

海洋細菌 *Roseobacter* OCh-C1株の rrn インタージェニックスペーサーの構造

芝 恒男*・依藤 元*・保科禎吾*・前田俊道*・村上正忠*

Sequence analysis of the intergenic spacer existing between
16S rDNA and 23S rDNA of *Roseobacter* sp. OCh-C1

Tsuneo Shiba*, Hajime Yorifuji*, Teigo Hoshina*,
Toshimichi Maeda*, and Masatada Murakami*

Sequence analysis of the intergenic spacer, existing between 16S rDNA and 23S rDNA, was performed on *Roseobacter* sp. OCh-C1 which was isolated at Otsuchi Bay, Iwate, Japan. The intergenic spacer contained isoleucine tRNA and alanine tRNA like regions. Their structures were very similar to those of *Rhodobacter sphaeroides*. A non-coding region between the two rRNA genes was detected in *Roseobacter* sp. OCh-C1. The sequence in the downstream of 3' end of alanine tRNA region was very different between *Rhd. sphaeroides* and *Roseobacter* sp. OCh-C1.

緒言

rrn オペロンには一般に、rRNA 遺伝子が5'末端領域から16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA の順に配列し、各rRNA 遺伝子間にはtRNA 遺伝子が介在している¹⁾。近年細菌の簡易同定法として、16S rRNA の遺伝子(16S rDNA)をPCR(温度循環装置)で増幅抽出し、これを制限酵素で切断し電気泳動で調べ、細菌株間の相違を調べる方法(PCR-RFLP)が盛んに研究されている²⁻⁴⁾。rRNA 遺伝子は比較的安定した変異の少ない遺伝子であるため、16S rDNA を用いたPCR-RFLP は属以上のレベル

での解析に有効であるが、種以下の解析には適さない⁵⁾。一方16S rDNA と23S rDNA 間のインタージェニックスペーサー(IGS)は腸内細菌群においては変異の激しい領域であることが知られ¹⁾、種以下のレベルでの近縁関係を明らかにするのに有効なことが示唆されているが、腸内細菌群以外の他の細菌群については余り調べられていない。

岩手県大槌湾の河口から湾口までのほぼ全域の表面海水中では、毎年夏期にバクテオリオクロフィルを含有する好気性細菌が優占となるが⁶⁾、その分離株90株は、制限酵素 *HaeIII* 及び *RsaI* による16S rDNA のPCR-RFLP で、すべて *Roseobacter denitrificans*⁷⁾ と同一のパターンを示

水産大学校研究業績 第1538号, 1995年12月22日受付。

Contribution from National Fisheries University, No.1538. Received Dec. 22, 1995.

*水産大学校製造学科微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

すことが筆者らの研究で明らかとなっている⁸⁾。そこで年毎及び採集場所毎の菌株間の相違をさらに詳しく調べるには、16S rDNA よりも変異性が激しいとされる IGS を用いるのが妥当と思われた。そこで本報では、IGS の変異性を確認するため、分離株の内一株、*Roseobacter* sp. OCh-C1株 (16S rDNA 及び菌体吸収スペクトルに基づき同定) の IGS の一次構造を調べたので報告する。

