

海水から単離した低栄養性細菌の同定

Identification of the isolated oligotrophic marine bacteria

中山 美月・福井 貴史・小林 照幸

Mizuki NAKAYAMA, Takashi FUKUI and Teruyuki KOBAYASHI

我々はこれまでに海水から複数の低栄養性細菌を単離し、形態、利用可能な炭素源など幾つかの性質について調べた。また、16S rRNA 遺伝子の一部分の塩基配列の解析により、単離した細菌の属を推定した。本研究では以前の研究で *Pseudoalteromonas* 属と推定された MW11 株について菌種の同定を試みた。

MW11 株の 16S rRNA 遺伝子全体の約 1.4 kbp の塩基配列を決定し、EZ BioCloud Database での解析を行った結果、*Pseudoalteromonas carrageenovora* 及び *Pseudoalteromonas espejiana* が、それぞれ 99.86%、99.73% と非常に高い類似性を示した。形態観察、生理・生化学的な手法による分析の結果から、MW11 株は *Pseudoalteromonas* 属の細菌であることが示唆されたが、同じ表現型を持つ *Pseudoalteromonas* 属の細菌は見つからなかった。これらの結果から、MW11 株は *P. carrageenovora* の近縁種もしくは新種である可能性が高いと考えられる。

1. はじめに

環境中には多種多様の細菌が存在しており、有機物の分解、窒素固定、炭素固定など、物質循環と環境保全において非常に重要な役割を果たしている。

環境中で生存する微生物において細菌の代謝機構は多くの部分が共通であるが、変異および環境への適応の結果、細菌の中には独自の代謝機構を持つものも存在する。

通常の海水に含まれる栄養源の濃度は非常に低い。その為、海水の様な低栄養環境下で増殖可能な細菌は、栄養源の効率的な取り込みと代謝を行って生存していると考えられる。蛍光顕微鏡¹⁾と Direct Viable Count 法²⁾により、一般的な寒天培地を用いたコロニー形成法では、海水中に存在する細菌全体の 0.01~0.1% しか検出出来ないことが示された³⁾。更に、直接計数法と寒天培地を使った計数法での違いは、水や土などの試料から直接 DNA を抽出して行った 16S rRNA の塩基配列の解析により、測定可能な細菌の種類が異なる為であると解明さ

れている^{4,5,6)}。つまり、一般的な寒天培地で培養可能な細菌はごく一部であり、最も多く存在する海洋性細菌のグループは未だ培養できていないというのが現在の共通認識である。

低栄養性細菌は非常に低濃度の炭素源の存在下で増殖可能であり、Kuznetsov らは「1-15mg/L 以下の炭素源でも増殖可能な細菌」と定義している⁷⁾。多くの研究者が超低濃度の炭素源での増殖に着目し、実際に、様々な自然環境中から多くの低栄養性細菌が単離されてきたが、その遺伝学的アプローチによる研究は限られている。

低栄養性海洋細菌を単離してどの様な栄養源を利用可能か、どの様な種かを調べる事により、新規の代謝経路の発見や生物多様性・物質循環における細菌の位置付けに関する知見を得る可能性がある。更に、低栄養性細菌は、増殖のために僅かな栄養源しか必要としないことから低コストの触媒、物質の生産、環境浄化など工業的にも役立つ。

我々はこれまでに多くの低栄養性細菌を様々な環境から単離してきた。その中の 3 株の細菌については、形態、利用可能な炭素源など幾つかの性質について調べ、16S rRNA 遺伝子の一部分の塩基配列の解析により、どの属に含まれる細菌かを推定した⁸⁾。本研究では以前の研究で *Pseudoalteromonas* 属と推定された MW11 株

連絡先：小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

千葉科学大学大学院薬学研究科

Graduate School of Pharmacy, Chiba Institute of Science
Graduate School

(2019年9月30日受付, 2019年12月13日受理)

