

2002年度 修士論文

室戸海洋深層水中の細菌相の分析並びに
青紫色素violaceinを産生する新規細菌群の発見

Analysis of Bacteria in “Muroto Deep Seawater” and
the New Marine Bacteria Producing Violacein, a Violet Pigment.

高知工科大学大学院
工学研究科 基盤工学専攻
物質・環境システムコース
1055013
矢田 修一

目次

緒言	4
材料と方法	6
1. 室戸海洋深層水由来細菌の単離と保存	6
1-1 室戸海洋深層水の採取	6
1-2 深層水由来細菌の分離	
1-3 細菌の保存	6
2. 海洋深層水由来細菌の同定	6
2-1 単離株の培養	6
2-2 ゲノムDNAの回収及び精製	6
2-3 16S rRNA遺伝子の増幅	6
2-4 配列の決定	7
2-5 データベース検索と属の同定	7
3. 青紫色素産生菌の16S rRNA遺伝子全長の塩基配列の決定	7
3-1 青紫色素産生菌V-1グループの520P1株とV-2グループの710P1株	7
結果	8
1. 室戸海洋深層水中の細菌相	8
1-1 単離した細菌の特徴	8
1-1-1 <i>Vibrio</i> 属	8
1-1-2 <i>Pseudomonas</i> 属	9
1-1-3 <i>Shewanella</i> 属	9
1-1-4 <i>Marinobacter</i> 属	
1-1-5 <i>Erythrobacter</i> 属	
1-1-6 <i>Tenacibaculum</i> 属	10
1-1-7 <i>Bacillus</i> 属	10
1-1-8 <i>Dietzia</i> 属	10
1-1-9 <i>Halomonas</i> 属	10
1-1-10 <i>Hyphomicrobium</i> 属	10
1-1-11 <i>Idiomarina</i> 属	11
1-1-12 属の決定ができなかった株	11
2. violacein産生新規細菌群の発見	11
考察	13
謝辞	
参考文献	16
実験マニュアル	20

図表		21	
表1	深層水由来細菌の単離及び培養に用いた培地 (PPES) の組成		21
表2	冷凍保存液の組成	21	
図1	16S rRNA遺伝子上におけるプライマーの位置	22	
図2	材料と方法 (細菌の保存と同定法)	23	
表3	室戸海洋深層水中の細菌相	24	
図3	violacein産生株8株の比較	26	
図4	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> (X82144) との比較	28	
図5	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> (X82138) との比較		31
図6	violacein非産生株 (402W15, 520P1B) とVグループの比較	34	
図7	属間での相同性		

緒言

海洋深層水は、我国では1976年に海洋科学技術センター（JAMSTEC）によってその研究が始められた。「海洋深層水」とは、海洋学で言う深層水（水深1000m以深）とは異なり、産業への利用を目的とした、太陽光が届かない補償深度以深の海水（無光層）を指す。海洋深層水中では、植物プランクトンによる有機物の生産が行われず、細菌による有機物を無機物に分解する営みが行われているため、無機栄養塩類が豊富である。また、表層水より水温が低く、溶存有機物が少ないうえ、鉛直混合や人為的影響が少ないことから清浄であることが特徴である。このように海洋深層水は、低温、豊富な無機栄養塩類、清浄性を特徴とする、資源性の高い海水と注目されている（中島敏光，2002；豊田孝義 他，1998）。

高知県室戸岬の紀伊水道側の沖合は、水深が深く、水深500-1000mを流れる北太平洋中層流が大陸棚にぶつかるため、補償深度以深（室戸岬沖では約130m以深）の海水が局地的に湧昇している（深澤理郎，1998）。この湧昇海水の中に含まれる無機塩類を利用してプランクトンが増殖するため、それを餌とする魚が集まる好漁場となっている。このような条件を備える場所は、同時に海洋深層水の取水にとっても適地であるため、1989年、高知県とJAMSTECは、高知県室戸市三津に国内初の海洋深層水利用実験施設（KAUL）を完成させた。この施設は、後に高知県海洋深層水研究所に発展し、深層水の解明並びにその利用法の研究が進められている（中島俊光，2002；豊田孝義 他，1998；中島俊光 他，1998）。

海洋深層水の特徴を活かした多くの利用法が考えられており、例えば、表層水と深層水の水温差を利用した海洋温度差発電（OTEC）の研究や、冷水域の水産資源の培養と飼育などの調査が行われた。また、深層水やそれから逆浸透法によって得た脱塩水が飲料水、食品原料、化粧品原料、製塩原料として活用されるようになった。海洋深層水の一つの資源としては、そこに棲息すると予想される有用細菌がある。しかし、その探索は十分に行われていないのが現状である。そこで、本論文では、海洋深層水中の有用細菌の探索を目指し、まず始めに海洋深層水中の細菌相全体を把握するため、1999-2002年にかけて室戸海洋深層水から単離した67株の細菌について、その分類学的位置を明らかにしようとした。その結果、67株のうち58株は11属に分類されたが、残りの9株については属レベルの分類も困難な希少または未報告と考えられる細菌であった。

また、室戸海洋深層水中には、色素を産生する細菌が存在する。細菌が産生する色素はしばしば抗菌性などの生理活性を持つため、色素産生細菌のうち先に報告した青紫色素産生細菌（矢田修一，2001）について研究を行った。この青紫色素は、violaceinまたはそれに極めて近い物質であることが見いだされている（長崎恵子，2001）。

violaceinを産生する細菌としては、19世紀末より土壌及び水圏から単離される*Chromobacterium violaceum*が知られている（Margalith, P. Z., 1992; Duran, N., & Menck, C. F., 2001）。また*Chromobacterium*属として分類されていたが、その後、新たに*Janthinobacterium*属に再分類された*Janthinobacterium lividum*が知られている（John, G. H., et al., 1994）。violaceinを産生する海洋細菌では*Pseudoalteromonas luteoviolacea*があり、McCarthy, S. H.らによって鹿児島錦江湾よりその分離が報告されている

(McCarthy, S. H. *et al.*, 1985)。Laatsch.Hらによると *P. luteoviolacea* は、violaceinとdeoxyviolaceinを産生する (Laatsch, H., & Thomson, R. H., 1984)。violaceinは、グラム陽性細菌に対する抗菌作用や抗トリパノソーマ作用を示すことが知られている (Margalith, P. Z., 1992; Leon, L. L., *et al.*, 2001; Melo, P. S., *et al.*, 2000)。

今回、室戸海洋深層水中から8株の青紫色素産生菌を得、その16S rRNA遺伝子塩基配列の解析を行ったところ、*P. luteoviolacea*とは異なり、しかも単一種ではなく、それぞれ同一の塩基配列を持つ二群の細菌からなることが明らかとなった。

材料と方法

1 室戸海洋深層水由来細菌の単離と保存

1-1 室戸海洋深層水の採取

室戸海洋深層水は、高知県室戸市三津にある高知県海洋深層水研究所の取水設備を用い1999年から2002年まで採水した。海洋深層水研究所では、室戸岬沖約2km、水深320mより鉄線鎧装硬質ポリエチレン管（外径：176.2mm，内径：125mm 管長約2,650m）を用いポンプで一日920 tの深層水を組み上げている。採取したサンプルは、温度上昇を防ぐため保冷した状態で輸送し、同日中に細菌分離操作を行った。

1-2 深層水由来細菌の分離

深層水を、平板培地（PPES- 表1参照）に100 μ l塗布し、20 で培養した。または、メンブレンフィルター（ミリポアSC1J419H6）で深層水1mlを濾過した後、メンブレンを平板培地に密着させ20 で培養した。2日後からコロニーを目視で確認することができ、約6日後にコロニー数は定常となった。なお、コロニー数は150個/ml程度であった。平板培地に増殖したコロニーを白金耳で新たな平板培地に広げ3-4日間20 で培養した。そこで得られた単一のコロニーを研究に用いた。

1-3 細菌の保存

確立した細菌株は、液体培地（PPES- ）5mlを用い20 で3-4日間巡回培養した。この培養液を4000rpmで5分間遠沈し、上清を捨て、沈殿した細菌に冷凍保存液（表2参照）2.5mlを加え懸濁し、0.5mlずつCryotube（Nunc）に分注し、-80 にて冷凍保存した。

2 海洋深層水由来細菌の同定

海洋深層水由来細菌の同定は、得られた株のうち67株について行った。

2-1 単離株の培養

単離株からゲノムDNAを回収し精製するため、単離株を1-3で述べた方法で培養した。

2-2 ゲノムDNAの回収及び精製

培養液1mlを8000rpmで10分間遠心分離し培地を取り除いた。QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）を用い、残った菌体のペレットからゲノムDNAの抽出及び精製を行った。DNAは、50 μ lのAE緩衝液（10mM Tris·Cl， 0.5mM EDTA， pH 9.0）に溶解し、-30 で保存した。