方法

大槌湾で分離された OCh-C1株を PPES-II 寒天培地⁷⁾、20℃で静地培養した。菌を白金耳でかき取り、100 µl の蒸留水に懸濁し、100℃で10分間加熱してDNAを抽出した。遠心後、上澄液を鋳型 DNA 液として用いた。PCR 反応は、0.5 µg 相当の PCR プライマー、TaqDNA ポリメラーゼ 2 ユニット、同酵素用10倍濃度の pH 緩衝液 (日本ジーン) 10 µl、デオキシアデノシン 3 燐酸、デオキシグアノシン 3 燐酸、デオキシシチジン 3 燐酸、デオキシチミジン 3 燐酸各 250 µM、0.2 µg 相当の鋳型 DNA を含む総量 100 µl の反応液を用い、98℃ 5 分の加熱処理後、94℃ 60 秒 (：鋳型 2 本鎖 DNA の遊離 1 本鎖化) / 48℃ 45 秒 (：鋳型 DNA とプライマーが融合して部分的に 2 本鎖となる反応) / 72℃ 90 秒 (：プライマーを起点として鋳型 DNA 鎖に沿って 5' 末端領域から 3' 末端領域への DNA 合成が行われる反応)、30 サイクルで行った。1 本鎖 DNA からなる PCR プライマーとして、16S rDNA の 3' 末端領域の 5'-AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3' を順方向プライマーとして、さらに 23S rDNA の 5' 末端領域の相補鎖の 5'-CTTGCTGCCT AGGCATCCA-3' を逆方向プライマーとして用いた。PCR 産物の確認は、NuSieve GTG Agarose (FMC BioProducts, Rockland, USA) 4.5g/TAE 緩衝液 (40mM Tris base, pH8.1; 2mM 酢酸; 0.2 mM 2Na-EDTA) 150ml, 40V, 16時間の電気泳動で行った。分子量マーカーとして、100 Base-Pair Ladder (ファルマシア・LKB) を用いた。電気泳動ゲルを臭化エチジウム 0.5 µg/ml の溶液で染色し、紫外線照射下で発せられる蛍光により PCR 産物の確認を行った。次に PCR 産物をカッターでゲルより切り出し、70℃でゲルを融解後、この融解液を直接鋳型 DNA 液として再度 PCR を行った。最終 PCR 産物をウルトラフリー C3 (ミリボア) で遠心濾過し、脱塩精製した。PCR 産物の塩基配列は、パーキンエルマー社のダイターミネーター法によ

り、373S DNA シークエンサーを用いて調べた。すなわち、DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit を用い、サイクルシーケンスを 96℃ 30 秒、50℃ 15 秒、60℃ 4 分で行った。泳動ゲルには、Long Ranger (パーキンエルマー) を 5.5% 濃度で用いた。

結果と考察

OCh-C1株の PCR 産物として、約 300bp (塩基対) と 870bp の 2 本鎖 DNA 断片を得た。このうち 300bp 2 本鎖 DNA 断片は、塩基配列が既知のインタージェニックスペーサーとは全く異なっていた。さらに得られた塩基配列の中間領域の相補鎖の 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3' を逆方向プライマーとし、16S rDNA の 5' 末端領域の 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' を順方向プライマーとして PCR をおこなったところ、理論的な大きさ、約 2,000bp、に相当する PCR 産物が得られなかった。したがって 300bp DNA 断片は、rrn オペロンのインタージェニックスペーサーではなく、非特異的な PCR 産物だと考えられた。

次に Fig. 1 に、870bp DNA 断片の塩基配列と、比較対象として、*Roseobacter* と同じ Proteobacteria 綱の α -3 クラスタに属する *Rhodobacter sphaeroides*⁵⁾ の IGS を示す。

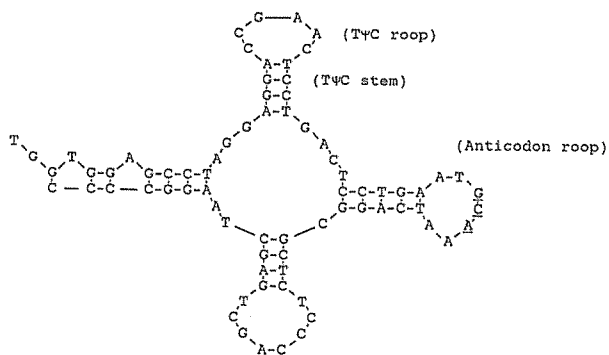
OCh-C1株の 870bp DNA 断片においては、用いたプライマーの構造が 5' 及び 3' 末端のいずれにも確認されず、ダイターミネーターによるシーケンス伸長反応が他端にまで届かなかったことが推察された。しかしながら得られた PCR 産物においては、16S rDNA の 3' 末端に位置する mRNA の結合部位のアンチシャインダルガノ配列領域⁹⁾ が認められ、目的の IGS が得られていることがわかった。*Rhd. sphaeroides* の IGS との間には、アンチシャインダルガノ配列領域と、*Rhd. sphaeroides* の塩基番号 296 から 370、すなわちイソロイシン tRNA 遺伝子の領域⁸⁾ において、100% の相同性が認められた。他に、*Rhd. sphaeroides* の塩基番号 421 から 497、すなわちアラニン tRNA 遺伝子の領域⁹⁾ で OCh-C1株との間に 87% の相同性が認められた。Fig. 2 に OCh-C1株のアラニン tRNA 相同領域の 2 次元構造を示す。870bp DNA 断片のアラニン tRNA 相同領域では、*Rhd. sphaeroides* と同一のアンチコドンループが認められたが、T ψ C ステム及び T ψ C ループ領域においてはかなりの変異が認められた。870bp DNA 断片の IGS