について、生理・生化学的手法による菌種の同定を試みた。

2. 実験方法

2. 1 培養条件

細菌の培養は MB2216 培地 (Becton Dickinson) に必要に応じて 1.5% 寒天を加え、好气的条件下で 30°C、24 時間保温した。培養液および形成したコロニーを形態観察および生理・生化学的性状分析に使用した。

2. 2 第一段階分析

培養した細菌をフェイバー G「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical) を使用してグラム染色した後、光学顕微鏡による細菌の形態観察を行った。Barrow & Feltham らの方法⁹⁾に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、グルコースからの酸/ガス産生、グルコースの酸化/発酵の有無を測定した。

2. 3 第二段階分析

API 20NE および API ZYM (bioMérieux) キットを用いて、細菌の詳細な生理・生化学的性状を分析した。API 20 NE の使用時には、寒天培地で培養後の細菌を人工海水 MARINE ART SF-1 (富田製薬) で懸濁し、0.5 マクファーランドに調整した後に 29 ± 2°C で 24 時間保温し、資化能力と各種酵素活性を測定した。API 20 ZYM の使用時には、5 - 6 マクファーランドに調整した後、30°C で 4 時間保温した。キットに含まれる分析項目は表 3 および表 4 に示した。その他の分析および培養は一般的な方法¹⁰⁾を用いた。

2. 4 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と系統解析

16S rRNA 遺伝子両端の塩基配列に相補的なプライマー、27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いて、MW11 株の 16S rRNA 遺伝子をコロニー PCR により増幅した。PCR の条件は以下の通りである。94°C で 2 分間変性させた後、98°C で 10 秒間、55°C で 2 分間、68°C で 2 分間を 35 回繰り返す、最後に、68°C で 10 分間の伸長を行った。反応には KOD FX neo (東洋紡) を用いた。16S rRNA 遺伝子全体の塩基配列は、プライマー 27F、1492R および 337F (5'-GACTCCTACGGGAGGCWG CAG-3')、800F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3')、800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') を使用し、精製した PCR 産物を鋳型としてサンガー法により決定した。

16S rRNA 遺伝子の相同性比較は、EZ BioCloud Database (<https://www.ezbiocloud.net/>) を用いて行った。系統樹は塩基配列解析ソフトウェア Genetyx Ver. 10 (Hi

tachi) を用いて、配列間距離を Kimura の二変数法にて補正し、近隣結合法により作成した。ブートストラップサンプリングは 1000 回行った。

3. 結果と考察

以前の報告において MW11 株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から *Pseudoalteromonas* 属の細菌であると推定されていた⁸⁾。しかし、解析に用いた塩基配列は 16S rRNA 遺伝子の一部分 800 bp 程であり、種レベルを推定するためには全体の塩基配列を元に比較することが必要となる。本研究では、16S rRNA 遺伝子全体の約 1.4 kbp の塩基配列を元に他の細菌の 16S rRNA 遺伝子と比較し、MW11 株の細菌種の同定を試みた。EZ BioCloud Database での解析の結果、99% 以上の非常に高い類似性を持つ *Pseudoalteromonas* 属の細菌が多数見出され、その中でも *Pseudoalteromonas carrageenovora* 及び *Pseudoalteromonas espejiana* の類似性は、それぞれ 99.86%、99.73% と非常に高い値を示した (表 1)。また、系統解析の結果から MW11 株は *P. carrageenovora* の近縁種であると推定された (図 1)。しかし、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の類似性が 100% を示した場合においても別種の可能性があることが知られており、細菌種を同定するためには、生理・生化学的特徴を含めた表現型を比較する必要がある。

