

令和三年度 博士学位論文

比較ゲノム解析に基づく  
細菌の抗菌物質生産機構の  
多様性に関する研究

宇都宮大学大学院工学研究科

システム創成工学専攻

櫻岡 良平

## 目次

### 第1章 序論

1.1. 植物保護細菌における抗菌物質生産	1
1.1.1. 植物保護細菌	1
1.1.2. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌	1
1.1.3. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌による抗菌物質の生合成	2
1.2. 抗菌物質生産と Quorum Sensing	6
1.2.1. Quorum Sensing	6
1.2.2. AHL を介した Quorum Sensing 制御機構	7
1.2.3. Quorum Sensing による抗菌物質生産制御	9
1.3. 比較ゲノム解析	10
1.3.1. 塩基配列決定技術と次世代シーケンサー	10
1.3.1. 比較ゲノム解析	11
1.4. 研究目的	11
1.5. 参考文献	13

### 第2章 *Serratia marcescens* における Quorum Sensing 及びプロディジオシン生合成 遺伝子の比較ゲノム解析

2.1. 緒言	17
2.1.1. <i>S. marcescens</i> とプロディジオシン	17
2.1.2. <i>S. marcescens</i> におけるプロディジオシン生産と Quorum Sensing	17
2.1.3. 研究目的	18
2.2. 実験方法	19
2.2.1. 次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の取得	19
2.2.2. シーケンシングリードのアセンブル及びアノテーション	19
2.3. 実験結果及び考察	22
2.3.1. <i>S. marcescens</i> AS-1 株の全ゲノム解析	22
2.3.2. <i>S. marcescens</i> における Quorum Sensing 遺伝子群の比較ゲノム解析	25
2.4. 小括	31
2.5. 参考文献	33

<b>第3章 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌における抗菌物質生合成遺伝子の比較ゲノム解析</b>	
3.1. 緒言	36
3.1.1. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌と植物保護	36
3.1.2. 研究目的	36
3.2. 実験方法	38
3.2.1. 次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の取得	38
3.2.2. シーケンシングリードのアセンブル及びアノテーション	39
3.2.3. PHL の抽出及び定量	40
3.3. 実験結果及び考察	42
3.3.1. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌の全ゲノム解析	42
3.3.2. PHL 生合成遺伝子クラスターの比較ゲノム解析	42
3.3.3. PHL 生産の比較解析	45
3.3.4. PRN、PLT、PHZ 生合成遺伝子クラスターの比較ゲノム解析	48
3.3.5. 抗菌物質生合成遺伝子クラスターと植物保護効果の関連性	50
3.4. 小括	51
3.5. 参考文献	53
<b>第4章 結論</b>	
4.1. 本研究のまとめ	55
4.2. 今後の展望	55
4.2.1. プロディジオシン生合成遺伝子と Quorum Sensing の関係	55
4.2.2. 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 属細菌が生産する抗菌物質の植物保護効果	56
<b>謝辞</b>	57

# 第 1 章 序論

## 1.1. 植物保護細菌における抗菌物質生産

### 1.1.1. 植物保護細菌

農業は人の生活と深い関わりのある根幹産業である。近代農業においては、化学肥料や化学農薬、病害抵抗性品種の開発、水道などのインフラ整備などによって農作物の収穫量が急激に増大し、安定した作物の供給が可能となってきた。その一方で、農業に用いられる肥料や農薬等の化学物質による環境負荷が様々な問題を引き起こすようになり、これらを低減するための技術開発が急務となってきた。この解決策の一つに生物防除法がある。生物防除法では、化学農薬の代替として、害虫を捕食する天敵昆虫や、植物病原菌の生育を阻害する微生物が用いられる。植物病害による被害を軽減する能力を有する細菌は、植物保護細菌と呼ばれており、微生物農薬としてすでに商品化され、幅広い作物に使用されている（吉田ら 2013）。植物保護細菌を用いる微生物農薬の出荷額は、2010 年時点で約 8.5 億円と規模は小さいものの、今後 20 年で微生物農薬の市場がさらに拡大するとのレポートも存在し、今後の大きな伸びが期待される（吉田ら 2013）。

植物保護細菌の生物防除効果は、病害生物の生育阻害や、植物体への強い定着性による競合などが挙げられるが、特に重要と考えられるのが抗菌物質の生産である。多くの細菌は、他の微生物の生育や増殖に対して阻害効果を有する抗菌物質を生産することが知られている。細菌が生産する抗菌物質などの二次代謝産物は、医療分野における治療薬や、農業分野における微生物殺菌剤として幅広い用途に利用されている。抗菌物質を生産する細菌を生物農薬として利用する試みは長年続けられており、欧米を中心に様々な微生物殺菌剤が上市されている（本間 1991; 吉田ら 2013）。

### 1.1.2. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌

*Pseudomonas* 属細菌は、土壌や水圏など様々な環境中に生息するグラム陰性桿菌の一種である（Peix *et al.* 2009）。現在、分類手法の発展とともに *Pseudomonas* 属細菌は多種多様な種に細分化されているが、これらの中に、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌と呼ばれる分類群が存在する。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌

は、King B 培地などの特定の培地で培養し、紫外線を照射するとコロニーの周辺において青から青緑色の蛍光を呈することが古くから知られている (Bultreys *et al.* 2003)。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌に分類される菌種の中には、日和見感染症の原因菌として知られる緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* や、植物の斑点細菌病の原因菌である *Pseudomonas syringae* など、一部の病原性細菌が含まれるが、半数以上の種が植物保護細菌として利用できる可能性があるとの報告もなされている (染谷ら 2019a)。

### 1.1.3. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質の生合成

蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌は、抗菌物質を含む様々な二次代謝産物を生産するが、その中でも植物保護効果に関連する物質は数十種類に上ると言われている (土屋ら 2009)。植物保護効果を有する代表的な蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌として、*Pseudomonas protegens* や *Pseudomonas chlororaphis* が挙げられる。これらの細菌種は、多種多様な抗菌物質を生産するが、2,4-ジアセチルフログルシノール (PHL)、ピロールニトリン (PRN)、ピオルテオリン (PLT)、シアン化水素 (HCN)、フェナジン (PHZ) 等が代表的な抗菌物質として挙げられる (Fig. 1-1) (染谷ら 2019a)。

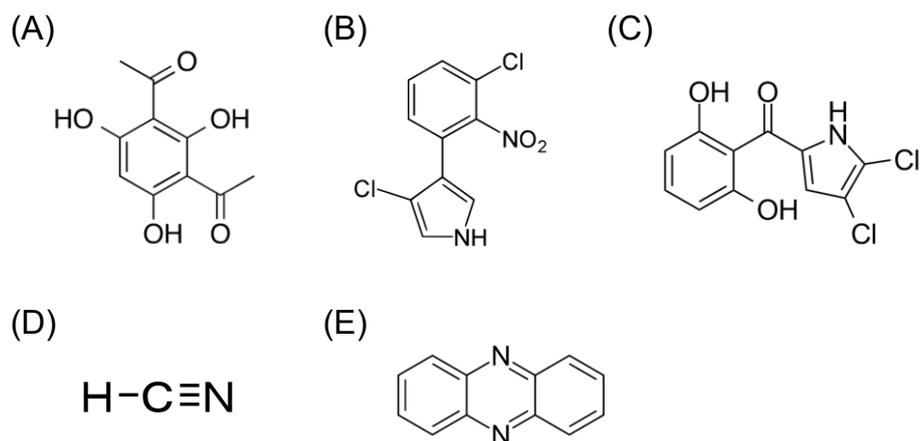


Fig. 1-1. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が生産する抗菌物質である PHL (A)、PRN (B)、PLT (C)、HCN (D)、PHZ (E) の構造

PHLは、様々な *Pseudomonas* 属細菌によって合成されることが知られており、*in vitro* において様々な微生物に対する増殖阻害活性を示すことが報告されてい

る (Kwak *et al.* 2012)。植物病原性卵菌である *Pythium ultimum* に PHL を曝露すると、細胞構造が変化することで菌糸の成長や遊走子の運動性が阻害される (de Souza *et al.* 2003)。糸状菌 *Neurospora crassa* を用いた研究では、PHL はミトコンドリアをターゲットとした毒性を有する可能性が報告されている (Troppens *et al.* 2013)。*Pseudomonas* 属細菌による PHL の生合成は、9 個の遺伝子で構成される *phl* クラスターを介して行われる (Yan *et al.* 2017)。具体的には、PhlD により 3 分子のマロニル CoA からフロログルシノールが合成される。フロログルシノールは PhlABC によりアセチル化され、モノアセチルフロログルシノールが合成される。最後に、PhlABC により再びアセチル化が起こり、PHL が合成される (Fig. 1-2)。

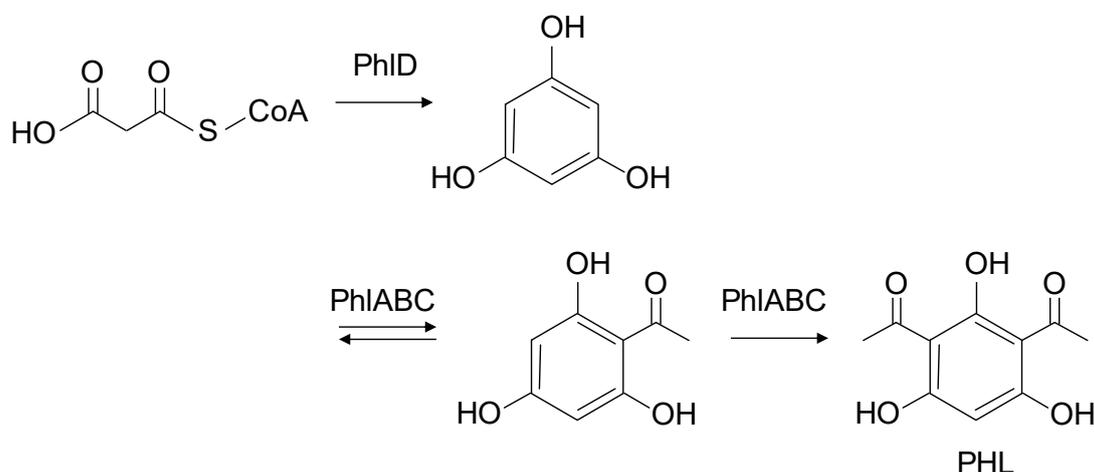


Fig. 1-2. *Pseudomonas* 属細菌における PHL 生合成経路

PRN は、*Pseudomonas* 属細菌以外にも *Burkholderia* 属細菌、*Enterobacter* 属細菌、*Myxococcus* 属細菌、*Serratia* 属細菌等も生産することが報告されている (Pawar *et al.* 2019)。PRN は、特に真菌に対して高い増殖阻害効果があり、タンパク質、RNA、DNA の合成阻害や、呼吸に関わる電子伝達系の阻害などを示すことが明らかになっている (Warden *et al.* 1976)。*Pseudomonas* 属細菌による PRN の生合成は、4 個の遺伝子で構成される *prn* クラスターを介して行われる (Pawar *et al.* 2019)。具体的には、PrnA によりトリプトファンが塩素化され、7-クロロトリプトファンが生成する。7-クロロトリプトファンは、PrnB によりモノデクロロアミノピロニトリンへ変換され、PrnC による塩素化を通じて、最終的に PrnD

により PRN が合成される (Fig. 1-3)。

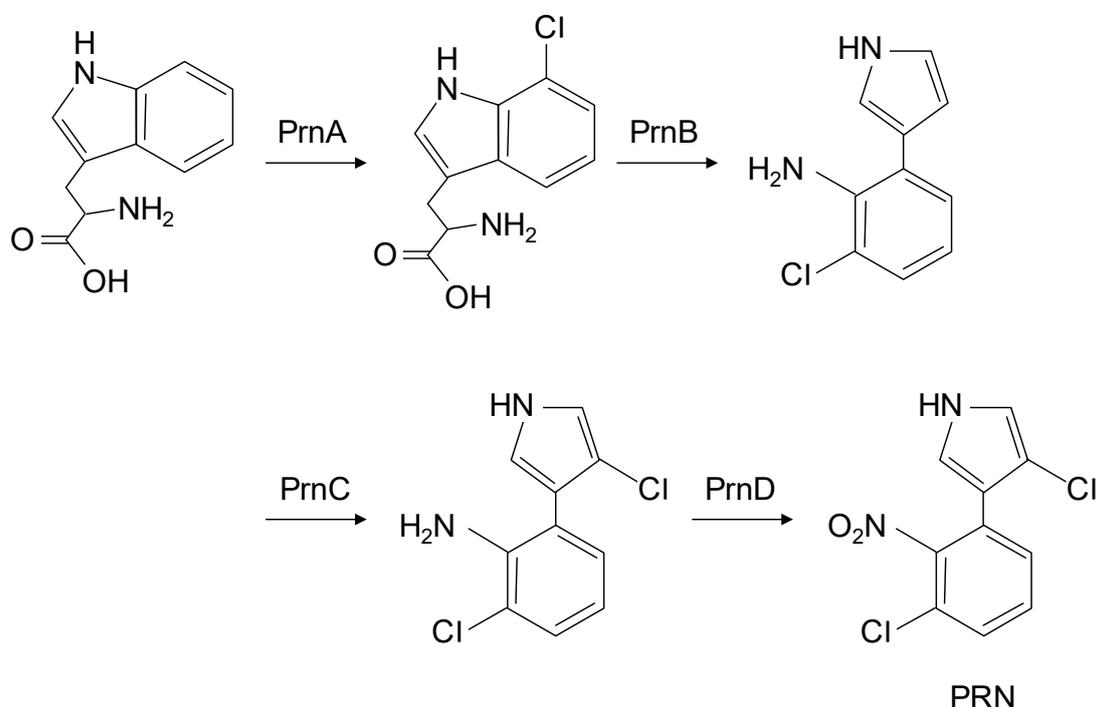


Fig. 1-3. *Pseudomonas* 属細菌における PRN 生合成経路

PLTは、緑膿菌 *P. aeruginosa* において最初に単離された抗菌物質であり (Takeda and Nakanishi 1958)、抗細菌活性、抗真菌活性、除草活性などを示し、特に *P. ultimum* による苗立ち枯れ病に対して高い防除効果が報告されている (Howell and Stipanovic 1980)。*Pseudomonas* 属細菌による PHL の生合成は、17 個の遺伝子で構成される *plt* クラスターを介して行われる (Yan *et al.* 2017)。具体的には、PltF を介して PltL タンパク質にプロリンが結合する。この複合体は、PltE による酸化、PltA による塩素化を受けて、ジクロロピロールが合成される。最終的に、PltBCG の作用により PLT が合成される (Fig. 1-4)

