

## B-36

## 16S-23S rDNA スペーサー領域情報を用いた光合成細菌の分類

ひさだ たかよし ひらいし あきら

○久田 貴義、平石 明

豊橋技術科学大学エコロジー工学系

【目的】現在、細菌の系統分類には 16S rRNA 遺伝子の塩基配列がよく用いられている。しかし 16S rDNA は保存性の高い遺伝子であるため、近縁種の識別に用いることは困難である。そこで今回は光合成細菌を対象として 16S-23S rDNA スペーサー領域（以下 ITS : internal transcribed spacer）の塩基配列解析が光合成細菌の分類にどのように利用できるかを検討した。

【方法】試験菌株はプロテオバクテリア $\alpha$ -2 グループに含まれる光合成細菌の属 *Blastchloris*、*Rhodobium*、*Rhodoplanes* および *Rhodopseudomonas* に属する 16 菌種 42 菌株を用いた。光合成培養、集菌した後、cell lysate を鋳型として ITS の PCR 増幅を行った。PCR プライマーとして 16S rRNA の下流側と 23S rRNA の上流側に位置するユニバーサルプライマーを用いた。PCR 産物を精製後、ITS に含まれる保存性の高い 2 つの Ile-tRNA、Ala-tRNA をコードする領域でそれぞれ設計したシークエンスプライマーを用いてサイクルシークエンス反応を行った。また ITS は多コピーであるため、別途 PCR 産物のサブクローニングを行ったのち、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は GENETYX-MAC で編集し、CLUSTAL W を用いて多重アライメントを行ない、近隣結合法により系統樹を作成した。この際ギャップを考慮して進化距離を求めた。また GENETYX-MAC により tRNA の 2 次構造を予測した。

【結果と考察】ITS に基づく系統樹は 16S rDNA の遺伝子配列に基づくそれと類似したが、同属内の近縁種識別により高い解像度があった。前回報告したように<sup>1)</sup>、その ITS 塩基配列相同性と DNA-DNA 交雑形成率には高い相関があり、ITS 塩基配列相同性が近縁種識別の指標になりうると考えられた。また ITS 塩基配列の多重アライメントでは、2 つの tRNA コード領域塩基配列は同属内で完全に一致した。ITS 塩基配列から 2 つの tRNA コード領域を抽出し、その塩基配列から系統樹を作成したところ各属ごとに非常に明確なクラスターを形成した。結論として ITS 全塩基配列は菌種レベルでの識別、tRNA コード領域の配列および 2 次構造は属レベルでの識別の指標となることが示唆された。

1) 日本農芸化学学会 2000 年度大会（東京）講演要旨集 p290(2000)