

## 低栄養性海洋細菌 MW8 の同定

### Identification of the isolated oligotrophic marine bacteria MW8

小林 照幸<sup>1)</sup>・福井 貴史<sup>2)</sup>

Teruyuki KOBAYASHI<sup>1)</sup> and Takashi FUKUI<sup>2)</sup>

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。本研究では以前の研究で *Serratia* 属の新種の可能性が高い株であると示唆された MW8 株について菌種の同定を試みた。

MW8 株の 16S rRNA 遺伝子全体の塩基配列を決定し、BLAST 相同性検索を行った結果、*Pseudomonas stutzeri* と 100% の相同性を示した。また、形態観察、生理・生化学的な手法による分析の結果からも、MW8 株は *Pseudomonas stutzeri* と同様の特性を示した。全体の塩基配列の決定および生理・生化学的分析を行った本研究結果から、MW8 株は *Pseudomonas stutzeri* に帰属する細菌であると同定した。

#### I. 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<sup>1)</sup>と Direct Viable Count 法<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>。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<sup>4, 5, 6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。本研究では以前の研究で

連絡先：小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学総合学習・日本語支援センター

Comprehensive Learning & Japanese Language Support Center, Chiba Institute of Science

(2022年9月28日受付, 2023年1月11日受理)

*Serratia* 属と示唆された MW8 株について、生理・生化学的な手法による菌種の同定を試みた。

## II. 実験方法

### 1. 培養条件

細菌の培養は LB 培地 (Becton Dickinson) に必要に応じて 1.5% 寒天を加え、好氣的条件下で 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. 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<sup>9)</sup>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。

### 3. 第二段階分析

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製した後に 29 ± 2°C で 24 時間保温し、API 20NE (bioMérieux) を用いて資化能力と各種酵素活性を測定した。API 20 ZYM (bioMérieux) を用いた各種酵素活性の測定には、細菌を 5–6 マクファーランドに調製し、30°C で 4 時間保温した後に使用した。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<sup>10)</sup>を用いた。

### 4. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と系統解析

MW8 株よりアクロモペプチダーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いて DNA の抽出を行なった。この DNA を PCR の鋳型とし、16S rRNA 遺伝子両端の塩基配列に相補的なプライマー、9F と 1510R を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。16S rRNA 遺伝子全体の塩基配列は、プライマー 9F、515F、1099F、536R、926R および 1510R 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 BLAST 検索は、ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory) を用い、データベースは DB-BA16.0 (TechnoSuruga Laboratory)、DDBJ・EMBL・GenBank を利用した。系統樹は塩基置換モデルを Kimura の二変数法を用い、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。

## III. 結果と考察

以前の報告において MW8 株は 16S rRNA 遺伝子の塩

基配列から *Serratia* 属の細菌であると示唆された<sup>8)</sup>。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 遺伝子全体の塩基配列を元に他の細菌の 16S rRNA 遺伝子と比較し、MW8 株の細菌種の同定を試みた。BLAST 検索の結果、*Pseudomonas* 属の細菌、*Pseudomonas stutzeri* および uncultured bacterium と 100% の相同性を示した (表 1)。また、基準株を用いた系統解析の結果から MW8 株は *P. stutzeri* の近縁種であることが示された (図 1)。これらの結果から MW8 株は *Pseudomonas stutzeri* であると推測された。しかし、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が 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. MW8 株の 16S rRNA 塩基配列の BLAST 検索結果

属・種	株名	相同性 (%)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	XL272	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	CB-3	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PheN2	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	D-134-1	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	RBPA9	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	N2	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
uncultured bacterium	-	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	JQR2-5	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	SA1	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	RNA-111	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	GN33-1	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	FB15	99

相同性スコアで上位 20 に検索された 16S rRNA 塩基配列データ。

表現型を調べるための第一段階分析の結果、MW8 株は運動性を有するグラム陰性の桿菌であることが分かった (図 2)。カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陽性を示し、グルコースを酸化した (表 2)。この結果と以前の報告<sup>8)</sup>を比較すると、培地組成が異なっても生育について

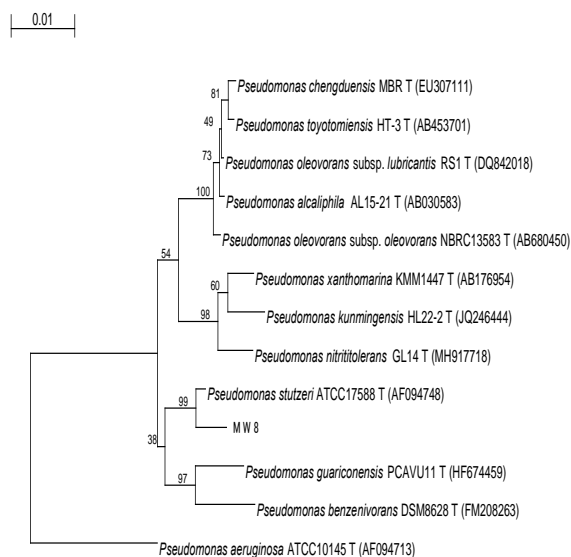


図 1. MW8 株の分子系統樹

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の T はその種の基準株を示す。

表 2. MW8 株の表現型（第一段階分析）

分析項目	MW8
細胞形態	桿菌 (0.4-0.5×1.0~2.0 μm)
グラム染色性	—
芽胞の有無	—
運動性	+
コロニー形態	
直径	0.1-0.3 mm
色調	クリーム色
形	円形
隆起状態	中央隆起
周縁	波状
表面の形状など	平滑
透明度	半透明
粘稠度	バター様
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