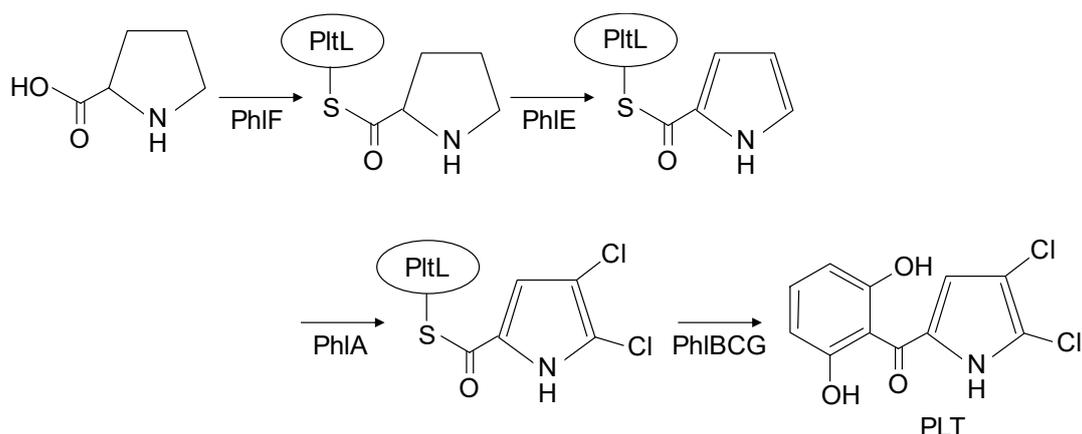


Fig. 1-4. *Pseudomonas* 属細菌における PLT 生合成経路

HCN は、*Pseudomonas* 属細菌に限らず、多くの細菌や真核生物が生産することが明らかになっている（染谷ら 2017）。HCN は強い細胞毒性を有しており、植物病原菌に対して強力な阻害物質であることには間違いはないが、保護対象となる植物や、土壌中に生息する動物や有用細菌に対しても毒性を示すことから、積極的に抗菌物質として用いる動きはなく、雑草の防除に利用するという一部の報告にとどまっている（Kremer and Souissi 2001）。HCN の生合成は、3 個の遺伝子で構成される *hcn* クラスターを介して行われ（Yan *et al.* 2017）、HcnABC 複合体により、グリシンを HCN と二酸化炭素に変換する（Laville *et al.* 1998）。

PHZ は、*Pseudomonas* 属細菌では *Pseudomonas synxantha*、*P. chlororaphis*、*P. aeruginosa* で生産能が報告されている。PHZ の生合成は、8~9 個の遺伝子で構成される *phz* クラスターを介して行われる（染谷ら 2019b）。具体的には、エリトローズ-4-リン酸（E4P）とホスホエノールピルビン酸（PEP）を基質として、PhzA-G の反応によりフェナジン-1-カルボン酸（PCA）が生成する。この PCA を基質として、菌種により様々な構造の PHZ 誘導体に変換される（Fig. 1-5）。*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* では、PCA は PhzO により 2-ヒドロキシフェナジン（2-OH-PHZ）と 2-ヒドロキシ PCA（2-OH-PCA）に変換される。*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* では、PCA は PhzH によりフェナジン-1-カルボキサミド（PCN）に変換される。緑膿菌 *P. aeruginosa* では、PhzM と PhzS により PCA は 1-ヒドロキシフェナジン（1-OH-PHZ）やピオシアニン（PYO）に変換される。

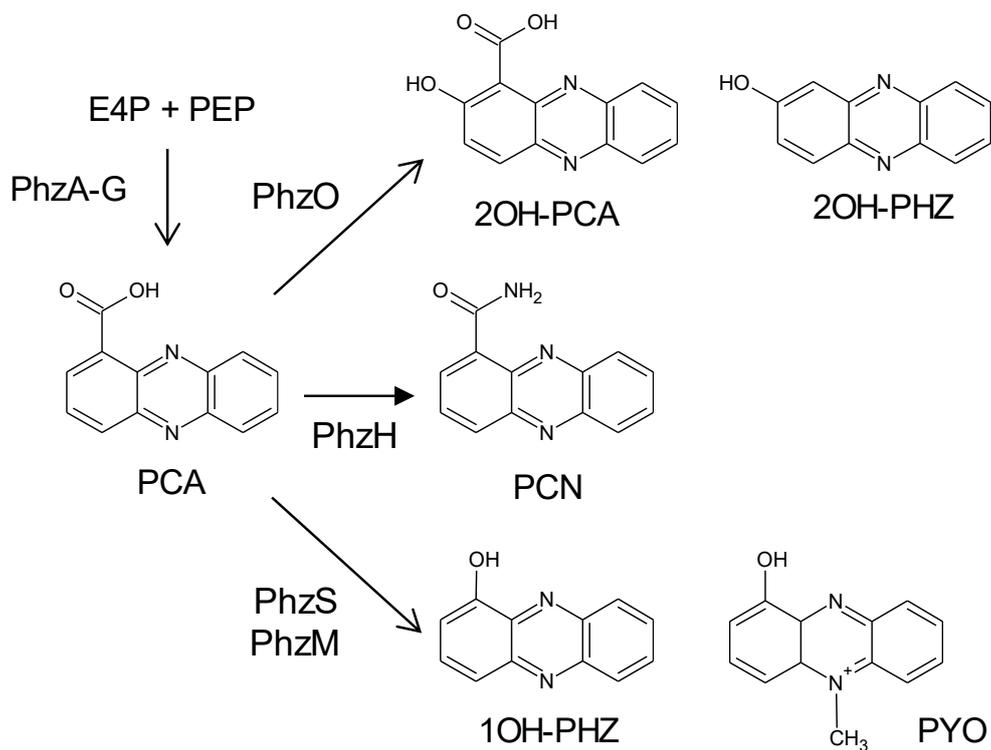


Fig. 1-5. *Pseudomonas* 属細菌における PHZ 誘導体の生合成経路

PHZ 誘導体は、様々な植物病原菌に対して抗菌活性を示すだけでなく、植物病原菌に対する植物側の抵抗性誘導因子として機能していることが知られている（染谷ら 2019b）。PHZ 生産菌の植物保護効果は、PHZ 誘導体自体の抗菌活性や、植物体への直接的な生理作用などが組み合わさることで現れるのではないかと考えられている。

## 1.2. 抗菌物質生産と Quorum Sensing

### 1.2.1. Quorum Sensing

細菌は従来、単独で行動を行っていたと考えられていたが、他の多くの生物と同様に相互にコミュニケーションを取り合い、集団として活動していることが明らかとなってきた。この細菌によるコミュニケーション機構の 1 つに Quorum Sensing (QS) がある。QS とは、細菌がオートインデューサーと呼ばれるシグナル物質を介して周囲の細胞密度を感知し、一定の細胞密度を超えた時に様々な遺伝子の発現を活性化する機構のことを呼ぶ（Parsek and Greenberg 2000）。オー

トインデューサーの種類は細菌種によって様々であるが、本研究で着目したグラム陰性細菌の場合は、アシル化ホモセリンラクトン (*N*-acyl-L-homoserine lactone: AHL) を用いることが多い。AHL はホモセリンラクトン (HSL) とアシル鎖がアミド結合を形成した化学構造を取っている (Parsek and Greenberg 2000)。AHL のアシル鎖長は、通常 C4 から C18 程度であり、これに 3 位の炭素がオキソ体やヒドロキシ体となった AHL が主要な構造となっている (Fig. 1-6)。さらに一部の細菌では、AHL のアシル鎖の末端がメチル化されたものや、アシル鎖の一部に不飽和結合が見られる特殊な AHL を生産することも明らかとなっている (Churchill and Chen 2011)。以降では、オートインデューサーとして AHL を用いた QS について詳細を述べる。

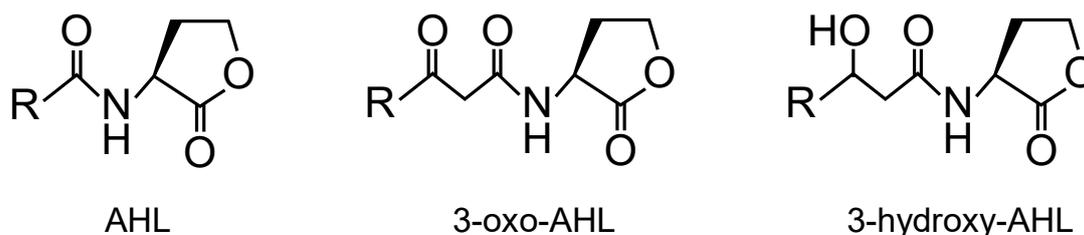


Fig. 1-6. AHL の基本構造

### 1.2.2. AHL を介した Quorum Sensing 制御機構

AHL を介した QS 機構は、海洋性発光細菌である *Vibrio fischeri* において、発光遺伝子群の制御機構として発見されたのが最初の報告である (Nealson *et al.* 1970)。それ以降、多種多様なグラム陰性細菌において、AHL を介した QS 機構の存在が明らかになってきた (Atkinson and Williams 2009)。*V. fischeri* で最初に発見された基本的な QS 機構を Fig. 1-7 に示す。まず AHL は、AHL 合成酵素である LuxI により合成される。LuxI は、*S*-アデノシルメチオニンとアシルキャリアータンパク質を基質として AHL を合成する。細胞内で合成された AHL は、細胞膜を透過して細胞周辺に拡散し、細胞分裂を繰り返すことで細胞密度が増加し、結果的に個々の細胞が AHL を放出することで AHL の局所濃度も上昇する。AHL 濃度がある一定値を超えると、AHL レセプタータンパク質である LuxR と AHL が結合し、複合体が形成される。AHL-LuxR 複合体は、*lux box* と呼ばれ

る QS の特異的なプロモーター配列に結合し、下流の遺伝子の発現を活性化させる (Dong et al. 2017)。

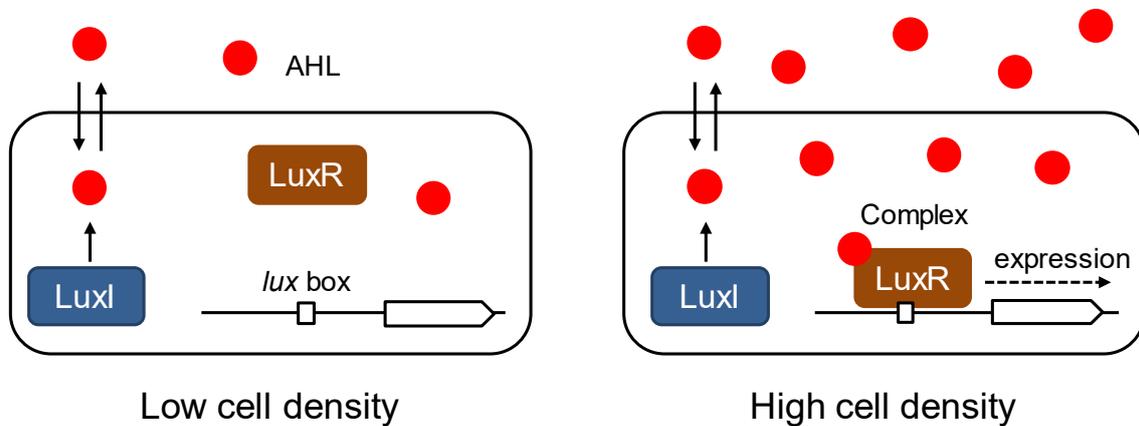


Fig. 1-7. グラム陰性細菌における AHL を介した QS の模式図

この LuxR ファミリータンパク質と AHL の複合体形成による標的遺伝子の活性化機構は、二つの転写制御型に分類される (Fig. 1-8)。一つ目の制御型は、前述の *V. fischeri* のように、AHL と LuxR の複合体が *lux box* に結合することで下流の遺伝子の転写を活性化する正の制御型である。正の制御型では、細胞密度が増大し、AHL 濃度が上昇すると、細胞内で AHL と LuxR が複合体を形成し、その複合体が標的遺伝子のプロモーターである *lux box* に結合し、転写を活性化する。二つ目の制御型は、AHL と結合していない LuxR ファミリータンパク質が *lux box* に結合し、転写をブロックする負の制御型である。例として、植物病原菌 *Pantoea stewartii* の LuxR ファミリータンパク質である EsaR による制御様式を Fig. 1-8 に示す。AHL が低濃度の場合、EsaR は *lux box* に結合しており、下流の標的遺伝子の転写をブロックしている。細胞密度が増大し、AHL 濃度が上昇すると、細胞内で AHL と EsaR が複合体を形成し、複合体は *lux box* から遊離し、転写の抑制が脱抑制に代わることで、標的遺伝子の転写が活性化する (von Bodman et al. 1998)。これらの制御型では、LuxR ファミリータンパク質による制御メカニズムは大きく異なるが、最終的に AHL 濃度の上昇とともに転写が活性化するという面では、同じ機能を有しているとも言える。

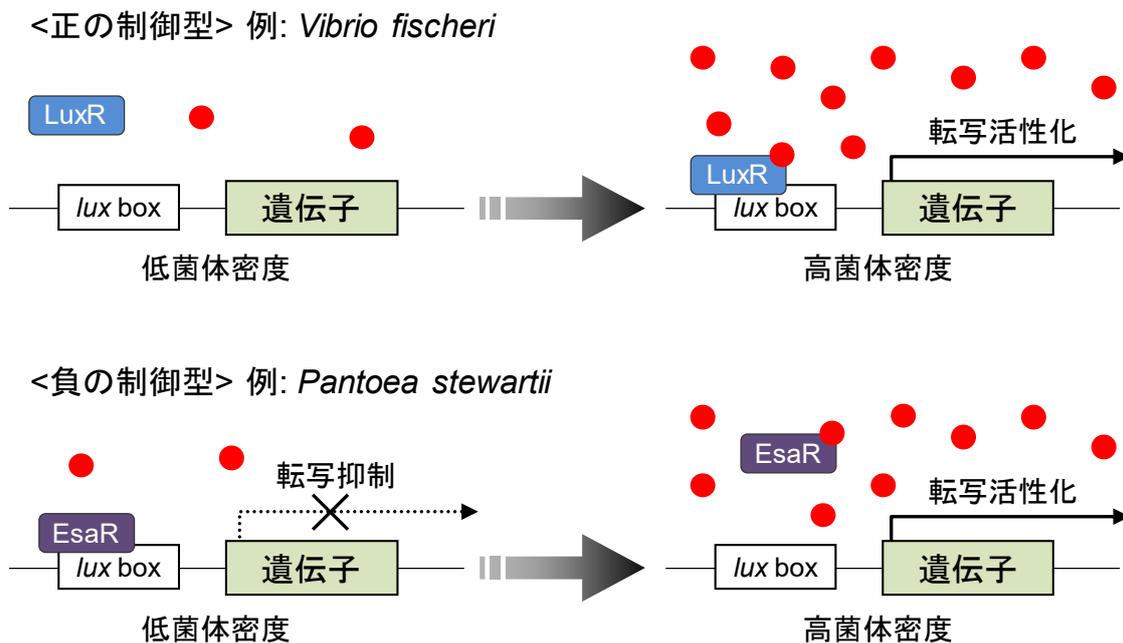


Fig.1-8. 正及び負の制御型による Quorum Sensing の転写制御機構

### 1.2.3. Quorum Sensing による抗菌物質生産制御

QS が注目されている大きな理由として、多くの病原性細菌が自身の病原性発現を QS により制御している点が挙げられる。そのため、病原菌の QS を何らかの手法により抑制することができれば、効果的に病原性発現を抑制することが可能となる (Dong *et al.* 2007)。その一方で、様々なグラム陰性細菌において、自身の抗菌物質生産が AHL を介した QS により制御されていることが明らかとなってきた。例として、*Chromobacterium violaceum* が生産し、紫色を呈するビオラセイン (McClellan *et al.* 1997)、*Serratia marcescens* が生産し、赤色を呈するプロデジオン (Morohoshi *et al.* 2007)、植物病原菌 *Pectobacterium carotovorum* が生産するカルバペネム (McGowan *et al.* 2005) 等が、AHL を介した QS により制御される抗菌物質として挙げられる。これらの細菌は、環境中に定着し、その場所で細胞密度が増加したところで一斉に抗菌物質を生産することで、生息域を保護し外部の侵入から身を守っているのではないかと考えられる。また、前述の植物保護細菌においても、QS により抗菌物質生産を制御する例が報告されている。最もよく知られているのが、*P. chlororaphis* における PHZ 生産の QS による制御である。*P. chlororaphis* には 4 種類の亜種が存在するが、その一種である

