

カイコウオオソコエビより分離した細菌

小林 英城^{*1} 長濱 統彦^{*1}

1999年5月18日の「かいこう」によるマリアナ海溝チャレンジャー海淵の潜航調査(dive No.72)において採取した「シンカイオオソコエビ」の内臓より細菌の分離を試みた。細菌の分離方法は好氣的培養法と嫌氣的培養法を用いた。その結果、好氣的培養法においては細菌の生育が認められず、嫌氣的培養法において細菌の生育が認められた。光学顕微鏡による観察より、形態的に2-3種の細菌が存在していると推察された。その中の1種は微好気条件においても生育が認められた。この菌株を単離した後、その16S rDNA 配列を決定し、同定を行った。その結果、この菌株は海洋環境に幅広く分布している *Vibrio* 属の細菌と判明した。

キーワード : *Vibrio* 属細菌, チャレンジャー海淵, シンカイオオソコエビ

The bacterium isolated from *Hirondellea gigas* (Shinkaioosokoebi)

Hideki KOBAYASHI^{*2} Takahiko NAGAHAMA^{*2}

We tried to isolate microorganisms from *Hirondellea gigas* which was caught from the Challenger Deep of the Mariana Trench (dive No.72) using unmanned submersible "KAIKO". Two isolation methods of aerobic and anaerobic media were used. The growth of the microorganisms was found in not aerobic medium but anaerobic medium. 2-3 types of microorganisms were found in the culture by the microscopic observation. One of these strains were grown in a slightly aerobic medium. We isolated this strain and determined its 16S rDNA sequence. As the result, this strain was *Vibrio* sp. which is widely distributed in the marine environment.

Keywords : *Vibrio* species, The Challenger Deep, *Hirondellea gigas*

* 1 海洋科学技術センター深海環境フロンティア

* 2 Frontier Research Program for Deep-sea Extremophiles, Japan Marine Science and Technology Center

1. はじめに

マリアナ海溝チャレンジャー海淵は深度10,000m以上の世界で最も深い場所である。我々は、これまでこの世界最深部の海底底土の微生物相について明らかにしてきた^{1), 2)}。また、その微生物の中から有用な酵素を生産する細菌を分離し、その性質を報告した³⁾。ここに生育する微生物は種々の特殊環境微生物も含まれていた²⁾。既にこの海底には、多くの海鼠が生育していることが観察され、またベイトトラップにより多くのヨコエビが捕獲された。これらの底性生物の体内においても特殊環境微生物が存在していると考えられる。既に、マリアナ海溝のヨコエビから絶対好圧性細菌の分離が報告されている⁴⁾。海底に棲息していると思われる生物は海底の微生物と密接に関係していると考えられる。そこで、今回ヨコエビの内臓から微生物を分離を試みた。

2. 潜航およびサンプリング

1999年5月18日の「かいこう」によるマリアナ海溝チャレンジャー海淵の潜航調査(diveNo.72)においてベイトトラップを用いて採取したヨコエビ(シンカイオオソコエビ)を採取した。採取地点は北緯11° 19.9315', 東経142° 12' 42.42" 深度10897mである。採取したヨコエビは直ちに滅菌海水を用いて洗浄し、液体窒素にて凍結保存した。

3. 微生物の分離

凍結保存したヨコエビを解凍後、解体して内臓を取り出した。体長約3cmの個体を用いたが、内臓は体積にて約300-400μl程度であった(図1)。この内臓を用いて、微生物の分離を試みた。分離は、好気的条件下と嫌気的条件下にて

行った。好気的条件下の培地は、海洋性細菌分離用のMarinebroth 2216および、陸上にて頻繁に用いられる肉汁寒天培地、大腸菌などの培養に用いられるLB培地を用いた。一方、嫌気的条件下にて用いた培地は窒素源および炭素源としてYeast Extract, Vitamine類, 各種微量元素を加え、NaCl濃度を3%に調製した改変DSM334液体培地を用いた。なお、気相は窒素、または水素・二酸化炭素混合ガス(1:4)を用いた。