表 1. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく近縁種

属・種	株	類似性 (%)
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	IAM 12662	99.86
<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	ATCC 29659	99.73
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	IAM 12927	99.58
<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	A 37-1-2	99.45
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	KMM162T	99.45
<i>Pseudoalteromonas distincta</i>	ATCC 700518	99.38
<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	DSM 14585	99.38
<i>Pseudoalteromonas undina</i>	NCIMB 2128	99.36
<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i>	KMM 3548	99.31
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	KMM 661	99.18
<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i>	H7	99.16
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	GFC	99.11
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	ATCC 14393	99.02
<i>Pseudoalteromonas fuliginea</i>	CIP 105339	98.83
<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	KMM 3562	98.78
<i>Pseudoalteromonas translucida</i>	KMM 520	98.63
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	Mano4	98.47
<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	CECT 4664	98.42
<i>Pseudoalteromonas neustonica</i>	PAMC 28425	97.94
<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>	HJ51	97.33
<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	MB8-11	97.30
<i>Pseudoalteromonas mariniglutinos</i>	KMM 3635	97.28

16S rRNA 遺伝子の相同性比較で 97% 以上の類似性を持つ細菌のみ示した。

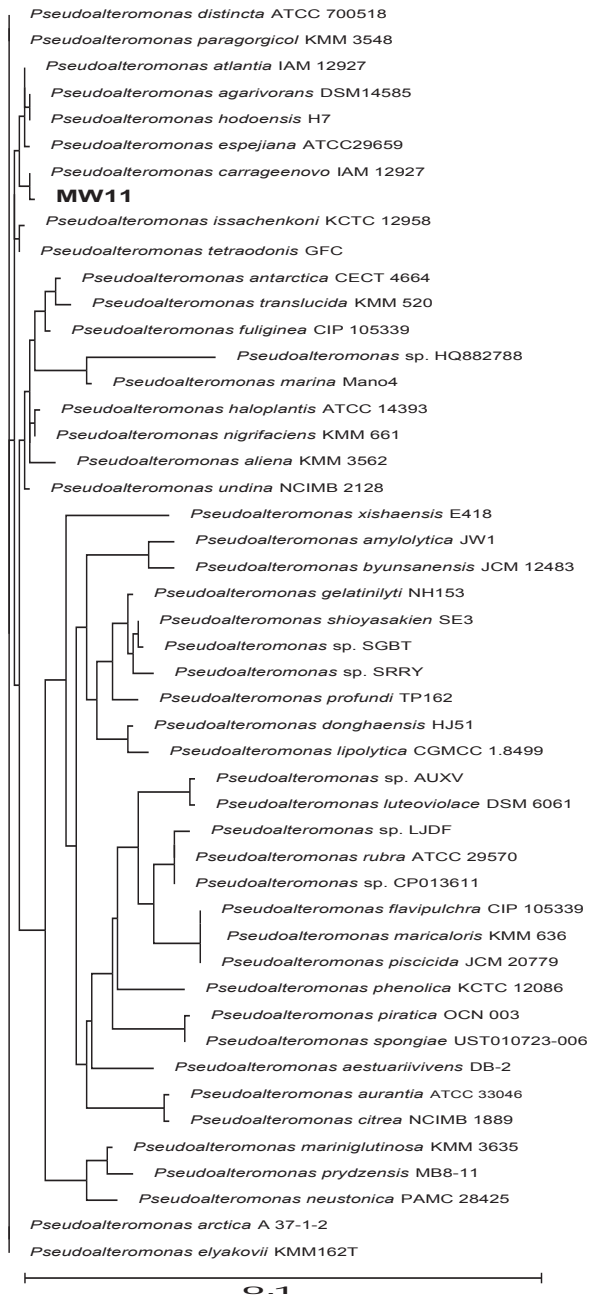


図1. MW11 株の系統学的位置

NJ方で系統樹を作成した。ブートストラップは1000回行った。スケールバーは10%の相違塩基を示している。

表現型を調べるための第一段階分析の結果、MW11株は運動性を有するグラム陰性の湾曲がある桿菌であることが分かった(図2)。37°Cで生育せず、グルコースを酸化し、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陽性を示した(表2)。この結果と以前の報告⁸⁾を比較すると、培地組成が異なっても生育温度について同様の結果が得られ、形態の特徴も電子顕微鏡を用いて観察され



図2. MW11 株のグラム染色像

表2. MW11 株の表現型(第一段階分析)

