

南極海産ヒモムシ *Parborlasia corrugatus* より分離された 細菌の系統解析

西村 基弘¹⁾・田邊 朋子²⁾・稲垣 昌宣¹⁾・小川 麻里³⁾

Phylogenetic Analysis of Bacteria Isolated from Antarctic *Parborlasia corrugatus*

Motohiro NISHIMURA¹⁾, Tomoko TANABE²⁾, Masanori INAGAKI¹⁾ and Mari OGAWA³⁾

要 旨

南極昭和基地付近の沿岸より採取された紐形動物ヒモムシの一種 *Parborlasia corrugatus* について、それに共生する細菌のうち培養可能な菌株の分離を試みた。分離は、酸素要求性（好気的条件、嫌気的条件）と生育温度（5℃、30℃）の異なる条件下で培養することにより行った。その結果、培養温度30℃の培地から14種類のコロニーが見出され、そのうち好気由来が9種類、嫌気由来が5種類であった。一方、培養温度5℃の培地からは明瞭なコロニーは認められなかった。得られた14株の細菌について、16S rRNA 遺伝子を解析し分類学的帰属を行った。

キーワード： *Parborlasia corrugatus*, 共生細菌, 16S rRNA 遺伝子

はじめに

宿主生物と相利共生関係にある微生物は、宿主との間で代謝物質の授受を中心とした緊密な生理的機構を有している。最近の研究によると、ヒトデやホヤ、ウミウシなどの海洋無脊椎動物から見出された生理活性物質は、共生微生物の代謝産物に由来することが報告されている¹⁾。しかも、その多くは陸上微生物由来の生理活性物質とは異なるユニークな化学構造を有しており、このことから宿主生物の代謝産物が共生微生物の二次代謝に深く関与していることが推察される。ところで、特殊環境に生息する生物は、置かれた環境に適応するために特有の代謝系を有しており^{2,3)}、それより生成される代謝産物には環境特異性の高い物質が含まれることが予想される。したがって、そのような生物に共生する微生物は新規生理活性物質の探索源として大いに期待できる。

ヒモムシは紐形動物門 Nemertea に属する主として海産の無脊椎動物でおよそ1200種類が知られている⁴⁾。このうち、南極海に生息するヒモムシとしては、*Parborlasia corrugatus* (= *Lineus corrugatus*) が報告されているが⁵⁾、このたび国立極地研究所の協力を得て、この南極産ヒモムシを入手することができた。そこで、本研究ではこれを材料に共生細菌を分離し、その分類学的帰属を試みた。本論文はヒモムシ由来細菌に関する初めての報告である。

¹⁾ 安田女子大学 薬学科, 薬学部, ³⁾ 安田女子大学 児童教育学科, 教育学部

²⁾ 広島共立病院薬剤部

I. 材料および方法

1. 試料

実験に用いたヒモムシは2013年1月に南極昭和基地付近の沿岸より採取されたものである。図1に示す解剖皿(20×28.5cm)の中心に横たわるのがヒモムシで、左端腹面には口が確認できる(矢印の先端部)。



図1 南極海産ヒモムシ
ヒモムシの下にある白い物体は内部から取り出された餌(イカの切り身)である。

2. 培養

-80℃で凍結保存されたヒモムシを解凍後、滅菌PBSで洗浄し、消化管内容物を含む組織片をホモジナイザー(PT2100, 東京理化器械)を用いてホモジネーションした。得られたホモジネートを100μm nylon filter (Steriflip-NY フィルターユニット, ミリポア社)で濾過したのち、人工海水で調製した5種類の寒天培地(Neutrient agar, 変法GAM agar, ISP4 agar, MRS agar, Marine agar; 変法GAM agarは日水製薬, 他はDifco社)に濾液を塗布し、各培地について5℃と30℃, それぞれ好気的および嫌気的条件下で最長10日間培養した。嫌気的培養にはアネロパック(三菱ガス化学)を使用し、嫌気ジャー(三菱ガス化学)の中で行った。以上の操作は無菌的に行った。