*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* においては、3 系統の QS 機構が存在しており、3 系統に含まれる 3 種類の AHL 合成遺伝子の全てが PHZ 誘導体の生産を多重制御していることが明らかとなっている (Morohoshi *et al.* 2017)。また、植物保護細菌としての報告がある *Serratia plymuthica* では、PRN の生産が QS により制御されている (Liu *et al.* 2007)。これらの細菌においては、QS を活性化することができれば、抗菌物質の生産量の向上や、抗菌物質生産の安定化が期待できるため、植物保護効果をより高める技術につながることを期待される。

### 1.3. 比較ゲノム解析

#### 1.3.1. 塩基配列決定技術と次世代シーケンサー

生物の遺伝情報を解析する上で必要不可欠な DNA の塩基配列決定技術は、1977 年に発表されたサンガー法を皮切りに (Sanger *et al.* 1977)、2004 年には約 3 Gbp のヒトゲノムが解読されるなど (International Human Genome Sequencing Consortium 2004)、現在でも飛躍的な発展を遂げている分野である。従来は、突然変異誘発などを通じて目的の遺伝子をクローニングする部分から行われていた遺伝子解析であるが、現在では、前もってゲノム配列が決定された生物を用い、遺伝子破壊やクローニングを行うポストゲノム解析が主流となっている (兼崎 2017)。

20 年ほど前までは、1 種類の生物の全ゲノム配列を決定することは、国家プロジェクトレベルの規模で行われることもあったが、塩基配列決定技術の発展とともに、細菌レベルの全ゲノム配列を決定することは、次世代シーケンサーを用いることで容易に行うことができるようになった。次世代シーケンサーは、一度に決定できる塩基配列は 100~300bp と短いものの、ランダムに断片化された数千万以上の DNA を同時並行で配列決定できることから、一度に大量の塩基配列を決定することができる (大場 2017)。また、次世代シーケンサーを用いたゲノム配列の決定においては、シーケンシングリードを繋ぎ合わせるアセンブリの技術も必要となるが、コンピュータの処理能力の向上や、バイオインフォマティクス技術の発達とともに、短時間で大量のデータを処理できるようになってきた。

新規生物の未知のゲノム配列決定は、*de novo* シーケンシングと呼ばれている。

初期の次世代シーケンサーは、前述のように一度に決定できる塩基配列が短いため、ゲノム配列中のリピート配列が存在する部分では、ゲノム上の正確な位置や、リピート数などを決定することが困難な場合がある。そこで本研究では、第3世代シーケンサーと呼ばれる一分子シーケンサーの PacBio RS II (Pacific Biosciences) を用いた。PacBio RS II は、伸長される新規 DNA 鎖が通常の DNA と同じ構造を持つため安定性が高く、長いもので数十 kb ものリードを獲得できることから、リピート配列の影響を受けにくく、安定したアセンブリが可能であるため、特に *de novo* シーケンシングで幅広く使われるようになった(大場 2017)。

### 1.3.2. 比較ゲノム解析

前述のように、生物のゲノム情報の解析技術は飛躍的な発展を遂げており、個々の生物の全遺伝情報であるゲノム配列を他の生物と比較することで、生物機能の違いを明らかにすることが可能となってきた。このような解析手法を比較ゲノム解析と呼ぶ。大規模なものでは、同一の細菌種に分類される数百以上の菌株のゲノム配列を比較することで、種内における生物学的特性の違いを明らかにする報告も増えつつある (Baltrus *et al.* 2011; Hulin *et al.* 2018)。これまでにゲノム解析が行われてきた細菌種は、動物や植物の病原菌等、社会的に重要性の高い細菌種が中心に進められてきた。そのため、ゲノム配列や遺伝子機能の比較ゲノム解析が実施できる菌種は限られており、系統的に異なる細菌種間での比較は困難な場合が多かった (Loper *et al.* 2012; Shen *et al.* 2013)。現在では、次世代シーケンサーの発展とともに、研究対象となる細菌株のゲノム情報を獲得することが容易になり、また、国際塩基配列データベースへのゲノム情報の登録数も爆発的に増加していることから、大規模な比較ゲノム解析が実施可能な土壌が出来上がってきている。

### 1.4. 研究目的

多くの細菌は、他の微生物の生育や増殖に対して阻害効果を有する抗菌物質を生産する。抗菌物質は、病原菌の増殖を抑制することが可能であることから、様々な植物や動物の感染症予防技術への応用が期待されている。細菌の種類により、生産する抗菌物質の種類や数は多種多様であり、効果的な病原菌防除技術

を確立するためには、対象となる病原菌に応じて適切な抗菌物質を生産する細菌を育種する必要がある。一方で、特に農業分野では、多くの細菌は実験室レベルでは安定した抗菌物質生産を示すものの、実際の環境中では期待される病原菌防除効果が得られないケースが多々報告されている。この理由として、細菌の抗菌物質生合成遺伝子は、複雑な遺伝子発現機構に制御されている点が挙げられる。近年、生物の遺伝情報の解析技術が飛躍的に発展しており、個々の生物の全遺伝情報であるゲノム配列を決定し、他の生物のゲノム配列と比較することで、生物的機能の相違を明らかにする比較ゲノム解析が広く行われるようになってきた。本研究では、比較ゲノム解析を用いて、細菌の抗菌物質生合成遺伝子クラスター及びその発現制御機構の多様性を明らかにすることで、抗菌物質による微生物制御技術開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

### 1.5. 参考文献

1. Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface*. 6: 959-978, 2009.
2. Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, Cherkis K, Roach J, Grant SR, Jones CD, Dangl JL. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 7: e1002132, 2011.
3. Bultreys A, Gheysen I, Wathelet B, Maraite H, De Hoffmann E. High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 69: 1143-1153, 2003.
4. Churchill ME, Chen L. Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. *Chem Rev*. 111: 68-85, 2011.
5. de Souza JT, Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, Gianinazzi-Pearson V, Raaijmakers JM. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on pythium: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93: 966-975, 2003.
6. Dong SH, Frane ND, Christensen QH, Greenberg EP, Nagarajan R, Nair SK. Molecular basis for the substrate specificity of quorum signal synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114: 9092-9097, 2017.
7. Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 362: 1201-1211, 2007.
8. Howell CR, Stipanovic RD. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70, 712-715, 1980.
9. Hulin MT, Armitage AD, Vicente JG, Holub EB, Baxter L, Bates HJ, Mansfield JW, Jackson RW, Harrison RJ. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* reveals convergent gene gain and loss associated with specialization onto cherry (*Prunus avium*). *New Phytol* 219: 672-696, 2018.

10. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945, 2004.
11. Kremer RJ, Souissi T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr Microbiol* 43: 182-186, 2001.
12. Kwak YS, Bonsall RF, Okubara PA, Paulitz TC, Thomashow LS, Weller DM. Factors impacting the activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* against take-all of wheat. *Soil Biol Biochem* 54: 48-56, 2012.
13. Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.* 180: 3187-3196, 1998.
14. Liu X, Bimerew M, Ma Y, Müller H, Ovadis M, Eberl L, Berg G, Chernin L. Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiol Lett.* 270: 299-305, 2007.
15. Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW 2nd, Lim CK, Shaffer BT, Elbourne LD, Stockwell VO, Hartney SL, Breakwell K, Henkels MD, Tetu SG, Rangel LI, Kidarsa TA, Wilson NL, van de Mortel JE, Song C, Blumhagen R, Radune D, Hostetler JB, Brinkac LM, Durkin AS, Kluepfel DA, Wechter WP, Anderson AJ, Kim YC, Pierson LS 3rd, Pierson EA, Lindow SE, Kobayashi DY, Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS, Allen AE, Paulsen IT. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* 8: e1002784, 2012.
16. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711, 1997.
17. McGowan SJ, Barnard AM, Bosgelmez G, Sebahia M, Simpson NJ, Thomson NR, Todd DE, Welch M, Whitehead NA, Salmond GP. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors

- modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol.* 55: 526-545, 2005.
18. Morohoshi T, Shiono T, Takidouchi K, Kato M, Kato N, Kato J, Ikeda T. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone. *Appl Environ Microbiol.* 73: 6339-6344, 2007.
  19. Morohoshi T, Yamaguchi T, Xie X, Wang WZ, Takeuchi K, Someya N. Complete Genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production. *Microbes Environ.* 32: 47-53, 2017.
  20. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104: 313-322, 1970.
  21. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8789-8793, 2000.
  22. Pawar S, Chaudhari A, Prabha R, Shukla R, Singh DP. Microbial pyrrolnitrin: natural metabolite with immense practical utility. *Biomolecules* 9: 443, 2019.
  23. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9: 1132-1147, 2009.
  24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977.
  25. Shen X, Hu H, Peng H, Wang W, Zhang X. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* 14: 271, 2013.
  26. Takeda R, Nakanishi I. *Pseudomonas* pigments. I. Pyoluteorin, a new chlorine-containing pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Hako Kogaku Zasshi* 36, 281-290, 1958.
  27. von Bodman SB, Majerczak DR, Coplin DL. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7687-7692, 1998.
  28. Warden JT, Edwards DL. Electron spin resonance investigations of mitochondrial

- electron transport in *Neurospora crassa*: Characterization of paramagnetic intermediates in a standard strain. *Eur J Biochem* 71: 411-418, 1976.
29. Yan Q, Philmus B, Chang JH, Loper JE. Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*. *Elife*. 6: e22835, 2017.
  30. 大場利治, 次世代を超えた DNA シーケンス技術, 95: 543-546, 2017.
  31. 兼崎友, ゲノム研究の歴史と技術革新, 生物工学会誌, 95: 136-139, 2017.
  32. 染谷信孝, 竹内香純, 諸星知広, 植物保護能力を有する蛍光性 *Pseudomonas* の機能と生態, 化学と生物 57: 541-548, 2019a.
  33. 染谷信孝, 諸星知広, *Pseudomonas chlororaphis* - 色づく植物保護細菌, 土と微生物 73: 24-33, 2019b.
  34. 土屋健一, 染谷信孝, 微生物と植物の相互作用: 病害と生物防除, ソフトサイエンス社, 2009.
  35. 本間善久, きつ抗微生物による土壌病害の生物的防除, 化学と生物, 29: 503-509, 1991.
  36. 吉田重信, 對馬誠也, 植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望, 化学と生物 51: 541-547, 2013.

## 第2章 *Serratia marcescens* における Quorum Sensing 及びプロディジオシン生合成遺伝子の比較ゲノム解析

### 2.1. 緒言

#### 2.1.1. *S. marcescens* とプロディジオシン

*S. marcescens* はグラム陰性桿菌であり、腸内細菌科に分類される (Van Houdt *et al.* 2007a)。*Serratia* 属に分類されるいくつかの菌株は、プロディジオシン (2-メチル-3-ペンチル-6-メトキシプロジギニン) と呼ばれる赤色を呈する二次代謝産物を生産することで古くから知られている (Williamson *et al.* 2006)。プロディジオシンは、抗真菌、抗細菌、抗原虫、抗マラリア、免疫抑制及び原発性ヒト癌細胞のアポトーシスを誘導する抗癌活性を有することが報告されている (Williamson *et al.* 2005)。*Serratia* 属細菌におけるプロディジオシンの生合成は、*pigA-N* または *pigA-O* からなる遺伝子クラスターによって行われている (Harris *et al.* 2004; Van Houdt *et al.* 2007a)。その一方で、プロディジオシンを生産しない *S. marcescens* も、自然環境及び臨床環境から多数分離されている (Carbonell *et al.* 2000)。*S. marcescens* は、一般的な日和見病原菌として知られているが、プロディジオシン生産と病原性との関連性は明確ではなく、プロディジオシン生産の有無に関わらず、人に対する病原性が確認されている。さらに、プロディジオシンを生産しない *S. marcescens* は、細胞毒素を生産し、抗生物質耐性も高いことから、プロディジオシンを生産する *S. marcescens* よりも毒性が強いとの報告もなされており (Roy *et al.* 2014)、プロディジオシン生産が病原性に及ぼす影響の解析が必要とされてきた。

#### 2.1.2. *S. marcescens* におけるプロディジオシン生産と Quorum Sensing

第1章でも述べたように、QS は細胞密度に依存した遺伝子制御システムであり、一定の細胞密度を超えたことを感知すると、特定の遺伝子の発現を活性化する機構である (Atkinson and Williams 2009)。多くのグラム陰性細菌は、QS のシグナル伝達分子として AHL を生産し、使用している (Parsek and Greenberg 2000)。AHL は LuxI ファミリータンパク質と呼ばれる AHL 合成酵素により、*S*-アデノシルメチオニンとアシルキャリアータンパク質から合成される (Dong, *et al.*

2017)。合成された AHL は、AHL の受容体である LuxR ファミリータンパク質に結合して複合体を形成し、この複合体形成をきっかけとして標的遺伝子の転写が制御される (Parsek and Greenberg 2000)。一部の *Serratia* 属細菌においては、プロディジオシンの生合成経路が QS により制御されていることが報告されている (Van Houdt *et al.* 2007a)。例えば、*Serratia* sp. ATCC 39006 株は、AHL として *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) と *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) を生産し、QS によりプロディジオシン生産の他に、抗菌物質として働くカルバペネム、腐敗酵素として働くペクチン酸リアーゼやセルラーゼの生産を調節している (Thomson *et al.* 2000)。*S. marcescens* SS-1 株は、AHL として *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) と C6-HSL を生産し、QS によりプロディジオシン生産の他に、Sliding motility と呼ばれる寒天表面上における運動性を制御している (Hornig, *et al.* 2002)。これらとは対照的に、プロディジオシンを生産する *S. marcescens* CH-1 株では、LuxIR による QS を介さずにプロディジオシン生産が行われていることが明らかになっている (Wei *et al.* 2006)。これらの背景から、*S. marcescens* におけるプロディジオシン生産と QS を介したその調節機構との関係性には、不明な点が多いのが現状である。

### 2.1.3. 研究目的

本研究に先駆けて、我々の研究グループでは、土壌からプロディジオシンを生産する *S. marcescens* AS-1 株を単離し、AHL を介した QS によりプロディジオシンの生産とスウォーミング運動性が制御されることを明らかにしている (Morohoshi *et al.* 2007)。AS-1 株は、AHL 合成遺伝子として *spnI*、AHL レセプター遺伝子として *spnR* を有しており、*SpnI* は AHL 合成酵素として 3-oxo-C6-HSL と C6-HSL を生合成し、*SpnR* は負の制御型の AHL レセプタータンパク質として機能している。アメリカ国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) には、様々な細菌種のゲノム情報が登録されており、*S. marcescens* においては、2018 年 10 月時点で 34 株の完全ゲノム配列が公開されている。本章では、*S. marcescens* AS-1 株のゲノム配列を次世代シーケンサーにより取得するとともに、NCBI から取得した 34 株の *S. marcescens* の完全ゲノム配列を用いた比較ゲノム解析を行うことで、*S. marcescens* における