2-3 16S rRNA遺伝子の増幅

ゲノムDNAを鋳型とする16S rRNA遺伝子の増幅は、16S rRNA遺伝子の両端付近の塩基配列に相当するユニバーサルプライマー（鈴木健一郎 他， 2001）を用いてPCR法によって行った。使用したプライマーは下記の通りである。

フォワードプライマー FW07 '5agagtttgatcctggctcag-3' (T_m値60)

リバースプライマー RV03-a5ggagggtgatccagccgca-3' (T_m値64)

PCR増幅には、*Taq* polymerase (TaKaRa)を用い、反応はTaKaRaの方法にしたがった。プライマー濃度は各0.5 μ Mとし、鋳型DNAは、2-2で回収したものを1 μ l用いた。反応サイクルは、変性を94 15秒、アニーリングを57 15秒、ポリメラーゼ反応を72 30秒とし、30サイクル行った。

反応後、PCR産物は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用い精製し50 μ lのEB緩衝液 (10mM Tris \cdot Cl, 1mM EDTA, pH 8.0) に溶解し、で保存した。

2-4 配列の決定

67株のシーケンス反応は、r2Lプライマー (5'-catcggttacggcgtggac-3') を用いて行った。反応は、Cy5.5 dye Terminator kit (Amersham Biosciences) を用いAmersham Biosciencesの方法に従った。プライマー濃度は、2 μ Mとし、鋳型DNAは、2-3でPCR反応後精製したものを0.5 μ l用いた。反応サイクルは、変性を94 30秒、アニーリングを57 30秒、ポリメラーゼ反応を72 90秒とし、30サイクル行った。反応後、エタノール沈殿によって反応産物を精製し、DNAシーケンサーGene Rapid (Amersham Biosciences) を用いて塩基配列を決定した。

2-5 データベース検索と属の同定

得られた16S rRNA遺伝子の塩基配列は、GenBankに登録されている塩基配列から検索した。検索は、塩基配列が局所的に高い類似性を持ったものを検索するBLAST法で行った。

3 青紫色素産生菌の16S rRNA遺伝子全長の塩基配列決定

3-1 青紫色素産生菌V-1グループの520P1株とV-2グループの710P1株

520P1株と710P1株の16S rRNA遺伝子の全長の塩基配列の決定には以下のプライマーを用いた (鈴木健一郎 他, 2001)。

rE1L	'-ctaggagtctggaccgtgt-3'	Tm値60
r1L	'-gtattaccgcggtctgtgg-3'	Tm値62
fE2L	'-ggcaggcctaacacatgca-3'	Tm値64
f2L	'-ccagcagccgcggtaatag-3'	Tm値62
r2L	'-catcggttacggcgtggac-3'	Tm値60
fE3L	'-ccaacgcgaagaaccttacctac-3'	Tm値56
r3L	'-tggcgctcggttgcgggact-3'	Tm値62
f3L	'-gcccgcgaacgagcgcaac-3'	Tm値64
929f	'-taactcaaaggaattgacgg-3'	Tm値56
r4L	'-agggcggtgtgtacaag-3'	Tm値58

ここで使用したプライマーの位置は図1に示す。

反応は、Cy5 Dye Terminator kit (Amersham Biosciences) を用いAmersham Biosciencesの方法に従った。プライマー濃度は、6 μ Mとし、鋳型DNAは、2-3でPCR反応後精製したものを3 μ l用いた。反応サイクルは、変性を94 30秒、アニーリングをprimerのTm値より3 低い温度で30秒、ポリメラーゼ反応を72 90秒とし、40サイクル行った。反応後、エタノール沈殿によって反応産物を精製し、6 μ lの添着用緩衝液を加えシーケンスサンプルとした。DNAシーケンサーは、Long-Read Tower (Amersham Biosciences) を用いて塩基配列を決定した。

結果

1 室戸海洋深層水中の細菌相

室戸海洋深層水中の細菌数を2000年1月から12月まで、材料と方法1-2で述べた平板培地の培養、及び細菌をアクリジンオレンジで染色した後、蛍光顕微鏡で観察する方法によって計数した。その結果、コロニー計数による細菌数は平均65個/ml海水であり、直接計数法による菌体数は平均 5.0×10^4 個/ml海水であった。コロニー計数による細菌数は、直接計数法により得られた細菌数の約0.1%であった。コロニー数が、直接計数法で得られる細菌数に比べて極めて少ないことは、海水のみでなく、淡水中、土壌など多くの自然界の細菌に見られる現象であるが、海洋では、嫌気性細菌、偏性高圧細菌(1atmでは増殖できない細菌)、低温細菌、低栄養条件のみで増殖する細菌、培養条件が不明な細菌などが多いためであると考えられている。

本研究では室戸海洋深層水から分離した67株それぞれについて16S rRNA遺伝子の約350塩基の配列を決定し、GenBankに登録されている16S rRNA遺伝子の塩基配列と比較した。考察で詳しく述べるが、350塩基の配列の相同性が95%以上の株については互いに同属と考えて良いと判断した。本研究で決定した株の塩基配列とGenBankに登録されている株の塩基配列との相同性が100%を示したものは、暫定的に同属同種であると判断し、文献よりその細菌の性質を紹介する。また、この相同性が97から99%の株は、同属の近縁な細菌であると判断した。これらの細菌種については、同様に文献よりその細菌の性質を紹介する。

この結果、室戸海洋深層水より分離した67株のうち58株は、*Vibrio*属24株、*Pseudoalteromonas*属11株、*Shewanella*属9株、*Marinobacter*属4株、*Erythrobacter*属3株、*Tenacibaculum*属2株、*Bacillus*属1株、*Dietzia*属1株、*Halomonas*属1株、*Hyphomicrobium*属1株、*Idiomarina*属1株の11属に分類することができた。残り9株については属を決定することはできなかった。その詳細は、「1-1-12 属の同定ができなかった株」で詳しく述べる(表3)。

1-1 単離した細菌の特徴

1-1-1 *Vibrio*属

室戸海洋深層水中より得られた*Vibrio*属は、24株であり最も多かった。暫定的に同属同種と判断した株は、*V. anguillarum*2株(402W1, 402W4)、*V. lentus*1株(315W4)、*V. splendidus*3株(315W13, 315W2, 315W3) \checkmark 、*V. tapetis*2株(31504, 402W14)の4種である。同属で近縁な細菌であると判断したものは、*V. anguillarum*近縁種2株(315W6, 417W1)、*V. fisher*近縁種1株(402W9)、*V. loge*近縁種1株(402W5)、*V. splendidus*近縁種1株(315W1)である。また、次のものは、今回決定した塩基配列の領域では、同属の2種以上の近縁な細菌が存在する株である。31506, 402W11の2株は、*V. anguillarum*と*V. lentus*に100%の相同性を持っていた。また、608W1Xは、*V. anguillarum*と*Vibrio* sp. PMV19の両方に99%の相同性を持ち、516W3株は、*V. splendidus*とunidentified bacterium 4cにそれぞれ98%の相同性と99%の相同性を持っていた。

*V. anguillarum*は、ノルウェー沖より単離されたことが報告されている(Wiik, R., et al., 1989) \checkmark 。 *V. lentus*は、地中海のカキから単離され、16S rRNA遺伝子塩基配列は*V. splendidus*に高い相同性を示すが、*Vibrio*属に対し静菌作用を持つ0129(2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridin)に耐性を持つ

ことや炭水化物を分解して産生する酸の違いから新種であることが報告されている (Macian, M. C., et al., 2004)。fisherは、黄色色素を産生し蛍光を発することが報告されている (John, G. H., et al., 1994)。logeiは、東カナダの大西洋のサケより単離された冷水由来の細菌であることが報告されている (Griffiths, S. G., & Saloni, K., 1995)。splendidusは、色素産生は行わないが蛍光を発すること、硝酸塩を還元することが報告されている (John, G. H., et al., 1994)。tapetiは、ブラウンリング病のマニラハマグリから単離されその病原菌であるかどうか研究が進められている (Castro, D., et al., 2002)。

1-1-2 *Pseudoalteromonas*属

室戸海洋深層水中より得られた*Pseudoalteromonas*属は、11株であった。*P. denitrificans*を最も近縁とする株は9株存在し、そのうち402W15, 402P1, 520P1, 417P1の4株は*denitrificans*に99%の相同性を示し、315P1, 315P4, 315P5, 516P1, 710P1の5株は97%の相同性を示した。*P. rubra* *P. piscicida*に99%の相同性を示す1020R株も得られた。