3. 系統解析

出現したコロニーをごく少量採取し、16S rRNA遺伝子(16S rDNA)の変異領域(V1~V3)を含む約500 bpの領域をコロニーPCRにより増幅した。PCRにはMicroSeq[®]500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems社)を用い、同製品のプロトコールにしたがって行った。得られたPCR産物はMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いて精製後、塩基配列分析のための鋳型とした。塩基配列分析にはMicroSeq[®]500 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit (Applied Biosystems社)およびABI Prism 310 Genetic Analyzer

(Applied Biosystems社) を用いた。一方、16S rDNAの全塩基配列分析には、Bacterial 16S rDNA PCR Kit (TaKaRa Bio社) で増幅した産物を鋳型とし、同Kitに添付されているPrimer setおよびBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems社) を用いて行った。得られた16S rDNAの塩基配列についてはBLAST検索⁶⁾ を行い、相同性の高い配列 (ホモログ) を抽出・比較することにより分離株の帰属を行った。系統樹の作成にあたっては、BLAST検索より得たホモログをClustal W ソフトウェア⁷⁾ を用いてアラインメントし、1380bp前後の長さに一統したものを使用した。系統樹はNJ法⁸⁾ にもとづき作成した。

II. 結果および考察

1. 細菌の分離

ヒモムシのホモジネート濾過液を5種類の寒天培地に塗布し、所定の条件で培養を行った。その結果を表1に示す。今回使用した培地はすべて人工海水で調製したものであり、海水塩濃度に耐性を示さない一般細菌にとっては生育し難い培地組成となっている。そのため、形成されたコロニーは少なく、コロニーの形状とサイズ、色調の違いから全部で14種類の細菌を分離した。これらはすべて30℃での培養から得られたものであり、5℃の培養では明瞭なコロニーは見出されなかった。

表1 培養結果

	5℃ 好気	30℃ 好気	5℃ 嫌気	30℃ 嫌気
栄養寒天培地 (NU)	0	2	0	2
変法GAM培地 (GA)	0	3	0	1
MRS寒天培地 (MR)	0	0	0	0
Marine agar (MA)	0	4	0	2
ISP4	0	0	0	0

表中の数字は分離株数を示す。

一般に、低温環境に生息する細菌は0℃でも生育可能で、最適生育温度が15℃以下、生育の上限温度が20℃以下の好冷性細菌 (好冷菌) と、20℃以上でも増殖可能な耐冷菌に分れる。これによると、今回分離した細菌はいわゆる好冷菌ではなく、耐冷菌もしくは中温性の海洋細菌であることが推定される。5℃での培養でコロニーの形成が認められなかった理由は不明であるが、これについては、現在、液体培地を用いた増菌培養および培養期間の延長など、培養条件の見直しを検討している。

2. 16S rRNA遺伝子配列にもとづく分離菌株の帰属

分離した14株の分類学的帰属を行うため、16S rRNA遺伝子の可変領域をコロニーPCRにより増幅し、それぞれの塩基配列を決定した。次いで、得られた配列をBLAST検索にかけ相同性の高い配列を調べた。その結果を表2にまとめた。