*luxI/luxR* ホモログとプロディジオシン生合成遺伝子クラスターである *pig* クラスターの多様性と菌株間における分布を明らかにすることを目的とした。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の取得

2.1.3 に記載したように、AHL とプロディジオシンを生産する *S. marcescens* AS-1 株は、過去の研究で土壌サンプルから分離された。AS-1 株は、4 mL の LB 液体培地に植菌し、150 rpm で振とうしながら 30 °C で 18 時間培養した。培養液 200  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブに取り、20,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、培養上清を完全に除去して AS-1 株細胞を取得した。細胞からのゲノムの抽出には、DNeasy® Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用い、キットに付属のプロトコールに従い、ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA については、Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, Broad Range (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。AS-1 株のゲノム配列のシーケンシングは、次世代シーケンサーの PacBio RSII (Pacific Biosciences) を用いて行った。ライブラリー調製には、SMRTbell Template Prep Kit 1.0 (Pacific Biosciences) を使用し、株式会社マクロジェン・ジャパンの次世代シーケンス受託サービスにより、シーケンシングリードを取得した。

### 2.2.2. シーケンシングリードのアセンブル及びアノテーション

取得したシーケンシングリードのアセンブルを行うため、PacBio RSII システムに代表されるロングリードシーケンサーに最適化されたアセンブラプログラムである Canu プログラム ver. 1.7 (Koren *et al.* 2017) を使用した。Canu プログラムに用いるパラメータはデフォルトの値を使用し、推定ゲノムサイズは 5 Mbp とした。アセンブルで得られたスキュフォールドは、末端の重複部分をテキストエディタで検索して環状化した。環状化したスキュフォールドは、微生物ゲノム用アノテーションパイプラインである DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) により、アノテーションを行った (Tanizawa *et al.* 2018)。具体的には、コーディング配列 (CDS) は Prodigal プログラム ver. 2.6.3 により予測した (Hyatt *et al.* 2010)。tRNA をコードする配列は Aragorn プログラム ver. 1.2.38 (Laslett and Canback

2004) により予測した。rRNA をコードする配列は、Barrnap プログラム ver. 0.8 (<https://github.com/tseemann/barrnap>) により予測した。最終的に得られたアノテーション済の全ゲノム配列は、国立遺伝学研究所 DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の Mass Submission System (MSS) を通じて国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に登録し、AS-1 株の染色体は AP019009、内在性プラスミドは AP019010 のアクセッション番号を取得した。環状ゲノムのグラフィカルマップは、CGView Server (Grant and Stothard 2008) を使用して作成した。既に国際塩基配列データベースに登録されている *S. marcescens* に属する 34 菌株の全ゲノム配列は、NCBI Genome Web サイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) から、2018 年 10 月 15 日の時点のものを取得した (Table 2-1)。ゲノム解析ソフトには In silico Molecular Cloning Genomics Edition (インシリコバイオロジー) を使用した。相同性検索には BLAST プログラムを使用した (Altschul *et al.* 1990)。LuxI アミノ酸配列に基づく系統樹は、MEGA 7.0 プログラムに含まれる ClustalW プログラムを使用した近隣結合法を使用して作成した (Kumar *et al.* 2016)。全ゲノムアラインメントに基づく系統樹は、REALPHY プログラム ver. 1.12 を使用して作成した (Bertels *et al.* 2014)。

Table 2-1. 本研究の比較ゲノム解析に使用した *S. marcescens* 34 菌株の詳細 (Sakuraoka *et al.*  
Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

菌株	分離源	アクセッション番号
332	臨床分離株	CP021164
AR_0027	臨床分離株	CP026702 - CP026703
AR_0091	臨床分離株	CP027533
AR_0099	臨床分離株	CP027539
AR_0121	臨床分離株	CP028949
AR_0122	臨床分離株	CP029746
AR_0123	臨床分離株	CP028948
AR_0124	臨床分離株	CP028946
AR_0130	臨床分離株	CP028947
AR_0131	臨床分離株	CP029715
B3R3	トウモロコシ	CP013046 - CP013047
CAV1492	臨床分離株	CP011637 - CP011642
CAV1761	臨床分離株	CP029444 - CP029449
Db11	昆虫	HG326223
FDAARGOS_65	臨床分離株	CP026050
N4-5	土壌	CP031315 - CP031316
RSC-14	イヌホオズキ	CP012639
SGAir0764	大気	CP027300 - CP027301
SM39	臨床分離株	AP013063 - AP013065
SMB2099	臨床分離株	HG738868
SmUNAM836	臨床分離株	CP012685 - CP012686
U36365	臨床分離株	CP016032
UMH1	臨床分離株	CP018915 - CP018916
UMH2	臨床分離株	CP018924
UMH3	臨床分離株	CP018925
UMH5	臨床分離株	CP018917 - CP018918
UMH6	臨床分離株	CP018926
UMH7	臨床分離株	CP018919 - CP018922
UMH8	臨床分離株	CP018927
UMH9	臨床分離株	CP018923
UMH10	臨床分離株	CP018928
UMH11	臨床分離株	CP018929
UMH12	臨床分離株	CP018930
WW4	製紙機械	CP003959 - CP003960

## 2.3. 実験結果及び考察

### 2.3.1. *S. marcescens* AS-1 株の全ゲノム解析

*S. marcescens* AS-1 株のゲノムを抽出し、PacBio RSII プラットフォームでシーケンシング解析を行った。その結果、平均塩基対 15,150 bp のシーケンシングリードが 97,080 個得られ、最終的に取得した塩基対の総数は 1,470,807,268 bp であった。これらのシーケンシングリードを用いて、Canu プログラムでアセンブルを行ったところ、5,097,044 bp 及び 130,881 bp と大きさの異なる 2 つのスキファールドが得られた。両方のスキファールドの末端部分には重複配列が含まれていたため、重複部分を除去して環状 DNA に変換した。その結果、AS-1 株のゲノムは、1 つの環状染色体と、1 つの内在性プラスミドで構成されることが明らかとなった (Fig. 2-1)。最終的に、染色体のサイズは 5,071,908 bp で平均 GC 含量は 59.6% であり、pSERAS01 と命名した内因性プラスミドのサイズは 104,121 bp で平均 GC 含有量は 54.8% であった。この結果を基に、最終的に計算されるカバレッジは×284 となった。

得られたスキファールドについて、DFAST パイプラインを用いてアノテーションを行った。その結果、AS-1 株の染色体には CDS が 4,657 個、rRNA 遺伝子が 22 個で 16S rRNA-5S rRNA-23S rRNA オペロンとしては 7 組、tRNA 遺伝子が 93 個、tRNA と mRNA の両方の性質を持つ tmRNA が 1 個存在すると推測された。また、内在性プラスミド pSERAS01 には CDS が 94 個存在すると推測されたが、RNA と予測される配列は存在していなかった。

本研究で決定した AS-1 株の全ゲノム情報と国際塩基配列データベースに登録されている *S. marcescens* ゲノム情報を比較するため、*S. marcescens* 34 菌株の完全ゲノム配列を DDBJ/ENA/GenBank データベースから取得した (Table 2-2)。全てのゲノムサイズは 5 Mbp 前後であったが、内在性プラスミドを有する菌株は半数程度であり、最大で 5 個の内在性プラスミドを有している株も存在していた。内因性プラスミドの大きさは互いに異なり、3~200 kbp の範囲であった。AS-1 株のプラスミド pSERAS01 は、SGAir0764 株のプラスミドと一部で相同性を示したものの、全体的に相同性の高いプラスミドは存在しなかった。次に、AS-1 株及び国際塩基配列データベースから入手した *S. marcescens* の染色体配列を用いてゲノム系統樹を作成し、各菌株のゲノム間の相関性を解析した。その結果、

使用した *S. marcescens* 35 菌株の染色体配列は、ゲノム系統樹から 5 つのシーケンシングクレードに分類できることが明らかとなった (Fig. 2-2)。

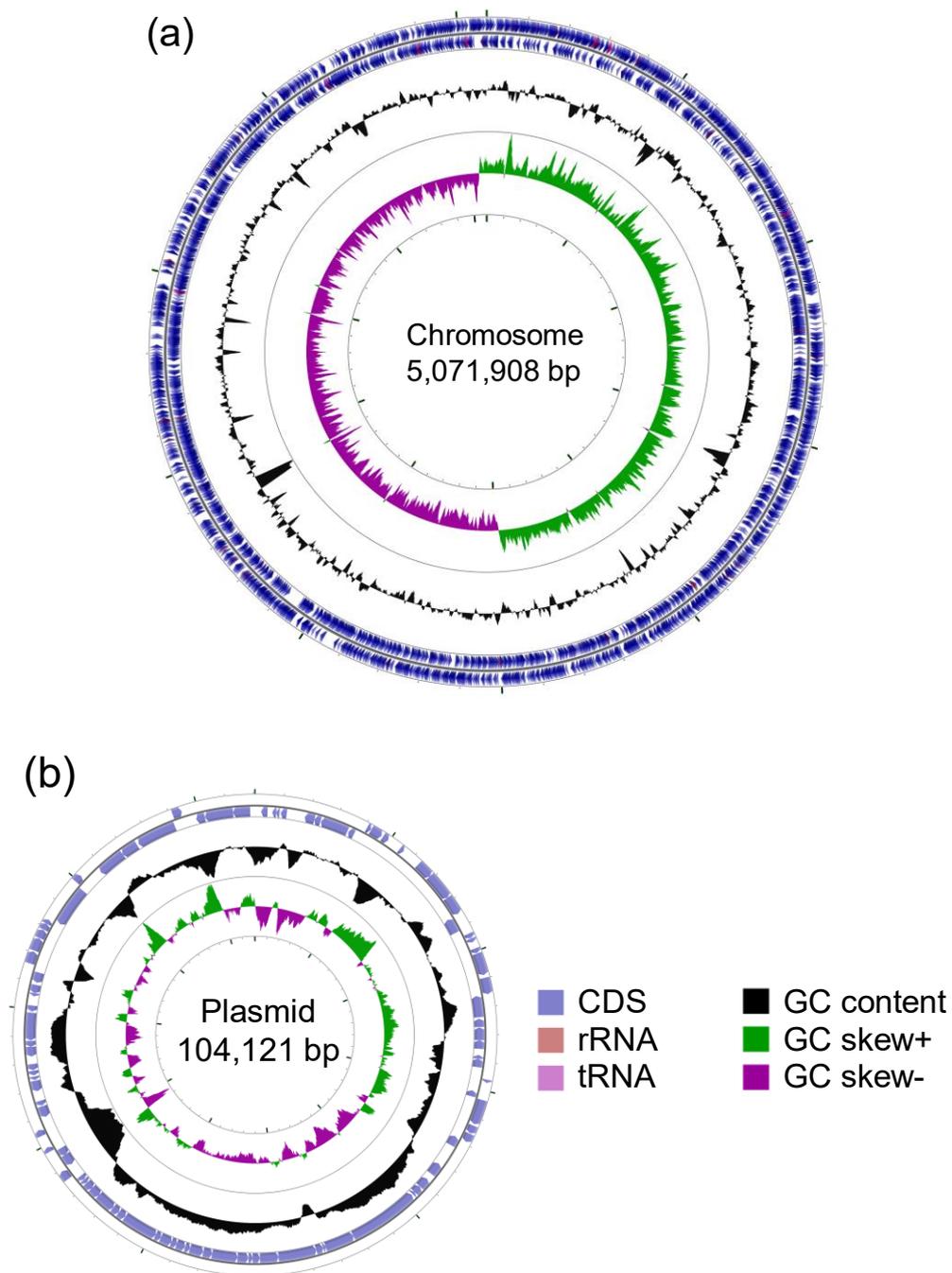


Fig. 2-1. *S. marcescens* AS-1 株の染色体 (a) とプラスミド pSERAS01 (b) のグラフィックマップ。CDS、rRNA、tRNA、GC 含量、GC-skew を含むグラフマップは CGView Server を用いて作成した。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

Table 2-2. *S. marcescens* AS-1 株及び DDBJ/ENA/GenBank データベースに登録されている *S. marcescens* 34 菌株の全ゲノム情報の概要 (Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

菌株	塩基数 (bp)					
	染色体	プラスミド1	プラスミド2	プラスミド3	プラスミド4	プラスミド5
AS-1	5,071,908	104,121	—	—	—	—
332	5,059,456	—	—	—	—	—
AR_0027	5,472,946	22,569	—	—	—	—
AR_0091	5,309,542	—	—	—	—	—
AR_0099	5,284,831	—	—	—	—	—
AR_0121	5,140,918	—	—	—	—	—
AR_0122	5,140,912	—	—	—	—	—
AR_0123	5,140,937	—	—	—	—	—
AR_0124	5,180,277	—	—	—	—	—
AR_0130	5,138,817	—	—	—	—	—
AR_0131	5,140,937	—	—	—	—	—
B3R3	5,471,721	123,171	—	—	—	—
CAV1492	5,477,084	199,444	73,100	69,158	6,393	3,223
CAV1761	5,540,160	204,825	73,100	69,158	6,393	3,223
Db11	5,113,802	—	—	—	—	—
FDAARGOS_65	5,248,423	—	—	—	—	—
N4-5	5,074,473	11,089	—	—	—	—
RSC-14	5,127,030	—	—	—	—	—
SGAir0764	5,142,714	76,484	—	—	—	—
SM39	5,225,577	58,929	41,517	—	—	—
SMB2099	5,123,091	—	—	—	—	—
SmUNAM836	5,207,023	26,346	—	—	—	—
U36365	5,125,866	—	—	—	—	—
UMH1	5,056,149	73,532	—	—	—	—
UMH2	5,308,626	—	—	—	—	—
UMH3	5,300,955	—	—	—	—	—
UMH5	5,357,156	100,699	—	—	—	—
UMH6	5,192,910	—	—	—	—	—
UMH7	5,182,841	111,810	47,264	21,738	—	—
UMH8	5,155,137	—	—	—	—	—
UMH9	5,024,591	—	—	—	—	—
UMH10	5,221,713	—	—	—	—	—
UMH11	5,221,717	—	—	—	—	—
UMH12	5,196,805	—	—	—	—	—
WW4	5,241,455	3,248	—	—	—	—

