

「室戸海洋深層水」中の細菌種の実験

Analysis of Bacterial Species in the Muroto Deep Seawater

矢田 修一¹・大場 雅行²・榎本 恵一¹

Shuichi YADA, Masayuki OHBA and Keiichi ENOMOTO

Abstract

Eighty-five strains of marine bacteria were isolated from the Muroto deep seawater at a depth of 320 m off the coast of Cape Muroto, Kochi Prefecture, Japan. The bacteria were analyzed based on the sequences of the 16S rRNA gene. Seventy-five strains were identified as 12 genera; 29 strains to the genus of *Vibrio*, 16 to *Pseudoalteromonas*, 9 to *Shewanella*, 6 to *Alteromonas*, 4 to *Marinobacter*, 3 to *Erythrobacter*, 2 to *Tenacibaculum*, 2 to *Dietzia* and 1 strain each to the genera of *Bacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina* and *Photobacterium*. Some of these strains were closely related to known bacteria including psychrotrophs, barophilic bacteria and bacteria which decompose hydrocarbons. Some other strains produced pigments reported to have physiological activities. On the other hand, the remaining 10 unidentified strains contained novel bacteria whose DNA sequences showed low homology with those of the already identified bacteria. Thus, the Muroto deep seawater has been demonstrated to be an important source for investigations of unknown, yet potentially useful, bacteria.

Key Words: deep seawater, bacterial species, 16S rRNA gene

要 旨

「室戸海洋深層水」中の細菌種を、分離した細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて分析した。分離した 85 株のうち 75 株は、*Vibrio* 属 29 株、*Pseudoalteromonas* 属 16 株、*Shewanella* 属 9 株、*Alteromonas* 属 6 株、*Marinobacter* 属 4 株、*Erythrobacter* 属 3 株、*Dietzia* 属 2 株、*Tenacibaculum* 属 2 株、*Bacillus* 属 1 株、*Halomonas* 属 1 株、*Idiomarina* 属 1 株、*Photobacterium* 属 1 株、計 12 属に分類された。その中には、既知の低温細菌、深海細菌、石油分解細菌に近縁と考えられる細菌や、生理活性を持つと報告されている色素を産生する細菌が見出された。属を決定できなかった 10 株には、その塩基配列が既知の細菌のものと低い相同性しか示さない、未報告と考えられる細菌が含まれていた。

キーワード：海洋深層水、細菌種、16S rRNA 遺伝子

1. はじめに

近年、海洋深層水（以下、深層水と略す）は、その特徴である低温性、豊富な無機栄養塩類、清浄性

を利用して、養殖や藻類の培養、食料品、化粧品、食用塩などの原料として広く利用されている。このように深層水は、低温性などの物理的特性やその成分を多様な目的に利用できる再生型資源と認められ

¹高知工科大学（〒782-8502 高知県香美郡土佐山田町宮ノ口 185）

²三菱化学生命科学研究所（〒194-8511 東京都町田市南大谷 11 号）

¹Kochi University of Technology

²Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences

るようになった(中島, 2002)。一方, ある特定の地域や海域に生息する生物群は, それ全体が生物資源または遺伝子資源とみなされ, その中から有用生物や有用遺伝子を探索することが盛んに行われるようになってきた(内藤, 2002)。深層水は数 100 m 以上の水深から取水されるため, 表層の海水とは異なる特徴的な生物資源を含んでいると予想される。それにもかかわらず, その生物相についての研究は未だ十分ではなく, 深層水中の生物資源や遺伝子資源の活用は大きく立ち遅れているのが現状である。したがって深層水中の主要な遺伝子資源である細菌種を解明することは, 有用細菌や有用遺伝子の探索と利用にとって重要な意義を持つと考えられる。そこで我々は, 「室戸海洋深層水」中の細菌種を把握するため, 1999 年から 2002 年にかけて「室戸海洋深層水」中から 85 株の細菌を分離し, 遺伝子解析に基づく細菌の分類を試みたので報告する。

2. 材料と方法

2.1 「室戸海洋深層水」中からの細菌の分離

深層水の採取は, 高知県海洋深層水研究所の取水設備を用い, 1999 年から 2002 年にかけて行った。室戸岬沖合約 2 km, 水深 320 m の取水口より取水管を経て送られてくる海水を, 研究所のポンプピット内において直接採水した。深層水の水温は 11.6 ~ 13.6 °C (平均 12.5 °C) であった。試料海水は, 保冷しながら輸送し, 当日中に細菌分離操作を行った。細菌の分離は, 深層水を PPES-II 平板寒天培地 (Taga, 1968) に直接塗布するか, 深層水を濾過したメンブレンフィルター (ミリポア, 孔径 0.45 µm) を平板培地に密着させ, 20 °C で培養することによって行った。コロニー数は培養開始後 5 ~ 6 日目で最大に達した。増殖したコロニーを採取し, 新たな平板培地上で画線培養し, 得られた単一のコロニーを研究に用いた。また, それぞれの細菌株は -80 °C で保存した。