Roseobacter	5'	10	20	30	40	50	
Rhd. sphaero	1	GTGAAGTCGT	AACAAGGTAG	CCGTAGGGA	ACCTGCCGCT	GGATCACCTC	50
						GGATCACCTC	50
Roseobacter	51	60	70	80	90	100	
Rhd. sphaero	51	CTTTCTAAGG	ATGTTCTAG	CAGCAAGAA	TTGTTCTTGA	GCTCGTGGAA	100
	51	CTTTCTAAGG	ATGTTCTAG	CAGCAAGAA	TTGTTCTTGA	GCTCGTGGAA	100
Roseobacter	101	110	120	130	140	150	
Rhd. sphaero	101	CACTTAGCAG	TACTTATGT	GAGATATCGG	CAGGCTCTTC	GGAGCACTGC	150
	101	--GCTACTTG	GCAAGAGCCA	GTGATGGTCT	CA-----	-----ACA	150
Roseobacter	151	160	170	180	190	200	
Rhd. sphaero	151	TTGNCGGAG	CGGTCCGCAT	ATCTCTTCAG	CTTCAAGAC	A-----	200
	151	CGCGCGGAG	CGGTCCGCAT	ATCTCTTCAG	AGACAGAGCA	AGCGCGGGTT	200
Roseobacter	201	210	220	230	240	250	
Rhd. sphaero	201	CGTAACCGCC	GTGTGAGCCA	CCTCGGGCCT	TGCGGCCCTC	GGCACATGCC	250
	201						250
Roseobacter	251	260	270	280	290	300	
Rhd. sphaero	251	TCAAAACGGT	CCACTGGACC	GTTTTCGCG	CGCACCGGC	GTA--TGGGT	300
	251				CGCACCGGC	GCAATGTTGGT	300
Roseobacter	301	310	320	330	340	350	
Rhd. sphaero	301	CGGTAGCTCA	GGTGGTTAGA	GGCGACGGCT	GATTAAGGGTG	AGGTGGGAGG	350
	301	CGGTAGCTCA	GGTGGTTAGA	GGCGACGGCT	GATTAAGGGTG	AGGTGGGAGG	350
Roseobacter	351	360	370	380	390	400	
Rhd. sphaero	351	TTCAAGTCCT	CCTCGAGCCA	CCAT--AAGTT	A-----	-----	400
	351	TTCAAGTCCT	CCTCGAGCCA	CCAT--AAGTT	CGCGGATTT	GATGCCAGCG	400
Roseobacter	401	410	420	430	440	450	
Rhd. sphaero	401	CCAGCGCGGC	AGGACTGCGA	GGGGCCCTTAG	CTCAGCTGGG	AGAGGGCTTG	450
	401			GGGGCCCTTAG	CTCAGCTGGG	AGAGGACCTTG	450
Roseobacter	451	460	470	480	490	500	
Rhd. sphaero	451	ATTTCGCAITG	AGGAGGTCAG	CGAGTTCGGT	CGTCTTAGGC	TCCACCAITTA	500
	451	CTTTTCGAAGG	AGGGGGTICAT	CG--GTTCCAT	CGCGATTAGGC	TCCACCAATGAT	500
Roseobacter	501	510	520	530	540	550	
Rhd. sphaero	501	CTTCAGTTTG	ATCGGTAAAG	ACTTCTGAGA	TGCTTCCCGG	TCCAACTGGG	550
	501	CCGGTTC--G	ATCGCCAAGG	CCATGTTGGTG	GGTCTGGGCG	TCCAAACCGGA	550
Roseobacter	551	560	570	580	590	600	
Rhd. sphaero	551	CGANTTAACA	TGATTTTGA	GAGATAACAA	TCAGTCAACC	TGGATCGCC	600
	551	CGAGATTTTG	AGATCGTTCA	GAGAGATAGA	ACA--TCAAGT	---ATCGCC-	600
Roseobacter	601	610	620	630	640	650	
Rhd. sphaero	601	CGTCTTAGGN	GATGATCAGC	AGCATGCTTC	GGCAGAGCTG	CACGTTGAT	650
	601	GGTCTTCCCA	GTAGGGGAAG	ACTGCGGTT	CGACCCCGCA	GGCGAT---	650
Roseobacter	651	660	670	680	690	700	
Rhd. sphaero	651	ACTATTCCAA	GTAAAGTACA	-CTAACCGTG	TGCATGCCA	ATAAGGATG	700
	651	ATGTTTCCAA	GTCTAGTACA	ACTGACCGCG	ACACCTTCTG	GGTCAATCGCA	700
Roseobacter	701	710	720	730	740	750	
Rhd. sphaero	701	TCAGCAACG	TTCCGCCAAC	GAAACAGTGG	GGAAACCGG	AAAATGTATG	750
	701	TGGGAATGTA	CATGCTTCTG	ACATGGGAAA	CACTTCTCT	CTTCCGGAT	750
Roseobacter	751	760	770	780	790	800	
Rhd. sphaero	751	CATTGATTA	ATGCTCAACC	GAAGTCAAAA	GGCGGGTGA	GCGCAGGAGA	800
	751	AGATCAAGC	GCAGAAAAGG	CGTTTGGTGG	ATGCCTAGGC	AGCAAGAGGC	800
Roseobacter	801	810	820	3'	830	840	850
Rhd. sphaero	801	AGCTTGCTT	CGTCTGGCG	GTCA.....	850
	801	GATGAAGGAC	GTGAT.....	850

