海洋哺乳類の分離株がないことなどこの推測を裏付けるための研究は今後の課題である。

第三章 総合考察

緑膿菌は臨床、土壌、淡水、動植物体、そして海洋と、多様な環境に生育できる生物である。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。

この疑問に答えるためには、まずそれぞれの環境中の株が系統的に相互にどの程度独立性を持ったものなのかを調べる必要がある。もし頻繁に相互の環境間の移動あるいは遺伝子伝播が行なわれているとすれば、異なる環境中から得られた株の間でも、相互の遺伝子構造ならびにそれによって規定される性質は似通っていることになる。しかしある程度環境に応じて隔離がなされているとすれば、それぞれに特徴的な系統群が見えてくるはずである。前者の場合には、緑膿菌は相互に有用な遺伝子を交換しつつ、様々な環境で生き永らえてきたと考えられるし、後者の場合には、基本的な性質を規定する遺伝子群に加え、それぞれの環境に特徴的な遺伝子とそれに規定される形質が形作られ、個々の環境に適応しながら分布を広げてきた、と考えられる。

海洋分離株、沿岸分離株、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。しかし、ひとつひとつの遺伝子によって塩基置換の速度や細胞外環境の感受性はそれぞれ異なるため、精確な系統的關係を導くためには遺伝子を組み合わせ、比較する塩基情報を増やす必要があった。本研究では保存性の高い遺伝子を組み合わせた系統樹を作成したところ、海洋分離株が 2 つのグループ (Group. I ,Group. II) を形成した。また機能遺伝子を組み合わせた系統樹からも、海洋分離株のグループ (Group. II) が形成された。Group. I は 2005 年 5 月に相模湾沖の測点 S1 の表層と黒潮沖の測点 S2 の表層から単離された菌株からなり、一方 Group. 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含まれた。測点によるまとまりはないが、採集時期の異なる菌株

が同じグループに属した。これらの結果から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。

また d_s , d_N , d_N/d_s 比と株間の塩基置換率 (%) の検討の結果、系統解析に適した遺伝子の推定を行えることが系統樹の結果からもわかった。本研究で用いた遺伝子の中で *gyrB* 遺伝子と *oprD* 遺伝子が本研究の目的に適した遺伝子であることがわかった。この2つの遺伝子を組み合わせた系統樹からも海洋分離株のグループの形成は確認された。

gyrB 遺伝子に着目した分離源ごとの塩基置換数を求めたところ、海洋分離株は淡水分離株や臨床分離株に比べて塩基置換数が少ないことが明らかとなった。この結果は海洋分離株が海洋環境という陸域からの影響が少なく、安定した環境の中で進化の遅れた原始的なグループであることを示しているのではないだろうか。保存性の高い遺伝子を組み合わせた系統樹では海洋分離株が他の *Pseudomonas* 属に系統的に近い位置を占めた。このことから緑膿菌は海洋を起源とし、陸域へとその分布を広げたのではないだろうか。

このように、遺伝子を組み合わせた系統樹から分離源ごとに系統的に異なるグループが形成された。この結果は異なる環境にはそれぞれに系統的に独自の緑膿菌が生育しているという仮説を支持する。従来知見では分離源によって遺伝的タイプを区別できないとされてきたが、本研究では逆の結果を得た。確かに本研究の結果もひとつひとつの遺伝子の結果からでは遺伝的タイプに違いがないと結論づけることもできるが、塩基配列をつなぎ合わせ、塩基配列の情報量を増やすことでこの仮説をさらに支持する結果が得られる可能性がある。この仮説から緑膿菌がどのように多様な環境へ分布を広げてきたか、この疑問に対する答えが浮かぶ。

この地球上のある環境に出現した緑膿菌は次第に遺伝子に変異を蓄積し、そこでの最適の株が選択されることを通じて系統的に独自のグループを形成した。その一方で、緑膿菌の機能遺伝子が極めて変異し易い、あるいは遺伝子伝播し易い性質を保持することから、一部の株がその環境から別の環境に侵入し、そこへの定着に成功した。これらの株は同様に遺伝的変異を蓄積し、以前の環境中の株群とは異なる遺伝子型を持ったグループへと進

化を遂げた。今回の解析結果は、最初海で生まれた緑膿菌の Group I が淡水から陸域、さらに動植物体へと分布を広げていったこと、そして Group II は比較的最近になって陸あるいは淡水から再び海へと侵入、定着したことを示唆している。このようなプロセスは、分子進化に伴う生物の適応放散という点から非常に興味深いことと思われる。

しかしながら、今回の研究結果からは、何故緑膿菌が別種へと変異を遂げることなく、このように生息域を広げてきたのか、緑膿菌の遺伝子のどのような構造的特徴がそれを可能にしたのかは不明である。この解明には海洋株を含めた詳細な遺伝子構造の解析が必要であり、遺伝学的あるいは進化学的にも魅力的かつ大きな課題と思われる。少なくとも本研究はそうした新たな展開を可能にする学問的基礎、さらに生物材料を提示することができたと考える。

今回のこうした知見は、他の菌についても同様のテーマを提供することに通じる。昨年乗船した白鳳丸 KH-04-5 次航海において、南太平洋海域で緑膿菌の分離を試みたが、得られなかった。その一方で、*Pseudomonas putida* と簡易同定された株が多数分離された。この種は緑膿菌に比較的近縁とされるが、やはり海洋からの分離例はない。従って緑膿菌と同様、その分離域に応じてどのような系統関係が見出されるかは興味深い課題である。緑膿菌と同様の結果が得られれば、*Pseudomonas* 属に共通した性質が、地球レベルでの分布を可能にしていると判断される。逆に異なる結果が得られるならば、緑膿菌に固有の生物的特徴を絞り込む作業が待たれる。

今回の結果は単に海洋から分離された緑膿菌の系統的な位置づけを明らかにするだけでなく、地球規模で分布する生物として、進化的側面から様々な興味深い課題を掘り起こすことができた。今後さらにデータを積み重ねることにより、緑膿菌がいつどこからどのように地球上全体に広がってきたかを明らかにしていきたい。

表1. 淡青丸KT04-9次航海における採水地点と
その深度(m)、試料海水の濾過量(ml)と用いた培地

採水地点	深度 (m)	海水濾過量 (ml) と用いた培地		
		NA	NAC	KCNA
T1	0	1	100	100
	10	1	100	100
T2	0	1	100	100
	20	1	100	100
T3	0	1	100	100
	20	1	100	100
T4	0	1	200	200
	20	1	200	200
T5	0	10	300	300
	20	10	300	300

表1. 淡青丸KT04-9次航海における採水地点と
その深度(m)、試料海水の濾過量(ml)と用いた培地

採水地点	深度 (m)	海水濾過量 (ml) と用いた培地		
		NA	NAC	KCNA
S1	0	10	1000	1000
	20	10	1000	1000
	200	10	1000	1000
	1490	10	1000	1000
S2	0	10	1000	1000
	20	10	1000	1000
	200	10	1000	1000
	4000	10	1000	1000
S3	0	10	1000	1000
	20	10	1000	1000
	200	10	1000	1000
	2200	10	1000	1000
S4	0	10	1000	1000
	20	10	1000	1000
	200	10	1000	1000
	2650	10	1000	1000

表2. 培地の組成

培地名	試薬名	g/DW (L)
NA寒天培地 (pH 6.8 ± 0.2)	Difco™ Nutrient Broth (BD)	8
	NaCl (Wako)	5
	Bacto™ Agar (最終濃度1.5%)	15
NAC寒天培地 (pH 7.4 ± 0.1)	Bacto™ Peptone (BD)	20
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Wako)	0.61
	K ₂ HPO ₄ (Wako)	0.3
	Cetyltrimethyl ammonium Bromide (Wako)	0.2
	Nalidixic Acid (SIGAMA)	15 mg
	Bacto™ Agar (BD) (最終濃度1.5%)	15
CKNA寒天培地 (pH 7.3 ± 0.2)	Bacto™ Peptone (BD)	20
	MgSO ₄ ·7H ₂ O (Wako)	0.61
	K ₂ HPO ₄ (Wako)	0.3
	Cetyltrimethyl ammonium Bromide (Wako)	0.2
	Nalidixic Acid (SIGAMA)	5 mg
	Kanamycin sulphate (Wako)	50 mg
	Bacto™ Agar (BD) (最終濃度1.5%)	15
NA液体培地 (pH 6.8 ± 0.2)	Difco™ Nutrient Broth (BD)	8
	NaCl (Wako)	5

表3. 淡青丸KT04-9次航海において単離した緑膿菌株

採水地点	S1, 0m	S1, 1490m	S2, 0m
緑膿菌株数	7	2	11

表4. 採取したイシイルカの器官と単離した緑膿菌株数

採取部分	表皮	鼻腔	口腔内	喉	食道	気管支	胃	肝臓	腸上部	腸下部	筋肉内壁
コロニー有無 (NAC培地、25℃)	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○
コロニー数 (CKNA培地、42℃)	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0

表5. 系統解析に用いたプライマー情報

遺伝子	コードするタンパク質 (rRNA) とその機能	プライマー	増幅断片長 (bp)	出典
16S rDNA	SSU rRNA	20F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1500R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT	1213	Cheneby <i>et al.</i> , 2000 Wang & Wang 1996
23S rDNA	LSU rRNA	23S-F: CCTAGGATAACCTAGGTATC 23S-R: AAAAGACGACTCGTCATCAGC	1144	本研究
ITS1	16S-23S rRNA間のスペーサー領域	rrn16S: GAAGTCGTAACACGG rrn23S: CAAGGCATCCACCGT	503	Guasp <i>et al.</i> , 2000
<i>gyrB</i>	DNA Gyrase subunit B 弛緩型DNAに負の超らせんを導入する酵素	<i>gyrB</i> -F: ACGCCGGCGGCAAGTTCGA <i>gyrB</i> -R: GCCGGGTCCTTTTCCTGGCA	913	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
<i>oprD</i>	外膜タンパク質 OprD アミノ酸などの小分子の取り込み、抗生物質の通過孔	pDF1: ATGAAAGTGATGAAGTGGAGC pDR1: CAGGATCGACAGCGGATAGT	1129	Yoneyama <i>et al.</i> , 1992
<i>fliC</i>	鞭毛タンパク質 flagellin 運動性と走化性、表面構造への吸着	CW45: GGCAGCTGGTTNGCCTG CW46: GGCCTGCAGATCNCAA	910	Winstanley <i>et al.</i> , 1996
<i>mexB</i>	抗生物質の排出ポンプ MexB プロトン駆動力による輸送によって異物を排出	<i>mexB</i> -F: TGATCTACCGGCAGTTCTC <i>mexB</i> -R: AACGGAATCGACCAGCTTTC	1131	本研究