2.2 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定

深層水中から分離した細菌よりゲノム DNA を抽

出・精製し, 16S rRNA 遺伝子両端付近の塩基配列に相補的なプライマーを用いて, 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅した。用いたプライマーは, *Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子のポジション 8 ~ 27 に相当するフォワードプライマー (5'-agagtttgatcctggctcag-3') とポジション 1542 ~ 1522 に相当するリバースプライマー (5'-aaggaggtgacagccgca-3') である(平石, 2001)。また, 反応には TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。塩基配列決定のための反応は, *E. coli* 16S rRNA 遺伝子のポジション 821 ~ 803 に相当するリバースプライマー r2L (5'-catcgtttacggcgtggac-3') (平石, 2001; Hiraishi, 1992) と, Cy5.5 dye Terminator Kit (Amersham Biosciences) を用いて行った。また, 塩基配列の決定には DNA シーケンサー Gene Rapid (Amersham Biosciences) を用い, 約 300 塩基の配列を決定した。

2.3 相同性検索と属の同定

局所的に高い相同性を持つ塩基配列を検索する BLAST 法 (Altschul *et al.*, 1990) を用いて, 決定した塩基配列とデータベース中の既知の塩基配列との相同性を調べた。塩基配列データベースとして GenBank を用いた。データベース登録配列と 100 % の相同性を示した株は, 暫定的に登録細菌と同一種とした。また, 結果で述べる通り, 対象とする細菌と 95 % 以上の相同性を示す細菌がデータベース中に存在する場合のみ, その細菌と同属とした。

2.4 細菌が産生する色素の抽出と分光測定

色素産生細菌を PPES-II 液体培地に植菌し, 20 °C において 7 ~ 10 日間静置培養した。遠心分離による集菌後, エタノールを用いて菌体より色素を抽出した。ロータリーエバポレーターを用いて抽出液を減圧乾固し, 再び色素をエタノールに溶解した。色素の可視スペクトルは Beckman DU-640 分光光度計で測定した。*Pseudoalteromonas luteoviolacea* が産生する青紫色素 violacein, 及び *Pseudoalteromonas denitrificans* が産生する赤色素 prodigiosin を菌体より抽出し, 比較のために用いた。P.

luteoviolacea (IAM 14710 株) と *P. denitrificans* (IAM 14544 株) は、東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センター IAM カルチャーコレクションより分与された。

3. 結 果

1999 年から 2002 年にかけて「室戸海洋深層水」中より 85 株の細菌を分離し、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づいて細菌の分類を行った。

16S rRNA 遺伝子の中央部では末端部に比べて安定したプライマーとの相補的結合を期待できるため、塩基配列の決定には、16S rRNA 遺伝子の中央部付近に相補的なプライマーを用いた。あらかじめ、数種の分離株と 3 種のプライマー (r1L, r2L, f3L) (平石, 2001; Hiraishi, 1992) を用いた予備実験を行い、3 種のプライマーの中で比較的長い配列を解読でき、安定した結果が得られた r2L プライマーを以後使用した。株によって決定できた塩基配列の長さが異なるが、相同性解析の精度を高めるため、解読された配列のうち全株に共通の領域ではなく、各株について得られた最長の塩基配列を BLAST 法 (Altschul *et al.*, 1990) による相同性検索に用いた。

本研究では、細菌の分類と同定のために、16S rRNA 遺伝子の全長 (約 1500 塩基) ではなく、約 300 塩基の部分塩基配列を用いたが、この方法が妥当であるかどうか検討した。分離細菌株の予備的な相同性検索では、*Vibrio* 属が最も多く、ついで *Pseudoalteromonas* 属と *Shewanella* 属が多かった。そこで 16S rRNA 遺伝子全域を用いる相同性の検討を、*Vibrio* 属、*Pseudoalteromonas* 属、*Shewanella* 属について行った。これらの属の細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長にあたる 1366 塩基配列を GenBank のデータベースより抽出し、その相同性を割り出した。用いた 16S rRNA 遺伝子データベースは次の通りである。*Vibrio anguillarum* (X71821), *V. lentus* (AJ278881), *V. fischeri* (X74702), *V. logei* (AF323992), *V. splendidus* (AB038030), *V. tapetis* (Y08430), *Pseudoalte-*

romonas denitrificans (X82138), *P. luteoviolacea* (X82144), *P. rubra* (X82147), *Shewanella fidelia* (AF420313), *S. pealeana* (AF011335), *S. woodyi* (AF003549), *S. violacea* (D21225)。