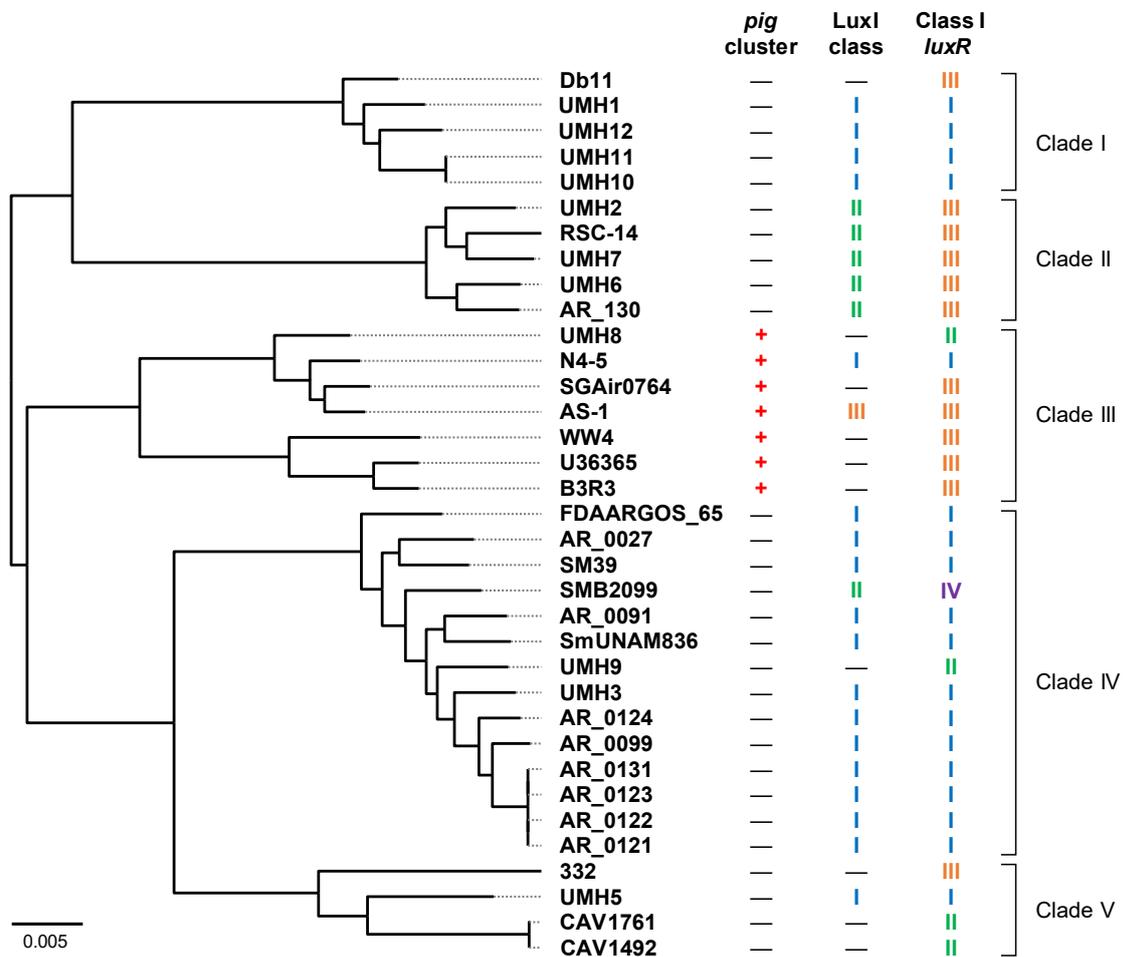


Fig. 2-2. *S. marcescens* 35 菌株の染色体を用いたゲノム系統樹。 *pig* クラスター、LuxI アミノ酸配列の分類、クラス I *luxR* 遺伝子周辺配列の分類、系統樹のクレードは右側に示す。  
(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

### 2.3.2. *S. marcescens* における QS 遺伝子群の比較ゲノム解析

AS-1 株を含む *S. marcescens* の全ゲノム配列を用い、BLAST プログラムにより *luxI* 遺伝子の存在を検索した結果、35 株中 25 株に AHL 合成遺伝子である *luxI* と相同性を示す遺伝子配列が存在することが明らかとなった (Fig. 2-2)。次に、これらの菌株由来の LuxI ホモログのアミノ酸配列を用い、ClustalW プログラムによりアライメントを作成後、MEGA 7 プログラムを用いた近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2-3)。アミノ酸配列の 95% 同一性を指標にクラスタリングを行った結果、LuxI アミノ酸配列は 3 つのクラスに分類されることが明らか

となった。

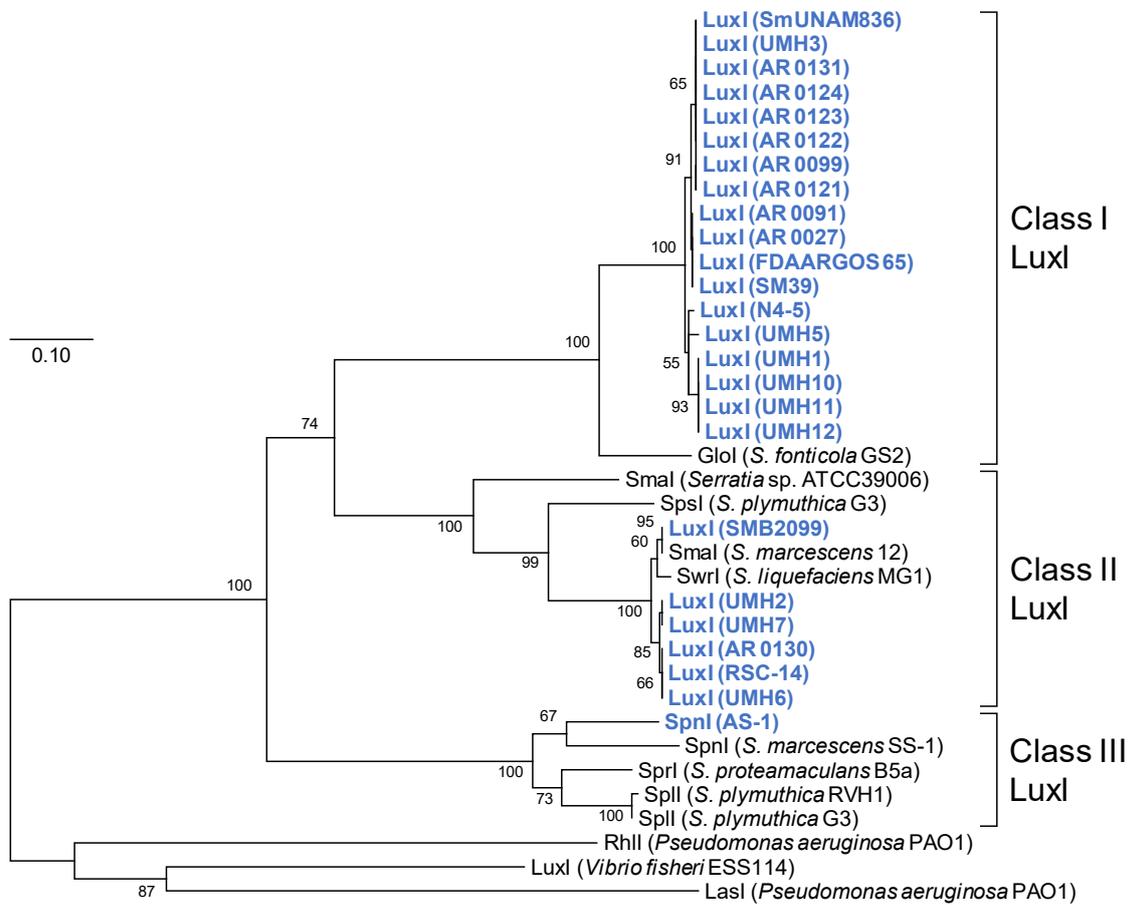


Fig. 2-3. *S. marcescens* 由来 LuxI のアミノ酸配列に基づく系統樹。ブートストラップテストは 1000 回で実施し、ブートストラップ値は各枝の横に示した。スケールバーは 10% の相違塩基を示す。系統樹作成のためのアウトグループとして、*Vibrio fischeri* ESS114 由来の LuxI (UniProt アクセション番号 P35328)、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 由来の RhII (P54291)、LasI (P33883) を使用した。本研究の比較ゲノム解析で明らかになった LuxI ホモログは青色で示す。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

*S. marcescens* 由来 LuxI のクラス分類について、クラス I LuxI には、18 菌株由来の LuxI ホモログが含まれており、全体として最も支配的なクラスであった。クラス II LuxI には、6 菌株由来の LuxI ホモログが含まれていた。Fig. 2-2 に示すゲノム系統樹と LuxI クラスの分布を比較したところ、クラス I LuxI は、クレード II を除くすべてのグループに広く分布していたが、クラス II LuxI は、大部分がクレード II に分類される菌株が保有しており、LuxI のクラス分類とゲノム

系統樹を基にしたシーケンシングクレードとの間には何らかの関連性が存在する可能性が示唆された。クラス III LuxI は、クレード III の AS-1 株のみが保有していた。AS-1 株と同じくクレード III に分類される N4-5 株はクラス I LuxI を保有していたことから、AS-1 株では、クラス III LuxI は他の菌株とは異なる経路で獲得したものである可能性が示唆された。

Fig. 2-3 の LuxI ホモログのアミノ酸配列に基づく系統樹から、クラス I LuxI は、*Serratia fonticola* GS2 株の AHL 合成酵素 GloI (DDBJ/ENA/GenBank アクセション番号 KX257356) と高い相同性を示すことが明らかとなった。*S. fonticola* GS2 株は、C6-HSL と *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) を生成することが過去の報告で明らかになっており (Jung *et al.* 2017)、クラス I LuxI も同様の構造の AHL を生合成する可能性が考えられる。次に、クラス I LuxI を保有する菌株のゲノム配列の中から、クラス I *luxI* 遺伝子と、それと対になって存在する AHL レセプター遺伝子 *luxR* (クラス I *luxR* 遺伝子) のホモログがコードされる領域の配列の比較を行ったところ、*luxI* 及び *luxR* 遺伝子は相対する方向で隣接して存在しており、*luxR/luxI* 領域の上流には、リポ多糖輸出システムパーミアーズと推測される *lptF*、*lptG* 遺伝子ホモログと DeoR ファミリー転写調節因子と推測される *glcR* 遺伝子ホモログが、下流にはグリオキサラーゼと推測される *gloA1* 遺伝子ホモログが存在し、*luxR/luxI* 遺伝子はその間に配置されていることが明らかになった (Fig. 2-4)。興味深いことに、クラス I LuxI を保有しない菌株についても、クラス I *luxR* 遺伝子は全ての菌株で保存されていることが明らかになった。このクラス I *luxR* 遺伝子周辺の配列は、4 つのタイプに分類されることが明らかとなった (Fig. 2-4)。まず、タイプ I は、クラス I LuxI を保有する菌株が有する配列であり、前述のように *luxR/luxI* 遺伝子は *glcR* 遺伝子と *gloA1* 遺伝子の間に配置されている。タイプ II については、タイプ I から *luxI* 遺伝子のみが欠失した配列となっていた。タイプ III とタイプ IV は *luxR/luxI* 遺伝子の下流が完全に異なっており、タイプ III は tRNA-Leu が、タイプ IV は *gntP* 遺伝子が配置されていた。また、Fig. 2-2 のゲノム系統樹からは、クラス I *luxR* の周辺配列タイプとシーケンシングクレードとの間に関連性は見られなかった。

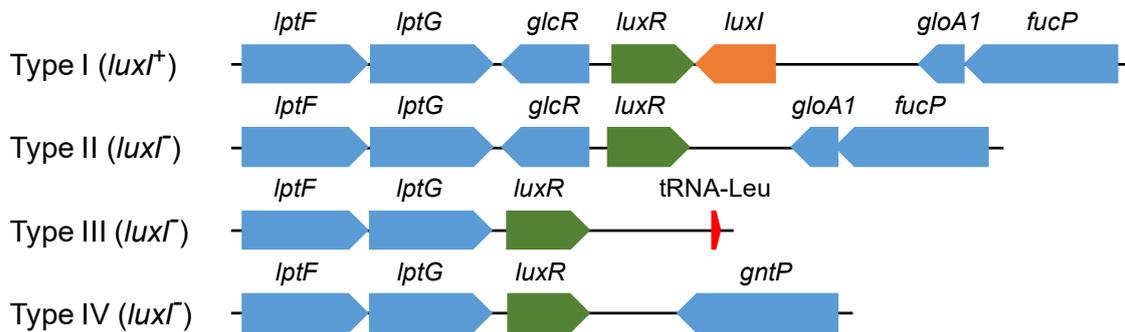


Fig. 2-4. クラス I *luxI/luxR* 遺伝子とその周辺配列。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、オレンジ色はクラス I *luxI* 遺伝子、緑色はクラス I *luxR* 遺伝子、赤色は tRNA、青色はその他の遺伝子をそれぞれ示す。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

Fig. 2-3 の系統樹から、クラス II LuxI は、*S. marcescens* 12 株の SmaI (Coulthurst *et al.* 2006)、*S. liquefaciens* MG1 株の SwrI (Givskov *et al.* 1998)、*Serratia* sp. ATCC 39006 株の SmaI (Thomson *et al.* 2000)、*S. plymuthica* G3 株の SpsI (Liu *et al.* 2011) と相同性を示すことが明らかとなった。これらの LuxI ホモログは AHL として C4-HSL 及び C6-HSL を生成することが報告されており、クラス II LuxI も同様の構造の AHL を生合成する可能性が考えられる。クラス II *luxI* 遺伝子と *luxR* 遺伝子は、外膜リパーゼ遺伝子ホモログ (*estA*) とグリシン tRNA シンテターゼ遺伝子ホモログ (*glyQ*) の間に位置していたが、クラス II LuxI を持たない他の菌株では、*estA* と *glyQ* の間の領域は完全に消失していた (Fig. 2-5)。

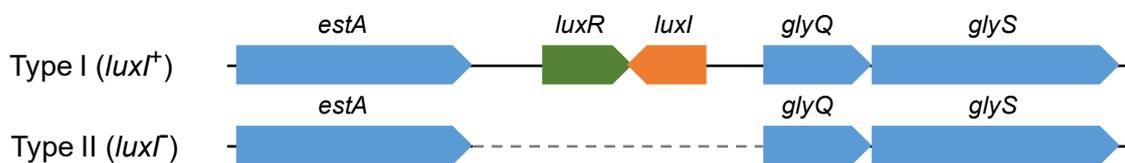


Fig. 2-5. クラス II *luxI/luxR* 遺伝子とその周辺配列。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、オレンジ色はクラス II *luxI* 遺伝子、緑色はクラス II *luxR* 遺伝子、青色はその他の遺伝子、破線は欠失部位をそれぞれ示す。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