表 6. 系統解析に用いた分離源の異なる緑膿菌株

No.	試料菌株番号	保管菌株番号	分布域	採集場所
1	PAR- 2	97	海洋域	N7 (138°E, 31.5°N), 200m (KH-04-1)
2	PAR- 3	60	海洋域	N2 (138°E, 34°N), 200m (KH-04-1)
3	PAR- 5-1	1179	海洋域	S1, 0m (KT-03-5)
4	PAR- 8	1200	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
5	PAR- 10	1303	海洋域	S4, 0m (KT-03-5)
6	PAR- 12-1	1276	沿岸域	東京湾
7	PAR- 16-1	1563	淡水域	多摩湖
8	PAR- 17	1540	淡水域	多摩湖
9	PAR- 19	1506	淡水域	荒川
10	PAR- 20	1518	淡水域	荒川
11	PAR- 23	1683	臨床	
12	PAR- 24-1	1921	臨床	
13	PAR- 25	1155	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
14	PAR- 29	1171	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
15	PAR- 30	1176	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
16	PAR- 31	1183	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
17	PAR- 33	1203	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
18	PAR- 37	1163	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
19	PAR- 47	1202	海洋域	S2, 0m (KT-03-5)
20	PAR- 76	1549	淡水域	石神井池
21	PAR- 77	1550	淡水域	石神井池
22	PAR- 78	1557	淡水域	井の頭公園池
23	PAR- 79	1558	淡水域	井の頭公園池
24	PAR- 82-1	1584	淡水域	湖
25	PAR- 84-1	1589	淡水域	湖
26	PAR- 85	1590	淡水域	湖
27	PAR- 88	1501	淡水域	荒川
28	PAR- 89	1504	淡水域	荒川
29	PAR- 90	1505	淡水域	荒川
30	PAR- 92	1508	淡水域	荒川
31	PAR- 94	1520	淡水域	荒川

表 6. 系統解析に用いた分離源の異なる緑膿菌株

No.	試料菌株番号	保管菌株番号	分布域	採集場所
32	PAR- 99	1924	臨床	埼玉県
33	PAR- 101	1920	臨床	埼玉県
34	PAR- 102	1673	臨床	東京都
35	PAR- 103	1721	臨床	北海道
36	PAR- 104	1682	臨床	岡山県
37	PAR- 105	1708	臨床	埼玉県
38	PAR- 106	1709	臨床	埼玉県
39	PAR- 107	1732	臨床	宮城県
40	PAR- 109	1710	臨床	埼玉県
41	PAR- 110	1922	臨床	埼玉県
42	PAR- 111	1923	臨床	埼玉県
43	PAR- 112	1733	臨床	宮城県
44	PAR- 113	1757	臨床	神奈川県
45	PAR- 222	222	海洋域	S2, 0m (KT-04-9)
46	PAR- 223	223	海洋域	S2, 0m (KT-04-9)
47	PAR- 224	224	海洋域	S2, 0m (KT-04-9)
48	PAR- 226	226	海洋域	S1, 1490m (KT-04-9)
49	PAR- 235	235	海洋域	S1, 0m (KT-04-9)
50	PAR- 238	238	海洋域	S2, 0m (KT-04-9)
51	PAR- 239	239	海洋域	S2, 0m (KT-04-9)
52	PAR- 240	240	海洋域	S1, 0m (KT-04-9)
53	PAR- 241	241	海洋域	S1, 0m (KT-04-9)
54	PAR- 242	242	海洋域	S1, 0m (KT-04-9)
55	PAR- 243	243	海洋域	S1, 0m (KT-04-9)
56	PAR- 244	244	イルカ	岩手県大槌湾
57	PAR- 245	245	イルカ	岩手県大槌湾
58	PAR- 246	246	イルカ	岩手県大槌湾
59	PAR- 251	T- 1	沿岸域	東京湾 T- 1 (KT-00-12)
60	PAR- 252	T- 2	沿岸域	東京湾 T- 2 (KT-00-12)
61	PAR- 253	T- 3	沿岸域	東京湾 T- 3 (KT-00-12)

表7. 緑膿菌の遺伝子塩基配列の多様性

遺伝子	d_S	d_N	d_N/d_S	Mean nucleotide substitutions among pairs of strains (%)
16S rDNA	0.001 (0.0012)	0.001 (0.0008)	0.667	0.1
23S rDNA	0.003	0.001	0.333	0.1
<i>gyrB</i>	0.029	0.001	0.034	0.7
ITS1	0.013	0.015	1.154	0.2
<i>mexB</i>	0.007	0.006	0.857	0.8
<i>oprD</i>	0.152	0.051	0.336	7.7
<i>fliC</i>	0.113	0.097	0.858	11.5

表8. 分離源の違いによる $gyrB$ 遺伝子塩基配列情報

分離源	菌株数	塩基配列長 (bp)	No. of Polymorphic sites				
			Total	Synonymous	Nonsynonymous	Parsimony-informative	Sigleton
すべての試料菌株	58	852	31	24	7	23	8
海洋	22	852	11	11	0	9	2
臨床	15	852	16	14	2	10	6
淡水	15	852	21	15	6	10	11
イルカ	3	852	0	0	0	0	0
沿岸	3	852	7	7	0	0	7

図1. 東京湾における採水地点

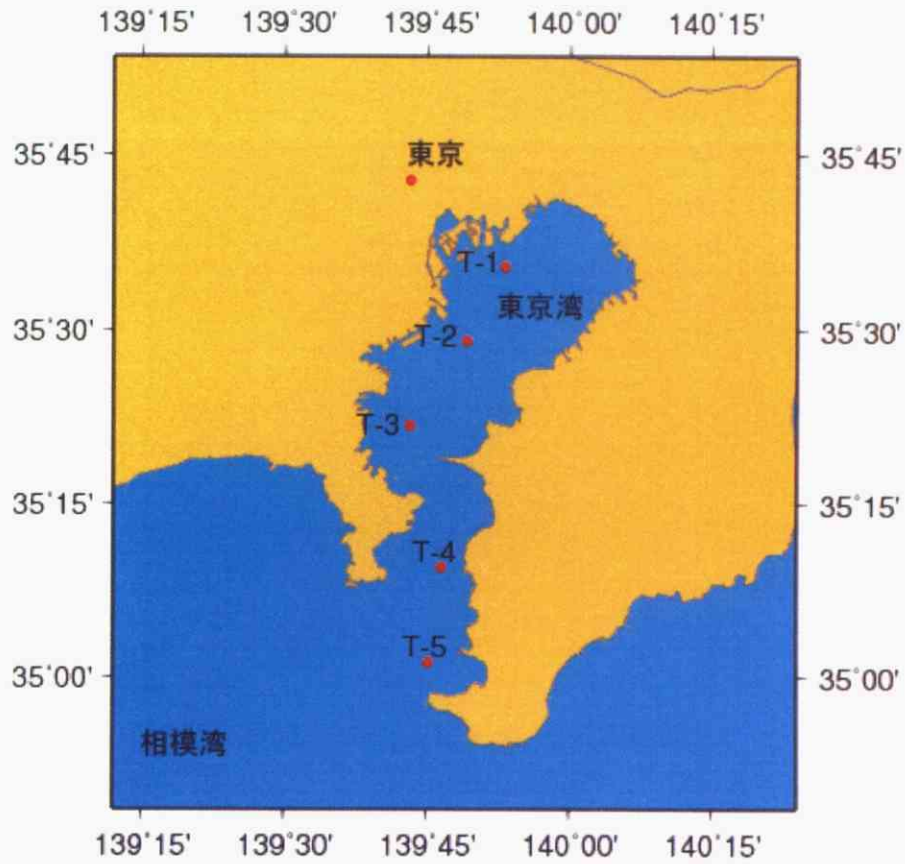


図2. 太平洋における採水地点

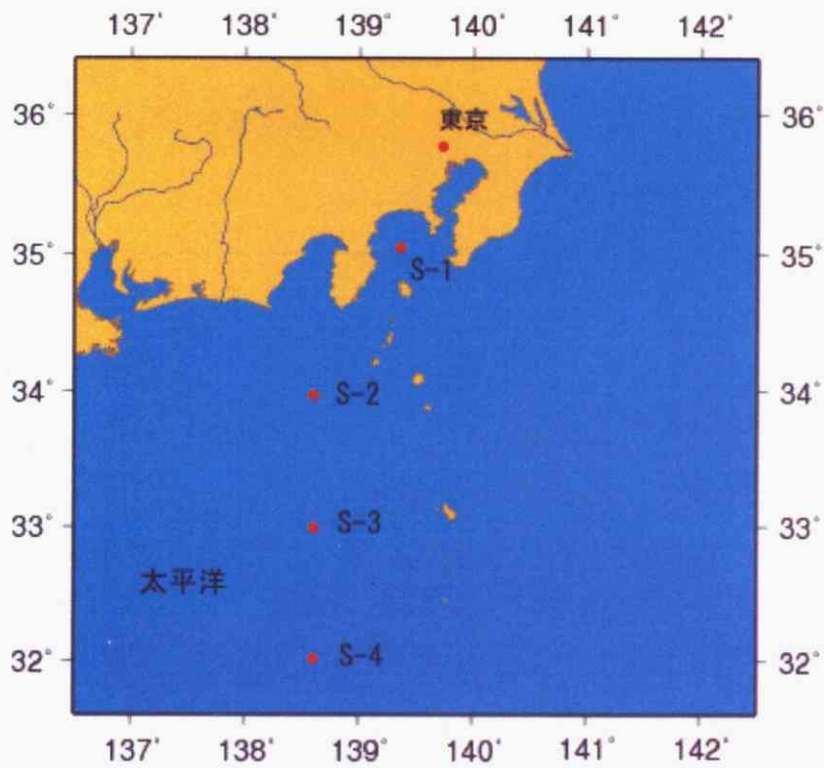


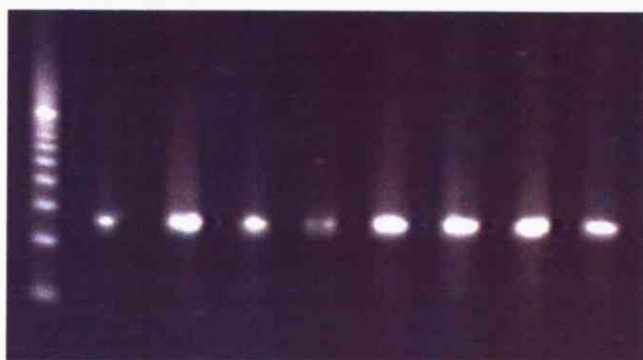
図 3. 23S rDNA 専用プライマーを用いた PCR 結果



Lane 1 (左から); 500bp size marker, Lane 2 - 4; 沿岸分離株 (油壺湾から)
Lane 5; 標準株 PAO1, Lane 6; 他の *Pseudomonas* 属
Lane 7; 他の *Pseudomonas* 属, Lane 8; 海洋分離株 PAR-8

用いた菌株は 16S rDNA 塩基配列による同定済みのものを用いた。Lane; 6 と Lane; 7 の株は緑膿菌ではないことが上記の同定結果から明らかにされている。