その結果、*Vibrio* 属 6 種の間での相同性は 93 ~ 97 %, *Pseudoalteromonas* 属 3 種の間では 93 ~ 98 %, *Shewanella* 属 4 種の間では 94 ~ 97 % であった。ところが、異なる属の細菌間の相同性は 86 ~ 90 % であり、同属間の相同性とは明らかな差が認められた。

次に部分塩基配列の相同性を求めるため、塩基配列を決定するのに用いたプライマー (r2L) の 3' 末端側から 360 塩基を上の塩基配列より抽出し、互いに比較した。その結果、*Vibrio* 属間の相同性は 96 ~ 98 %, *Pseudoalteromonas* 属間では 95 ~ 99 %, *Shewanella* 属間では 97 ~ 98 % であり、1366 塩基を用いた相同性よりやや高い値を示した。また、異なる属間の相同性は 86 ~ 94 % であり、同属間より低い値を示した。この結果より、約 300 塩基についての相同性が 95 % 以上を同属の条件と見なすと、16S rRNA 遺伝子全長を用いた分類と同様の結果が得られることが分かった。

上の相同性に基づく基準に従って分離細菌の分類を行ったところ、85 株のうち 75 株は、*Vibrio* 属 29 株、*Pseudoalteromonas* 属 16 株、*Shewanella* 属 9 株、*Alteromonas* 属 6 株、*Marinobacter* 属 4 株、*Erythrobacter* 属 3 株、*Dietzia* 属 2 株、*Tenacibaculum* 属 2 株、*Bacillus* 属 1 株、*Halomonas* 属 1 株、*Idiomarina* 属 1 株、*Photobacterium* 属 1 株の 12 属に分類することができた (Table-1.1, Table-1.2)。残り 10 株については、属を決定するに至らなかった (Table-1.3)。これはデータベース中に近縁種が見出せなかったか、近縁種が存在するがその属が定められていなかったためである。

Table-1.1 (No. 22 ~ 34) の *Pseudoalteromonas* 属 13 株は青紫色の色素を産生した。海洋細菌 *Pseudoalteromonas luteoviolacea* は violacein と呼ばれる青紫色色素を産生することが報告されているため (Laatsch *et al.*, 1984; McCarthy *et al.*, 1985)、これらの分離株及び *P. luteoviolacea* (IAM14710

Table-1.1 Bacterial species in the Muroto deep seawater

No.	Strain	Geneus	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) /Reference (bp)	Matched (%)	Characteristics
1	315W17	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	224/224	100	
2	315W18	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	263/263	100	
3	315W20	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	309/310	99	
4	315W21	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	265/265	100	
5	315W23	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	167/168	99	
6	315W11	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> (Y18234)	310/319	97	
7	402Y1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus horikoshii</i> (AB043865) <i>Bacillus</i> sp. KX6 (AB043862)	324/324	100	alkaliphilic bacterium (<i>B. horikoshii</i> , KX6)
8	608R3	<i>Dietzia</i>	<i>Dietzia maris</i> (X81920)	181/182	99	actinomycete, oil degradation (<i>D. maris</i>)
9	911R	<i>Dietzia</i>	<i>Dietzia maris</i> (X81920)	365/367	99	isolated in a salt-making factory (911R)
10	608Y1	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter citreus</i> (AF118020) <i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1 (AY007680)	404/404	100	
11	608Y3	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter citreus</i> (AF118020) <i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1 (AY007680)	435/436	99	
12	608Y2	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1 (AY007680)	459/461	99	activation of eosinophil (608Y2)
13	710W2	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas venusta</i> (AJ306894) <i>Halomonas meridiana</i> (AJ306891) <i>Halomonas aquamarina</i> (AJ306888)	277/277	100	
14	402W3	<i>Idiomarina</i>	<i>Idiomarina abyssalis</i> (AF052740)	279/279	100	deep sea (the Northwestern Pacific Ocean) (<i>I. abyssalis</i>)
15	315W5	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i> (AJ000726)	354/355	99	degradation of hydrocarbons (<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , <i>M. aquaeolei</i>)
16	315W14	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i> (AJ000726)	351/351	100	
17	315W16	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i> (AJ000726)	322/322	100	
18	315W12	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter</i> sp. NCE312 (AF295032)	336/336	100	
19	520W1	<i>Photobacterium</i>	Ddeep-1 (AB055793) <i>Photobacterium</i> sp. KT0248	366/371 364/371	98 98	deep sea (Izu-Ogasawara Trench) (Ddeep-1)
20	516W1	<i>Pseudoalteromonas</i>	North Sea bacterium 12-13 (AF069666) <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AS-41 (AJ391202)	420/420 419/420	100 99	
21	402W15	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	319/320	99	no pigment produced (402W15)
22	402P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	391/394	99	
23	417P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	382/383	99	
24	520P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	300/301	99	isolated in Norwegian fjords, producing prodigiosin
25	315P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	348/358	97	(<i>P. denitrificans</i>)
26	315P4	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	330/338	97	
27	315P5	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	378/388	97	
28	516P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	431/443	97	producing violacein
29	710P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	379/389	97	(402P1, 417P1, 520P1, 315P1, 315P4, 315P5, 516P1, 710P1, 714P1, 315P11, 315P3, 612P1, 710P2)
30	714P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	311/318	97	
31	315P11	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	393/403	97	
32	315P3	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	362/376	96	
33	612P1	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	402/417	96	
34	710P2	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138)	247/255	96	
35	1020R	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> (X82147) <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (X82215)	341/343	99	producing prodigiosin (1020R)

