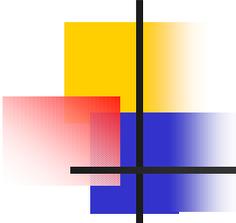


海洋深層水に由来する色素産生菌 のDNA塩基配列に基づく同定

物質・環境システム工学科

環境生物工学講座

No.1010099 矢田 修一



目的

室戸海洋深層水(水深320m、水温9-12)から
青紫色素産生菌を単離

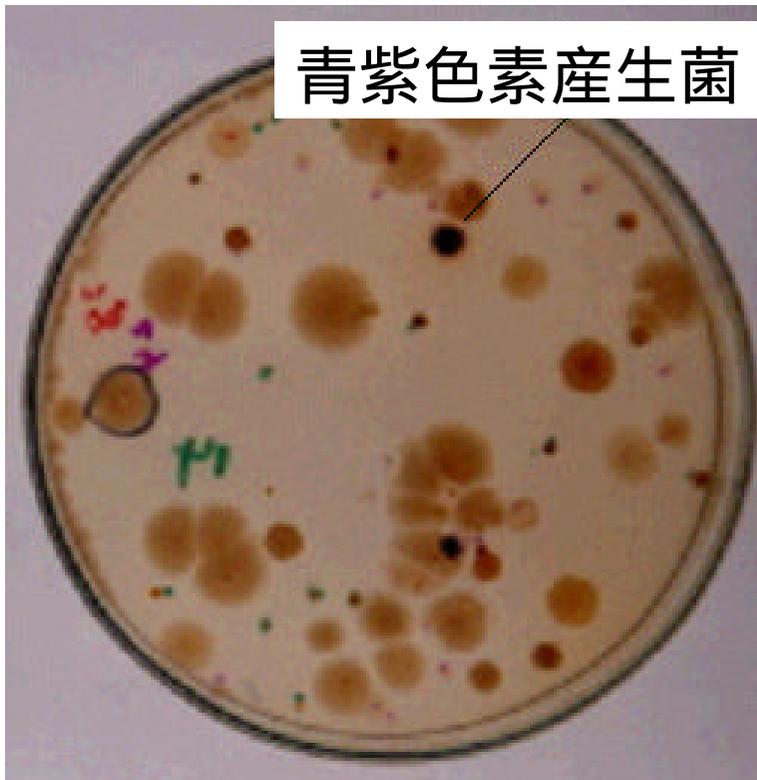


青紫色素の利用の検討

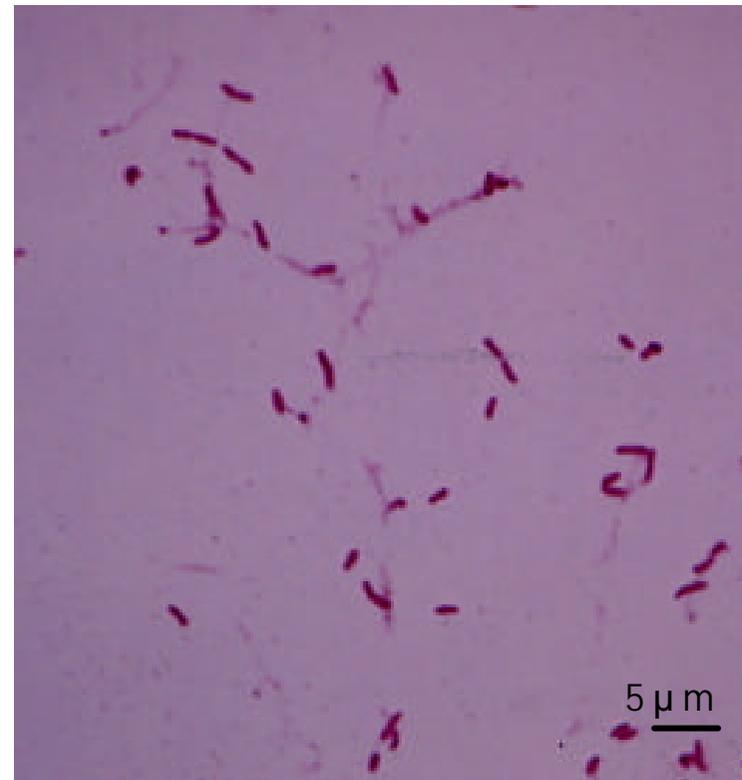
色素の物性・構造決定

色素産生菌の同定

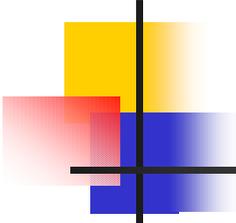
青紫色素産生菌の単離



単離前の寒天培地



色素産生菌の写真(×600)



DNA塩基配列に基づく同定

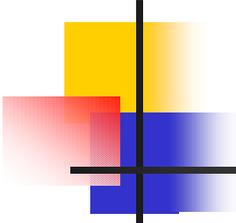
細菌の細胞膜を溶かしタンパク質などの不純物を
取り除きDNAを精製

(SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY に従った)

PCR法により16S rRNA遺伝子を増幅

DNAの塩基配列を決定

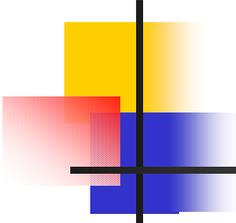
データベースのデータと比較



DNA塩基配列に基づく青紫色素 産生菌の系統分類

データバンクより近縁とされる菌種

520P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> , <i>P.luteoviolacea</i>
516P1	<i>P.denitrificans</i> , <i>P.aurantia</i> , <i>P.citreus</i>
612P1	<i>P.denitrificans</i> , <i>P.luteoviolacea</i>
714P1	<i>P.denitrificans</i> , <i>P.luteoviolacea</i> , <i>P.citreus</i> , <i>Shewanella</i> sp.
417P1	<i>P.rubra</i> , <i>P.aurantia</i> , <i>P.citreus</i> , <i>P.luteoviolacea</i>