*P. denitrificans*は、ノルウェー西岸のフィヨルドより単離された冷水性の細菌である。また、赤色素prodigiosinを産生し、その学名の由来となった脱窒反応 (denitrification) を行うことが報告されている (Enger, ., et al., 1987)。しかしながら、室戸海洋深層水中より単離した*denitrificans*と99%の相同性を示す株は、脱窒作用を示さず、prodigiosinではなく青紫色素violaceinを産生する (長崎恵子, 2001; 矢田修一, 2001)。このことから*P. denitrificans*とは明らかに異なる細菌であった。

1-1-3 *Shewanella*属

室戸海洋深層水中より得られた*Shewanella*属は、9株であった。暫定的に同属同種と判断した株は、*S. fidelia* 1株 (51601)、*S. pealeana* 2株 (31502, 51604)、*S. woodyi* 3株 (31503, 612W1, 612W2) の4種であった。同属で近縁な細菌であると判断したものには、*S. fidelia*近縁種2株 (51602, 7100)、*S. violacea* 1株 (315B1) であった。

*S. fidelia*は、2001年に北海道大学より16S rRNA遺伝子の配列がGenBankに登録されたが、その詳細は、まだ報告されていない。*S. pealeana*は、ヤリイカ*Loligo peale*の卵包腺より単離され、耐冷性の細菌であることが報告されている (Michael, R. L., et al., 1999)。*violacea*は、琉球海溝5110mの海底堆積物より単離され、紫色色素を産生することが報告されている (Yuichi, N., et al., 1998)。今回単離した近縁種315B1株も黒紫色の色素を産生した。また、*S. violacea*は好圧菌としても研究が進められている (Kato, C., & Nogi, Y., 2005)。*woodyi*は、地中海西部のアルボラン海の水深198, 220, 370, 384, 370mの海水と水深435mに棲息していたヤリイカの墨から単離され、蛍光を発することが報告されている (John, C. M., et al., 1997)。以上、報告されているものに関しては、冷水を好む傾向がある。

1-1-4 *Marinobacter*属

室戸海洋深層水中より得られた*Marinobacter*属は、4株であった。*M. hydrocarbonoclasticus*と *M. aquaeol*の2種に100%の相同性を示した株が2株 (315W14, 315W16)、99%の相同性を示す315W5株が存在していた。残りの1株は*Marinobacter* sp. NCE312株と100%の相同性を示した。

*M. hydrocarbonoclasticus*は、製油所の近くの地中海の海水から単離され

た。また、0.08から3.5MのNaCl濃度で成育し、炭素とエネルギー源として様々な炭化水素を用いる石油分解菌であることが報告されている (Gauthier, M. J., et al., 1992)。*M. aquaeole*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単離された。また、0から3.5Mの間のNaCl濃度で生育し、最適塩濃度は0.85Mであった。n-hexadecane、pristane及び、いくつかの原油成分を分解すること、*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 (Nguyen, B. H., et al., 1999)。この2種は、いずれも油田の近くで採取されている石油分解菌であり幅広い塩濃度で棲息できる細菌であることが分かった。

1-1-5 *Erythrobacter*属

室戸海洋深層水中より得られた*Erythrobacter*属は、3株であった。*E. citoreus*と*Erythrobacter* sp. JP13.1の両方に100%の相同性を示す608Y1株と99%相同性があった608Y3, 608Y2の2株があった。

*E. citoreus*は、地中海 (カルピ、コルシカ湾) からの水深35mの海水から単離された。黄色素を産生し黄色コロニーを形成することが報告されている (Dietmar, V., et al., 1999)。608Y1, 608Y2, 608Y3の3株も黄色のコロニーを形成した。また、高知医科大学の研究により608Y2株に免疫細胞を活性化する作用があることが報告されている (渡部嘉哉 他, 2000)。

1-1-6 *Tenacibaculum*属

室戸海洋深層水中より得られた*Tenacibaculum*属は、2株であった。612G2, 710Y2の2株は*T. mesophilum*が同属で近縁な細菌であった。

*T. mesophilum*は、日本とパラオの海岸に上がった海綿および緑藻から分離された。黄色素を産生し黄色いコロニーを形成することが報告されている (Makoto, S., et al., 2001)。単離した710Y2株は、黄色のコロニーを形成したが、612G2株は緑色のコロニーを形成した。

1-1-7 *Bacillus*属

室戸海洋深層水より得られた*Bacillus*属は、*B. horikoshi*と*Bacillus* sp. KX6の両方に100%の相同性を示す402Y1の1株であった。*B. horikoshi*は、2000年に海洋技術センターより16S rRNA遺伝子の配列がGenBankに登録され、深海由来であり好アルカリであることが配列と共に報告されている。

1-1-8 *Dietzia*属

室戸海洋深層水中より得られた*Dietzia*属には、*D. mari*に近縁な608R3株が存在した。*D. mari*は、放線菌であり鉱物油やパラフィン (C-14からC-18) を分解する油分解菌であり、分解には、塩濃度が影響していることが報告されている (Zviagintseva, I. S., et al., 2001)。

1-1-9 *Halomonas*属

室戸海洋深層水中より得られた*Halomonas*属には、*H. vonusta* *H. meridiana*, *H. aquamarila*100%の相同性を示す710W2株が存在した。これらは、16S rRNA遺伝子277塩基配列での違いは見られず、単離株がどの種であるかは同定できなかった。

H. vonusta *H. aquamarila*は、ハワイの海水より単離され、*H. meridiana*は、南極大陸の塩湖より単離された。単離株に相同な3種の細菌は、3種の16S rRNA遺伝子の塩基配列はよく似ておりそれらの相同性は、97.6%であることが報告されている (David, R. A., et al., 2002)。

1-1-10 *Hyphomicrobium*属

室戸海洋深層水中より得られた*Hyphomicrobium*属は1株(520W1)であった。この株は、16S rRNA遺伝子371塩基での相同性より*Hyphomicrobium*属に分類され、98%の相同性を示す最も近縁な種は、伊豆・小笠原海溝水深7242mの海水から単離された*Hyphomicrobium* sp. Ddeep-1株である(Ocky, K. R., et al., 2001)。

1-1-11 *Idiomarina*属

室戸海洋深層水中より得られた*Idiomarina*属には、*I. Abyssalis*1株(402W3)が存在していた。これは、北西太平洋の水深4000から5000mの海水中から単離され、耐冷性であり2.6MのNaClで生育が可能であることが報告されている(Elena, P. L., et al., 2000)。

1-1-12 属の同定ができなかった株

属の同定ができなかった株には、次の2通りがあった。まず、GenBankに登録されている16S rRNA遺伝子と高い相同性があるが、属種名が命名されていない株である。315Y12株は、アメリカのSCRIPPS海洋研究所に保存されているSCRIPPS413株と100%の相同性をもつ同属同種であった。315Y11株はSCRIPPS413株と相同性が99%の近縁種であった。16S rRNA遺伝子の相同性より402W6株は、marine eubacterial sp. (Delong, E. F., et al., 1993) 北極海由来のASW-7W3, ASW-4B2と同属であると考えられる。402W12は、北極海由来のASW-7W3, ASW-4B2と南極海由来の2CM93と同属であると考えられる。402W8株は、グリーンランド由来の34H、日本海溝由来のNBTe (Yanagibayashi, M., et al., 1999)と同属であると考えられる。これらの単離株は、同種または近縁種と考えられる細菌が、GenBankに見出されるが、GenBank登録株の属種名が命名されていないため、現在属名は決定できていない。315Y1株と402W10株は、線虫(*Eubostrichus diana*)より分離された*Eubostrichus diana* epibacterium (Polz, M. F., et al., 1999)と95%の相同性を示すため同属であると推定されるが、近縁種が特殊な細菌であるため生理学的性質及び16S rRNA遺伝子の塩基配列全長を決定して分類する必要があると考える。

次に、GenBankに登録されている16S rRNA遺伝子のどれとも相同性が低い株である612R1株と315W19株の属の同定は行えなかった。315W19株が90%の相同性を示した熱水噴出口のチューブワーム(*Riftia pachyptila*)に共生している細菌(Li, L., et al., 1999)の様に特殊な環境に棲息している未報告の新種である可能性が高い。

2 violacein産生新規細菌群の発見

室戸海洋深層水から単離された細菌株のうち*Pseudoalteromonas*属に同定されたものは、11株あった。その中で、色素を産生するものは9株であり、赤色素prodigiosin産生株が1株、青紫色素violaceinを産生したものは、402P1、417P1、520P1、315P1、315P4、315P5、516P1、710P1の8株(Vグループ)であった。また、Vグループは、16S rRNA遺伝子287塩基配列の比較で、それぞれ同じ塩基配列を持つ3株(V-1グループ)と5株(V-2グループ)の2グループに分けることができた(図2)。このことから、violacein産生細菌群は少なくとも2種類存在していることが分かった。

violaceinを産生する*Pseudoalteromonas*属の海洋細菌として既に*P. luteoviolacea*が報告されている(Laatsch, H., & Thomson, R. H., 1984; McCarthy, S. H., et al., 1985)。そこで、V-1グループ520P1株とV-2グループ