個々の培地にヨコエビの内臓を塗布または添加し、4℃または25℃にて静置培養を行った。その結果、好気的に培養を行った培地には1-2週間培養を行ってもコロニー形成は認められなかった。一方、嫌気的に培養した場合、4℃にて培養した培養液(気相は窒素)から顕微鏡観察において形態的に異なる2-3種類の細菌が観察された。そこで、この培養液より細菌の単離を試みた。嫌気的条件下においてコロニー形成をさせることは困難であったが、微好気条件にてコロニー形成をする菌株一株を分離することに成功した。また、この菌株をAmp1株と命名した。

4. Amp1株の性質

Amp1株は4-25℃まで生育が認められ、運動性のある桿菌である。好気的および嫌気的条件下において生育し、嫌気的条件下においては菌が伸張しフィラメント状になる。

5. Amp1株の16S rDNA解析

分離した菌株を同定するため、16S rDNA解析を行った。16S rDNAはコロニーPCR法を用いて増幅し、DNA sequencer model 4000Lを用いて、そのDNA配列を決定した。その配列を用いて、Blastによるホモロジー検索、および



図1 シンカイオオソコエビの解体
矢印は微生物分離に用いた内臓部分を示す。

Fig. 1 Dissection of amphipoda
Arrow indicates the internal organ used for the isolation of microorganisms

Clustalxを用いた系統樹解析を行った。図2に示のように、Amp1株はVibrio属の細菌であることがわかった。また、最も高い相同性を示した*V. campbelli* ATCC 25920Tにおいても97%と同一種とするには低い値であった。したがって、