株)を液体培養し、その菌体から抽出した色素の可視スペクトルを比較した。その結果、分離株の色素は 575 nm 付近に吸収極大を示し、そのスペクトルは *P. luteoviolacea* から抽出した violacein のものと一致した。したがって、分離株が産生する青紫

色素は、violacein またはそれに極めて近い色素であると考えられる。

しかし、分離株の塩基配列は、*P. luteoviolacea* よりむしろ *P. denitrificans* の塩基配列により高い相同性を示し、特に 3 株 (402P1, 417P1,

Table-1.2 Bacterial species in the Muroto deep seawater

No.	Strain	Geneus	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) /Reference (bp)	Matched (%)	Characteristics
36	516O1	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella fidelia</i> (AF420313)	309/309	100	
37	516O2	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella fidelia</i> (AF420313)	285/287	99	
38	710O	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella fidelia</i> (AF420313)	367/368	99	
39	315O2	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella pealeana</i> (AF011335)	218/218	100	
40	516O4	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella pealeana</i> (AF011335)	295/295	100	
41	315B1	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella violacea</i> (D21225)	398/405	98	deep sea (Ryukyu Trench) (<i>S. violacea</i>)
42	315O3	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella woodyi</i> (AF003549)	314/314	100	
43	612W1	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella woodyi</i> (AF003549)	311/311	100	
44	612W2	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella woodyi</i> (AF003549)	306/306	100	
45	612G2	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum mesophilum</i> (AB032504)	313/319	98	
46	710Y2	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum mesophilum</i> (AB032502)	402/410	98	
47	315O5	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. PMV19 (AF456340)	412/415	99	
48	608W1X	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. PMV19 (AF456340)	444/447	99	isolated from Norwegian fish (<i>V. anguillarum</i>)
			<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)	442/446	99	
49	315W6	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)	357/358	99	
50	417W1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)	343/344	99	
51	402W1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)	354/354	100	
52	402W4	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)	319/319	100	
53	315O6	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio lentus</i> (AJ278881)	415/415	100	
			<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)			
54	402W11	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio lentus</i> (AJ278881)	251/251	100	
			<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)			
55	315W4	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio lentus</i> (AJ278881)	304/304	100	
56	402W9	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio fisheri</i> (X74702)	324/330	98	
57	402W5	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio logei</i> (AF323992)	296/297	99	
58	315O12	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio logei</i> (AF323992)	386/388	99	
59	315O13	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio logei</i> (AF323992)	266/279	95	
60	516W3	<i>Vibrio</i>	unidentified bacterium 4c (AF293974)	383/386	99	
			<i>Vibrio splendidus</i> (AY046955)	382/386	98	
61	315W1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (AB038030)	321/322	99	
62	315W13	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (AB038030)	329/329	100	
63	315W2	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (AB038030)	360/360	100	
64	315W3	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (AB038030)	329/329	100	
65	315O4	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio tapetis</i> (Y08430)	347/347	100	
66	402W14	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio tapetis</i> (Y08430)	330/330	100	
67	315O1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	393/393	100	
68	402W2	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	349/349	100	
69	402W7	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	430/430	100	
70	315O11	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)	417/418	99	
71	402W17	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. LMG19840 (AJ316207)	357/359	99	
			<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)			
72	402W13	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. RE35F/12 (AF118021)	223/224	99	
			<i>Vibrio</i> sp. EN276 (AB038023)			
73	315W22	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. 3d 7 (AF388393)	383/385	99	
74	608Y4	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp. ANG. HOH (AF022410)	389/391	99	
75	710W1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio campbellii</i> (X74692)	200/210	95	