図 4. *mexB* 遺伝子専用プライマーを用いた PCR 結果



Lane 1 (左から); 500bp size marker, Lane 2 - 5; 沿岸分離株 (油壺湾から)
Lane 6; 海洋分離株 PAR-8, Lane 7; 他の *Pseudomonas* 属
Lane 8; 他の *Pseudomonas* 属, Lane 9; 標準株 PAO1

用いた菌株は 16S rDNA 塩基配列による同定済みのものを用いた。Lane; 7 と Lane; 8 の株は緑膿菌ではないことが上記の同定結果から明らかにされている。

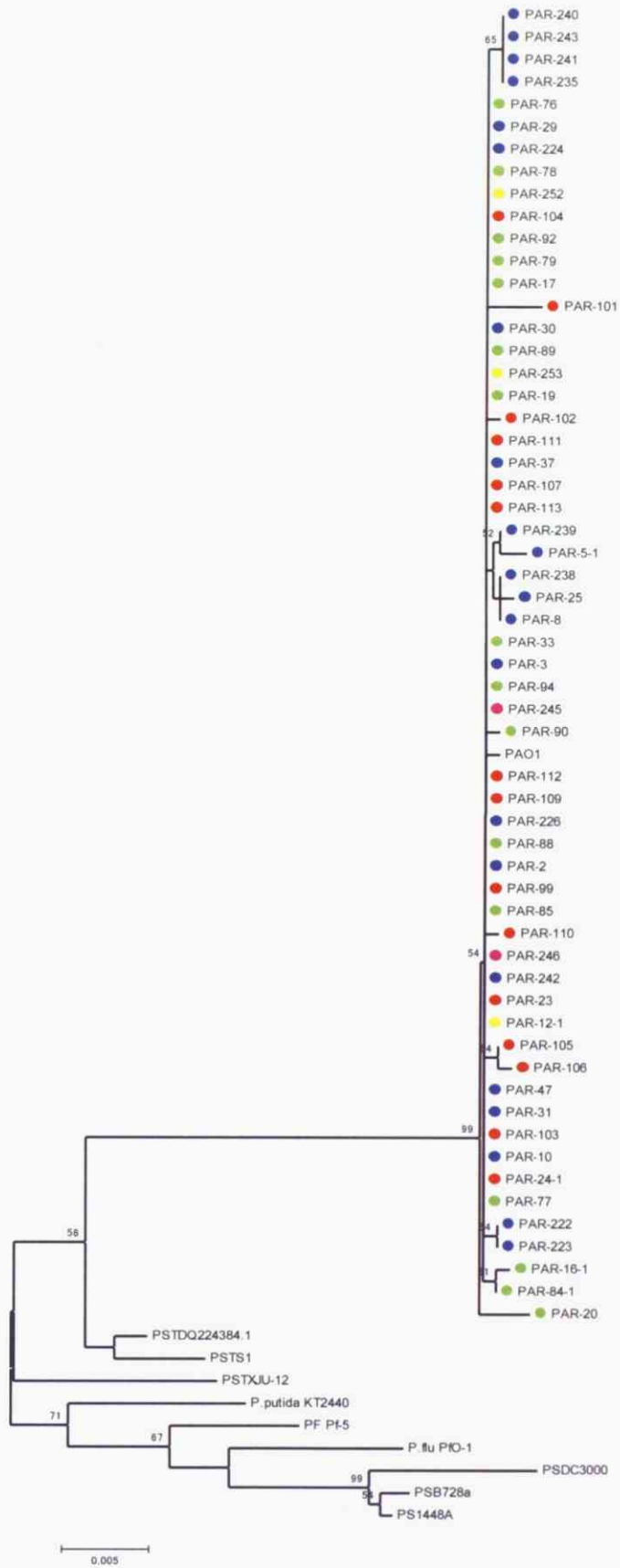


図5. 16S rDNAに基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

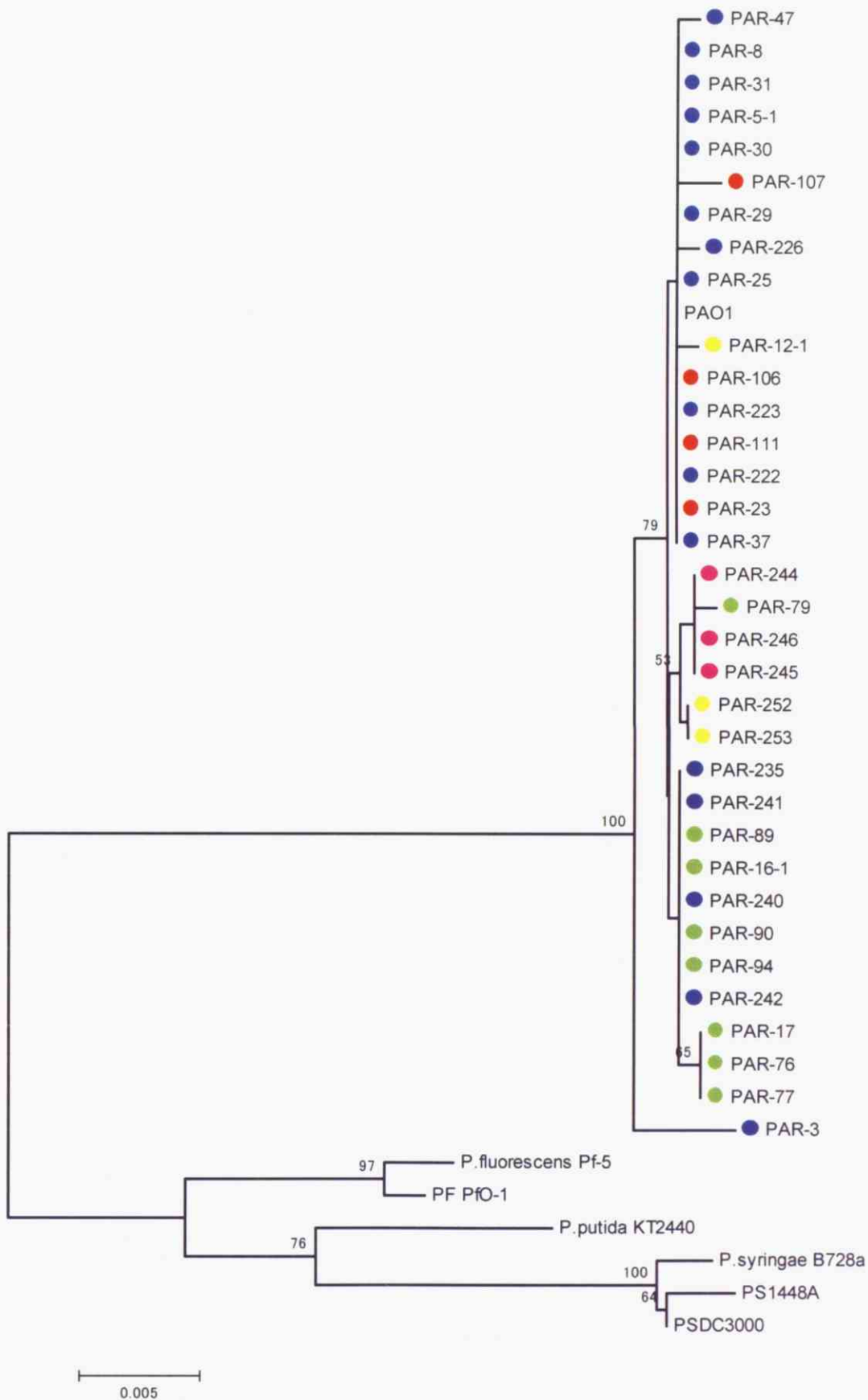


図 6. 23S rDNA に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルガ分離株