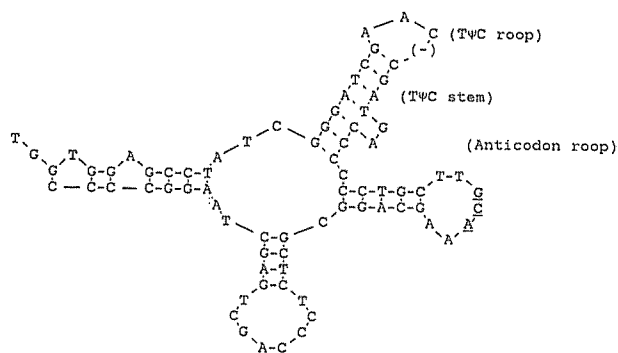
Roseobacter Rhd. sphaero	1	5'	10	20	30	40	50	
	1	GTGAAGTCGT	AACAAGGTAG	CCGTAAGGGA	ACCGGAGGNTN	GGATCAGCTC		50
								50
Roseobacter Rhd. sphaero	51	60	70	80	90	100		
	51	CTTTCTAAGG	ATGTCCTAG	CAGCAAGAAC	TTGTTCTTGA	GTCGTGGAA		100
	51	CTTTCTAAGG	ATGTCCTAG	CAGCAG-GC	TTG-CCT--G	TCTCGTIG-AA		100
Roseobacter Rhd. sphaero	101	110	120	130	140	150		
	101	CACTTAGCAG	TCACTTATGT	GACATATCGG	GAGGCTCTTC	GGAGCACTGC		150
	101	--GCTACTTG	GCAAGAGCCA	GTCAATGGTCT	CA-----	-----ACA		150
Roseobacter Rhd. sphaero	151	160	170	180	190	200		
	151	TTGGNCCGAG	CCGTCCTCAT	ATCTCTTCA	CTTCAAAGAC	A-----		200
	151	CGCGCCGAGG	CCGTCCCAT	ATCCCTTCA	AGAAGAGCA	AGCGCGGGTT		200
Roseobacter Rhd. sphaero	201	210	220	230	240	250		
	201	CGTAAACGCC	GTGTGAGCCA	CCTCGGCCCT	TGCGGCCCTC	GGCATATGCC		250
	201							250
Roseobacter Rhd. sphaero	251	260	270	280	290	300		
	251	TCAAACCGGT	CCACTGGACC	GTTTTGCC	GGCACCGGCC	GTAA--TGGGT		300
	251				GCAGCGGAGG	GCATGTGGGT		300
Roseobacter Rhd. sphaero	301	310	320	330	340	350		
	301	CGGTAGCTCA	GGTGGTTAGA	GCGCACGCCCT	GATAAGCGTG	AGGTCCGAGG		350
	301	CGGTAGCTCA	GGTGGTTAGA	GCGCACGCCCT	GATAAGCGGTG	AGGTCCGAGG		350
Roseobacter Rhd. sphaero	351	360	370	380	390	400		
	351	TTCAAAGTCCT	CCTCGACCGCA	GCAT-AAGTT	A-----	-----		400
	351	TTCAAAGTCCT	CCTCGACCGCA	GCATCAAATC	CGGCGGATTT	GATGCCAGCG		400
Roseobacter Rhd. sphaero	401	410	420	430	440	450		
	401	-----T	-----T	GGGGCCTTAG	CTCAGCTGGG	AGAGGCCTTG		450
	401	CCAGCGCGGC	AGGACTCGCA	GGGGCCTTAG	CTCAGCTGGG	AGAGGACCTTG		450
Roseobacter Rhd. sphaero	451	460	470	480	490	500		
	451	ATTTGCAATTG	AGGAGGTGAG	CGAGTTGGGT	CGTCTTAGGG	TCCACCA TTA		500
	451	CTTTTGC AAGG	AGG GGGTCAT	CG-GTTCGAT	CGCGATAGGG	TCCACCA GAT		500
Roseobacter Rhd. sphaero	501	510	520	530	540	550		
	501	CTTCAGTTTG	ATCGGTAAGG	ACTTCCTGAGA	TGCTTCCCGG	TCCAACITGG		550
	501	CGGGTTC--G	ATGGCCAAGG	CAATGTGGTG	GCTTGGGG	TCCAACCGGA		550
Roseobacter Rhd. sphaero	551	560	570	580	590	600		
	551	CGANTTAACA	TGATTTTGA	GAGATACACA	TCAGTTCAAC	TGGATCGCC		600
	551	CGAGATTTTG	AATCGTTCA	GAGAGATACA	ACA--TCAGT	---ATCGCC-		600
Roseobacter Rhd. sphaero	601	610	620	630	640	650		
	601	CGTCTTAGGN	GATGATCAGC	AGGATGCTTC	GCCAGAGCTG	CACTT T GAT		650
	601	GGTCTTCCCA	GTAGGGGAG	ACGFGGGT	CGACCCCGCA	GGCGA T---		650
Roseobacter Rhd. sphaero	651	660	670	680	690	700		
	651	ACTATTCCAA	GTTAAGTACA	-CTAACCGTG	TGGCATGCCA	ATACAGGATG		700
	651	ATTGTTCCAA	GTTAAGTACA	ACTGACCCCG	ACGACCTTGG	GGTCA T GCA		700
Roseobacter Rhd. sphaero	701	710	720	730	740	750		
	701	TACGCAACG	TTCCCAAC	GAAACAGTGG	GGAAACGGG	AAAATGTATG		750
	701	TGGGAATGTA	CATGTTCTG	ACATGGGAAA	GAGCCTTCT	CTTCCGGAT		750
Roseobacter Rhd. sphaero	751	760	770	780	790	800		
	751	CATTGATTA	ATGCTACCC	GAAGTCAAAA	GGCGGGTGT	GCGCAGGAGA		800
	751	CAGATCAAGC	GCGAAAAGG	CGTTTGGTGG	ATGCCTAGGC	AGCAAGAGGC		800
Roseobacter Rhd. sphaero	801	810	820	3'	830	840	850	
	801	AGCTTGTCTT	CGTCTGGGCG	GTCA.....		850
	801	GATGAAGGAC	GTGAT.....		850