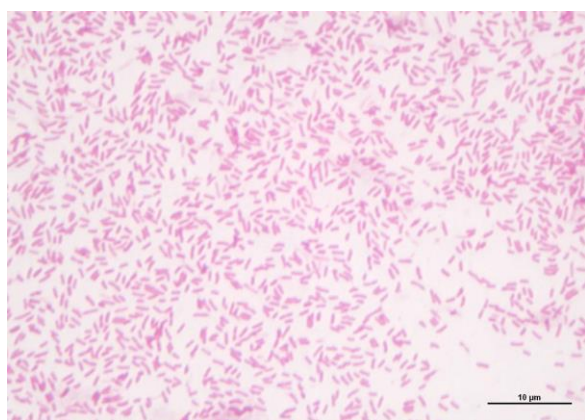


図 2. MW8 株のグラム染色像

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た結果と一致した。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、MW8 株は *Pseudomonas* 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 *Pseudomonas* 属の一般的な性状<sup>9)</sup>と一致しており、MW8 株が *Pseudomonas* 属の細菌であることが示唆された。

API20NE キットを用いた第二段階分析の結果、MW8 株は硝酸塩の還元に伴いガスを産生し、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さなかった。また、ゼラチンの加水分解は

表 3. MW8 株の生化学・資化性試験（第二段階分析）

分析項目	MW8
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	
グルコース	+
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. MW8 株の生化学試験 (追加分析)

分析項目	MW8
APIZYM	
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)	+
ロイシンアリルアミダーゼ	+
バリンアリルアミダーゼ	+
シスチンアリルアミダーゼ	-
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	+
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	-
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	-
$\beta$ -グルクロニダーゼ	-
$\alpha$ -グルコシダーゼ	-
$\beta$ -グルコシダーゼ	-
N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ	-
$\alpha$ -マンノシダーゼ	-
$\alpha$ -フコシダーゼ	-
生育温度	
4°C	+-
37°C	+
42°C	+
43°C	-
6% NaCl	+
8% NaCl	-
マッコンキー寒天培地での生育	+
蛍光色素の産生	-
でんぷんの加水分解	+
Tween80 の加水分解	+
Simmons のクエン酸利用	+

+: 陽性、-: 陰性、+-: 反応が弱い

見られず、グルコース、マルトース、リンゴ酸を資化した (表 3)。これらの特徴は *P. stutzeri* の特徴<sup>11,12,13)</sup> と一致するものであった。更に MW8 株と *P. stutzeri* の特徴を比較するために追加試験を行った。API ZYM キットによる分析では僅かにアルカリホスファターゼ活性を示し、エステラーゼ、リパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、バリンアミダーゼ、ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ活性を示した。他の 11 種類の酵素活性は示さなかった。また、MW8 は 4°C および 6% NaCl 存在下で生育し、8% NaCl 存在下で生育を示さず、マッコンキー寒天培地で生育した。更に、デンプンおよび Tween80 を加水分解し、Simmons のクエン酸を利用した (表 4)。これらの特徴も第二段階分析の結果と同様に *P. stutzeri* の特徴<sup>11,12,13)</sup> と一致するものであった。*P. stutzeri* は、蛍光色素を生成しない為、他の *Pseudomonas* 属の細菌と簡単に区別可能であり<sup>14)</sup>、42°C 以

上で成長する能力によっても区別可能である<sup>15)</sup>。MW8 株はこのどちらの特徴も備えていた。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列、第一段階、第二段階、追加試験の結果から、MW8 株は *Pseudomonas* 属の細菌であり、*P. stutzeri* もしくはその近縁種である可能性が非常に高いと考えられる。*P. stutzeri* は多くの異なる場所で単離されており、各株は単離された場所によってその特徴が僅かに異なるのみであり、多くの株がその核酸組成に基づいてのみ区別できることが示唆されている<sup>16)</sup>。MW8 株の細菌種の最終的な決定のためにはゲノム解析、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。

#### IV. 結論

以前の報告において MW8 株は *Serratia* 属の細菌であると示唆された。しかし、本研究における各種同定試験の結果から *P. stutzeri* に帰属する細菌であると同定された。MW8 株は *P. stutzeri* である可能性が非常に高いが、最終的な決定のためにはゲノム解析など、更なる解析が必要である。

#### 参考文献

- 1) Porter K G, Feig Y S : The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*, 25, 943-948, 1980.
- 2) Kogure K, Simidu U, Taga N : A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol*, 25, 415-420, 1979.
- 3) 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.
- 4) Beja` O, Suzuki M T, Koonin E V et al. : Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol*, 2, 516-529, 2000.
- 5) DeLong E F : Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5685-5689, 1992.
- 6) 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.
- 7) Kuznetsov S, G Dubinina N, Lapteva : Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 33, 377-387, 1979.

- 8) 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.
- 9) Barrow G I, Feltham R K A : Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition. University Press, Cambridge, 1993.
- 10) 日本土壤微生物学会 : 土壤微生物実験法 第3版. 養賢堂, 東京, 2013
- 11) Palleroni N J : *Pseudomonas*. In: Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, et al. (editors). Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2015.
- 12) Xie F, Ma H, Quan S, Liu D, Chen G, Chao Y, Qian S : *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from a phosphate mine. Int J Syst Evol Microbiol. 64, 559–564, 2014.
- 13) 坂崎利一 監訳 : 臨床材料にみられる腸内細菌以外のグラム陰性、好気性および通性嫌気性桿菌の同定, 近代出版, 1993
- 14) Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni N J : Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol Mol Bio Rev, 70, 510–547. 2006
- 15) Bennasar A, Rosselló-Mora R, Lalucat J, Moore E R : 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov". Int J Sys Bacteriol. 46, 200–205, 1996.
- 16) Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, Grimont P A, Kandler O, Krichevsky M I, et al. : Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Syst Evol Microbiol, 37, 463–464, 1987.