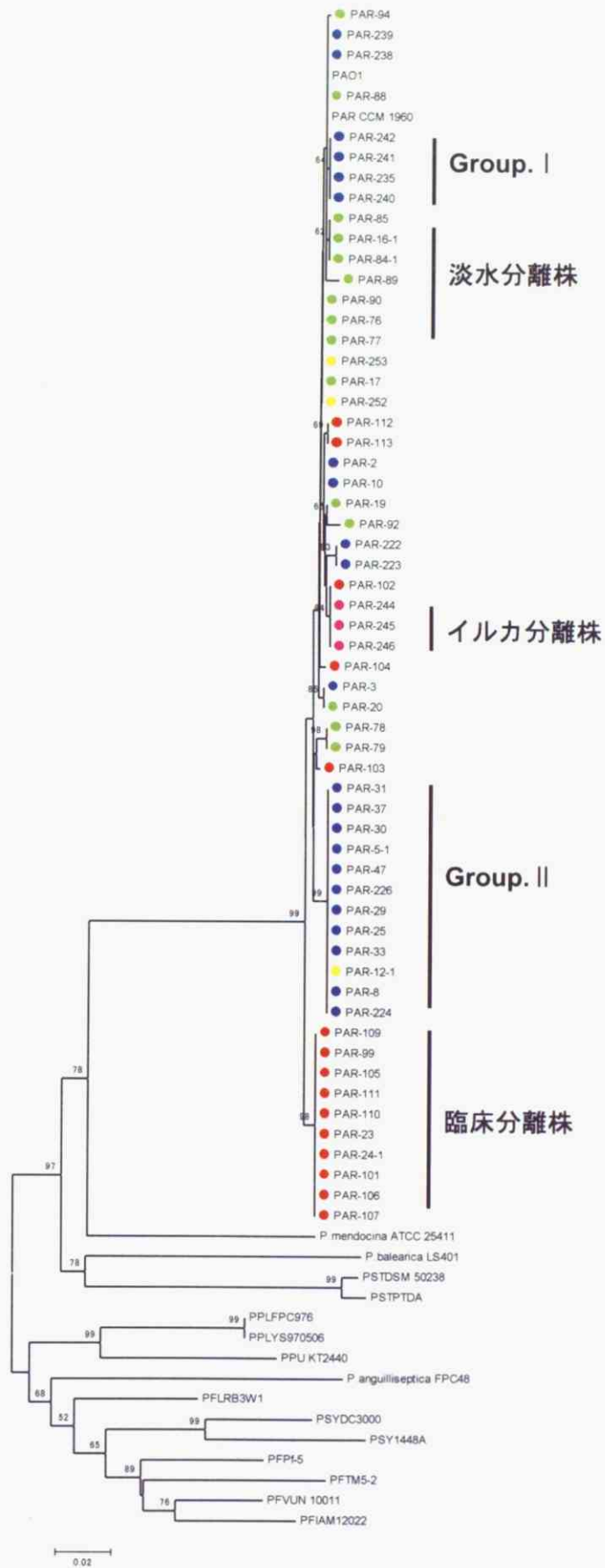


図7. *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

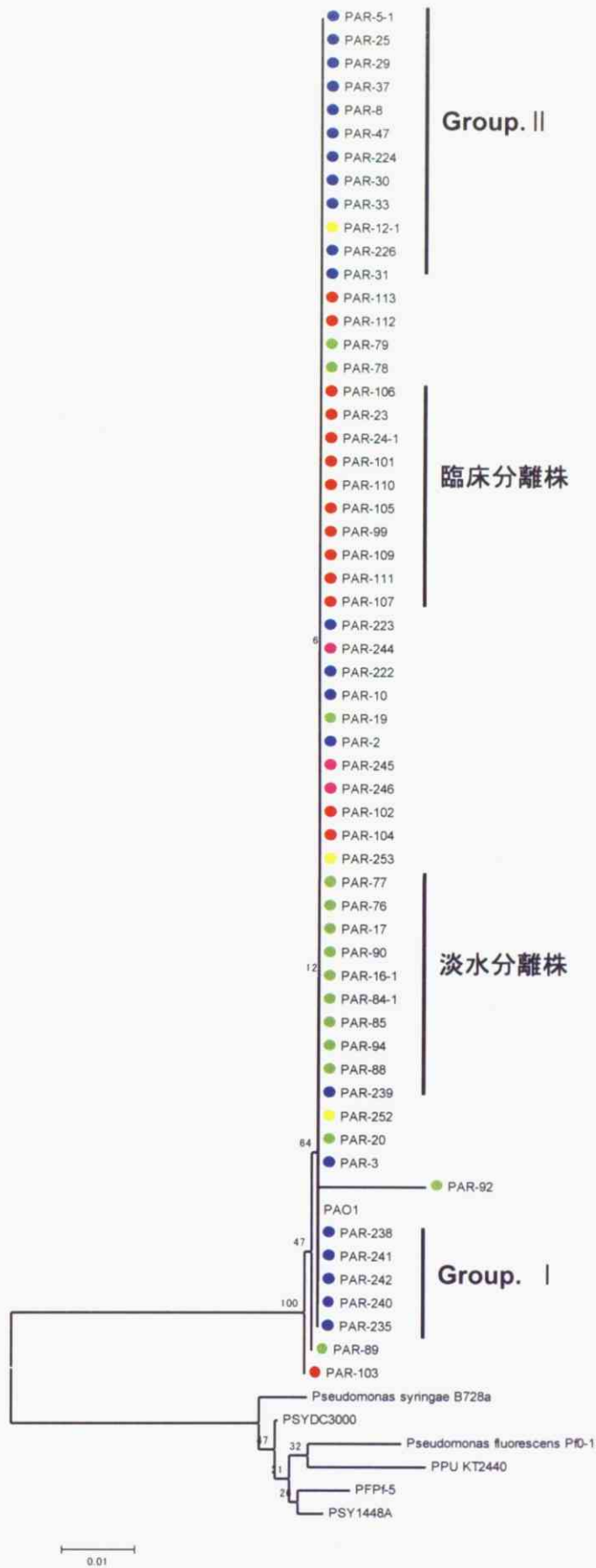


図 8. *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹 (同義置換のみ)

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

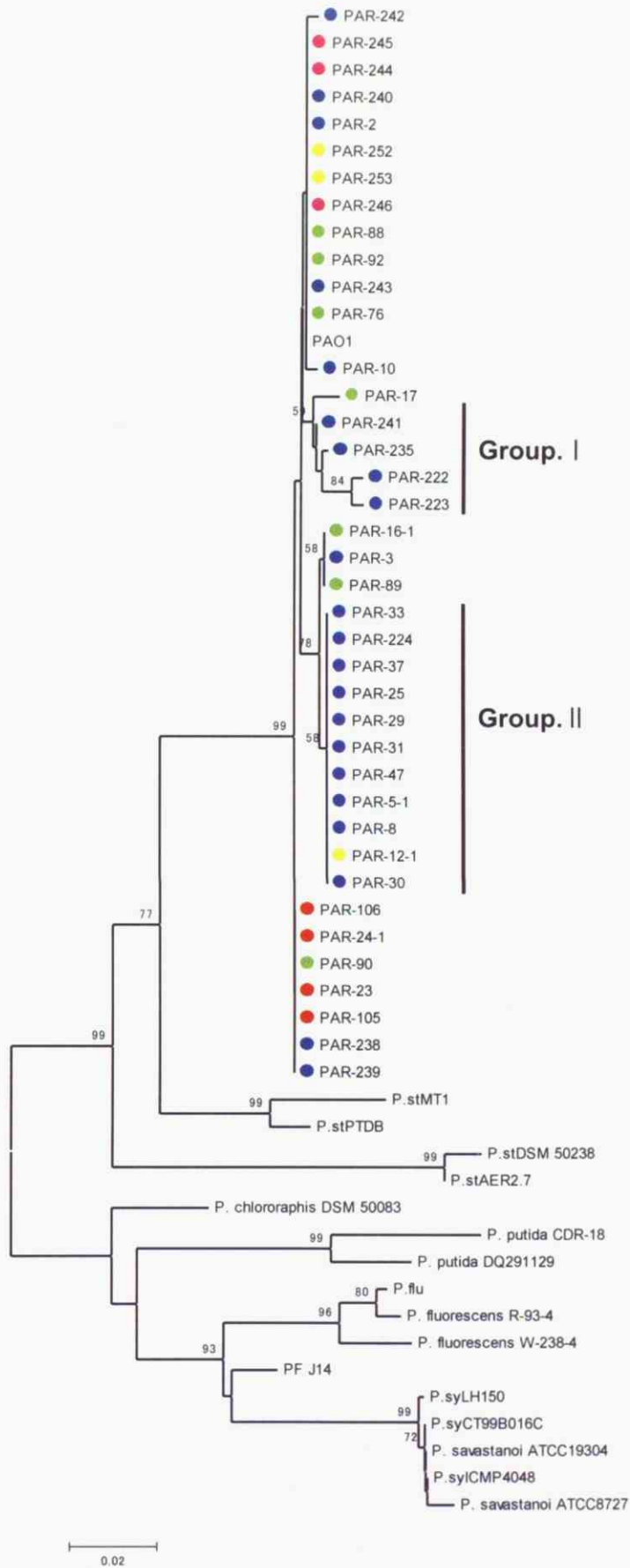


図9. ITS1に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

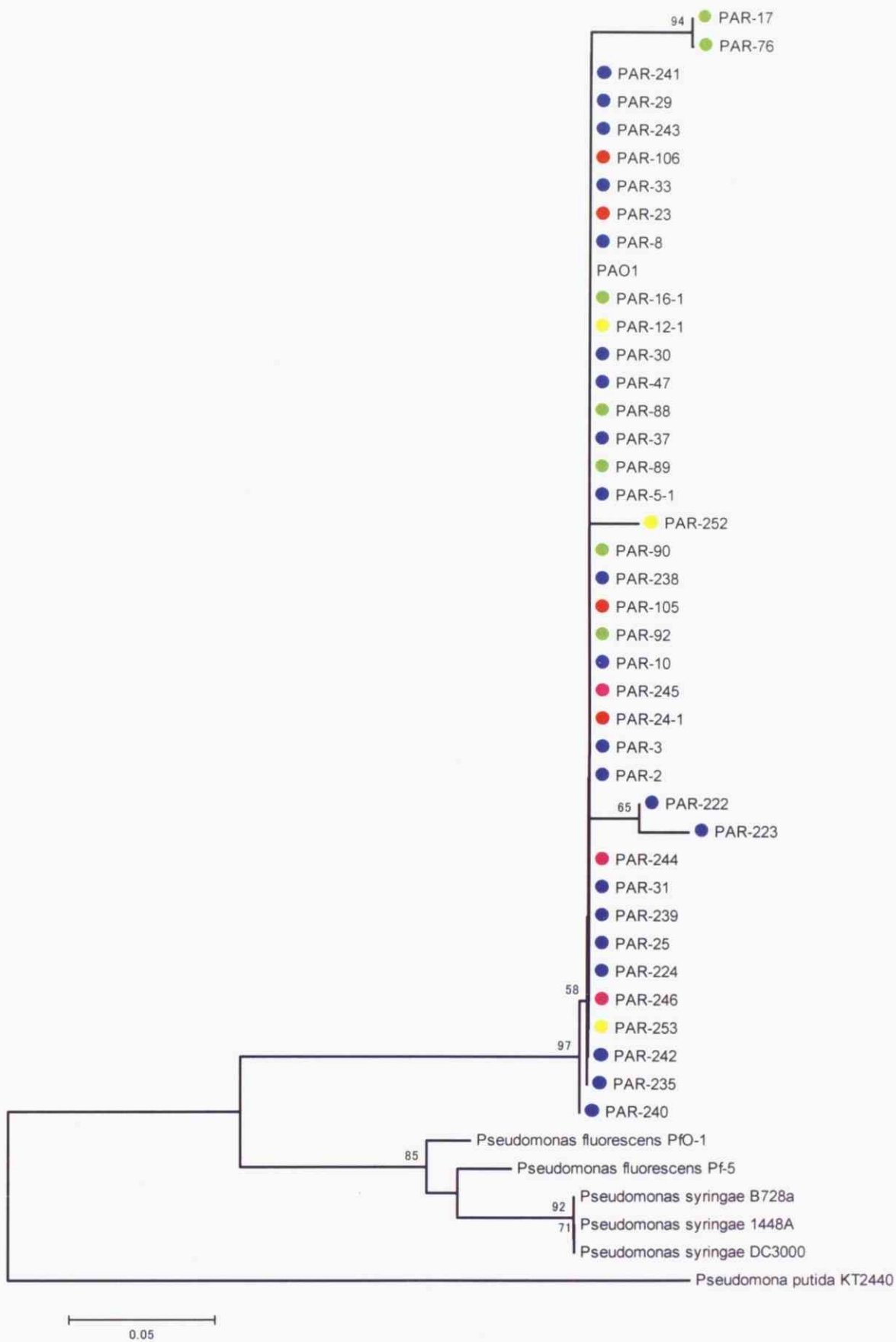


図 10. ITS1 に基づく系統樹 (同義置換のみ)