分析項目	MW11
細胞形態	桿菌 (0.5×2.5~4.0 μm)
グラム染色性	-
芽胞の有無	-
運動性	+
コロニー形態	
直径	1 mm
色調	クリーム色
形	円形
隆起状態	レンズ状
周縁	全縁
表面の形状など	スムーズ
透明度	不透明
粘稠度	バター様
生育温度試験	
37 (°C)	-
45 (°C)	-
カタラーゼ反応	+
オキシダーゼ反応	+
グルコースからの酸産生	+
O/Fテスト(酸化/発酵)	+ / -

+: 陽性、-: 陰性

た結果と一致した。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、MW11株は *Pseudoalteromonas* 属の細菌であると考えられるが、第一段階分析により得られた結果も *Pseudoalteromonas* 属の一般的な性状¹¹⁾と一致しており、MW11株が *Pseudoalteromonas* 属の細菌であることが示唆された。

表3. MW11 株の表現型 (API 20NE)

分析項目	MW11
生化学試験	
硝酸塩還元	—
インドール産生	—
グルコー 酸性化	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—
ウレアーゼ	+
エスクリン加水分解	+
ゼラチン加水分解	+
β-ガラクトシダーゼ	+
チトクロームオキシダーゼ	+
資化性試験	
ブドウ糖	—
L-アラビノース	—
D-マンノース	—
D-マンニトール	—
N-アセチル-D-グルコサミン	—
マルトース	—
グルコン酸カリウム	—
n-カプリン酸	—
アジピン酸	—
dl-リンゴ酸	—
クエン酸ナトリウム	—
酢酸フェニル	—

+: 陽性、—: 陰性

表4. MW11 株の表現型 (API ZYM)

分析項目	MW11
アルカリホスファターゼ	—
エステラーゼ (C4)	+
エステラーゼ リパーゼ (C8)	+
リパーゼ (C14)	+
ロイシンアリアルアミダーゼ	—
バリンアリアルアミダーゼ	—
シスチンアリアルアミダーゼ	—
トリプシン	—
キモトリプシン	—
酸性ホスファターゼ	—
ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ	+
α-ガラクトシダーゼ	+
β-ガラクトシダーゼ	—
β-グルクロニダーゼ	—
α-グルコシダーゼ	—
β-グルコシダーゼ	—
N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ	—
α-マンノシダーゼ	—
α-フコシダーゼ	—

+: 陽性、—: 陰性

表5. MW11 株の表現型 (追加分析)

分析項目	MW11
生育	—
嫌気	+
20°C	+
35°C	—
10% NaCl	+
pH10	—
分解	—
Tween80	+
でんぷん	—
チロシン寒天培地でのメラニン様色素産生	+

+: 陽性、—: 陰性

表6. *Pseudoalteromonas* 属の細菌との比較

分析項目	MW11	1	2
硝酸塩還元	—	—	—
でんぷんの加水分解	—	—	+
グルコースからの酸産生	+	+	+
ウレアーゼ*	+	+	+
β-ガラクトシダーゼ*	+	+	+
資化性試験 (API 20NE)			
グルコース	—	+	+
D-マンノース	—	+	+
D-マンニトール	—	+	+
N-アセチル-D-グルコサミン	—	—	—
マルトース	—	+	+
n-カプリン酸	—	+	+
アジピン酸	—	—	—
dl-リンゴ酸	—	—	—
酢酸フェニル	—	+	+

1: *P. carrageenovora* IAM 12622, 2: *P. espejiana* IAM 12640.