表2 16S rRNA遺伝子の可変領域 (V1 ~ V3) を対象とした分類学的帰属

菌番号	帰属	特記事項	Accession No.
NU01	<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter</i> sp. BJ-5の16S ribosomal RNA geneの可変領域(460bp)と配列が100%一致。同株は北極海氷から分離された。	DQ298409
NU02	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BFR-5および <i>Bacillus subtilis</i> に属する多数の菌株の16S ribosomal RNA geneの可変領域(470bp)と配列が100%一致。	LT599743
GA01	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1の16S ribosomal RNA geneの可変領域(408bp)と配列が99%一致。	CP000094
GA02	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium</i> sp. NFU35-25の16S ribosomal RNA geneの可変領域(490bp)と配列が100%一致。同株は凍結海産魚から分離された。	AB705304
GA03	<i>Psychrobacter</i>	NU01株と同一。	-
MA01	<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter</i> sp. SOD-101の16S ribosomal RNA geneの可変領域(414bp)と配列が100%一致。同株は南極大陸の土壌より分離された。	JX196620
MA02	<i>Psychrobacter</i>	<i>Psychrobacter glacincola</i> IC007の16S ribosomal RNA geneの可変領域(364bp)と配列が100%一致。同株は南極大陸に漂着した海氷から分離された。	PGU85877
MA03	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp. AT-BI-46をはじめ多数の <i>Microbacterium</i> 属菌の16S ribosomal RNA geneの可変領域(367bp)と配列が100%一致。	KX023892
MA04	<i>Psychrobacter</i>	NU01株と同一。	-
NU01A*	<i>Carnobacterium</i>	GA02株と同一。	-
NU02A*	<i>Carnobacterium</i>	GA02株と同一。	-
GA01A*	<i>Carnobacterium</i>	GA02株と同一。	-
MA01A*	<i>Carnobacterium</i>	GA02株と同一。	-
MA02A*	<i>Carnobacterium</i>	GA02株と同一。	-

* 末尾の“A”は嫌気由来株を示す。

本実験では16S rRNA遺伝子のうち特定の領域に限定した解析であるため属レベルでの帰属となるが、最終的には14種類の菌株は5属7菌種に集約された。その多くは*Psychrobacter*もしくは*Carnobacterium*として同定された。一般に、*Psychrobacter*属は耐冷性と耐浸透圧性を有することから寒冷極地由来の試料からの報告が多く⁹⁾、一方、*Carnobacterium*属は乳酸桿菌の一種であり嫌気的条件下で生育するが、耐冷性ならびに耐凍結融解性、および耐圧性を示すことから、深海や南極土壌などからも分離されている¹⁰⁾。*Psychrobacter*属の「psychro」とは「冷たい」の意であり、今回この属の菌種が複数検出されたことは大変に興味深い。実際に、寒冷極地からの*Psychrobacter*属の分離例は*Carnobacterium*属に比べると明らかに多い。そこで、分離した3種類の*Psychrobacter*属(NU01株、MA01株、MA02株)について、より詳細な帰属を行うため16S rRNA遺伝子の全塩基配列を解析し、他の*Psychrobacter*属との進化系統上の位置関係を調べた。その結果を図2に示す。3種類の分離株は明らかに異なるクラスターに含まれ、NU01株は*P. cibarius* JG-220 (accession no. AY639872)、MA01株は*P. psychrophilus* NP42 (accession no. EU196312)、そしてMA02株は*P. glacincola* ANT9253 (accession no. AY167308)と最も系統的に近縁であることが判明した。