520P1) は *P. denitrificans* に 99 % の相同性を示した (Table-1.1). 分離した青紫色素産生株は, その塩基配列の相同性から二つのグループに分けることができた. Fig. 1 は 520P1 株と 710P1 株の塩基配列を *P. luteoviolacea* (GenBank X82144) の配列と比較したものである. 520P1 株と 710P1 株の塩基配列は, 複数の個所で *P. luteoviolacea* の配

列と異なっており, 520P1 株と 710P1 株の間でも配列の違いが認められた. 色素産生細菌のうち, 402P1 株と 417P1 株の塩基配列は 520P1 株の配列と一致し, 残り 9 株 (315P1, 315P4, 315P5, 516P1, 714P1, 315P11, 315P3, 612P1, 710P2) の塩基配列は 710P1 株の配列と一致した. 一方, *Pseudoalteromonas* 属の 1020R 株

Table-1.3 Bacterial species in the Muroto deep seawater

No.	Strain	Geneus	Closest species (GenBank accession no.)	Matched (bp) /Reference (bp)	Matched (%)	Characteristics
76	315Y11	unidentified	marine bacterium SCRIPPS 413 (AF359548)	328/329	99	
77	315Y12	unidentified	marine bacterium SCRIPPS 413 (AF359548)	332/333	99	
78	315Y13	unidentified	marine bacterium SCRIPPS 413 (AF359548)	336/337	99	
79	402W6	unidentified	marine eubacterial sp. (L10950)	272/277	98	
			Chukchi sea bacterium AWS-7W3 (AF283852)	270/277	97	the Arctic Ocean (AWS-7W3, AWS-4B2)
			arctic sea ice bacterium AWS-4B2 (AF283849)	270/277	97	
80	402W12	unidentified	unclutured <i>Colwellia</i> sp. MERTS 2CM 93 (AF424079)	242/251	96	the Antarctic Ocean (2CM 93),
			Chukchi sea bacterium AWS-7W3 (AF283852)	242/251	96	the Arctic Ocean (AWS-7W3, AWS-4B2)
			arctic sea ice bacterium AWS-4B2 (AF283849)	241/251	96	
81	402W8	unidentified	<i>Colwellia</i> sp. 34H (AF396670)	355/368	96	Greenland(34H),
			unidentified gamma protobacterium NB1-e (AB013826)			Japan Trench(NB1-e)
82	315Y1	unidentified	<i>Eubostrichus diana</i> e epibacterium (AF154057)	354/372	95	isolated from <i>Eubostrichus diana</i> e (epibacterium)
83	402W10	unidentified	<i>Eubostrichus diana</i> e epibacterium (AF154057)	295/310	95	
84	612R1	unidentified	<i>Cytophaga aprica</i> (D12655)	283/310	91	
85	315W19	unidentified	unidentified gamma protobacterium BD1-7 (AB015519)	308/340	90	Suruga Bay (BD1-7)
			<i>Riftia pachyptila</i> endosymbiont (U77478)	265/283	93	symbiont of <i>Riftia pachyptila</i> (endosymbiont)

(Table-1.1, No. 35) は赤い色素を産生した。 *P. denitrificans* は prodigiosin と呼ばれる赤色素を産生することが知られているため (Enger *et al.*, 1987), 1020R 株と *P. denitrificans* (IAM14544 株) を液体培養し, その菌体から抽出した色素の可視スペクトルを比較した。 1020R 株の色素は 535 nm 付近に吸収極大を持ち, そのスペクトルは *P. denitrificans* から抽出した prodigiosin のものと一致した。 したがって 1020R 株が産生する色素は, prodigiosin またはそれに極めて近い色素であると考えられる。

4. 考 察

4.1 「室戸海洋深層水」中の細菌種の特徴

「室戸海洋深層水」中の細菌種の特徴として, 冷水域の細菌の近縁種が多数認められた。 また深海由来と考えられる細菌の近縁種も数株得られた。 深層水中から分離された代表的な冷水域の細菌の近縁種について以下に述べる。 *Vibrio anguillarum* は,