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルガ分離株

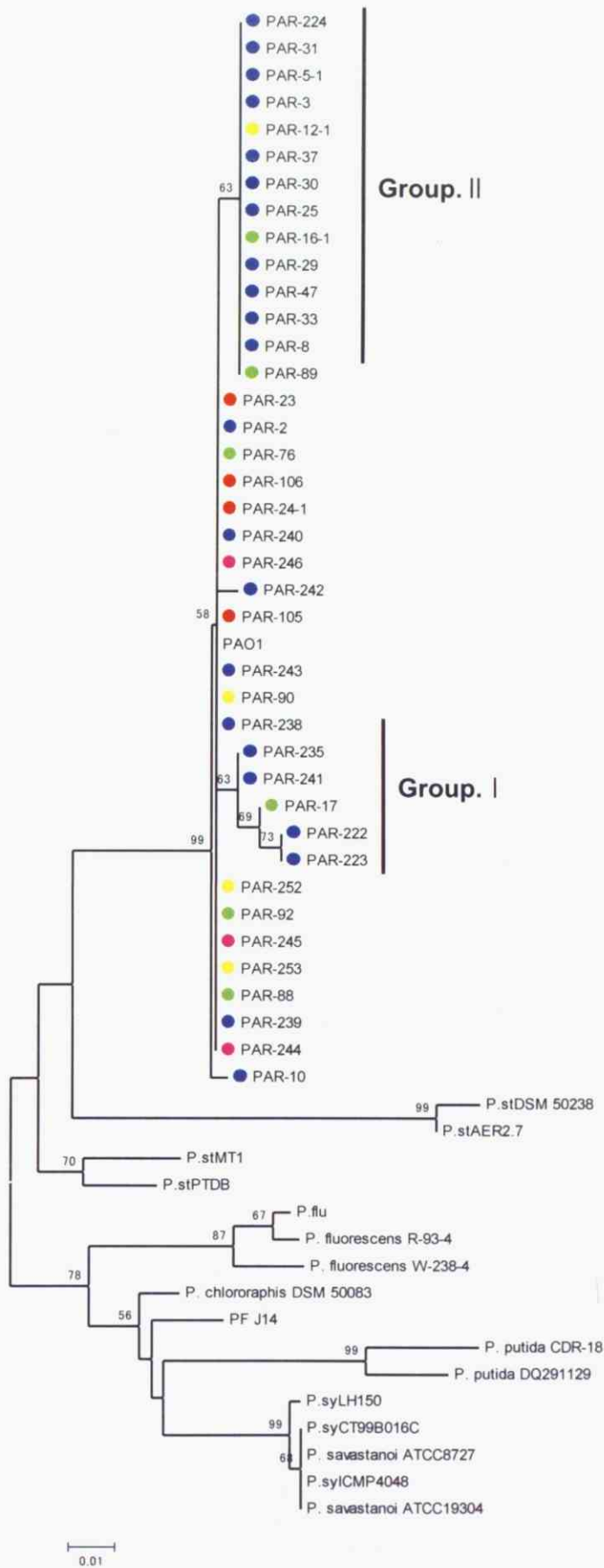


図 11. ITS1 に基づく系統樹 (非同義置換のみ)

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

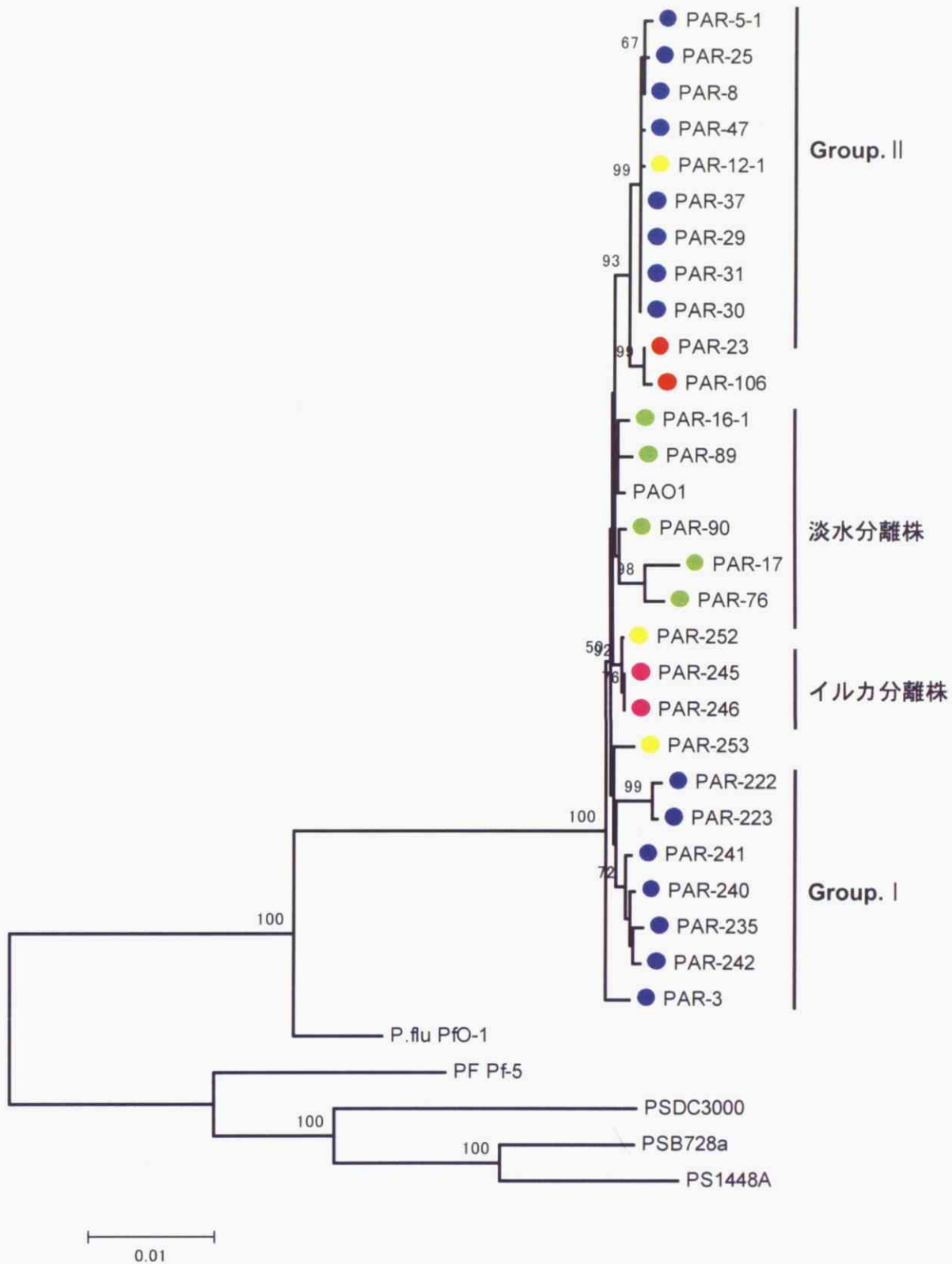


図 12. 16S rDNA・23S rDNA・*gyrB*・ITS1 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