今回用いた *S. marcescens* 35 菌株の中では、クラス III LuxI は AS-1 株のみが保有している。前述のように、AS-1 株のクラス III LuxI (SpnI) は C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL の 2 種類の AHL を合成する (Morohoshi *et al.* 2007)。AS-1 株の SpnI は、*S. marcescens* SS-1 株の SpnI (Horng *et al.* 2002)、*S. proteamaculans* B5a 株の SpnI (Christensen *et al.* 2003)、*S. plymuthica* RVH1 株の SpnI (Van Houdt *et al.* 2007b)、*S. plymuthica* G3 株の SpnI (Liu *et al.* 2011) と相同性を示すが、これらの LuxI ホモログは 3-oxo-C6-HSL を生成することが報告されている。今回の比較ゲノム解析で明らかになった *luxI* 遺伝子を保有する *S. marcescens* 菌株について、AS-1 株を除く 24 菌株全てが、*luxI* 遺伝子を染色体上に有していた。その一方で、AS-1 株の *spnI* 遺伝子だけが、内在性プラスミドである pSERAS01 に配置していた。*S. marcescens* SS-1 株は AS-1 株と高い相同性を示す *spnI* 遺伝子を有しており、その周辺配列も報告されている (Horng *et al.* 2002)。そこで、AS-1 株と SS-1 株の *spnI/spnR* 遺伝子の周辺配列の比較を行った (Fig. 2-6)。その結果、AS-1 株と SS-1 株の SpnI 及び SpnR はアミノ酸レベルで 89% の高い同一性を示しており、周辺配列も類似していた。特に、AS-1 株の *spnI* 遺伝子上流にある *pinR* 遺伝子は、SS-1 株においても *spnT* 遺伝子を挟んで上流に存在しており、アミノ酸レベルで 89% と高い同一性を示した。また、両菌株ともに *pinR* 遺伝子上流には推定トランスポザーゼ遺伝子が存在しており、そのアミノ酸配列は部分的に 97% と非常に高い同一性を示した。SS-1 株については、*spnI/spnR* 遺伝子からなる QS システムは、トランスポゾン転移により獲得したものと考えられている (Wei, *et al.*, 2006)。AS-1 株においても、*spnI/spnR* 遺伝子周辺領域が SS-1 株のものと類似しており、さらに上流に推定トランスポザーゼ遺伝子が存在していたことから、AS-1 株の *spnI/spnR* 遺伝子からなる QS システムも、トランスポゾン転移によって pSERAS01 プラスミドに挿入されて獲得した可能性が考えられる。

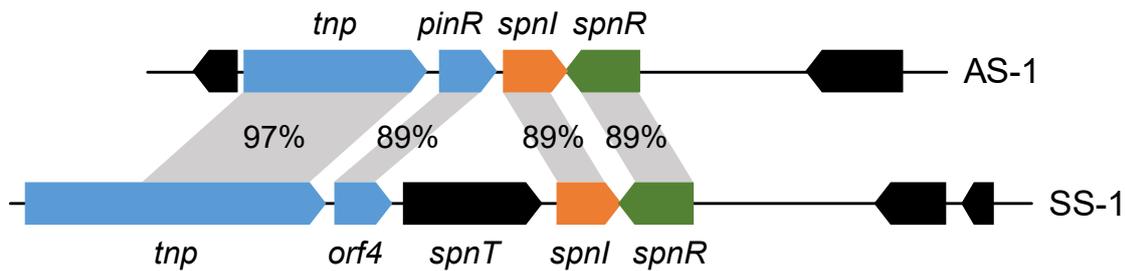


Fig. 2-6. クラス III *luxI/luxR* 遺伝子とその周辺配列。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、オレンジ色はクラス III *luxI* 遺伝子、緑色はクラス III *luxR* 遺伝子、青色は *pinR* 及び推定トランスポザゼ遺伝子 (*tnp*)、黒色はその他の遺伝子をそれぞれ示す。各遺伝子のアミノ酸配列の相同性はグレーの領域中に示す。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

プロデジオシン生合成遺伝子群である *pig* クラスタは、*S. marcescens* ATCC 274 及び ATCC 39006 株から同定され、塩基配列が報告されている (Harris *et al.* 2004)。そこで、これらの菌株の *pig* クラスタの塩基配列を基にした BLAST 検索を行った結果、比較ゲノム解析で用いた *S. marcescens* 35 菌株の中で、Fig. 2-2 に示すゲノム系統樹のクレード III に属する 7 菌株のみが、ゲノム配列中に *pig* クラスタを保有しており、その配列は ATCC 274 株の *pig* 遺伝子クラスターと 98% 以上の高い同一性を示していた。これらの菌株では、*pig* クラスタは、MerR ファミリー転写調節遺伝子 (*cueR*) と銅トランスポーター ATPase 遺伝子 (*copA*) の間に位置していたが、*pig* クラスタを持たない菌株では、*cueR* 遺伝子と *copA* 遺伝子の間の領域が完全に欠失していた (Fig. 2-7)。SS-1 株 (Hornig *et al.* 2002) 及び AS-1 株 (Morohoshi *et al.* 2007) では、プロデジオシン生産が AHL を介した QS により制御されることが報告されている。しかしながら、本研究における比較ゲノム解析の結果では、*S. marcescens* 35 菌株の中で、AS-1 株と N4-5 株の 2 株しか *luxI* 遺伝子と *pig* クラスタの両方を保有していなかった (Fig. 2-2)。また、*S. marcescens* 332 株、CAV1492 株、CAV1761 株、Db11 株、UMH9 株は、ゲノム中に *luxI* 遺伝子と *pig* クラスタのどちらも保有していなかった (Fig. 2-2)。そのため、プロデジオシンと QS 機構は、*S. marcescens* のライフサイクルの中で、必須な機能ではないことが考えられる。

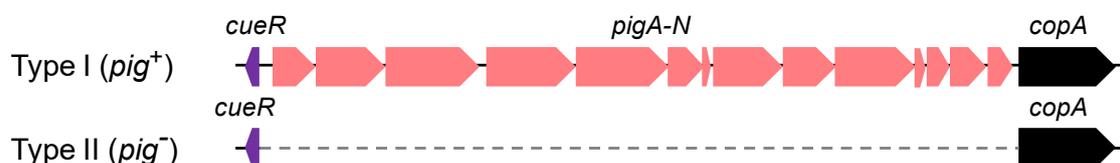


Fig. 2-7. *pig* クラスタとその周辺配列。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、ピンク色は *pig* クラスタ遺伝子群、紫色は *cueR* 遺伝子、黒色は *copA* 遺伝子、破線は欠失部位をそれぞれ示す。(Sakuraoka *et al.* Genome Biol Evol 11: 931-936, 2019 より引用)

緒言で述べたように、LuxR による QS 制御様式は、正の制御型と負の制御型の二種類が存在するが、AS-1 株と SS-1 株の AHL レセプターである SpnR は負の制御因子として働き、*pig* クラスタのプロモーターに結合して転写を抑制しているが、AHL と複合体を形成するとプロモーターから遊離し、*pig* クラスタの発現が活性化してプロディジオシン生産が行われる (Horng *et al.* 2002; Tao *et al.* 2008)。そのため、*spnR* 遺伝子を破壊すると、*pig* クラスタの発現が常に活性化した状態となり、菌体密度の上昇とは関係なく構成的にプロディジオシン生産が行われるようになる (Wei *et al.* 2006; Tao *et al.* 2008)。前述のように、AS-1 株の *spnI/spnR* 遺伝子はトランスポゾン転移により獲得した可能性が高く、*spnI/spnR* 遺伝子を獲得する前は、QS とは関係なく構成的にプロディジオシン生産が行われていたものと考えられる。そのため、AS-1 株ではトランスポゾン転移により、結果的にプロディジオシン生産が QS の制御下になったが、QS を獲得する以前でも、プロディジオシン生産は正常に行われていたものと推察される。以上より、*S. marcescens* においてはプロディジオシン生産の制御のために QS はそもそも必須ではなく、進化の過程で QS による制御様式を獲得したものと考えられる。

## 2.4. 小括

本章では、土壌より単離した *S. marcescens* AS-1 株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより明らかにし、国際塩基配列データベースに登録されている *S. marcescens* 34 菌株の全ゲノム配列と合わせた比較ゲノム解析を行い、赤色を呈

する抗菌物質であるプロディジオシン生産に関わる遺伝子の多様性解析を行った。プロディジオシン生合成遺伝子群である *pig* クラスタは、ゲノム系統樹で明らかになった 5 種類のシーケンシングクレードの中でもクレード III に分類される菌株のみが保有しており、特定の分類群しかプロディジオシン生産能を持たないことが明らかとなった。*S. marcescens* のプロディジオシン生産は、細胞密度依存的遺伝子発現機構である QS により制御されることが知られているが、QS のシグナル物質である AHL の合成遺伝子である *luxI* は、*pig* クラスタの有無に関わらず全てのシーケンシングクレードに分布しており、そのアミノ酸配列の相同性から、3 種類の配列クラスに分類できることが明らかとなった。AS-1 株が有する *luxI* 遺伝子 (*spnI*) はクラス III に分類されるが、クラス III *LuxI* は AS-1 のみが保有しており、他の菌株では *luxI* 遺伝子が全て染色体上に配置していたのに対し、AS-1 株のみが内在性プラスミド上に配置していた。*spnI* 遺伝子の周辺配列を調べたところ、過去に報告のある *S. marcescens* SS-1 株の *spnI* 遺伝子の周辺配列と高い類似性を示し、上流には推定トランスポザナーゼ遺伝子が存在していた。以上より、AS-1 株は元々プロディジオシン生産が QS に制御されていなかったが、トランスポゾン転移により内在性プラスミドに *spnI* 遺伝子が挿入したことにより、プロディジオシン生産が QS の制御下になった可能性が考えられる。

*S. marcescens* は、そのコロニーが特徴的な赤色を呈することで古くから知られた菌種であるが、今回の比較ゲノム解析を通じて、プロディジオシン生産は必ずしも *S. marcescens* に必須な機能ではなく、一様に QS に制御されているわけではないことが初めて明らかになった。今後は、*S. marcescens* が進化の過程でどのように *pig* クラスタや QS 遺伝子群を獲得したか明らかにすることで、抗菌物質生産がどのように細菌種に広まっていったかの手掛かりがつかめるかもしれない。

## 2.5. 参考文献

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1990.
2. Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6: 959-978, 2009.
3. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol* 31: 1077-1088, 2014.
4. Carbonell GV, Della Colleta HH, Yano T, Darini AL, Levy CE, Fonseca BA. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28: 143-149, 2000.
5. Christensen AB, Riedel K, Eberl L, Flodgaard LR, Molin S, Gram L, Givskov M. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology* 149: 471-483, 2003.
6. Coulthurst SJ, Williamson NR, Harris AK, Spring DR, Salmond GP. Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* 152: 1899-1911, 2006.
7. Dong SH, Frane ND, Christensen QH, Greenberg EP, Nagarajan R, Nair SK. Molecular basis for the substrate specificity of quorum signal synthases. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 9092-9097, 2017.
8. Givskov M, Ostling J, Eberl L, Lindum PW, Christensen AB, Christiansen G, Molin S, Kjelleberg S. Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 180: 742-745, 1998.
9. Grant JR, Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36: W181-184, 2008.
10. Harris AKP, Williamson NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Foulds I, Simonsen HT, Leeper FJ, Salmond GPC. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* 150: 3547-3560, 2004.

11. Horng YT, Deng SC, Daykin M, Soo PC, Wei JR, Luh KT, Ho SW, Swift S, Lai HC, Williams P. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 45: 1655-1671, 2002.
12. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11: 119, 2010.
13. Jung BK, Khan AR, Hong SJ, Park GS, Park YJ, Park CE, Jeon HJ, Lee SE, Shin JH. Genomic and phenotypic analyses of *Serratia fonticola* strain GS2: a rhizobacterium isolated from sesame rhizosphere that promotes plant growth and produces *N*-acyl homoserine lactone. *J Biotechnol* 241: 158-162, 2017.
14. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27: 722-736, 2017.
15. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874, 2016.
16. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 32: 11-16, 2004.
17. Liu X, Jia J, Papat R, Ortori CA, Li J, Diggie SP, Gao K, Cámara M. Characterization of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. *BMC Microbiol* 11: 26, 2011.
18. Morohoshi T, Shiono T, Takidouchi K, Kato M, Kato N, Kato J, Ikeda T. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of *N*-acylhomoserine lactone. *Appl Environ Microbiol* 73: 6339-6344, 2007.
19. Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8789-8793, 2000.
20. Roy P, Ahmed NH, Grover RK. Non-pigmented strain of *Serratia marcescens*: an unusual pathogen causing pulmonary infection in a patient with malignancy. *J Clin*

Diagn Res 8: DD05-DD06, 2014.

21. Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34: 1037-1039, 2018.
22. Tao Y, Morohoshi T, Kato N, Ikeda T, Zhuang H. The function of SpnR and the inhibitory effects by halogenated furanone on quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48: 391-397, 2008.
23. Thomson N, Crow M, McGowan S, Cox A, Salmond G. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* 36: 539-556, 2000.
24. Van Houdt R, Givskov M, Michiels CW. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev* 31: 407-424, 2007a.
25. Van Houdt R, Moons P, Aertsen A, Jansen A, Vanoirbeek K, Daykin M, Williams P, Michiels CW. Characterization of a *luxI/luxR*-type quorum sensing system and *N*-acyl-homoserine lactone-dependent regulation of exo-enzyme and antibacterial component production in *Serratia plymuthica* RVH1. *Res Microbiol* 158: 150-158, 2007b.
26. Wei JR, Tsai YH, Horng YT, Soo PC, Hsieh SC, Hsueh PR, Horng JT, Williams P, Lai HC. A mobile quorum-sensing system in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 188: 1518-1525, 2006.
27. Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, Salmond GP. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* 4: 887-899, 2006.
28. Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RAA, Goldet G, Slater H, Woodley L, Leeper FJ, Salmond GPC. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylopyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 56: 971-989, 2005.