プ710P1株の16S rRNA遺伝子のほぼ全域である1486塩基の配列を決定し、そのうち1353塩基について、*P. luteoviolacea* (GenBank登録番号X82144) の塩基配列と比較を行ったところ、V-1グループとV-2グループは共に94%の*P.*

*luteoviolacea*との相同性を示した(図3)。この結果からはVグループと*P. luteoviolacea*は同属であるが全く別種の細菌であることが判明した。

BLAST法で最も相同性の高い塩基配列を持つ細菌をGenBankより検索したところ、*P. denitrificans* (GenBank登録番号X82138) がVグループ8株の287塩基配列との相同性が高く近縁であると判明した。*P. denitrificans*は、北欧フィヨルドより単離された細菌で赤色素prodigiosinを産生することが報告されている(Enger, ., et al., 1987)。BLAST法を用いた比較により*denitrificans*は、V-1グループ(402P1、417P1、520P1)と99%の相同性を示し、V-2グループ(315P1、315P4、315P5、516P1、710P1)とは97%の相同性を示した。さらにVグループの1424塩基配列について、GenBankに登録されている*P. denitrificans* (X82138) の16S rRNA遺伝子塩基配列との比較を行った(図4)。その結果、V-1グループ520P1株とV-2グループ710P1株は、それぞれ1425塩基配列中16塩基、44塩基が異なっており、相同性は99%、97%であった。GenBankに登録された*P. denitrificans*の配列中の5個の塩基の種類が未同定であるため相同性はこれより高くなる可能性がある。よって、V-1グループ520P1株は、*P. denitrificans*と近縁であるが、産生色素が異なること、*P. denitrificans*の特徴である脱窒(denitrification)活性を示さない(矢田修一, 2001)ことから異なる種の細菌であると考えられる。V-2グループ710P1株は、GenBankに登録されている細菌では*P. denitrificans*との相同性(97%)が最も高いものであったので、これも未報告の新しい種と考えられる。

V-1グループ520P1株を継代していくとviolaceinを産生しない白色コロニーを生じた。色素産生コロニーと混在するまま継代を続けるとviolacein産生コロニーよりも白色コロニーが優勢となっていく。白色コロニーより単離した株は、継代してもviolaceinを合成することはなかった。そこで、violaceinを産生していない2株(520P1B'、520P1C')についてその16S rRNA遺伝子を元株である520P1株と比較した。比較の結果、16S rRNA遺伝子138塩基配列について520P1、520P1B、520P1Cの配列は完全に一致した(図5)。この結果から白色コロニーは、培養時の他の細菌の混入によるものではなく、violacein産生を行わなくなった520P1株の変異株であると分かった。また、海洋深層水からもV-1グループと同じ配列を持つにもかかわらずviolaceinを産生しない白色コロニーを形成する402W15株が単離された(図5)。このことから、実験室内の環境だけでなく、自然界でもviolaceinを産生しない株が存在することが分かった。

考察

本研究ではGenBankに登録されたデータベースとの相同性検索をBLAST法を用いて行った。約300塩基の16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく属の同定が妥当なものであるかどうかを検討するため、属分類に際し最も株数の多い*Vibrio*属とそれに続き株数の多かった*Pseudoalteromonas*属、*Shewanella*属の16S rRNA遺伝子のほぼ全長に近い1366塩基配列を比較し、同属であるための塩基配列の相同性を割り出した。さらに16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定するため用いたりバースプライマー（r2L）から5'末端側の360塩基配列の相同性を*Vibrio*属、*Pseudoalteromonas*属、*Shewanella*属を用いて比較することで、このプライマーを用いた塩基配列に基づく属の分類の可否について検討した。*Vibrio*属は、*V. anguillarum*, *V. lentus*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. splendidus*, *V. tapetis*の塩基配列をデータベースより得て用いた。また、同様に*Pseudoalteromonas*属は、*P. denitrificans*, *P. luteoviolacea*, *P. rubra*を、*Shewanella*属は、*S. fidelia*, *S. pealeana*, *S. woodyi*, *S. violacea*の配列を得て比較に用いた。

1366塩基配列の相同性は、*Vibrio*属間で93-97%であり比較的高い相同がみられた。また、*Pseudoalteromonas*属間で93-98%、*Shewanella*属間で94-97%あった。同様に*Vibrio*属6種と*Pseudoalteromonas*属3種の相同性をそれぞれ比較したところ相同性は86-88%、*Vibrio*属6種と*Shewanella*属4種のそれぞれの相同性は87-90%、*Pseudoalteromonas*属3種と*Shewanella*属4種の相同性は88-90%であった（図6）。

360塩基配列の相同性は、*Vibrio*属間で96-98%であり1366塩基の相同性よりやや高い相同性が見られた。また、*Pseudoalteromonas*属間で95-99%、*Shewanella*属間で97-98%あった。同様に*Vibrio*属6種と*Pseudoalteromonas*属3種の相同性をそれぞれ比較したところ相同性は86-91%、*Vibrio*属6種と*Shewanella*属4種のそれぞれの相同性は89-90%、*Pseudoalteromonas*属3種と*Shewanella*属4種の相同性は92-94%であった。

その結果、360塩基配列で比較したものは1366塩基配列で比較したもののより相同性の数値がやや高く出るものの、同属間の相同性と異属間の相同性でその値に明確な差が見られた。約300塩基の相同性比較で95%以上の相同性があれば同属と見なして良いと考えられる結果が得られた。このことからリバースプライマー（r2L）を用いた配列を比較することで属同定を行った本研究は、16S rRNA遺伝子全長の配列を用いた場合とほぼ同一の結果を与えるものと考えられる。

本研究により室戸海洋深層水から単離し、分類した株のうちその有用性が報告されているものには、次のものがあり、その利用が検討されている。

*Marinobacter*属の石油分解菌は、タンカー座礁により流出した石油の分解に利用できると考えられる。*Bacillus*属の好アルカリ性細菌は、産生する酵素（リパーゼ、プロテナーゼ）をアルカリ環境下である洗剤に配合することができることが期待できる。*Dietzia*属の油分解細菌は、鉱物油やパラフィンを分解することから工業排水の浄化処理に用いることが期待できる。

*Erythrobacter*属に分類できた1株は、高知医科大学の報告により免疫細胞を活性化する働きがあることから医学分野での利用が考えられる。

*Pseudoalteromonas*属に分類できた1株は、prodigiosinを産生し、この色素は

免疫抑制作用、アポトーシス誘導作用があることが報告されているため医学分野での利用が考えられる (Kawauchi, K., et al., 1997)。

また、本研究での有用細菌の探索は、コロニーの色で識別できる色素産生細菌に注目した。色素は、複雑な構造をとることが多く、生理活性や抗生作用を有していることが多い。ここで、重点的に種の同定を行ったもの以外にも、赤、黄、オレンジ、濃紫などの色素を産生するものが採取されたため、これらの色素の解析と種の同定を進めていくことも今後の課題である。

V-1グループ520P1株の継代培養時に現れたviolaceinを産生しない株とviolaceinを産生する株の違いはどこにあるのか解明することも求められる。violaceinを合成する酵素の遺伝子解析は、*Chromobacterium violaceum*のviolacein合成酵素群の遺伝子について行われており、少なくとも4種の酵素あるいはタンパク質の遺伝子が含まれていることが報告されている (GenBank登録番号AB032799)。しかし、*C. violaceum*のviolacein合成酵素遺伝子の配列をもとに作成したプライマーでは、violacein合成酵素遺伝子の1つであるvio Aと相同性を示す配列を520P1株のゲノムから増幅することはできたものの、残りの3つの遺伝子については増幅できなかったことが報告されている (工藤彰人, 2002; 中嶋敦志, 2002)。このことから、*C. violaceum*のviolacein合成酵素遺伝子と520P1株のviolacein合成酵素遺伝子の塩基配列もしくは、4つの遺伝子のゲノム上の配置が違ふことが考えられる。violacein産生株とviolacein非産生株の違いを明らかにするためには、520P1株におけるviolacein合成酵素遺伝子の所在とその構成の解明が必要と考えられる。violaceinのような色素は無光層に棲息する細菌には一見無用のように思える。実際520P1株から生じた白色コロニーを形成する変異株の増殖が色素を産生する元株より速いのは、色素合成と言う負担が無くなるためであろうと推測される。ところが、自然界では色素を産生しない株は比較的まれであると考えられる。今回は1株のみ色素非産生株であった。これはviolaceinがグラム陽性菌に対して抗菌作用を示し (Margalith, P, Z., et al., 1992)、そのため自然界でも他の細菌の繁殖を抑えることによって自らのコロニーを形成していくためではないかと推測される。