比較対照とした細菌の説明

- *Pseudoalteromonas denitrificans*

生息地 : 北欧フィヨルド

特徴 : 硝酸塩還元能(denitrification)があることから*P.denitrificans*と命名された。赤色の色素prodigiosinを産生する。

- *Pseudoalteromonas luteoviolacea*

生息地 : 暖海、日本では鹿児島島の錦江湾から単離

特徴 : 青紫色素violaceinを産生することから*P.luteoviolacea*と命名された。

520P1 とのDNA塩基配列 の比較

520P1			
P.denitorificans	99%		
P.denitorificans (X82138)	99%	98%	
P.luteoviolacea (X82144)	94%	93%	94%

本研究 データバンク

520P1 と P.denitrificans のDNA塩基配列の比較

```
520P1      CGGCGGACGGGT GAGT AAT GCT TGGGAAT ATGCCTT TAGGT GGGGGACAACAGT TGGAAACGACTGCT
P.den      -----GACGGGT GAGT AAT GCT TGGGAAT ATGCCTT TAGGT GGGGGACAACAGT TGGAAACGACTGCT

AA T-- AOCGCAT GATGTCTACGGACCAAAGT GGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTA
AA GTC AOCGCAT ATGTCTACGGACCAAAGT GGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTA

GCTAGT TGGT TGAGGTAAAAGGCT CACCAAGGCAACGAT CCCTAGCTGGT TTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
GCTAGT TGGT TGAGGTAAAAGGCT CACCAAGGCAACGAT CCCTAGCTGGT TTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC

GAGACA OGGTCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGCACAATGGGCC CAGGCTGATGCAGCCATGCC
GAGACA OGGTCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGCACAATGGGCC CAGGCTGATGCAGCCATGCC

GCGTGTGTGAAGAAAGGCCCTAGGGT TGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGT TATAGT TTAATAGACTATAGCTG
GCGTGTGTGAAGAAAGGCCCTAGGGT TGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGT TATAGT TTAATAGACTATAGCTG

TGACGT TACTCGCAGAAAGCAGCAOCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGAGGGGTGCAAGCGT TAATCG
TGACGT TACTCGCAGAAAGCAGCAOCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGAGGGGTGCAAGCGT TAATCG

GAATTACTGGGCGTAAAAGCGTACGCAGGCGGT TGT TAAGCAGATGTGAAAGGCCCGGCTCAAC CTGGGAACTGCAT
GAATTACTGGGCGTAAAAGCGTACGCAGGCGGT TGT TAAGCAGATGTGAAAGGCCCGGCTCAAC CTGGGAACTGCAT

T TCGAACTGGC SACTAGAGTATGATAGAGGGTGGT AGAATTT CAGGT TGTAGGGTGA AATGCGTAGAGATCTGAAG
T TCGAACTGGC SACTAGAGTATGATAGAGGGTGGT AGAATTT CAGGT TGTAGGGTGA AATGCGTAGAGATCTGAAG

CATGTGGT TTAATTCGATGCAACCGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCAGAGAAGAGACTAGAGATAGACTTGT
CATGTGGT TTAATTCGATGCAACCGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATCCAGAGAAGAGACTAGAGATAGACTTGT

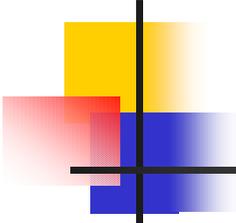
GCCTTCGGGA ACTCTGAGACAGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGT GTTGTGAGATGT TGGGT TAA GTCCGCAAC
GCCTTCGGGA ACTCTGAGACAGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGT GTTGTGAGATGT TGGGT TAA GTCCGCAAC

GAGCGCACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGT AATGCTGAGAACTCTAGGGAGACTGOCGGTGATAAA CCGGAGGA AG
GAGCGCACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGT AATGCTGAGAACTCTAGGGAGACTGOCGGTGATAAA CCGGAGGA AG

GTGGGGACGACGTCA GTCATCATGCGCOCTTA OGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGGTACAGAGTGCTGC
GTGGGGACGACGTCA GTCATCATGCGCOCTTA OGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGGTAC-----

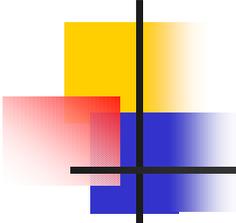
GAGCTCGCGAGGGTAGCGAATCACTTAAGCCTGT CGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
-----

TCGCTAGTAAATCGCGGATCAGAATGCOGCGGTGAAATACGTTCCOGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAC
-----
```



520P1 との生化学的性質の比較

	培養温度				硝酸塩還元	産生色素名(色)
	4	15	20	30		
520P1	-	+	+	-	-	violacein?(青紫)
P.denitrificans	+	+	+	-	+	prodigiosin(赤)
P.luteoviolacea	-	+	+	+	-	violacein(青紫)



結果

1. 520P1を含め5株はPseudoalteromonas属に分類される。
2. 520P1の性質
 - (1)DNA塩基配列に基づく同定ではP.denitrificansに近縁であった。
 - (2)P.denitrificansとは、産生色素、硝酸塩還元能や生育温度において違いがあった。
 - (3)P.luteoviolaceaが産生する色素violaceinに似た色素を産生することがわかった。
 - (4)P.luteoviolaceaとは、生育温度やDNA塩基配列などの違いがあった。

P.denitrificansに近縁であるが産生色素や硝酸塩還元能の違いから明らかに異なった種類の細菌であった。