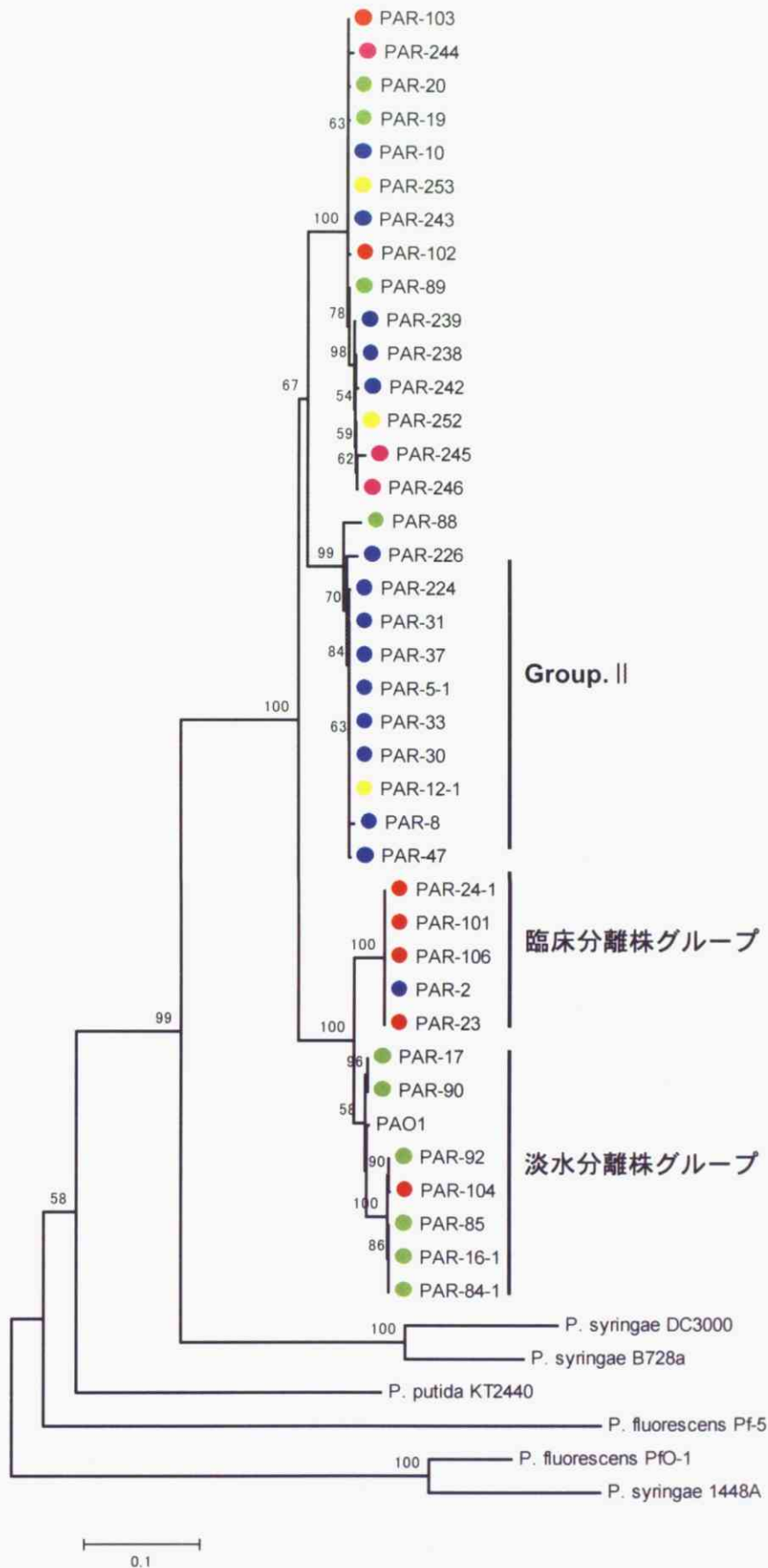


図 13. *oprD* 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

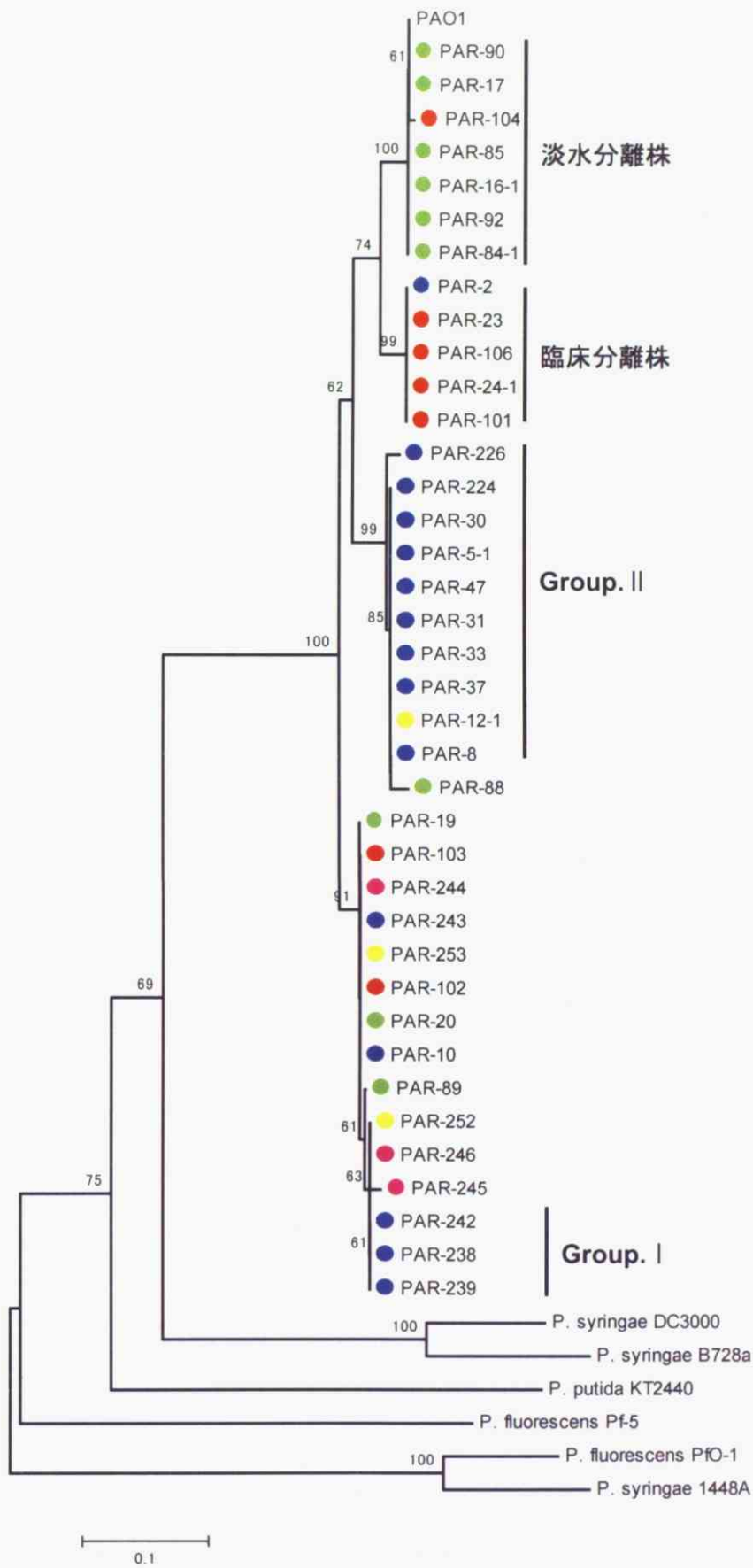


図 14. *oprD* 遺伝子に基づく系統樹 (同義置換のみ)