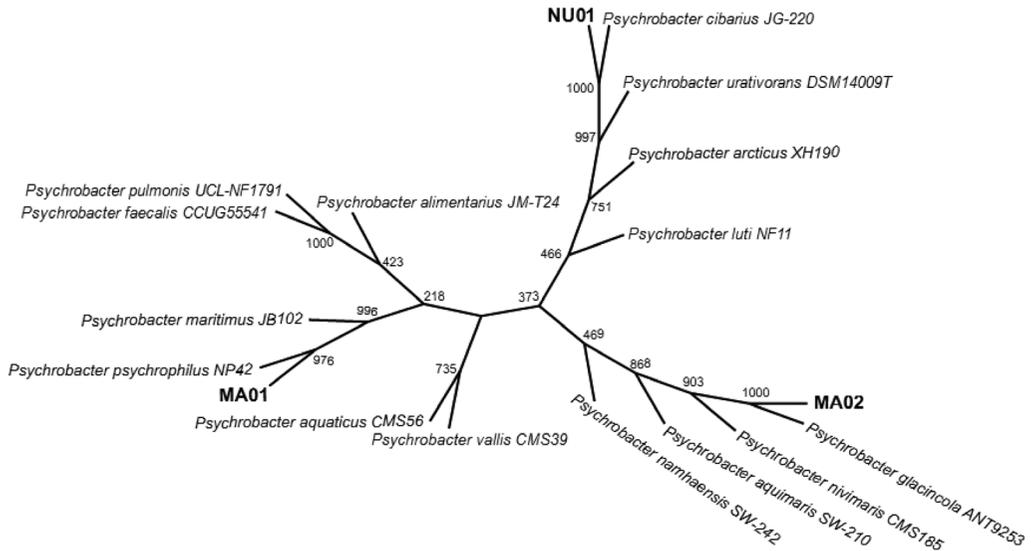


図2 分離細菌と近縁細菌の系統樹
 図中の数値はBootstrap値を示す。

P. cibarius JG-220はチョッカル（朝鮮塩辛）から分離され¹¹⁾、最適生育温度は25-30℃で4℃の低温でも生育可能なことから耐冷菌の一種であると考えられる。一方、*P. psychrophilus* NP42および*P. glacincola* ANT9253は、それぞれ北極圏の冷泉および南極の氷床から分離されたものである。各分離株とそれぞれの近縁株間の相同性はすべて100%を示したことから、NU01株は*P. cibarius*、MA01株は*P. psychrophilus*、MA02株は*P. glacincola*と推定されるが、確定にはDNA-DNA交雑法¹²⁾による実験的裏付けが必要である。今後は、これら3菌株についてヒモムシとの共生関係を調べるとともに、生理活性物質ならびに低温で高活性を示す有用酵素の探索を進める計画である。

3. Accession number

本研究では、南極海産ヒモムシより分離したNU01株、MA01株およびMA02株の16S rRNA遺伝子の全塩基配列を決定した。各配列はDDBJデータベースに登録済であるが、その際発行されたaccession numberはLC184493 (NU01株)、LC184277 (MA01株)、LC184492 (MA02株)である。

謝 辞

創価大学工学部の黒沢則夫教授（第54次南極地域観測隊員）より南極海産ヒモムシをご提供いただきました。心から感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、国立極地研究所の伊村智教授には有益なアドバイスとご協力を賜りました。深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

1. Piel, J. (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 26: 338-362.
2. Pittà, C. D., Biscontin, A., Albiero, A., Sales, G., Millino, C., Mazzotta, G. M., Bertolucci, C. and Costa, R. (2013) The antarctic krill *Euphausia superba* shows diurnal cycles of transcription under natural conditions. *PLoS One*, 8: e68652.
3. Morley, S. A., Berman, J., Barnes, D. K. A., Carbonell, C. D. J., Downey, R. V. and Peck, L. S. (2016) Extreme phenotypic plasticity in metabolic physiology of antarctic demosponges. *Front. Ecol. Evol.*, 3: article 157.
4. Gibson, R. (1995) Nemertean genera and species of the world: an annotated checklist of original names and description citations, synonyms, current taxonomic status, habitats and recorded zoogeographic distribution. *J. Nat. Hist.*, 29: 271-562.
5. Gibson, R. (1983) Antarctic nemerteans: the anatomy, distribution, and biology of *Parborlasia corrugatus* (McIntosh, 1876) (Heteronemertea, Lineidae). *Antarctic Research Series* 39: 289-316.
6. BLAST v 2.2.26: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-j.html>
7. Clustal W v2.1: <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>
8. Saitou, N. and Nei, N. (1987) A neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, 44: 406-425.
9. Che, S., Song, L., Song, W., Yang, M., Liu, G. and Lin, X. Complete genome sequence of antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. strain G. *Genome Announc.*, 1 (5): e00725-13.
10. Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D. and Dalgaard, P. (2007) *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 592-613.
11. Jung, S.-Y., Lee, M.-H., Oh, T.-K., Park, Y.-H. and Yoon, J.-H. (2005) *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 577-582.
12. De Ley, J., Cattoir, H. and Reynaerts, A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, 12: 133-142.

[2016. 9. 29 受理]

コントリビュータ：森本 金次郎 教授（薬学科）