

氏 名	かたのざかのりあき 片野坂徳章
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1062 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科水産学専攻
学位論文題目	海洋性低栄養細菌の16SrRNA遺伝子情報を用いた系統分類学的解析

(主査)

論文調査委員 教授 内田有恆 教授 中原紘之 教授 加藤暢夫

論 文 内 容 の 要 旨

外洋の従属栄養細菌を計数する際に、低濃度ペプトン培地 (ST10⁺培地; 0.5mg/L) を用いると、ZoBell2216E培地などの高濃度ペプトン培地を用いた場合に比べて2, 3桁高い値が得られる。このような低濃度有機物培地で増殖可能な従属栄養細菌は「低栄養細菌」と定義される。本研究の目的は外洋で常在している低栄養細菌種をその16SrRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき系統分類学的に位置づける事にある。内容は以下のとおりである。

第一章では、これまでの研究背景として、寒天平板培地や高濃度 (5 g/L) のペプトンを含むST培地では増殖できないが、ST10⁺培地では増殖可能な偏性低栄養細菌 (Obligate Oligotrophs : OO) が外洋で優勢に存在することを述べている。また、このようなOOが常法で分離された海洋細菌や、海水中の細菌粒子から分離・培養を経ずに直接抽出したゲノムDNAからPCR増幅した16SrRNA遺伝子 (16SrDNA) をクローニングして得た16SrDNAクローン (uncultured bacterial clones : UBC) のどちらとより近縁であるかを解析するための、16SrDNAの塩基配列情報に基づく系統分類の必要性について述べている。

第二章では、黒潮海域 (外洋) から分離したOO分離株の16SrDNA塩基配列を決定し、同じ海水試水から分離した通性低栄養細菌 (ST培地でも増殖可能; Facultative Oligotrophs : FO) 分離株、およびOOとして分離したが、継代培養を繰り返すうちにFO化した適応化通性低栄養細菌 (Adapted Facultative oligotrophs : AFO) 分離株のそれと系統学分類的に比較した結果について述べている。今回分離した3群の低栄養細菌分離株はすべてプロテオバクテリアγサブグループに属したが、そのなかでOO分離株はFO分離株と系統分類学的に明らかに異なること、またAFOはOOよりFOに近縁であることを明らかにしている。OOにみられる偏性低栄養性が、FOが一時的に陥った特殊な生理状態にすぎないという仮説を否定した。さらにOO分離株がデータベース中の既知の海洋細菌やUBCとも系統分類学的に異なる新奇な細菌であることも明らかにした。

第三章では、OO分離株の16SrDNAとそれらを分離した同一の海水中のUBCのそれを比較した結果、OOに近縁なUBCを得られなかったことを述べており、これは混成ゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行うと、偏った16SrDNAの増幅がなされるためではないかと考察している。ただし、異なる海域からはOO分離株の1つと近縁なUBCを分離できた事を述べており、このことからOO分離株の外洋での優占性を遺伝子レベルでも明らかにできたことと述べている。

第四章では、微量ではあっても添加したペプトンが、ある種の低栄養細菌の増殖を制限している可能性を考え、ST10⁺培地に加え、3種類 (iSW, C, およびCPN) の培地を新たに調製し、OOを計数し、分離したOO株を系統解析した結果を述べている。現場海水をろ過滅菌したのみで新たに有機物を添加しない培地 (iSW培地) やiSW培地に微量のグルコースを炭素源として添加した培地 (C培地) およびiSW培地にグルコース、無機態窒素、リンを添加した培地 (CPN培地) を用いた低栄養細菌の計数値は、ST10⁺培地を用いたそれと同等あるいはそれ以上に高く、それらの低栄養培地から分離したOOの中に、ST10⁺培地では増殖できないOO株を見いだした。ST10⁺培地を用いて分離したOOはすべてプロテオバクテリアγサ