室戸海洋深層水中の細菌相は、*Vibrio*属35.8%、*Pseudoalteromonas*属16.4%、*Shewanella*属13.4%、*Marinobacter*属6.0%、*Erythrobacter*属4.5%、*Tenacibaculum*属3%、*Bacillus*属1.5%、*Dietzia*属1.5%、*Halomonas*属1.5%、*Hyphomicrobaculum*属1.5%、*Idiomarina*属1.5%、属同定ができなかった株13.4%であった。Ocky, et al.の報告によると北西太平洋水深1000-8000mの深海から採取した試料中の細菌相は*Vibrio*属44.2%、*Pseudoalteromonas*属29.3%、*Photobacterium*属26.5%であり (Ocky, K. R., et al., 2001)、本研究での結果とよく似ているが、*Photobacterium*属は今回の研究では確認できなかった。また、同じくOcky, et al.の報告では、北西太平洋水深0-200mの表層から採取した試料中の細菌相は、*Vibrio*属19.7%、*Pseudoalteromonas*属31.8%、*Halomonas*属25.1%、*Pseudomonas*属2.9%、*Photobacterium*属20.5%である。しかし、今回の研究では、*Pseudomonas*属、*Photobacterium*属は確認できず、*Halomonas*属は1株を確認したのみであった。この結果から、室戸海洋深層水の細菌相は、表層海水の細菌相と異なり、むしろ1000m以深の細菌相に近いことより、未報告の細菌や有用細菌の発見が今後も期待できる。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導と御助力を賜りました高知工科大学工学部榎本恵一教授を始め、大濱武教授、佐塚正樹講師に深く感謝いたします。また、研究を遂行するうえ多くの御尽力をいただいた高知工科大学工学部の教員の皆さまに深く感謝いたします。

また、本研究を行ううえでさまざまな面から支えて下さいました皆さまに深く感謝いたします。

参考文献

- Castro, D., et al., 2002 *Vibrio* isolated from the cultured Manila clam *Ruditapes philippinarum*: numerical taxonomy and antibacterial activities" *J. App. Microbiol.* 93, 438-447.
- David, R. A., et al., 2002 Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses *J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 241-249.
- DeLong, E. F., et al., 1996 Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages *J. Geom. Oceanogr.* 38(5), 924-934.
- Dietmar, V., et al., 1999 Polyphasic classification of 0.2 µm filterable bacteria from the western Mediterranean Sea *System. Appl. Microbiol.* 22, 635-646.
- Duran, N., & Menck, C. F., 2000 *Chromobacterium violaceum* a review of pharmacological and industrial perspectives *Crit Rev Microbiol.* 27(3), 201-222.
- Elena, P. L., et al., 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.
- Enger, ., et al., 1987 Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 416-421.
- Gauthier, M. J., et al., 1992 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(2), 568-576.
- Griffiths, S. G., & Saloniis, K., 1995 Characterization of bacteria associated with cold-water vibriosis of Atlantic salmon in eastern Canada" *J. Mar. Biotechnol.* 3, 188-192.
- John, C. M., et al., 1993 *Shewanella woodyi* sp. Nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Arabian Sea" *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(4), 1034-1039.
- John, G. H., et al., 1998 *Bergey's manual of determinative bacteriology* ninth edition Williams & Wikins USA.

Kawauchi, K., et al., 1997. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*” *Biochem. Biophys. Res. Commun* 237(3), 543-547.

Kato, C., & Nogi, Y., 2000. The relation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*” *Fems. Microbiol. Ecol.* 35(3), 223-230.

Laatsch, H., et al., 1984. Spectroscopic properties of Violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacine” *Chem. Soc. Perkin Trans.* , 1331-1339.

Leon, L. L., et al., 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*” *J. Antimicrob. Chemother.* 48(3), 449-450.

Li, L., et al., 1999. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths” *Biodivers. Conserv* 8, 659-677.

Macian, M.C., et al., 2001. *Vibrio lentus* sp. Nov., isolated from Mediterranean oysters” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt4), 1449-1456.

Makoto, S., et al., 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. Nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. Nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. Nov., and description of *Tenacibaculum mesopilum* sp. Nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. Nov.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1639-1652.

Margalith, P. Z., 1992. “Pigment Microbiology” Chapman & Hall. Tokyo. pp.111-118.

McCarthy, S. A., et al., 1985. Production and isolation of purple pigment by *Alteromonas luteoviolacea*” *Bull. Japan. Soc. Fish.* 51(3), 479-484.

Melo, P. S., et al., 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells” *In Vitro. Cell. Dev. Biol. An.* 36(8), 539-543.

Michael, R. L., et al., 1999. *Shewanella pealeana* sp. Nov., a member of the microbial community associated with the accessory gland of the squid *Loligo pealei*” *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1341-1351.

Nguyen, B. H., et al., 1999 *Aerobacter aquaeolei* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil producing well
*J. Syst. Bacteriol.*49, 367-375.

Ocky, K. R., et al., 2001 Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the Northwestern Pacific based on 16S ribosomal DNA analysis
*Mar. Biotechnol.*3, 454-462.

Polz, M. F., et al., 1999 Diversity and heterogeneity of epibiotic bacterial communities on the marine nematode *Albionellus dianae*
Appl. Environ. Microbiol. 65(9), 4271-4275.

Wiik, R., et al., 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., et al., 1999 Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292m during cultivation with decompression? *FEMS. Microbiol. Lett*170(1), 271-279.

Yuichi, N., et al., 1998 Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. Nov.
*Arch. Microbiol.*170, 331-338.

Zviagintseva, I. S., et al., 2001 Effect of media salinity on destruction of petroleum oils by nocardioform bacteria
Mikrobiologiya. 70(6), 759-764.

門田元, 多賀信夫 編 1985. “海洋微生物研究法” 学会出版センター 東京, pp.69-80.

工藤彰人, 2002. “海洋細菌が生み出す青紫色素「Ocean Violet」合成酵素遺伝子の探索-vioA様遺伝子の単離とその塩基配列の決定-” 高知工科大学卒業論文

鈴木健一郎, 平石明, 横田明 編 2001. “微生物の分類・同定実験法” シュプリンガー・フェアラーク東京, pp.266-270.

豊田孝義, 中島敏光, 黒山順二, 1998. “KAULの汲み上げ深層水中の栄養塩類” 海洋深層水98高知大会講演要旨集 pp.24-25.

中嶋敦志, 2002. “海洋細菌が生み出す青紫色素「Ocean Violet」合成酵素系の遺伝子構成-塩基配列決定に基づくVioA/VioB遺伝子の構成解明-” 高知工科大学卒業論文

中島敏光， 豊田孝義， 筒井浩之， 1998. “ 室戸岬海域および富山湾地域の海洋深層水の水質特性について ” 海洋深層水98高知大会講演要旨集 pp.26.

中島敏光 著 2002. “ -21世紀循環型資源-海洋深層水の利用 ” 緑書房 東京

長崎恵子， 2001. “ 海洋細菌が生み出す青紫色素「Ocean Violet」の分離・精製・構造解析 ” 高知工科大学卒業論文

深澤理郎， 1998. “ 北太平洋の中層循環 ” 海洋深層水98高知大会講演要旨集 pp.5-8.

矢田修一， 2001. “ 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 ” 高知工科大学卒業論文

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の解明 ” 平成11年度科学技術総合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長把握および機能解明 pp.147-156.

実験マニュアル

“TaKaRa Ex Taq TaKaRa

“Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit”
BioSciences pp.8-11.

“Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit”
BioSciences pp.9-12.

“QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit”
Handbook pp.52

“QIAquick Spin Handbook QIAGEN pp.18.