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

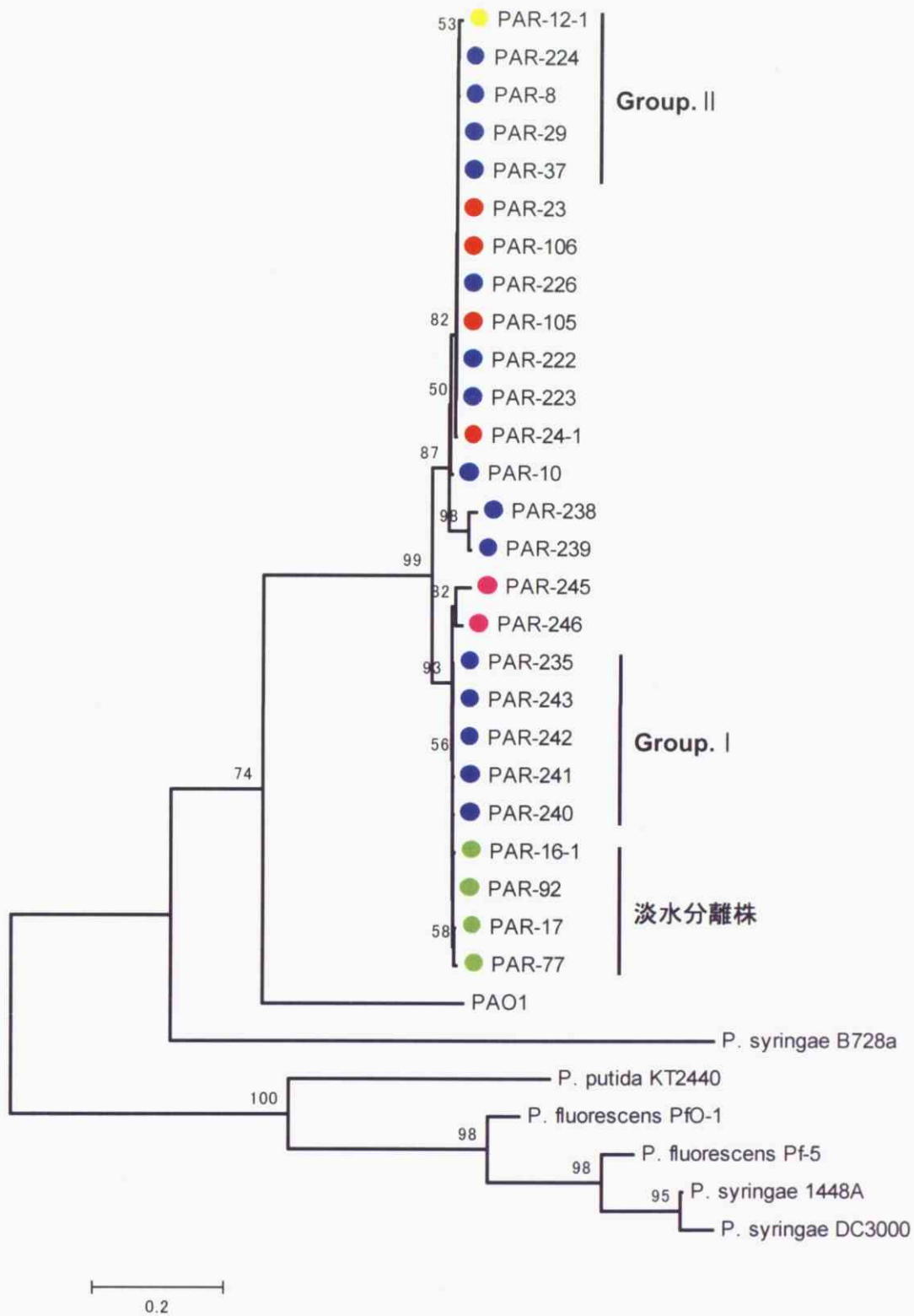


図 15. *fliC* 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

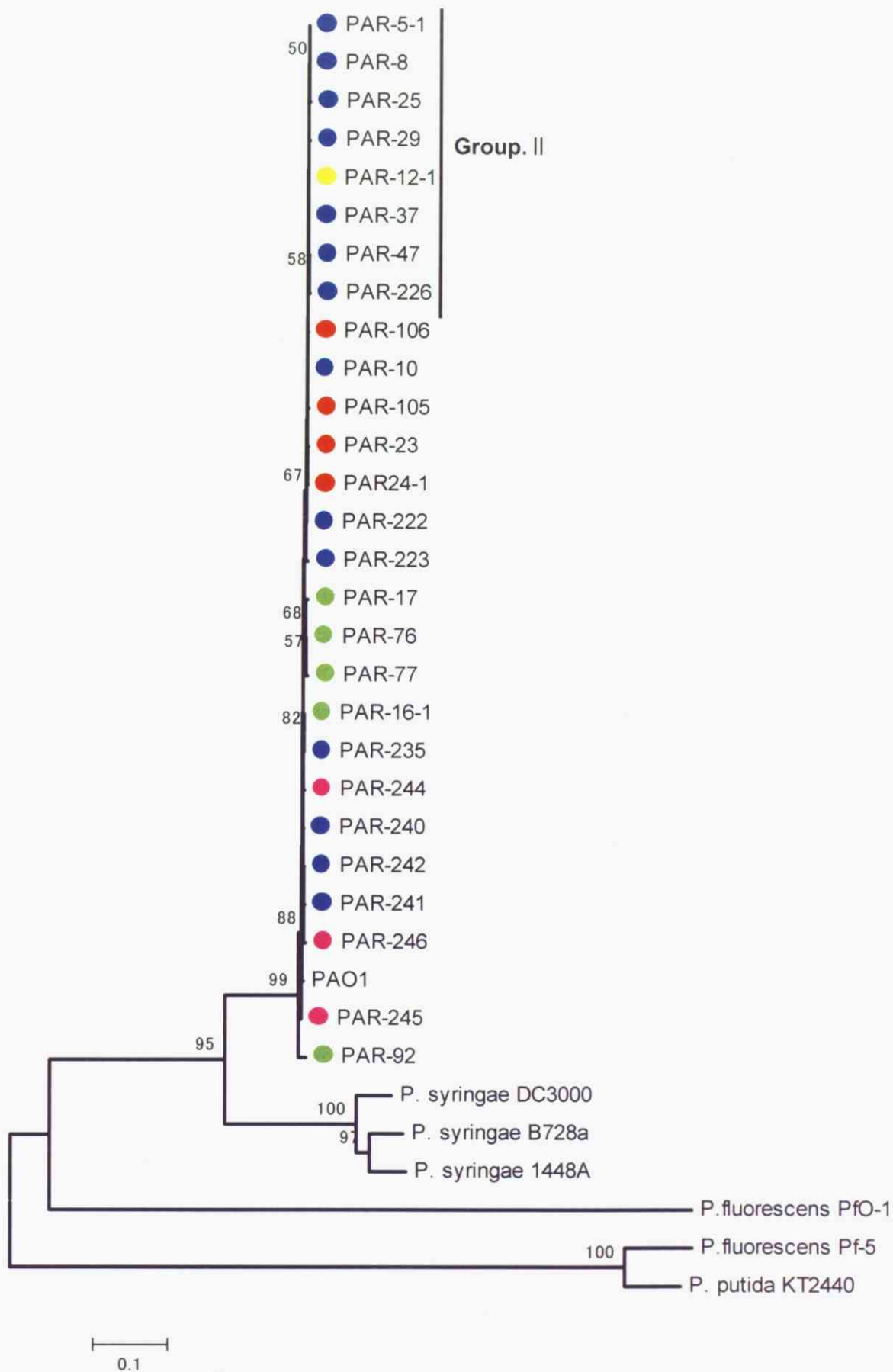


図 16. *mexB* 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

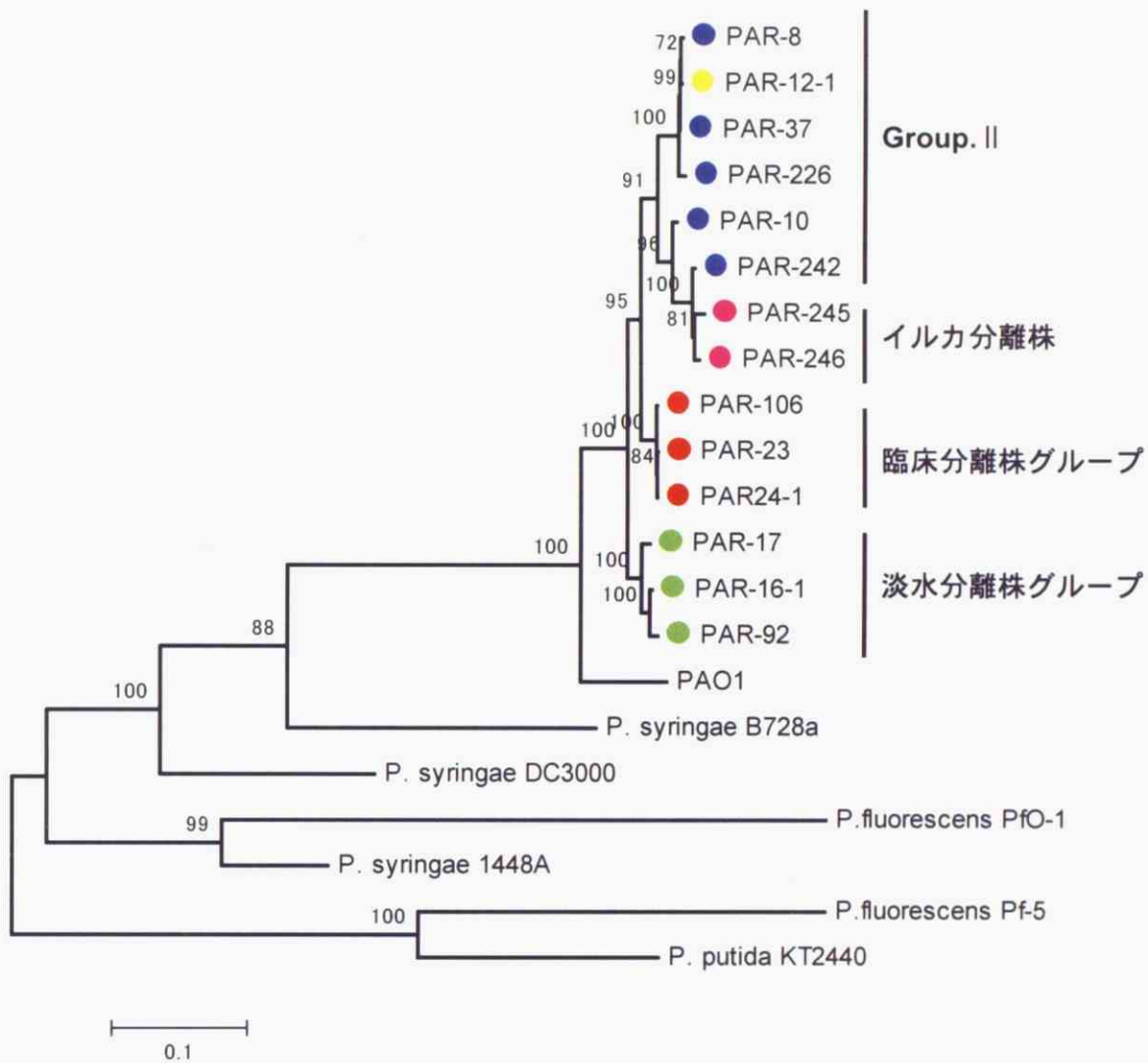


図 17. *mexB*・*oprD*・*fliC* 遺伝子に基づく系統樹



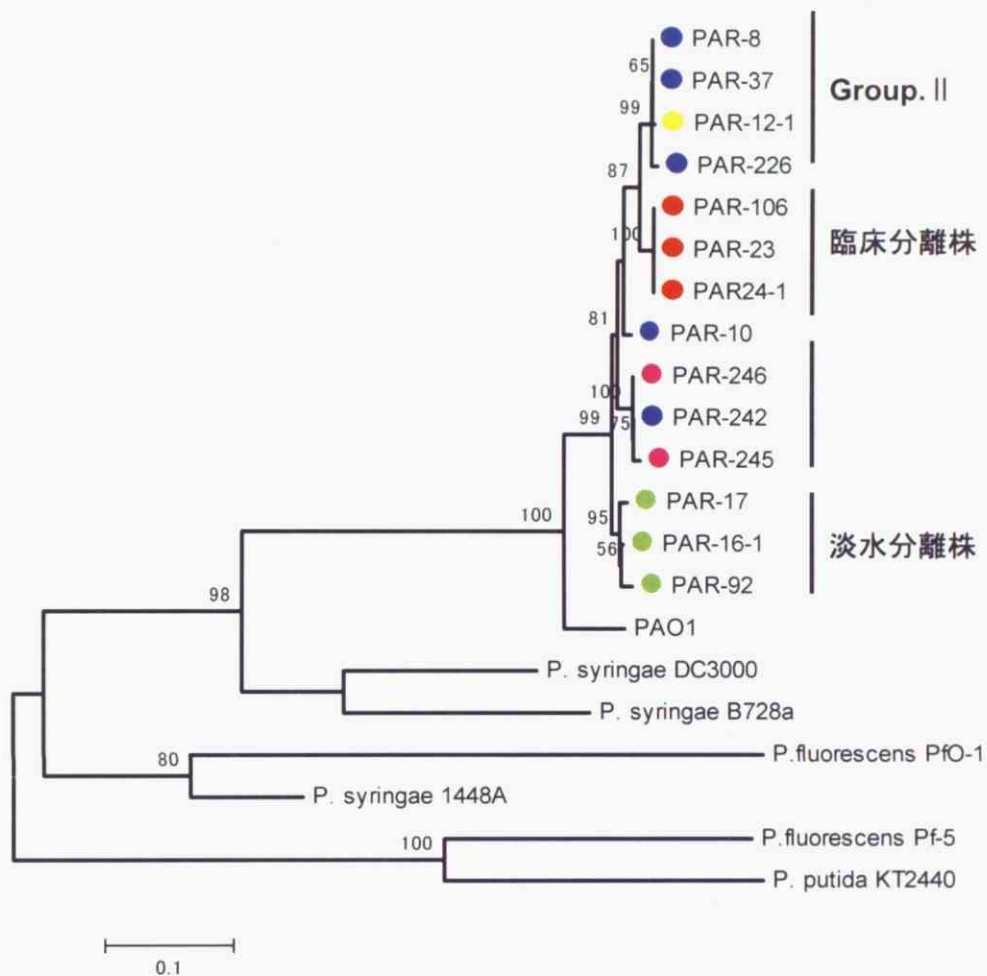


図 18. *mexB*・*oprD*・*fliC* 遺伝子に基づく系統樹 (同義塩基置換のみ)



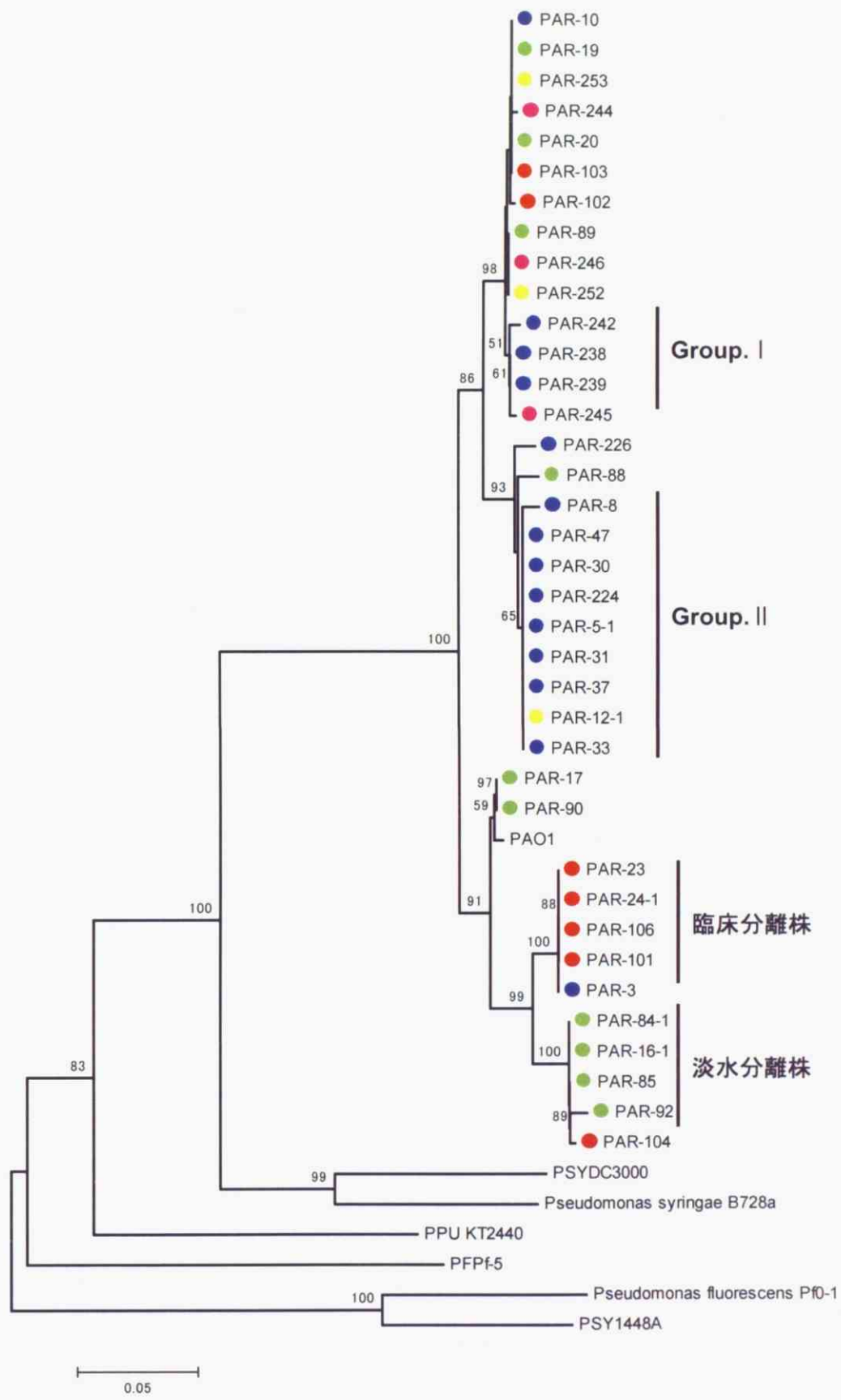


図 19. *gyrB*・*oprD* 遺伝子に基づく系統樹

● 海洋分離株、● 東京湾分離株、● 淡水分離株、● 臨床分離株、● イルカ分離株

引用文献

Ajello, G. W., and Hoadley, A. W. 1976. Fluorescent *Pseudomonads* capable of growth at 41°C but distinct from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. **4**:443-449.