ノルウェー産の魚類よりの分離が報告されており (Wiik *et al.*, 1989), これと同一種であると考えられる 2 株 (402W1, 402W4), 近縁種 4 株 (315W13, 417W1, 315O6, 402W11) が分離された。 *Pseudoalteromonas denitrificans* は, ノルウェー西岸のフィヨルドより分離された低温細菌であり, 赤色素 prodigiosin を産生することが報告されている (Enger *et al.*, 1987)。 「室戸海洋深層水」中からは *P. denitrificans* と相同性を示し, violacein と考えられる青紫色素を産生する細菌が分離された。 これらの色素産生株は, その塩基配列の相同性から, 3 株 (402P1, 417P1, 520P1) と 10 株 (315P1, 315P4, 315P5, 516P1, 710P1, 714P1, 315P11, 315P3, 612P1, 710P2) の二つのグループに分けることができた (Fig. 1)。 violacein は, *P. luteoviolacea* が産生する色素として報告されているが (Laatsch *et al.*, 1984; McCarthy *et al.*, 1985), 分離株は *P. luteoviolacea* とは異なる塩基配列を持っていた (Fig. 1)。 *Shewanella pealeana* は, ヤリイカ (*Loligo pealei*) の卵胞腺より分離さ

<i>P. luteoviolacea</i>	CCTGCTAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
520P1	GACTA.....T.....
710P1	GA·TGC.....T.....
<i>P. luteoviolacea</i>	GGTAATACGGAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGG
520P1	AG.....A.....
710P1	AG.....A.....
<i>P. luteoviolacea</i>	TTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAGTGGCA
520P1	
710P1	
<i>P. luteoviolacea</i>	AACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC
520P1	G.....A.....
710P1	G.....A.....
<i>P. luteoviolacea</i>	TGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAA
520P1	T.....
710P1	T.....

Fig. 1 Comparison of DNA sequences of 16S rRNA genes of strains 520P1, 710P1 and *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Partial sequences corresponding to the positions 469 to 768 of *E. coli* 16S rRNA gene are shown. Dots indicate identical bases. The sequence of *P. luteoviolacea* gene is according to the data in GenBank (accession number X82144).

れた耐冷細菌であることが報告されており (Leonardo *et al.*, 1999), 同一種と考えられる 2 株 (315O2, 516O4) が分離された。 *S. woodyi* は、地中海西部のアルボラン海のヤリイカの墨汁から分離された。発光することが報告されており、4 °C 及び 25 °C で増殖し、30 °C では増殖できない (Makemson *et al.*, 1997)。同一種と考えられる 3 株 (315O3, 612W1, 612W2) が分離された。710W2 株は、 *Halomonas venusta*, *H. aquamarina*, *H. meridiana* に 100 % の相同性を示す。 *H. venusta*, *H. aquamarina* はハワイの海水より分離され、 *H. meridiana* は南極大陸の塩湖より分離された (Arahal *et al.*, 2002)。710W2 株とこれら 3 種の細菌では、16S rRNA 遺伝子 277 塩基の配列が完全に一致するため、分離株がどの種であるかは同定できなかった。また、属の同定に至らなかった細菌には、marine eubacterial sp. (DeLong *et al.*, 1993) 及び北極海で分離された ASW-7W3, ASW-4B2 と同属であると考えられる 402W6 株、北極海の ASW-7W3, ASW-4B2 及び南極海で分離された 2CM93 と同属であると考えられる 402W12 株、グリーンランド沖で分離された 34H 及び日本海溝で分離された NB1-e (Yanagibayashi *et al.*, 1999) と同属であると考えられる 402W8 株がある。これらも冷水域の細菌の近縁種と考えられる。

深海由来の細菌の近縁種と考えられるものとして

次の株が分離された。 *Shewanella violacea* は、琉球海溝 5110 m の海底堆積物より分離され、紫色色素を産生することが報告されている (Nogi *et al.*, 1998)。この細菌は、好圧菌としても研究が進められている (Kato and Nogi, 2001)。分離した近縁種 315B1 株は、 *S. violacea* に 98 % の相同性を示し、未同定の黒紫色の色素を産生した。402W3 株は、北西太平洋の水深 4000 から 5000 m の海水中から分離された *Idiomarina abyssalis* (Ivanova *et al.*, 2000) と同一種と考えられる。520W1 株は、伊豆・小笠原海溝水深 7242 m の海水から分離された Ddeep-1 株 (Radjasa *et al.*, 2001) に 98 % の相同性を示した。Ddeep-1 株は、 *Hyphomicrobium indicum* (AB016982) の近縁種として分離され (Radjasa *et al.*, 2001), *Hyphomicrobium* 属として分類された。しかし、 *H. indicum* は、遺伝子相同性及び細菌の主要性状から *Photobacterium* 属への再分類が示唆されている (Radjasa *et al.*, 2001)。したがって、Ddeep-1 株とその近縁種である 520W1 株も *Photobacterium* 属の細菌と考えられる。