## 第3章 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌における抗菌物質生合成遺伝子の比較ゲノム解析

### 3.1. 緒言

#### 3.1.1. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌と植物保護

*Pseudomonas* 属細菌は、最も多様な細菌分類の一種であり、様々な環境中に分布していることが明らかになっている (Peix *et al.* 2009)。これらの *Pseudomonas* 属細菌の中には、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌と呼ばれる分類グループが存在する。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌は、紫外線の照射下で青から青緑色の蛍光する蛍光色素を生産することで古くから知られている (Bultreys *et al.* 2003)。また、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の多くは、植物病原菌に対して様々な抗菌物質を生産し、植物を病害から守る植物保護効果を発揮することが明らかとなっている (Höfte and Altier 2010)。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が生産する抗菌物質の種類は多種多様であり、良く知られている抗菌物質としては、第1章でも紹介した PHL、PLT、PRN、PHZ などが挙げられる (Gross and Loper 2009)。これらの抗菌物質は、自身の抗菌スペクトル内の植物病原菌に対して増殖阻害効果を示し、高い植物保護効果を示すことが明らかになっている (Howell and Stipanovic 1979, 1980; He *et al.* 2004)。植物保護効果を有する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌を微生物製剤として用いた例は既に存在し、「ベジキーパー水和剤」や「セル苗元気」等の商品名で上市されている。しかしながら、微生物製剤は化学農薬と比べて植物保護効果が不安定であることが大きな問題点として挙げられている。抗菌物質生産は植物保護効果の安定化に大きな役割を果たしていると考えられるが、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌における抗菌物質生合成遺伝子群の多様性はほとんど明らかにされてこなかった。

#### 3.1.2. 研究目的

本研究グループでは、日本各地で採取した植物の根から、3,000 株以上の蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌を分離し、抗菌物質生合成遺伝子の存在を網羅的にスクリーニングしてきた (Someya *et al.* 2020)。これらの菌株の中から、主要な抗菌物質生合成遺伝子を1つ以上有する菌株を選抜し、16S rRNA 配列に基づくクラ

スター解析を行ったところ、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌は 10 種類の操作的分類単位 (Operational Taxonomic Units: OTU) に分類できることが明らかとなった (Fig. 3-1)。OTU とは、ある一定以上の類似性を持つ配列同士を 1 つの菌叢のように扱うための操作上の分類単位のことであり、一般的には 96~97% の同一性を OTU 分類の指標とする場合が多い。抗菌物質生合成遺伝子の存在を特定のプライマーを用いた PCR で評価したところ、OTU HLR には 3 つの抗菌物質生合成遺伝子 (PHL、PLT 及び PRN)、OTU RZ には 2 つの抗菌物質生合成遺伝子 (PRN 及び PHZ)、OTU H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7 及び H8 は 1 つの抗菌物質生合成遺伝子 (PHL) を有することが明らかとなった。さらに、各 OTU に属する菌株を用いて、植物病原性真菌 (*Rhizoctonia solani*) に対するキャベツ苗の保護効果を調べたところ、OTU HLR 及び RZ に分類される菌株の多くが植物保護効果を有することが明らかとなった。これらの 10 種類の OTU は、それぞれ抗菌物質生合成遺伝子の保有状況も異なり、*R. solani* に対する植物保護効果も異なることから、抗菌物質生合成遺伝子クラスターの有無と植物保護効果の関係性はこの段階では明確ではない。そこで本研究では、10 種類の OTU に分類される各代表株の全ゲノム配列を取得し、それぞれの抗菌物質生合成遺伝子クラスター及びその周辺配列を対象とした比較ゲノム解析により、植物保護活性との関連性を明らかにすることを目的とした。

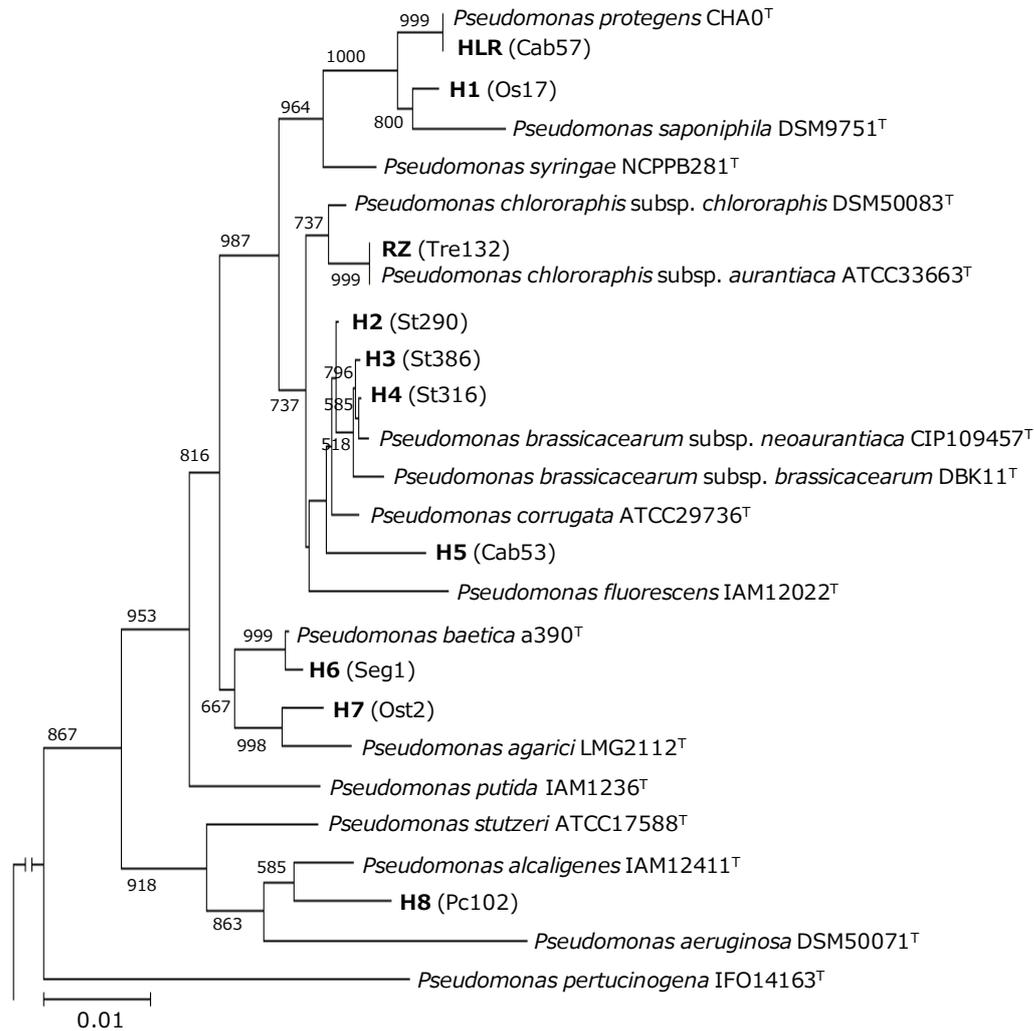


Fig. 3-1. 16S rDNA 配列を基にした抗菌物質合成遺伝子を有する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の OTU 分類。(Someya *et al.* Microb Environ 35: ME19155, 2020 より引用)

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の取得

各 OTU の代表菌株として、OTU HLR からは Cab57 株、Boi14 株、Eq60 株を、OTU RZ からは Tre132 株を、OTU H1 からは Os17 株と St29 株を、OTU H2 からは St290 株を、OTU H3 からは St386 株を、OTU H4 からは St316 株を、OTU H5 からは Cab53 株を、OTU H6 からは Seg1 株を、OTU H7 からは Ost2 株をそれぞれ代表菌株として選択した。Cab57 株、Os17 株及び St29 株の全ゲノム配列は決定済であるため (Takeuchi *et al.* 2014; 2015)、国際塩基配列データベースか

ら配列を入手して解析に使用した。それ以外の菌株については、前章 2.2.1 と同様の方法でゲノムを抽出した。抽出した DNA については、Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, Broad Range を用いて濃度を測定し、株式会社マクロジェン・ジャパンの次世代シーケンス受託サービスにより、SMRTbell Template Prep Kit 1.0 (Pacific Biosciences) を用いてライブラリーを調製し、PacBio RS II (Pacific Biosciences) を用いてシーケンシングリードを取得した。

### 3.2.2. シーケンシングリードのアセンブル及びアノテーション

取得したシーケンシングリードのアセンブルは、前章 2.2.2 と同様に、Canu プログラム ver. 1.7 (Koren, et al., 2017) を使用した。Canu プログラムに用いるパラメータはデフォルトの値を使用し、推定ゲノムサイズは 7 Mbp とした。アセンブルで得られたスキファールドは、末端の重複部分をテキストエディタで検索して環状化した。環状化したスキファールドは、微生物ゲノムアノテーションパイプラインである DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) により、アノテーションを行った (Tanizawa *et al.* 2018)。具体的には、コーディング配列 (CDS) は Prodigal プログラム ver. 2.6.3 (Hyatt *et al.* 2010)、tRNA をコードする配列は、Aragorn プログラム ver. 1.2.38 (Laslett and Canback 2004)、rRNA をコードする配列は、Barrnap プログラム ver. 0.8 (<https://github.com/tseemann/barrnap>) によりそれぞれ予測した。最終的に得られたアノテーション済の全ゲノム配列は、DDBJ の MSS を通じて国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に登録した。各菌株ゲノム配列のアクセッション番号は Table 3-1 に示す。相同性検索は、SequenceServer 1.0.14 (Priyam *et al.* 2019) と BLAST ソフトウェア (Altschul *et al.* 1990) で実施した。全ゲノムアラインメントに基づく系統樹は、REALPHY 1.12 を使用して作成した (Bertels *et al.* 2014)。

### 3.3.3. PHL の抽出及び定量

培養上清から PHL を抽出するために、菌株を 10 g/L グルコースを含む 4 mL の NB 培地 (日本 BD) に接種した。18 時間後、前培養液 40  $\mu$ L を新しい 10 g/L グルコースを含む 4 mL の NB 培地に接種し、さらに 16 時間培養後、20,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、培養上清を取得した。培養上清 200  $\mu$ L とアセトニト

リル 200  $\mu\text{L}$  を混合し、バイアル瓶に分注してサンプル溶液とした。サンプル中の PHL は、HPLC システム（日本分光）を用いて検出を行った。システムに接続する逆相 HPLC カラムには、Mightysil RP-18GP カラム（C18, 250 $\times$ 4.6 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ ; 関東化学）を使用した。サンプル溶液 20  $\mu\text{L}$  をオートサンプラーによりカラムにロードし、移動相として水:アセトニトリル:酢酸(50:50:0.1 [v/v/v]) を 2 mL/min の流速で流した。PHL の検出には UV/VIS 検出器を使用し、波長 270 nm の吸光度により PHL のピークを検出した。ピーク面積は、ChromNAV ソフトウェア（日本分光）により計算し、既知濃度の PHL スタンダードを用いて作成した検量線により、サンプル中の PHL 濃度を計算した。

Table 3-1. 本研究で使用した蛍光性 *Pseudomonas* 属菌株のゲノム情報 (Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

菌株	OTU	ゲノム情報									
		植物保護 活性 <sup>a</sup>	サイズ (bp)	CDS	rRNA	tRNA	GC%	アクセッション番号	文献		
Cab57	HLR	++	6,827,892	6,186	16	68	63.3	AP014522	Takeuchi <i>et al.</i> , 2014		
Boi14	HLR	+++	6,968,016	7,760	16	75	63.4	AP024341	This study		
Eqa60	HLR	-	6,945,474	6,306	16	74	63.3	AP024342	This study		
Tre132	RZ	+++	6,961,699	6,519	16	73	62.8	AP020336	This study		
Os17	H1	-	6,885,464	6,284	19	70	63.5	AP014627	Takeuchi <i>et al.</i> , 2015		
St29	H1	-	6,833,117	6,102	19	68	63.3	AP014628	Takeuchi <i>et al.</i> , 2015		
St290	H2	-	6,775,898	5,892	15	65	60.8	AP014703	This study		
St386	H3	-	6,821,346	6,036	16	67	60.8	AP021900	This study		
St316	H4	-	6,777,545	6,049	16	69	60.5	AP021901	This study		
Cab53	H5	-	6,259,290	5,537	16	71	62.2	AP021902	This study		
Seg1	H6	-	6,625,535	5,900	19	71	59.2	AP021903	This study		
Ost2	H7	+	7,357,961	6,462	19	79	62.9	AP021904	This study		
Pc102	H8	-	6,682,531	5,990	12	69	66.8	AP021905	This study		

<sup>a</sup> 植物保護活性は *R. solani* とキヤベツを用いた感染システムを用いた以前のデータを改変したものをを用いた (Someya *et al.* 2020)。植物保護効

果は、+++ (75%以上阻害)、++ (50~75%阻害)、+ (25~50%阻害)、- (25%以下阻害) で表記した。

### 3.3. 実験結果及び考察

#### 3.3.1. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の全ゲノム解析

抗菌物質生合成遺伝子を有する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌において、16S rRNA 塩基配列によるクラスタリングで明らかになった 10 種類の OTU から代表菌株 13 株を選抜し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。アノテーション後のゲノム情報を Table 3-1 に示す。全ての菌株において、ゲノムのサイズは一般的な *Pseudomonas* 属細菌で見られる 6~7 Mbp であった。また、今回解析した 13 株全てにおいて、内在性プラスミドの存在は確認されなかった。次に、それぞれのゲノム配列の中から、抗菌物質生合成遺伝子クラスターの分布を調査した。代表菌株とその近縁種の全ゲノム配列を用いたゲノム系統樹を Fig. 3-2 に示す。今回用いた 13 菌株の中で、OTU RZ に分類される Tre132 株を除いた 12 株において、ゲノム配列中に PHL 生合成遺伝子クラスターが存在していた。PRN 生合成遺伝子クラスターと PLT 生合成遺伝子クラスターは、OTU HLR に分類される菌株にのみ存在していた。PHZ 生合成遺伝子クラスターは、OTU RZ 以外では、*P. aeruginosa* DSM 50071 株にのみ存在しており、本研究で用いた他の OTU では存在が確認できなかった。

#### 3.3.2. PHL 生合成遺伝子クラスターの比較ゲノム解析

PHL の生合成は、9 つの遺伝子から構成される *phl* クラスターを介して行われる。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌における *phl* クラスターの多様性と分布を明らかにするために、本研究で選抜した 12 菌株の全ゲノム配列において、*phl* クラスター配列とその周辺領域を比較し、その結果を Fig. 3-3 に示す。OTU HLR と H1 の *phl* クラスター周辺の配列はほぼ同一であった。OTU H2、H3 及び H4 の *phl* クラスターの上流配列は非常に類似しており、下流配列は Fig. 3-2 に示すゲノム系統樹と密接に関連していた。OTU H5 の Cab53 株と *P. chlororaphis* UFB2 株では、*phl* クラスターと周辺配列は高い類似性を示していた。しかし、*P. chlororaphis* UFB2 株の全ゲノム配列は、*phl* 遺伝子クラスターを持たない *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* の基準株である DSM 19603 の全ゲノム配列とは系統的に大きく離れていたことから (Fig. 3-2)、UFB2 株と Cab53 株は *P. chlororaphis* には分類されず、別の *Pseudomonas* 属細菌に分類されると考えられる。

ゲノム系統樹からは、*Pseudomonas baetica* a390 株と OTU H6 の Seg1 株、*Pseudomonas agarici* LMG 2112 株と OTU H7 の Ost2 株、*Pseudomonas alcaligenes* NBRC 14159 株と OTU H8 の Pc102 株が、それぞれ系統的に近縁であることが明らかとなった (Fig. 3-2)。しかしながら、Ost2 株の *phl* クラスターの下流配列は、*phl* クラスターを持たない *P. chlororaphis* PCL1606 株の下流配列と類似していた。さらに、Seg1 株及び Pc102 株の *phl* 遺伝子クラスター周辺配列と相同性を示す配列は、国際塩基配列データベースに登録されている配列からは検索されなかった。以上の結果から、*phl* クラスターは元々 OTU H6、H7 及び H8 には存在しておらず、遺伝子の水平伝播などにより、進化的に後から獲得したものである可能性が考えられる。