Amp1株は新種の細菌の可能性もあると考えられるが、近縁種とのDNA-DNA Hybridization等のさらなる解析が必要であろう。

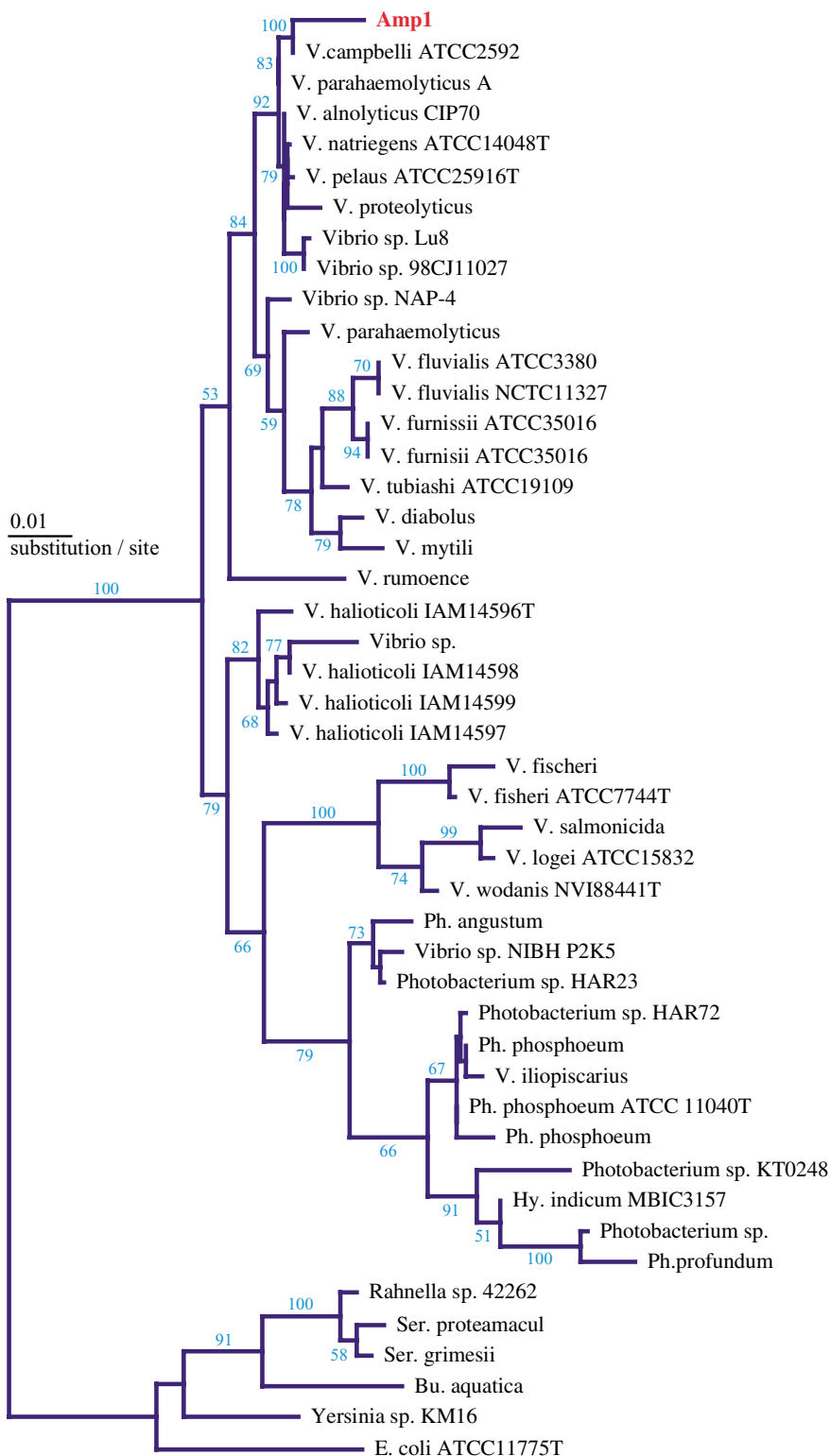


図2 Amp1 株の16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹(最尤樹)

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rDNA sequences of strain Amp1 and the related strains by using the maximum likelihood method.

6. 考察および今後の解析

今回分離したAmp^r株は*Vibrio*属の細菌であった。すでに、この属の細菌がマリアナ海溝チャレンジャー海淵の底土より分離されていることが報告されている²⁾。しかしながら、*Vibrio*属の細菌は海洋環境に幅広く分離しているため、本当に「シンカイオオソコエビ」の内臓に常駐している細菌なのかは不明である。さらに、今回採取した「シンカイオオソコエビ」はベイトトラップを用いているため、たとえ内臓に存在していたとしても、寄せ餌として用いた魚(サバ)に付着していた細菌の可能性もある。したがって、このような方法で細菌が分離されても、その由来については推定できない。また、たとえ新種の細菌であったとしても、まだ海洋環境の微生物については知見が乏しく、「新種」ということで何かを論ずることはできない。

海洋生物の内臓から微生物の分離を試みる場合、潜水調査船にて直接捕獲するか無菌的な寄せ餌を用いたベイトトラップが望ましいと考える。さらに、海底にて生物を捕獲し、それを無菌的に船上まで引き上げることが理想である。貝類は捕獲も容易であるが、棲息領域が熱水鉱床や冷水噴出口周辺に限られており、マリアナ海溝のような超深海領域の場合あまり期待できない。

深海環境の微生物はそこに生育する生物と密接に関係していると考えられる。特に深度が10,000mの超深海においては、そこに棲息する生物にとって微生物は有用な有機物の1つである。超深海環境の生物の腸内細菌群についてはあまり研究されておらず、有用細菌も分離される可能性もあり、今後注目していく予定である。

7. 謝 辞

本潜航において無人探査機「かいこう」システムを運行された「かいこう」チームの皆様、および研究母船「かいいい」の船乗員の皆様に大変お世話になりました。また、「シンカイオオソコエビ」の採取に関して同乗した深海研究部の皆様に多大なるご協力を頂きました。以上の方々に、ここで感謝を申し上げます。

引用文献

- 1) Kato C, Li L, Tamaoka J and Horikoshi K (1997) Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. *Extremophiles* 1:117-123.
- 2) Takami H, Inoue A, Fuji F and Horikoshi K (1997) Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana trench. *FEMS Microbiol Lett* 152: 279-285.
- 3) Kobayashi H, Yoshihiro T, Inoue A, Takami H and Koki Horikoshi. (1998) Purification and characterization of α -maltotetraohydrolase produced by Mariana isolate MS300. *Extremophiles* 2:401-407.
- 4) Yayanos A. A, A. S. Dietz, and R. V. Boxtel (1981) Obligately barophilic bacterium from the Mariana Trench. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5212-5215.

(原稿受理：2000年8月23日)