表 1

深層水由来細菌の単離及び培養に用いた培地 (PPES-) の組成

PPES-

Polypeptone	2.0	g
Proteose peptone No.3	1.0	g
Soytone	1.0	g
Yeast extract	1.0	g
$\text{FeCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
<hr/>		
seawater	1000	ml

1M NaOHを用いpHを7.8に調整する。
 (門田元, 多賀信夫 編, 1985)

表2

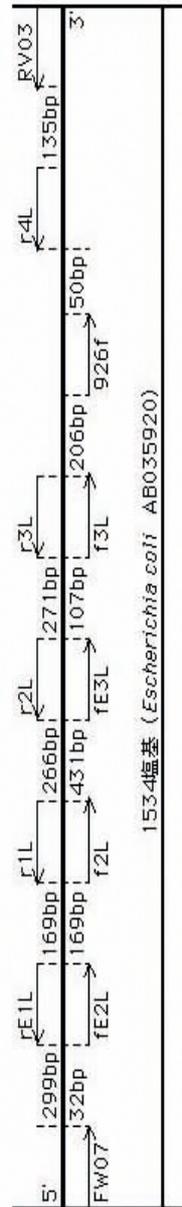
冷凍保存液の組成

	2.5	gpepton
glycero	50	ml
<hr/>		
	450	mlseawater

(鈴木健一郎、平石明、横田明 編, 2001)

図1

16S rRNA遺伝子上における使用プライマーの位置



プライマーFW07, RV03は、16SrRNA遺伝子のPCR増幅に用いた。
他のプライマーは、塩基配列を決定するのに用いた。

図2

材料と方法（細菌の保存と同定法）

海洋深層水をPPES- (表1) 平板培地に25, 50, 100 μ l塗布 (1-2)
3-4日間20 で培養

コロニーを単離

PPES- 液体培地に植菌
3-4日間20 で旋回培養

海洋深層水由来細菌の同定

細菌の保存 (1-3)

QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いた

遠心分離

細菌からゲノム DNA の回収および精製

(2-2)

保存液 (表2) で再懸濁

PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅 (2-3)

シーケンス反応 (2-4, 3)

シーケンス

データベース検索と属の同定 (2-5)

表3-1

室戸海洋深層水中の細菌相

番号	属名	株名	近縁種	相同塩基数 /検索塩基数	相同性 (%)	特徴
1	<i>Bacillus</i>	402Y1	<i>Bacillus horikoshii</i> , <i>Bacillus</i> sp. KX6	324/324	100	好アルカリ性
2	<i>Dietzia</i>	608R3	<i>Dietzia maris</i>	181/182	99	放線菌、油分解
3	<i>Erythrobacter</i>	608Y1	<i>Erythrobacter citreus</i> <i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1	404/404	100	
4	<i>Erythrobacter</i>	608Y3	<i>Erythrobacter citreus</i> <i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1	435/436	99	
5	<i>Erythrobacter</i>	608Y2	<i>Erythrobacter</i> sp. JP 13.1	459/461	99	
6	<i>Halomonas</i>	710W2	<i>Halomonas vonusta</i> <i>Halomonas Meridiana</i> <i>Halomonas aquamarina</i>	277/277	100	
7	<i>Hyphomicrobium</i>	520W1	<i>Hyphomicrobium</i> sp. Ddeep-1	366/371	98	深海性 (伊豆・小笠原海溝)
8	<i>Idiomarina</i>	402W3	<i>Idiomarina abyssalis</i>	279/279	100	深海性 (北西太平洋)
9	<i>Marinobacter</i>	315W5	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i>	354/355	99	石油分解菌
10	<i>Marinobacter</i>	315W14	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i>	351/351	100	石油分解菌
11	<i>Marinobacter</i>	315W16	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> <i>Marinobacter aquaeolei</i>	322/322	100	石油分解菌
12	<i>Marinobacter</i>	315W12	<i>Marinobacter</i> sp. NCE312	336/336	100	
13	<i>Pseudoalteromonas</i>	516W1	north sea bacterium 12-13 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AS-41	420/420 419/420	100 99	
14	<i>Pseudoalteromonas</i>	402W15	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	319/320	99	
15	<i>Pseudoalteromonas</i>	402P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	391/394	99	分離株は violacein 産生
16	<i>Pseudoalteromonas</i>	520P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	300/301	99	分離株は violacein 産生
17	<i>Pseudoalteromonas</i>	417P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	382/383	99	分離株は violacein 産生
18	<i>Pseudoalteromonas</i>	315P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	348/358	97	分離株は violacein 産生
19	<i>Pseudoalteromonas</i>	315P4	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	330/338	97	分離株は violacein 産生
20	<i>Pseudoalteromonas</i>	315P5	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	378/388	97	分離株は violacein 産生
21	<i>Pseudoalteromonas</i>	516P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	431/443	97	分離株は violacein 産生
22	<i>Pseudoalteromonas</i>	710P1	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	379/389	97	分離株は violacein 産生
23	<i>Pseudoalteromonas</i>	1020R	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> 他	341/343	99	分離株は prodigiosin 産生

表3-2

室戸海洋深層水中の細菌相

番号	属名	株名	近縁種	相同塩基数 /検索塩基数	相同性 (%)	特徴
24	<i>Tenacibaculum</i>	612G2	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	313/319	98	
25	<i>Tenacibaculum</i>	710Y2	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	402/410	98	
26	<i>Shewanella</i>	51601	<i>Shewanella fidelia</i>	309/309	100	
27	<i>Shewanella</i>	51602	<i>Shewanella fidelia</i>	285/287	99	
28	<i>Shewanella</i>	7100	<i>Shewanella fidelia</i>	367/368	99	
29	<i>Shewanella</i>	31502	<i>Shewanella pealeana</i>	218/218	100	
30	<i>Shewanella</i>	51604	<i>Shewanella pealeana</i>	295/295	100	
31	<i>Shewanella</i>	315B1	<i>Shewanella violacea</i>	398/405	98	深海性 (琉球海溝)
32	<i>Shewanella</i>	31503	<i>Shewanella woodyi</i>	314/314	100	
33	<i>Shewanella</i>	612W1	<i>Shewanella woodyi</i>	311/311	100	
34	<i>Shewanella</i>	612W2	<i>Shewanella woodyi</i>	306/306	100	
35	<i>Vibrio</i>	31505	<i>Vibrio</i> sp. PMV19	412/415	99	
36	<i>Vibrio</i>	608W1X	<i>Vibrio</i> sp. PMV19 <i>Vibrio anguillarum</i>	444/447 442/446	99 99	
37	<i>Vibrio</i>	315W6	<i>Vibrio anguillarum</i>	357/358	99	
38	<i>Vibrio</i>	417W1	<i>Vibrio anguillarum</i>	343/344	99	
39	<i>Vibrio</i>	402W1	<i>Vibrio anguillarum</i>	354/354	100	
40	<i>Vibrio</i>	402W4	<i>Vibrio anguillarum</i>	319/319	100	
41	<i>Vibrio</i>	31506	<i>Vibrio lentus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	415/415	100	
42	<i>Vibrio</i>	402W11	<i>Vibrio lentus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	251/251	100	
43	<i>Vibrio</i>	315W4	<i>Vibrio lentus</i>	304/304	100	
44	<i>Vibrio</i>	402W9	<i>Vibrio fisheri</i>	324/330	98	
45	<i>Vibrio</i>	402W5	<i>Vibrio togei</i>	296/297	99	
46	<i>Vibrio</i>	516W3	unidentified bacterium 4c <i>Vibrio splendidus</i>	383/386 382/386	99 98	
47	<i>Vibrio</i>	315W1	<i>Vibrio splendidus</i>	321/322	99	
48	<i>Vibrio</i>	315W13	<i>Vibrio splendidus</i>	329/329	100	
49	<i>Vibrio</i>	315W2	<i>Vibrio splendidus</i>	360/360	100	
50	<i>Vibrio</i>	315W3	<i>Vibrio splendidus</i>	329/329	100	

表3-3

室戸海洋深層水中の細菌相

	属名	株名	近縁種	相同塩基数 /検索塩基数	相同性 (%)	特徴
51	<i>Vibrio</i>	31504	<i>Vibrio tapetis</i>	347/347	100	
52	<i>Vibrio</i>	402W14	<i>Vibrio tapetis</i>	330/330	100	
53	<i>Vibrio</i>	31501	<i>Vibrio</i> sp. EN276	393/393	100	
54	<i>Vibrio</i>	402W2	<i>Vibrio</i> sp. EN276	349/349	100	
55	<i>Vibrio</i>	402W7	<i>Vibrio</i> sp. EN276	430/430	100	
56	<i>Vibrio</i>	315011	<i>Vibrio</i> sp. EN276	417/418	99	
57	<i>Vibrio</i>	402W13	<i>Vibrio</i> sp. RE35F/12, <i>Vibrio</i> sp. EN276	223/224	99	
58	<i>Vibrio</i>	315W22	<i>Vibrio</i> sp. 3d 7	383/385	99	
59	unidentified	315Y12	marine bacterium SCRIPPS 413	332/333	100	
60	unidentified	315Y11	marine bacterium SCRIPPS 413	328/329	99	
61	unidentified	402W6	marine eubacterial sp. Chukchi sea bacterium AWS-7W3 arctic sea ice bacterium AWS-4B2	272/277 270/277 270/277	98 97 97	AWS-7W3, AWS-4B2は北極海
62	unidentified	402W12	unclutured <i>Colwellia</i> sp. MERTS 2CM 93 Chukchi sea bacterium AWS-7W3 arctic sea ice bacterium AWS-4B2	242/251 242/251 241/251	96 96 96	2CM 93は南極海、AWS-7W3 とAWS-4B2は北極海
63	unidentified	402W8	<i>Colwellia</i> sp. 34H unidentified gamma protobacterium NBTc	355/368	96	34Hはグリーンランド、NBTc は日本海溝
64	unidentified	315Y1	<i>Eubostrichus diana</i> epibacterium	354/372	95	線虫 (<i>E. diana</i>) より分離
65	unidentified	402W10	<i>Eubostrichus diana</i> epibacterium	295/310	95	線虫 (<i>E. diana</i>) より分離
66	unidentified	612R1	<i>Cytophaga aprica</i>	283/310	91	
67	unidentified	315W19	unidentified gamma protobacterium BD1-7 <i>Riftia pachyptila</i> endosymbiont	308/340 265/283	90 93	熱水噴出口のハオリムシ (<i>R. pachyptila</i>) に共生