*および資化性試験は API 20NE を用いた結果を示している。

API 20NE キットを用いた第二段階分析の結果、MW11 株は硝酸塩の還元、インドールの産生、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さず、ウレアーゼ、βガラクトシダーゼ、チトクロームオキシダーゼ活性およびエスクリン、ゼラチンの加水分解活性を示した。一方、各種糖、有機酸の資化は見られなかった (表3)。API ZYM キットによる分析ではエステラーゼ、リパーゼ、ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ、α-ガラクトシダーゼ活性を示したが、他の 14 種類の酵素活性は示さなかった (表4)。API 20NE および API ZYM キットで同様の分析項目が存在し、βガラクトシダーゼの結果が異なっていた。これはβガラクトシダーゼ活性の測定に用いた基質、反応条件が異なるためであると考えられるため、βガラクトシダーゼ活性を有すると結論づけた。多くの既知の *Pseudoalteromonas* 属の細菌と表現型を比較するため、

追加分析を行った。その結果、MW11 株は 10% NaCl で生育し、嫌気条件および 35°C で生育せず、Tween 80 およびでんぷんを加水分解し、チロシン寒天培地でのメラニン様色素の産生が確認された(表5)。これらの分析結果を用いて、*Pseudoalteromonas* 属の中で運動性陽性、ウレアーゼ陽性およびチロシン寒天培地でメラニン様色素を産生するなどの特徴を持つ既知種と比較した結果、MW11 株は既知種と共通点はあるものの、完全に一致する菌種が見つからなかった¹²⁾。

表6 は MW11 株、*P. carrageenovora*^{13, 14)} および *P. espejiana*^{14, 15)} の表現型を示している。硝酸塩還元、でんぷんの加水分解、グルコースからの酸産生、ウレアーゼ活性、 β -ガラクトシダーゼ活性の有無については *P. carrageenovora* と同じ特徴を示し、*P. espejiana* についても、でんぷんの加水分解以外は同じ特徴を示した。API 20NE キットによる資化性試験は *P. carrageenovora* および *P. espejiana* においても実施されており、この2種の細菌では同じ特徴を示した。一方、MW11 株は全ての糖、有機酸の資化が検出されず、*P. carrageenovora* および *P. espejiana* と明らかに異なる特徴を示した。

以上の結果から、種レベルの同定には至らなかったが、16S rRNA 遺伝子の塩基配列および表現型の特徴から、MW11 株は *Pseudoalteromonas* 属の細菌であり、*P. carrageenovora* の近縁種もしくは新種である可能性が高いと考えられる。MW11 株の細菌種の同定のためには基準種を用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションや脂肪酸組成の分析などを利用した解析が必要である。

参考文献

- Porter K G, Feig Y S : The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*, 25, 943-948, 1980.
- Kogure K, Simidu U, Taga N : A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol*, 25, 415-420, 1979.
- Ferguson R L, Buckley E N, Palumbo A V : Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol*, 47, 49-55, 1984.
- Beja` O, Suzuki M T, Koonin E V et al. : Construction and analysis of bacterial artificial chromo- some libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol*, 2, 516-529, 2000.
- DeLong E F : Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5685-5689, 1992.
- Suzuki M T, Rappe M S, Haimberger Z W et al. : Bacterial diversity among SSU rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl Environ Microbiol*, 63, 983-989, 1997.
- Kuznetsov, S., G. Dubinina, N. and Lapteva. 1979 Biology of oligotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 33:377-387
- Mizuki N, Takashi F, Teruyuki K : Isolation and characterization of oligotrophic marine bacteria. *The University Bulletin of Chiba Institute of Science*, 12, 11-15, 2019.
- Barrow G I, Feltham R K A : *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. University Press, Cambridge, 1993.
- 日本土壤微生物学会：土壌微生物実験法 第3版. 養賢堂, 東京, 2013
- Gauthier G, Gauthier M, Christen R : Phylogenetic analysis of the general alteromonas, *Shewanella* and *Moritella* using genes 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, 1995.
- Bowman J P, McMeekin, T A : *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, New-York, 2015.
- Masayo A M, Masaru M, Yosuke K, Kazuhide Y : *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol*. 42, 621-627, 1992.
- Lyudmila A R, Natalia V Z, Manfred R et al : *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 125-131, 2003.
- Chan Y, Bauman L, Garza M M et al. : Two New Species of *Alteromonas*: *Alteromonas espejiana* and *Alteromonas undina*. *Int J Syst bacterial*, 28, 217-222, 1978.