深層水中から分離された細菌中には、最も近縁な種と 95 % 以下の相同性しか示さない、未報告と推定される細菌も見出された。315Y1 株と 402W10 株は、線虫 (*Eubostrichus diana*) の体表より分離された *Eubostrichus diana* epibacterium (Polz *et al.*, 1999) に最も近縁であるが、95 % の相同性

しか示さなかった。315W19 株は、熱水噴出口のハオリムシ (*Riftia pachyptila*) に共生している細菌 (Feldman *et al.*, 1997) に 93 % の相同性を示すに過ぎなかった。612R1 株は、*Cytophaga aprica* に最も近縁であるが、91 % の相同性しか示さなかった。これらの GenBank のデータベースに近縁な属が見当たらない細菌は、全株数の約 4 % を占め、海洋深層水が未知の細菌を含む遺伝子資源として貴重であることを示している。

4.2 「室戸海洋深層水」中より見出された有用と考えられる細菌

「室戸海洋深層水」中より分離した細菌には次のような有用と思われる細菌が見出された。炭化水素分解菌として知られている *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* または *M. aquaeolei* と考えられる株が 2 株 (315W14, 315W16)、これと近縁である 315W5 株が分離できた。*M. hydrocarbonoclasticus* は、製油所の近くの地中海の海水から分離された (Gauthier *et al.*, 1992)。*M. aquaeolei* は、ベトナム沖の海底油田を採掘するプラットフォームより分離され、*M. hydrocarbonoclasticus* と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が 99.4 % 一致していることが報告されている (Huu *et al.*, 1999)。他にも *Dietzia maris* に近縁な 2 株 (608R3, 910R) が分離された。*D. maris* は、放線菌であり鉱物油やパラフィンを分解する油分解菌であることが報告されている (Zviagintseva *et al.*, 2001)。なお、*D. maris* 近縁株 2 株のうち 910R 株は、「室戸海洋深層水」を原料とする製塩施設から分離されたものである。

生理活性を持つと報告されている色素を産生する細菌として *Pseudoalteromonas* 属の細菌 14 株が分離された。そのうち 13 株は、抗トリパノソーマ作用、アポトーシス誘導作用、グラム陽性細菌に対する抗生作用など多様な生理作用をもつ青紫色素 violacein (Melo *et al.*, 2000; Margalith, 1992) と考えられる色素を産生した。*P. rubra* または *P. piscicida* に近縁な 1020R 株は、免疫抑制作用、アポトーシス誘導作用をもつ赤色素 prodigiosin

(Kawauchi *et al.*, 1997; Margalith, 1992) と考えられる色素を産生した。

608Y2 株には、アトピー性皮膚炎に関係する好酸球を活性化する作用がある (渡部ら, 2000)。これは、*Erythrobacter citoreus* と *Erythrobacter* sp. JP13.1 に近縁な細菌であった。

好アルカリ性細菌 *Bacillus horikoshii* は、2000 年に海洋科学技術センターより 16S rRNA 遺伝子の配列が登録されている。この *B. horikoshii* (AB043865) または *Bacillus* sp. KX6 (AB043862) と考えられる 402Y1 株が分離された。好アルカリ性細菌が産生するアルカリ性プロテアーゼやアルカリ性セルラーゼは、アルカリ性の溶液の中で酵素活性を持つため、洗濯用洗剤に配合するなど工業的に利用されている (Horikoshi, 1999)。

謝 辞

本研究の推進にあたり、高知県海洋深層水研究所の前所長谷口道子氏はじめ所員の方々には多大なご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。本研究の一部は、文部科学省 (旧科学技術庁) の平成 10 ~ 12 年度科学技術振興調整費による「地域先端研究 (「室戸海洋深層水」の特性把握および機能解明)」及び独立行政法人製品評価技術基盤機構の「平成 13 年度産業上有用な微生物等の収集に関する標準株整備事業」の一環として行われた。なお本研究で分離した細菌のうち 65 株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源センター (NBRC) において保存されている。

文 献

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Arahal, D. R., W. Ludwig, K. H. Schleifer and A. Ventosa (2002): Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 241-249.
- DeLong, E. F., D. G. Franks and A. L. Alldredge (1993): Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol.*