Roseobacter	551	<u>CGANT</u> TAACA TGGATT <u>TTG</u> GA GAGATACAGA TATGTTCCCTGGATCGGCT	550				
Rhd. sphaero	551	<u>CGAGAT</u> TTTG ACGATCGTTCA GAGAGATACA ACA--TCAAGT ---ATCGCC	600				
		610	620	630	640	650	
Roseobacter	601	<u>CGTCT</u> TAGGN GATGATCAGC AGCATGCTTC GG CAGAGCTG CACCGTTGAT	650				
Rhd. sphaero	601	<u>GTCT</u> CCC GA GTAGGGGAAG ACCGTGGGTT C GACCCCGCA GGCGAT---	650				
		660	670	680	690	700	
Roseobacter	651	<u>ACTATTCCAA</u> GTTAAGTACA -CTAACCGTGTGTCATGCCA ATACAGCATG	700				
Rhd. sphaero	651	<u>ATTGTTCCAA</u> GTCTAGTACA ACTGACCCCG ACCACCTTCG GGTGATGGCA	700				
		710	720	730	740	750	
Roseobacter	701	<u>T</u> CACGCAACG TTCCCCAAC GAACCACTGG GGCAAACGGG AAAATGTATG	750				
Rhd. sphaero	701	<u>T</u> GGGAATGTA CATGCTTCTG ACAATGGGAAA GACCTTCCT CTTCCGGAT	750				
		760	770	780	790	800	
Roseobacter	751	<u>GATT</u> TGATTA ATGCTC <u>ACCC</u> GAAGTCAAAA GGC GGGTGTA GCGCAGGAGA	800				
Rhd. sphaero	751	<u>CAGAT</u> CAAGC GCCAAAAGGG CGTTGGTGG ATGCTTAGGC AGCAAGAGGC	800				
		810	820	3'	830	840	850
Roseobacter	801	AGCTTGTCTT CGTCTGGGCG GTCA.....	850				
Rhd. sphaero	801	GATGAAGGAC GTGAT.....	850				

