

## 16S rDNA解析による新規海洋細菌の同定

小林史尚<sup>1,2)</sup>, 鈴木信雄<sup>3)</sup>, 中村嘉利<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学自然計測応用研究センター, エコテクノロジー研究部門;

<sup>2</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科, 物質工学専攻; <sup>3</sup>〒920-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Fumihisa Kobayashi, Nobuo Suzuki, and Yoshitoshi Nakamura: Identification of novel marine bacteria using 16S rDNA analysis

海水に生息する動物の腸管には、海水、底泥、餌などを通して常に多数の細菌が入り込み、動物種固有の細菌相を形成している。海産動物の腸内は一つの生態系と見なすことができ、腸内の細菌と宿主、及び細菌同士の相互作用を明らかにすることは、微生物生態学的に重要な課題である。海産動物の腸内の生態系についての研究の歴史は浅く、不明なことが多い<sup>1)</sup>。したがって陸上由来の細菌では、資化できなかつた物質を分解可能な細菌が生息している可能性がある。そこで前報<sup>2)</sup>では、海水中の難分解性芳香族化合物の処理を目的として、有害物質フェノールを分解する新規海洋細菌をクロシタナシウミウシの腸内から単離し、グラム染色等の同定試験を検討した。その結果、単離されたEBR01株は*Acinetobacter*属の菌株と類似性が高いことを明らかにした。本研究では、EBR01株と同時に単離されたEBR02株の2菌株について16S rDNAのシーケンス解析を行い、相同性検索による菌株同定を行った。

単離された菌体 (EBR01株及びEBR02株) をNutrient Agar (Oxoid, England, UK) に植菌し、30℃で1日間培養した。ゲノムDNAの抽出は、PepMan Method (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCRにより16S Ribosomal RNA遺伝子 (16S rDNA) の5'末端側約500 bpの領域を増幅した。その後、増幅された塩基配列をシーケンシングし、16S rDNA部分塩基配列を得た。PCR産物の精製、サイクルシーケンスにはMicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。なお、ゲノムDNA抽出からサイクルシーケンスまでの基本的操作はApplied Biosystems社のプロトコール (P/N4308132 Rev.A) に従った。解析は、得られた16S rDNAの塩基配列を用いて行った。相同性検索にはMicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1を、データベースとしてはMicroSeq Bacterial 500 Library v.0023 (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。

Figure 1 にEBR01株とEBR02株の16S rDNA塩基配列を示す。なお、これらの塩基配列はDDBJ (DNA Data Bank of Japan) 登録を行い、Accession Number としてそれぞれAB247271とAB247452を得ている。MicroSeqを用いた解析の結果、EBR01株の16S rDNA部分塩基配列は相同率99.24 %で*Acinetobacter johnsonii*<sup>3)</sup>の16S rDNAに対し最も高い相同性を示した。したがってEBR01株は、*Acinetobacter johnsonii*である可能性が高い。一方EBR02株の16S rDNA部分塩基配列は相同率97.32 %で*Acinetobacter lwoffii*<sup>4)</sup>の16S rDNAに対し最も高い相同性を示した。EBR02株は、*Acinetobacter lwoffii*の16S rDNAの塩基配列とは、数%異なっていたので、*Acinetobacter lwoffii*と近縁であるが、別種である可能性が考えられる。これを分類学的に判断するためには、16S rDNA塩基配列解析のみでこの種の異同を判断することは難しく、検体菌株と基準株との間でハイブリダイゼーションを用いて

DNA-DNA相同値を比較することが必要である<sup>5)</sup>。

以上の結果から、クロシタナシウミウシの腸内から単離されたEBR01株は、*Acinetobacter johnsonii*である可能性が高いが、EBR02株は*Acinetobacter lowffii*に近縁の新種である可能性が示された。

(a)

TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGCGGCA GGCTTAACAC ATGCAAGTCG AGCGGGGAAR GGTAGCTTGC  
TACCTGACCT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCTTAGGAA TCTGCCTATT AGTGGGGGAC AACATTCCGA AAGGAATGCT  
AATACCGCAT ACGCCCTACG GGGGAAAGCA GGGGATCTTC GGACCTTGCG CTAATAGATG AGCCTAAGTC AGATTAGCTA  
GTTGGTGGGG TAAAGGCCTA CCAAGGCGAC GATCTGTAGC GGGTCTGAGA GGATGATCCG CCACACTGGG ACTGAGACAC  
GGCCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG AAAGCCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTG  
AAGAAGGCCT TTTGGTTGTA AAGCACTTA AGCGAGGAGG AGGCTACTKG GATTAATACT CTDGGATAGT GGACGTTACT  
CGCAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG GTA

(b)

TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGCGGCA GGCTTAACAC ATGCAAGTCG AGCGGGGAAA GGTAGCTTGC  
TACTGGACCT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCTTAGGAA TCTGCCTATT AGTGGGGGAC AACATTCCGA AAGGAATGCT  
AATACCGCAT ACGTCCTACG GGAGAAAGCA GGGGACCTTC GGGCCTTGCG CTAATAGATG AGCCTAAGTC GGATTAGCTA  
GTTGGTGGGG TAAAGGCCTA CCAAGGCGAC GATCTGTAGC GGGTCTGAGA GGATGATCCG CCACACTGGG ACTGAGACAC  
GGCCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGGG GAACCCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTG  
AAGAAGGCCT TATGGTTGTA AAGCACTTA AGCGAGGAGG AGGCTACTAG TATTAATACT ACTGGATAGT GGACGTTACT  
CGCAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG GTA

Figure 1 Partial sequence of 16S rDNA in EBR01 strain (a) and EBR02 strain (b).

#### 引用文献

- 1) 杉田治男, 出口吉昭: 海産動物の腸内細菌相, 海洋科学, 211, 51-57 (1988)
- 2) 小林史尚, 岩井尚子, 鈴木信雄, 中村嘉利: クロシタナシウミウシの腸から単離された海洋細菌の同定, 金沢大学自然計測応用研究センター臨海実験施設研究概要・年次報告, 3, 18-19 (2005)
- 3) Bouvet, P.J.M. and Grimont, P.A.D.: Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lowffii*. Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 228-240 (1986)
- 4) Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A.: Approved Lists of Bacterial Names, Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 225-420 (1980)
- 5) Stackebrandt, V.B.D. and Goebel, B.M.: Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 44, 846-489 (1994)

#### 謝辞

本研究のシーケンス及び相同性検索においては、(株) テクノスルガの協力をいただいた。また本研究の一部は、科学研究費若手研究B (小林史尚、17710060) の援助により行われた。ここに記して謝意を表します。