βグループに属したが、iSW培地、C培地、およびCPN培地を用いて分離したOOは、γサブグループだけではなく、プロテオバクテリアβサブグループやFlexibacter/Cytophaga/Bacteroidesグループに属する系統学的に多様かつ新奇な細菌も存在していた。以上の結果からST10⁴培地に含まれる微量のペプトンが、γサブグループ以外のOOの増殖を阻害している可能性を考察している。さらにCPN培地から分離した1株のOO株が大西洋や太平洋の海水試水から得られているUBCの1つと近縁であることから、将来UBCの一部はOOとして分離される可能性を明らかにした。

第五章では、得られた結果を総括しており、系統分類学的に新奇な偏性低栄養細菌が外洋域全般に広く普遍的に分布していると結論している。

論文審査の結果の要旨

極めて有機物濃度が低い低栄養環境である外洋海中には、海水の有機物濃度より数万倍高い濃度のペプトンを含む高濃度ペプトン培地には増殖できず、それを海水程度に希釈した低濃度ペプトン培地でのみ増殖可能な偏性低栄養細菌 (Obligate Oligotrophs : OO) が多く存在する。本研究は、これらOOの16SrDNA遺伝子の塩基配列情報からその系統分類学的位置を検討したものである。本研究の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 黒潮海域の同一の海水試水からOOと、高濃度ペプトン培地でも低濃度ペプトン培地でも増殖可能な通性低栄養細菌 (Facultative Oligotrophs : FO), および最初はOOとして分離したが、継代培養を繰り返すうちにFO化した適応化通性低栄養細菌 (Adapted Facultative Oligotrophs : AFO) を分離し、それらの16SrDNA部分塩基配列を決定したうえで比較した。その結果OOはFOやAFOとは系統的に全く異なり、OOの偏性低栄養性が、何らかのストレスによる一時的な生理状態にすぎないのではなく、OO固有の特徴である可能性を示した。また大部分のOO分離株の16SrDNAがデータベース上の既知の細菌とは相同性が低いことから、これらOO分離株が固有の増殖特性を持つ系統分類学的に新奇な細菌であることを初めて証明した。

2. 上記のOOを分離した海水中の細菌粒子をろ過濃縮し、そこから直接抽出したゲノムDNAから16SrDNAをPCR増幅することにより、その海水中で優占している細菌16SrDNA (uncultured bacterial clones ; UBC) を得ようとした。それらとOO分離株を系統分類学的に解析したところ、OO分離株と近縁なUBCが存在し、OOが海水中で優占している可能性を遺伝子分布の情報から示した。しかしOOの16SrDNAがUBCとして回収できなかったこともあったことから、混成種のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行う際に、偏った増幅によりOO分離株の16SrDNAが組み込まれたUBCを得ることができなかった可能性があることを考察し、分離培養を経ないDNA直接解析法の限界も示した。

3. 現場海水をろ過滅菌した培地やそこにグルコースなどペプトン以外の有機物を添加した低栄養培地を新たに調製し、低栄養細菌の計数を行ったところ、低濃度ペプトン培地を用いた計数値と同等あるいはそれ以上高い計数値を得た。またそれら各低栄養培地から分離したOOには低濃度ペプトン培地では増殖できないものが多いことから、微量のペプトンによっても増殖が阻害されるOOが存在することを初めて明らかにした。

4. 16SrDNA塩基配列により、系統解析を行った結果、低濃度ペプトン培地から分離されるOOがすべてプロテオバクテリアγサブグループに属するのに対し、それ以外の低栄養培地からはプロテオバクテリアβサブグループやFlexibacter/Cytophaga/Bacteroidesグループに属する系統分類学的に新奇なOOを分離できる事を明らかにした。またその中には大西洋の海水試水から得られているUBCに近縁なOOを分離することにも成功した。

以上のように本論文は新しく改良した低栄養液体培地を用いることにより、系統分類学的に新奇かつ多様な偏性低栄養細菌を多数分離することに成功し、海洋分子微生物学、微生物生態学、および系統分類学に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年2月17日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。