Allredge, A. L., and M. W. Silver. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. Prog. Oceanogr. **20**:41-82.

Allison, J. S., Dawson, M., Drake, D., and Monte, T.C. 1985. Electrophoretic separation and molecular weight characterization of *Pseudomonas aeruginosa* H-antigen flagellins. Infect. Immun. **49**:770-774.

Alonso, A., Rojo, F., and Martínez, J. L. 1999. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. Environ. Microbiol. **1**:421-430.

Angus, B. L., Carey, A. M., Caron, D. A., Kropinski, A. M. B., and Hancock, R. E. W. 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. **21**:299-309

Ansorg, R. 1978. Flagella specific H antigenic schema of *Pseudomonas aeruginosa*. Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. 1 **224**:228-238

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. IJMS. **50**:1563-1589.

Bhattacharya, M., Roy, S. S., Biswas, D., and Kumar, R. 2000. Effect of Mg²⁺ ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water of Haldia port. FEMS Microbiology Letter. **185**:151-156.

Brimer, C. D., and Montie, T. C. 1998. Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. J. Bacteriol. **180**:3209-3217.

Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated

ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6147-56.

Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada, R., and Kogure, K. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International.* **30**:911-922.

Chen, F., Xia, Q., and Ju, L. K. 2003. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *AEM.* **69**:6715-6722

Chowdhury, M. A., Huq, A., Xu, B., Madeira, F. J., and Colwell, R. R. 1997. Effect of alum on free-living and copepod-associated *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3323-3326.

Cladera, A. M., Bennasar, A., Barcelo, M., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. 2004. Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J. Bacteriol.* **186**:5239-5248.

Diamond, S. S., Ewing, D. E., Cadwell, G. A. 1979. Fatal bronchopneumonia and dermatitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in an Atlantic bottle-nosed dolphin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **175**:984-987.

Foght, J. M., Westlake, D. W., Johnson, W. M., and Ridgway, H. F. 1996. Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology.* **142**:2333-2340.

Fonseca, K., MacDougall, J., and Pitt, T. L. 1986. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis by selective media. *J. Clin. Pathol.* **39**:220-222.

Freedman, D. L., Swamy, M., Bell, N. C., and Verce, M. F. 2004. Biodegradation of Chloromethane by *Pseudomonas aeruginosa* strain NB1 under nitrate-reducing and aerobic conditions. *AEM.* **70**:4629-4634

Fukuoka, T., Ohya, S., Narita, T., Katsuta, M., Iijima, M., Masuda, N., Yasuda, H., Trias, J., and Nikaido, H. 1993. Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.*

37:322-327.

Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **7**:860-73.

Hoadley, A. W., and Ajello, G. 1972. Some characteristics of fluorescent *Pseudomonads* isolated from surface waters and capable of growth at 41°C. *Can. J. Microbiol.* **18**:1769-1773.

Hogardt, M., Trebesius, K., Geiger, A. M., Hornef, M., Rosenecker, J., and Heesemann, J. 2000. Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**:818-25.

Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R., and Colwell, R. R. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:275-283.

Ju, L. K. and Trivedi, H. K. 1992. Monitoring of denitrification by *Pseudomonas aeruginosa* using online fluorescence technique. *Biotechnol. Tech.* **6**:549-554.

Jukes, T. H., and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p.21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, N. Y.

Khan, N. H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, N., and Kogure, K. in press. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with fresh water, clinical, and animal isolates. *Microbial Ecology*.

Kiewitz, C., and Tummeler, B. 2000. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J. Bacteriol.* **182**:3125-3135.

Kimata, N., Nishino, T., Suzuki, S., and Kogure, K. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. *Microbial Ecology*. **47**:41-47.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.

Kiorboe, T., Tang, K., Grossart, H.P., and Ploug, H. 2003. Dynamics of microbial communities on

marine snow aggregates: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3036-47.

Kodaka, H., Iwata, M., Yumoto, S. and Kashitani, F. 2003. Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *J. Basic Microbiol.* **43**:407-413.

Laguerre, G., Rigottier-Gois, L., and Lemanceau, P. 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. *Mol. Ecol.* **3**:479-487.

Li, X. Z., Nikaido, H., and Poole, K. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **39**:1948-1953

Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., and Plesiat, P. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1797-1802.

Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J., and Woese, C. R. 1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Research.* **24**:82-85.

Mokhonov, V., Mokhonova, E., Yoshihara, E., Masui, R., Sakai, M., Akama, H., and Nakae, T. 2005. Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization. *Protein Expression and Purification.* **40**:91-100.

Moore, E. R. B., Mau, M., Arnscheidt, A., Bottger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Van de Peer, Y., De Wachter, R., and Timmis, K. N. 1996. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:478-492.

Ndip, R. N., Dilonga, H. M., Ndip, L. M., Akoachere, J. F., and Nkuo Akenji, T. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram. *Trop. Med. Int. Health.* **10**:74-81.

Oberhofer, T. R. 1981. Characteristics of Human Isolates of Unidentified Fluorescent *Pseudomonads* Capable of Growth at 42°C. *J.Clin. Microbiol.* **14**:492-495.

Okamoto, K., Gotoh, N. and Nishino, T. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**:1964-1971

Oliver, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 2005. **43**:93-100.

Palleroni, N. J., Ballard, R. W., Ralston, E., and Doudoroff, M. 1972. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **110**:1-11.

Paulsen, I. T., Brown, M. H., and Skurray, R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*. **60**:575-608

Penna, V. T. C., Martins, A. M., and Mazzola, P. G. 2002. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health*.

Pirnay, J.P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Vanderkelen, A., Zizi, M., Ghysels, B., and Cornelis, P. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environmental Microbiology*. **4**:898-911.

Rahme, L. G., Floch, L., Chamoux, R., Pannier, M., Espaze, E., and Richet, H. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J. Infect. Dis.* **170**:377-383.

Robertson, W. J., and Tobin, R. S. 1983. The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian coastal waters. *Can J. Microbiol.* **29**:1261-1269.

Römling, U., Wingender, J., Muller, H., and Tummeler, B. 1994. A Major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *AEM*. **60**:1734-1738.

Ruimy, R., Genauzeau, E., Barnabe, C., Beaulieu, A., Tibayrenc, M., and Andremont, A. 2001. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect. Immun.* **69**:584-588.

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., and Hamood, A. N. 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**:1721-31.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.

齊藤 厚, 山口 恵三. (編集) 1996. 緑膿菌の今日的意味. 医薬ジャーナル社, 大阪.

Schirm, M., Arora, S. K., Verma, A., Vinogradov, E., Thibault, P., Ramphal, R., and Logan, S. M. 2004. Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**:2523-2531.

Schmidt, K. D., Tummeler, B., and Romling, U. 1996. Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* **178**:85-93.

Selender, R. K., and Musser, J. M. 1990. Population genetics of bacterial pathogenesis, p. 11-36. In B. H. Iglewski and V. L. Clark (ed.), *Molecular basis of bacterial pathogenesis*, vol. X. The bacteria. Academic Press, San Diego, Calif.

Secko D. 2005. Pathogens fight back. **173**:864.

Spangenberg, C., Heuer, T., Burger, C., and Tummeler, B. 1996. Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters.* **396**:213-217.

Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R., and Olsen, M. H. 2003. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**:1316-1325.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson M. V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**:959-964.

Sweeney, J. C., and Ridgway, S. H. 1975. Common diseases of small cetaceans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **167**:533-540.

- Tanoue, E., Nishiyama, S., Kamo, M., and Tsugita, A. 1995. Bacterial membranes: possible source of a major dissolved protein in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **59**:2643-2648.
- Tanoue, E. 1995. Detection of dissolved protein molecules in oceanic waters. *Marine Chemistry* **51**:239-252.
- Tanoue, E., Ishii, M., Midorikawa, T. 1996. Discrete dissolved and particulate proteins in oceanic waters. *Limnol Oceanogr*. **41**:1334-1343.
- Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*. **156**:763-773.
- Trias, J., and Nikaido, H. 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of Biological Chemi.* **265**:15680-15684.
- Yamamoto, S., and Harayama, S. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:813-9.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., and Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*. **146**:2385-2394.
- Yoshpe-Purer, Y., and Golderman, S. 1987. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Israeli coastal water. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1138-1141.
- Watanabe A. 2000. [Drug-resistant bacteria in clinical situations]. *Rinsho Byori*. **111**:9-16.
- Watt, P. M., and Hickson, I. D. 1994. Structure and function of type II DNA topoisomerase. *Biochem J*. **303**:681-695
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.

Whittam, T. S. 1996. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia Coli*, P. 2708-2720. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiology Reviews*. **51**:221-271.

Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G., and Lory, S. 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*.

謝辞

本研究を進めるにあたって、実に多くの方々のお世話になりました。修士 2 年間を通して行った研究をこの修士論文にまとめながら、日々の研究の中で多くの有益な助言や懇切丁寧なご指導をいただいた方々への感謝の想いを改めて感じております。心から御礼申し上げます。

本研究のテーマである海洋から単離された緑膿菌の系統的 position という非常に様々な示唆に富み、また興味深い研究を頂いたこと、また本研究を進める中で多角的な視点からの助言、懇切丁寧な指導を受け賜ったこと、これらのことに対する深い感謝の意を指導教官である東京大学海洋研究所の木暮一啓教授に表します。この 2 年間、木暮一啓教授から本研究に対する激励を頂いたことで何とかやってこられたと感じております。誠に深く御礼申し上げます。また分子生物学実験と解析に関する知識と技術をご指導頂いた塚本久美子技官、実験室でいつも励ましを頂いたことや、研究の相談に気軽に乗って頂いたことに対して八尾花登美さん、同じ緑膿菌研究の先輩として実験手法や有益な助言を頂いた N. H. Khan 博士。これらの方々をはじめ東京大学海洋研究所海洋生態系動態部門海洋微生物研究室のスタッフおよび学生の皆様には、ともに研究を行う中で学ぶべきことの多さを実感させて頂いたことや惜しみない協力を頂いたことに対して深く感謝いたします。大変、お世話になりました。

また試料採集において東京大学海洋研究所研究船淡青丸 KT04-9、白鳳丸 KH04-1 航海において船長以下乗組員の方々に対して便宜を図っていただいたことに感謝の意を表します。また大槌湾にある東京大学国際沿岸センターにおいて 2005 年 5 月に参加した実習の中でイルカからの試料採集の際に便宜を図っていただき、深く御礼申し上げます。

最後に、毎日の生活の中で私を支えてくださった家族、友人に心から感謝しております。

海洋から単離された緑膿菌の系統的 위치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 위치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 と表記) 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正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.