図3

violacein産生株8株の比較

```

- 402P1          CTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAGTGGCAAGGATTCGCGG
V1 | 417P1          CTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAGTGGCAAGGATTCGCGG
- 520P1          CTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAGTGGCAAGGATTCGCGG
- 315P1          TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
| 315P4          TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
V2 | 315P5          TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
| 516P1          TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
- 710P1          TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
                    *          *****

- 402P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
V1 | 417P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCCTAGGGGATAGGTT
- 520P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
- 315P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
| 315P4          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
V2 | 315P5          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATCCTAGGGGATAGGTT
| 516P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
- 710P1          TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGATACAGGGGATTT
                    *****

- 402P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
V1 | 417P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
- 520P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
- 315P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
| 315P4          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
V2 | 315P5          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
| 516P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
- 710P1          TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCATACGAGGTCAGCAGA
                    *****

- 402P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
V1 | 417P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
- 520P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
- 315P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
| 315P4          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
V2 | 315P5          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
| 516P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
- 710P1          CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATCAGGTCAGGATCTG
                    *****

- 402P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
V1 | 417P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
- 520P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
- 315P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
| 315P4          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
V2 | 315P5          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
| 516P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
- 710P1          AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACGTCGGTCAATACTG
                    *****

```

室戸海洋深層水より採取されたviolacein産生株の16S rRNA遺伝子287塩基配列を比較した。図中で赤く表記した塩基は、異なっていた配列を持った部位である。

図4

Pseudoalteromonas luteoviolacea (X82144) との比較

```

520P1_V-1group_      ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGTGATAGCTTGCT
710P1_V-2group_      ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCCAACGGAATAGCTTGCT
P. luteoviolacea    -----AACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCTCTCTTG
                                                    ***                               *****

520P1_V-1group_      TCTGCAGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATAGCCTTTAGGTGGGGGA
710P1_V-2group_      TTCGGAGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATAGCCTTTAGGTGGGGGA
P. luteoviolacea    AGAAGATGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACGTGCCGTAAGGAGGGG
                                                    *      *      *      *****

520P1_V-1group_      AGTAGGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTT
710P1_V-2group_      AGTAGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTT
P. luteoviolacea    CAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGT--C
                                                    ****      *****      *****      *****

520P1_V-1group_      GCTGCCGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTTGAGGTAAAGGCT
710P1_V-2group_      GCTGCCGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTTGAGGTAAAGGCT
P. luteoviolacea    CGG--CTCTCGCCTTATGATCGGCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGT-AAGGCTATGG
                                                    ***      ***      *****      *      ****      *****

520P1_V-1group_      CACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGAC
710P1_V-2group_      CACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGAC
P. luteoviolacea    TACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAG
                                                    *****      *****

520P1_V-1group_      ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTCGAGCGCAAGCCTG
710P1_V-2group_      ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTCGAGCGCAAGCCTG
P. luteoviolacea    ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTCGACAAATGGCGCAAGCG
                                                    *****

520P1_V-1group_      ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGATGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGA
710P1_V-2group_      ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGATGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAAGGA
P. luteoviolacea    ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCATAAG
                                                    *****      *****

520P1_V-1group_      GGAATGGTTTAATAGACTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCT
710P1_V-2group_      GGAAATGGTTTAATAGATTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGGCT
P. luteoviolacea    GGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGG
                                                    *****      *****

520P1_V-1group_      TCAAGTCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
710P1_V-2group_      TCAAGTCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
P. luteoviolacea    AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTG
                                                    ****      *****      *****

520P1_V-1group_      CGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAAGCGAGATGTGAAGGCTCAACCTGGG
710P1_V-2group_      CGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAAGCGAGATGTGAAGGCTCAACCTGGG
P. luteoviolacea    CGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCGGCTCAACTGG
                                                    *****

```

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

AACTGCATTTGAAAGTCTTAAAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAG
AACTGCATTTGAAAGTCTTAAAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAG
AACTGCATTTGAACTGGCAAAC TAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGT

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAAT
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAAT
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAAT

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

ACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGAGGAACTAGATACCCCGGTAGTCCAC
ACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGAGGAACTAGATACCCCGGTAGTCCAC
ACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCC

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

GCCGTAACGATGTCTACTAGGACTTCTCGGATGACTTTTCCAAACGTAACGC
GCCGTAACGATGTCTACTAGGACTTCTCGGATGACTTTTCCAAACGTAACGC
GCCGTAACGATGTCTACTAGGACTTCTCGGATGACTTTTCCAAACGTAACGC
***** ** ***** **

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

ATTAAGTAGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAATTC AATTGACGGGG
ATTAAGTAGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAATTC AATTGACGGGG
ATTAAGTAGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

GCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGGAAGAACCTTACCTACA
GCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGGAAGAACCTTACCTACA
GCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGGAAGAACCTTACCTACA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

CTTGACATCCAGGATAGAGATAGACTTGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGT
CTTGACATCCAGGATAGAGATAGTTTCTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGT
CTTGACATACAGAACTTACTAGAGATAGTTTGTGCCTTCGGGAACCTGATACAG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTAGTTGCAACGAGCGC
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTAGTTGCAACGAGCGC
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGC

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

AACCCCTATCCTTAGCTGGT AATGCTGAGA AACTCTAGGGAGACTGCCGGTGT
AACCCCTATCCTTAGCTGGT AATGCTGAGA AACTCTAGGGAGACTGCCGGTGT
AACCCCTATCCTTAGTGGCAGC-GATTCCGGTCCGGAACTCTAAGGAGACTGCTGGT

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. luteoviolacea

AAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTTAGGGCTACAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTTAGGGCTACAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTTAGGGCTACAC

520P1_V-1group_ ACGTGCTACAAT**TTC**CAGAGTGCTGCGAGCTCGCGAGGGTAAGCGAATCACTTAA
 710P1_V-2group_ ACGTGCTACAAT**TTC**CAGAGTGCTGCGAGCTCGCGAGGGTAAGCGAATCACTTAA
P. luteoviolacea ACGTGCTACAATGGCAGATACAGAGTGCTGCGAACTTGCGAGAGTAAGCGAA**TCACTT**

520P1_V-1group_ CCTG**AGG**TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
 710P1_V-2group_ CCTG**AGG**TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
P. luteoviolacea AGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT**TCGCTA**
 ** *****

520P1_V-1group_ AATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG**GGTACAT**ACCGCCCGTCA
 710P1_V-2group_ AATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG**GGTACAT**ACCGCCCGTCA
P. luteoviolacea AATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCC**GGC---**

520P1_V-1group_ CACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCT**AACTAG**GAGGACGGTCAC
 710P1_V-2group_ CACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCT**AACTAG**GAGGACGGTCAC
P. luteoviolacea -----

520P1_V-1group_ CACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG**GG-**
 710P1_V-2group_ CACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG**GGG**
P. luteoviolacea -----

violaceinを産生する*P. luteoviolacea*とVグループの16S rRNA遺伝子の1353塩基配列を比較した。図中で赤く表記してある塩基は、*P. luteoviolacea*と異なった塩基配列を持つ部位である。