Fig. 1. Nucleotide sequences of 870bp DNA fragment of *Roseobacter* sp. OCh-C1 and the intergenic spacer of *Rhodobacter sphaeroides*. Region of anti-Shine-Delgarno sequence is underlined.



Roseobacter sp. OCh-C1



Rhodobacter sphaeroides

Fig. 2. Possible secondary structures of tRNA-like region of 870bp DNA fragment of *Roseobacter* sp. OCh-C1 and alanine tRNA of *Rhodobacter sphaeroides*. The letters with underline indicate anticodon. The structures were constructed manually.

では, *Rhd. sphaeroides* の塩基番号192から277の領域とイソロイシン tRNA とアラニン tRNA 領域との間で脱落がみられ, またアラニン tRNA の 3'側領域は *Rhodobacter* の IGS との比較で, 変異の激しいことがわかった。これは, 92.1%の相同性を示す16S rDNA¹⁰⁾ とは対照的である。したがって IGS を用いての PCR-RFLP では, 16S rDNA を用いるよりもはるかに詳細な菌株間の区別が可能だと思われる。

謝 辞

最後に, DNA 塩基配列を決めるにあたりお世話になった小野臨湖実習場の近藤昌和先生に感謝します。

文 献

- 1) L. S. Dillon, *The Gene*, Plenum Press, New York and London, 1987, p. 896.
- 2) V. Gurtler, V. A. Wilson, and B. C. Mayall: *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2673-2679 (1991).
- 3) E. Navarro, P. Simonet, P. Normand, and R. Bardin: *Arch. Microbiol.*, **157**, 107-115 (1992).
- 4) R. Vilgalys, and M. Hester: *J. Bacteriol.*, **172**, 4238-4246 (1990).
- 5) C. R. Woese: *Microbiol. Rev.*, **51**, 221-271 (1987).
- 6) T. Shiba: *Fisheries Sci.*, **61**, 245-248 (1995).
- 7) T. Shiba: *Sys. Appl. Microbiol.*, **14**, 140-145 (1991).
- 8) 依藤元・松尾由佳・芝恒男・前田峻道・村上正忠: 平成7年度第11回日本微生物生態学会講演要旨集, P.17.
- 9) S. C. Dyden, and S. Kaplan: *Nucleic Acid Res.*, **18**, 7267-7277 (1990).
- 10) J. A. Fuerst, J. A. Hawkins, A. Holmes, L. I. Sly, C. J. Moore, and E. Stackebrandt: *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **43**, 125-134 (1993).