- Oceanogr., 38: 924-934.
- Enger, ϕ ., H. Nygaard, M. Solberg, G. Schei, J. Nielsen and I. Dundas (1987): Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol., 37: 416-421.
- Feldman, R. A., M. B. Black, C. S. Cary, R. A. Lutz and R. C. Vrijenhoek (1997): Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 6: 268-277.
- Gauthier, M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin and J. -C. Bertrand (1992): *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 42: 568-576.
- Hiraishi, A. (1992): Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett. Appl. Microbiol., 15: 210-213.
- 平石明 (2001): リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列. 48-64 頁. 微生物の分類・同定実験法 (鈴木健一朗, 平石明, 横田明編). シュブリンガー・フェアラーク 東京, 東京.
- Horikoshi, K. (1999): Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63: 735-750.
- Huu, N. B., E. B. M. Denner, D. T. C. Ha, G. Wanner and H. Stan-Lotter (1999): *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil producing well. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 367-375.
- Ivanova, E. P., L. A. Romanenko, J. Chun, M. H. Matte, G. R. Matte, V. V. Mikhailov, V. I. Svetashev, A. Huq, T. Maugel and R. R. Colwell (2000): *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 901-907.
- Kato, C. and Y. Nogi (2001): Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. FEMS. Microbiol. Ecol., 35: 223-230.
- Kawauchi, K., K. Shibutani, H. Yagisawa, H. Kamata, S. Nakatsuji, H. Anzai, Y. Yokoyama, Y. Ikegami, Y. Moriyama and H. Hirata (1997): A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 237: 543-547.
- Laatsch, H., R. H. Thomson and P. J. Cox (1984): Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethyl-violacein. J. Chem. Soc. Perkin Trans., II: 1331-1339.
- Leonardo, M. R., D. P. Moser, E. Barbieri, C. A. Brantner, B. J. MacGregor, B. J. Paster, E. Stackebrandt and K. H. Nealson (1999): *Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 1341-1351.
- Makemson, J. C., N. R. Fulayfil, W. Landry, L. M. Van Ert, C. F. Wimpee, E. A. Widder and J. F. Case (1997): *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 1034-1039.
- Margalith, P. Z. (1992): Chapter 8, Other heterocyclic pigments. pp. 111-118. In Pigment Microbiology, Chapman & Hall, London.
- McCarthy, S. A., T. Sakata, D. Kakimoto and R. M. Johnson (1985): Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51: 479-484.
- Melo, P. S., S. S. Maria, B. C. Vidal, M. Haun, N. Duran (2000): Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. In vitro Cell. Dev. Boil. Anim., 36: 539-543.
- 内藤敦 (2002): 海洋生物資源の有効利用. シーエムシー 出版, 東京. 260 頁.
- 中島敏光 (2002): -21 世紀の循環型資源-海洋深層水の利用. 緑書房, 東京. 263 頁.
- Nogi, Y., C. Kato and K. Horikoshi (1998): Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov.. Arch. Microbiol., 170: 331-338.
- Polz, M. F., C. Harbison and C. M. Cavanaugh (1999): Diversity and heterogeneity of epibiotic bacterial communities on the marine nematode *Eubostriechus diana*. Appl. Environ. Microbiol., 65: 4271-4275.
- Radjasa, O. K., H. Urakawa, K. Kita-Tukamoto and K. Ohwada (2001): Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the Northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. Mar. Biotechnol., 3: 454-462.
- Taga, N. (1968): Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. Bull. Misaki. Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ., 12: 65-76.
- 渡部嘉哉, 富永明, 松本健治, 倉繁隆信 (2000): 炎症

細胞に対する作用機構の解明. 147-156 頁. 平成 11 年度科学技術総合研究委託費地域先導研究 研究成果報告書 室戸海洋深層水の特性把握および機能解明. 財団法人高知県産業振興センター, 高知.

Wiik, R., K. A. Hoff, K. Andersen and F. L. Daae (1989): Relationships between plasmids and phenotypes of presumptive strains of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. Appl. Environ. Microbiol., 55: 826-831.

Yanagibayashi, M., Y. Nogi and C. Kato (1999):

Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. FEMS. Microbiol. Lett., 170: 271-279.

Zviagintseva, I. S., M. N. Poglazova, M. T. Gotoeva and S. S. Beliaev (2001): Effect of the media salinity on destruction of petroleum oils by nocardioform bacteria. Mikrobiologiya, 70: 759-764.

(2003. 6. 9 受付, 2003. 9. 30 受理)