図5

Pseudoalteromonas denitrificans (X82138) との比較

520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAA CCAG TGATAGCTTGCT ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC CAACCGGA ATAGCTTGCT -TTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAGAT AT CTTG *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	ATCTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGT ATCGGA ATATGCCTTTAGGTGGGGGA TCGGA CTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATGCCTTTAGGTGGGGGA ATCTGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCNTGGGAATATGCCTTTAGGT AGGG ** * * *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	CAACAGTTGGAAACGACTGCTAATAG CTGCT TACGGACCAAAGTGGGGACCTT CAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCT CGGGA TGGGGACCTT CAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGTGG CTG ACCC *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	CGGGCCTCACGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTA CGGTC AGGTAAAGGCT CGGGCCTCACGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTA CGGTC AGGTAAAGGCT CGGGCCTCACGCCTAAAGATTAGCCCAAGTGGGATTA GCTAG TTGGT - GAGG CT AAAGG *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	CACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTT GAGAGG TGATCAGCTGGA ACTG AGAC CAC CAAGG CAACGATCCCTAGCTGGTTT GAGAGG TGATCAGCCACTGGA ACTG AGAC CACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTTT GAGAGG TGATCAGCCACTGGA ACTG AGAC *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT ATTCG CGCGCAAGCCTG ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT ATTCG CGCGCAAGCCTG ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT ATTCG CACAATGGCG CA AGCC *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	ATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGG ATGTA ATTTCAGCGAGGA ATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGG ATGTA ATTTCAG TA AGGA ATGCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTA AAAG CACTTT CA CGAG *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	GGAAAGGTTATAGTTTAATAGACTATAGCTGTGACGTT ACGTC GGAAGCACC GG CT GG AAAG GTTTAATAGAT TC AGCTGTGACGTTACT TAC AGAAGAAGCACC GG CT GGAAAGGTTATAGTTTAATAGACTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAG CA CCGG *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	-TT AT TGCCAGCAGCCCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG -TT AT TGCCAGCAGCCCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG AACCTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGA AT ACTACT *** *****
520P1_V-1group_ 710P1_V-2group_ <i>P. denitrificans</i>	GCGTAAAGCGTACGCAGCGGTTTGTAAAGCGAGATG TCGGA GGCTCAACCTGG GCGTAAAGCGTACGCAGCGGTTTGTAAAGCGAGATG TCGGA GGCTCAACCTGG GCGTAAAGCGTACGCAGCGGTTTGTAAAGCGAGATG TCGGA GGCTCAACCTGG *****

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

GAACTGCATTTTCTGAAGTGGCAGACTAGAGTATGATAGAGGATTTTCAGGTGTA
GAACTGCATTTTCTGAAGTGGCAGACTAGAGTATGATAGAGGATTTTCAGGTGTA
GAACTGCATTTTCTGAAGTGGCAGACTAGAGTATGATAGAGGATTTTCAGGTGTA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCAGGACCTGGGTCAA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

TACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTCGGTAGTCCA
TACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTCGGTAGTCCA
TACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGGATTCGGTAGTCCA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

CGCCGTAAACGATGTCTACTAGGAGCTGATCGGATGACTTTTCCAAACGTAACG
CGCCGTAAACGATGTCTACTAGGAGCTGATCGGATGACTTTTCCAAACGTAACG
CGCCGTAAACGATGTCTACTAGGAGCTGATCGGATGACTTTTCCAAACGTAACG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

CATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTGAATTGACGGG
CATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTGAATTGACGGG
CATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTGAATTGACGGG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

GGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAGGACCTTACCTAC
GGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAGGACCTTACCTAC
GGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAGGACCTTACCTAC

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

ACTTGACATCCAGAGAAGAGACTAGAGATAGACTTGTGGGACTCTGAGACAGG
ACTTGACATCCAGAGAAGAGACTAGAGATAGACTTGTGGGACTCTGAGACAGG
ACTTGACATCCAGAGAAGAGACTAGAGATAGACTTGTGGGACTCTGAGACAGG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTAGGTTCCGCAACGAGCG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTAGGTTCCGCAACGAGCG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGATGTTAGGTTCCGCAACGAGCG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

CAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTACTGCCGTGA
CAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTACTGCCGTGA
CAACCCCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTACTGCCGTGA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTGTAGGGCTACA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTGTAGGGCTACA
TAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGACCTGTAGGGCTACA

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

CACGTGCTACAATGGCAGGTACAGAGTGGTTCCGAGAGGTAAGCGAATCACTTA
CACGTGCTACAATGGCAGGTACAGAGTGGTTCCGAGAGGTAAGCGAATCACTTA
CACGTGCTACAATGGCAGGTACAGAGTCTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACT

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

~~A~~GGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAG
~~A~~GGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAG
AAGCCTATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCT

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

TAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCTGGGACACCCGCCGTC
TAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCTGGGACACCCGCCGTC
TAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTACACACTGCCCG

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

ACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCTAACTAGAGGACGGTCA
ACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCTAACTAGAGGACGGTCA
ACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCTAACTAGCTG-----

520P1_V-1group_
710P1_V-2group_
P. denitrificans

CCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG--
CCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGGG

BLAST法により最も近縁とされた*Pseudoalteromonas denitrificans*と violacein産生株の16S rRNA遺伝子の1425塩基配列を比較した。赤で示した塩基は、*P. denitrificans*と塩基配列が異なっていた部位である。*P. denitrificans*の "N" で示された塩基は、その種類が決定されていないものである。

図6

violacein非産生株 (402W15, 520P1B) とVグループの塩基配列の比較

```

520P1_V-1group1_      CTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGTTACTCAGCAGCCGCGG
710P1_V-2group_      TTGCAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCGTCTACTCAGCAGCCGCGG
402W15                 CTATAGCTGTGACGTTACTCGCAGAATCAGGACAGGACAGGCTG
520P1'B               -----

520P1_V-1group1_      TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGAGGCTACGCAGGCGGTT
710P1_V-2group_      TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGAGGCTACGCAGGCGGTT
402W15                 TAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCAGGCTACTGAGGCTGTT
520P1'B               -----AAGGCTACGGGCTAGTT
                        *****

520P1_V-1group1_      TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACTCGAACTGCGAGA
710P1_V-2group_      TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACTCGAACTGCGAGA
402W15                 TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACTCGAGCA
520P1'B               TGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGACTCGAGCA
                        *****

520P1_V-1group1_      CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGGCTGAGAGATCTG
710P1_V-2group_      CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGGCTGAGAGATCTG
402W15                 CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGGCTGAGAGATCTG
520P1'B               CTAGAGTATGATAGAGGGTGGTAGAATTTAGGTGTAGGCTGAGAGATCTG
                        *****

520P1_V-1group1_      AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACTCTGATGTACGAAAGC
710P1_V-2group_      AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACTCTGATGTACGAAAGC
402W15                 AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACTCTGATGTACGAAAGC
520P1'B               AAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACTCTGATGTACGAAAGC
                        *****

520P1_V-1group1_      -----
710P1_V-2group_      -----
402W15                 -----
520P1'B               GTGGGAGCAAACGGGA

```

室戸海洋深層水中より分離したviolacein非産生株402W15及び、violacein産生株520P1の継代培養中に現れたviolacein非産生株520P1'Bの16S rRNA遺伝子塩基配列をV-1グループ、V-2グループのものと比較した。

図7

属間での相同性 (%)

		13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
1	1366bp	88	88	87	87	87	87	86	95	96	93	93	97
	360bp	90	90	90	89	89	90	87	96	98	98	97	97
2	1366bp	89	89	88	88	88	88	87	96	97	94	95	
	360bp	90	90	89	90	90	90	86	96	97	98	98	
3	1366bp	89	89	88	89	89	89	88	94	95	95		
	360bp	90	90	89	90	90	91	87	96	97	98		
4	1366bp	89	88	88	88	88	88	88	94	93			
	360bp	90	90	89	90	89	89	87	96	97			
5	1366bp	88	88	87	88	88	88	87	96				
	360bp	90	90	89	89	88	89	87	97				
6	1366bp	90	90	89	89	88	88	88					
	360bp	90	90	90	90	89	89	88					
7	1366bp	90	90	89	90	93	93						
	360bp	93	93	93	94	95	95						
8	1366bp	89	89	88	89	98							
	360bp	93	93	92	93	99							
9	1366bp	88	88	88	89								
	360bp	93	93	92	93								
10	1366bp	96	95	97									
	360bp	97	97	97									
11	1366bp	96	94										
	360bp	98	97										
12	1366bp	95											
	360bp	98											

1	<i>Vibrio anguillarum</i> (X71821)
2	<i>Vibrio lentus</i> (AJ278881)
3	<i>Vibrio fischeri</i> (X74702)
4	<i>Vibrio logei</i> (AF323992)
5	<i>Vibrio splendidus</i> (AB038030)
6	<i>Vibrio tapetis</i> (Y08430)
7	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>
8	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>
9	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> (X82)
10	<i>Shewanella fidelia</i> (AF420313)
11	<i>Shewanella pealeana</i> (AF01133)
12	<i>Shewanella woodyi</i> (AF003549)
13	<i>Shewanella violacea</i> (D21225)

本研究で最も多く得られた*Vibrio*属の6種と、それについて株数の多かった*Pseudoalteromonas*属3種、*Shewanella*属4種の16S rRNA遺伝子の配列をデータベースより得て、その相同性を表にまとめた。16S rRNA遺伝子ほぼ全域である1366塩基配列の相同性は上段黒文字で記した。また、シーケンスに用いたプライマー（r2L）を含む5'末端側へ360塩基配列の相同性は下段赤文字で記した。

黄色のセルは*Vibrio*属内の相同性、紫色のセルは*Pseudoalteromonas*属内の相同性、オレンジ色のセルは*Shewanella*属内の相同性を示す。水色のセルは異属間の相同性を示す。