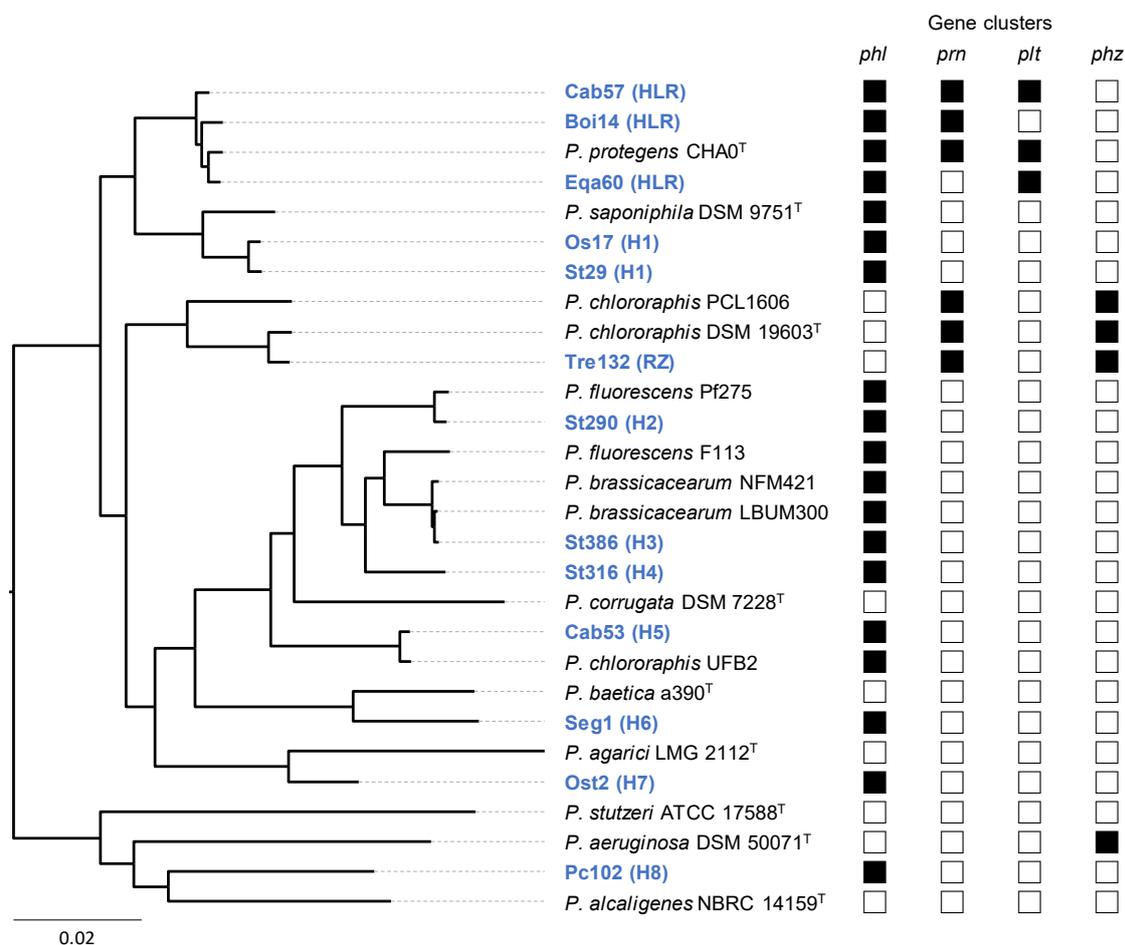


Fig. 3-2. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の染色体を用いたゲノム系統樹。本研究または前研究でゲノム配列を決定した株は青色で示す。*phl*、*prn*、*plt*、*phz* クラスターの保有 (■)、非保有 (□) は菌株の右側に示す。(Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

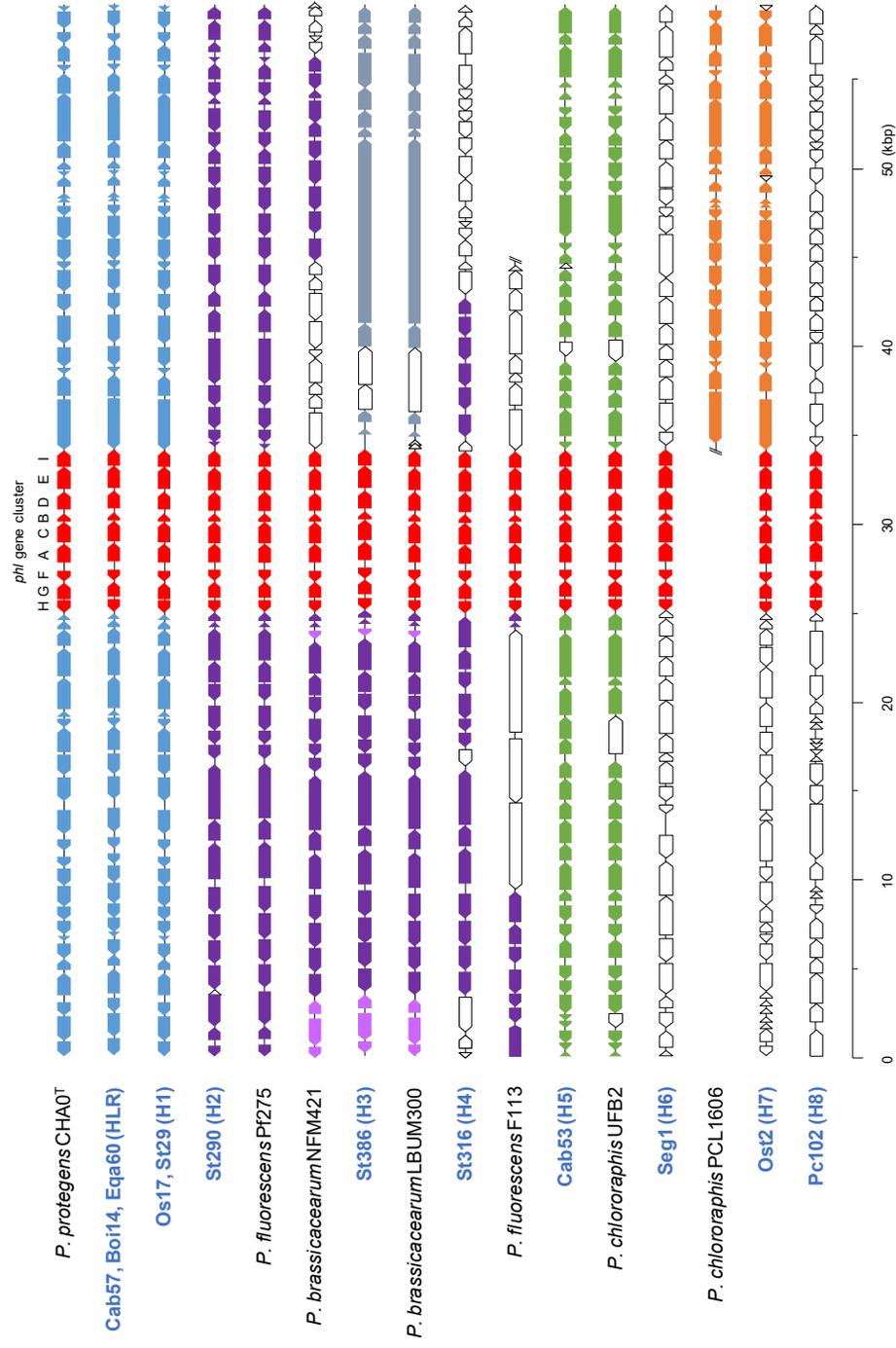


Fig. 3-3. *phl* クラスター周辺の遺伝子配置。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、*phl* クラスターは赤色、相同性のある遺伝子は同色、相同性のない遺伝子は白で示す。本研究または前研究でゲノム配列を決定した菌株名は青で示す。(Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

### 3.3.3. PHL 生産の比較解析

比較ゲノム解析で明らかとなった *phl* クラスターの多様性と、PHL 生産量との関係性を評価するために、先行研究 (Someya *et al.* 2020) で単離した抗菌物質合成遺伝子を有する菌株の中から、10 種類の OTU の代表株以外も含む 31 株を用い (Table 3-2)、培養上清中の PHL 濃度を測定した。PHL 定量結果を Fig. 3-4 に示す。OTU H2 に分類される 9 株は、全体的に高レベルの PHL 生産を示し、OTU H4、H5、H6 に分類される 6 株は、中程度の PHL 生産を示した。対照的に、OTU HLR、H1、H3、H7、H8 に分類される 15 株の PHL 生産量は少ない結果となった。*phl* クラスターとその周辺配列は、比較ゲノム解析により OTU H2、H3 及び H4 の間で高い相関性が見られたが (Fig. 3-3)、これら 3 つの OTU 間では PHL 生産量に顕著な差が見られた (Fig. 3-4)。この理由として、*phl* クラスターの発現を制御する遺伝子群は *phl* クラスターの周辺には存在せず、細胞全体の遺伝子発現制御に関わるグローバルな転写制御因子が関与しており、この転写制御システムが OTU H2、H3、H4 の間で異なるため、結果的に *phl* クラスター周辺配列が類似していても、PHL 生産量に相違がみられたのではないかと推察される。

Table 3-2. PHL 生産定量に用いた各 OTU に分類される蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌 (Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

OTU	菌株	分離源	分離地	植物保護活性 <sup>a</sup>
HLR	Boi14	ブロッコリー	茨城県古河市	+++
HLR	Cab57	ナズナ	北海道鹿追町	++
HLR	Eqa60	スギナ	北海道門別町	-
HLR	Pan63	スズメノカタビラ	茨城県竜ヶ崎市	++
HLR	Pc101	ベニバナインゲン	茨城県つくば市	++
HLR	Tan3	オオカモメヅル	長野県富士見町	+++
HLR	Tre92	シロツメクサ	茨城県高萩市	+++
RZ	Tre132	シロツメクサ	茨城県つくば市	+++
H1	Arp28	ヨモギ	茨城県日立市	-
H1	Os17	イネ	茨城県日立市	-
H1	St29	ジャガイモ	茨城県茨城町	-
H2	Af79	ネギ	茨城県高萩市	-
H2	Boc86	キャベツ	茨城県常陸太田市	-
H2	Brl5	ミズナ	茨城県常陸太田市	-
H2	Brn1	アブラナ	茨城県常陸太田市	-
H2	Brn9	アブラナ	茨城県常陸太田市	+
H2	Ls9	レタス	茨城県つくば市	-
H2	Pas1	オオバコ	長野県富士見町	-
H2	St290	ジャガイモ	神奈川県厚木市	-
H2	Vf3	ソラマメ	茨城県常陸太田市	-
H3	St367	ジャガイモ	北海道清里町	-
H3	St386	ジャガイモ	北海道本別町	-
H4	St316	ジャガイモ	北海道中札内村	-
H5	Cab53	ナズナ	北海道本別町	-
H5	Pas29	オオバコ	茨城県日立市	-
H5	St528	ジャガイモ	長崎県島原市	-
H5	Tre5	シロツメクサ	愛知県豊明市	-
H6	Seg1	キンエノコロ	長野県富士見町	-
H7	Ost2	マツヨイグサ	長野県富士見町	+
H8	Pc102	ベニバナインゲン	茨城県つくば市	-
H8	Sm6	ナス	愛知県豊明市	-

<sup>a</sup> 植物保護活性は *R. solani* とキャベツを用いた感染システムを用いた以前のデータを改変したものを用いた (Someya *et al.* 2020)。植物保護活性の指標は、+++ (75%以上阻害)、++ (50~75%阻害)、+ (25~50%) 阻害、- (25%以下阻害) で示す。

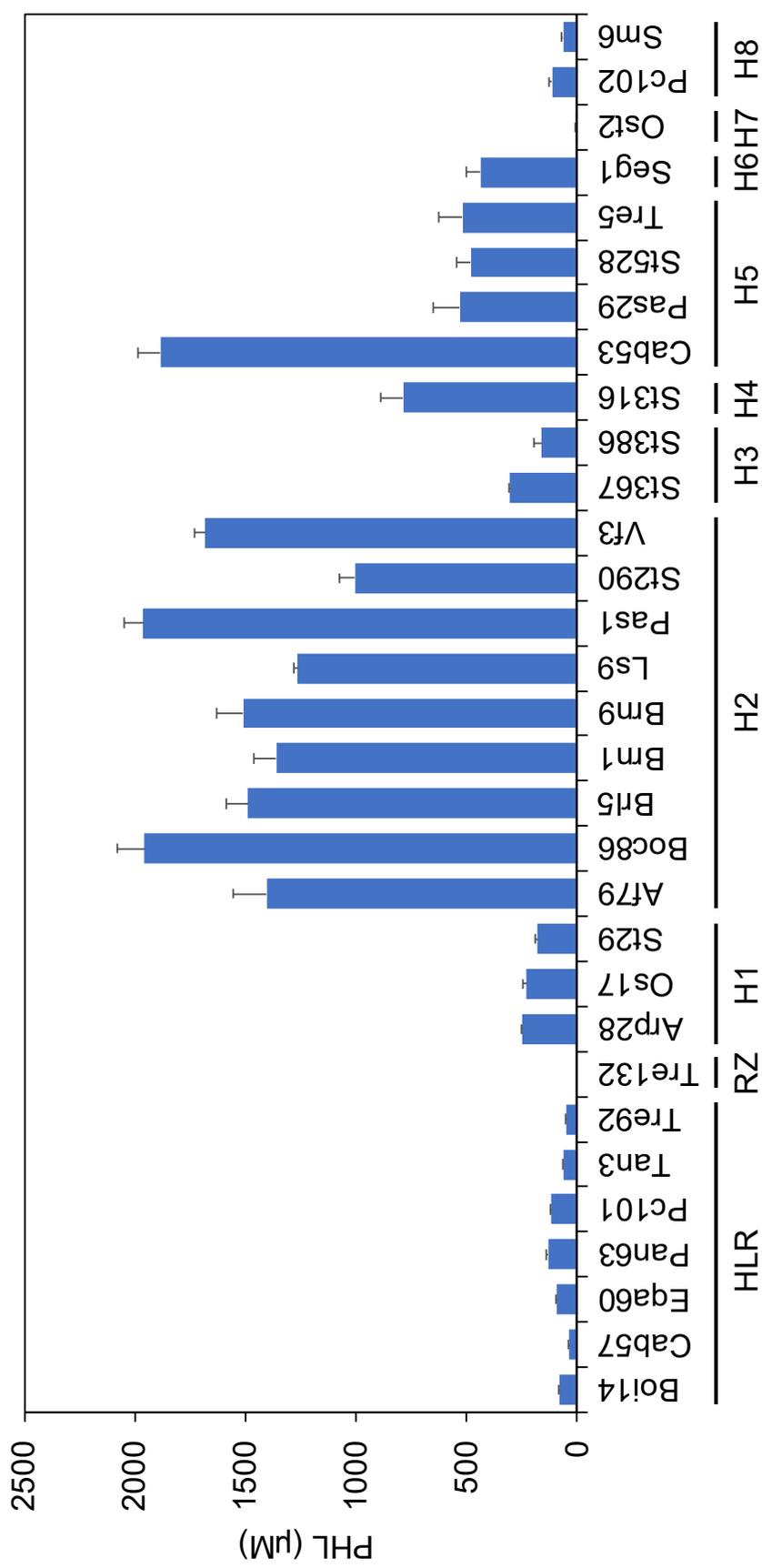


Fig. 3-4. *phl* クラスターを保有する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が生産する PHL の定量結果。定量は少なくとも 3 回実施し、エラーバーは標準偏差を示す。(Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

### 3.3.4. PRN、PLT、PHZ 生合成遺伝子クラスターの比較ゲノム解析

PRN の生合成に関わる遺伝子群である *prn* クラスターは、4 つの遺伝子で構成されている。*prn* クラスターは、OTU HLR、OTU RZ に分類される菌株のゲノム上で広く保存されていたが、例外として、OTU HLR に分類される Eqa60 株のみ、*prn* クラスターがゲノム上に存在しなかった。そこで、OTU HLR に分類される Cab57 株、Boi14 株、Eqa60 株、さらに OTU HLR に近縁の *P. protegens* CHA0 株のゲノム上に存在する *prn* クラスター及びその周辺配列の比較を行った (Fig. 3-5A)。CHA0 株、Cab57 株、Boi14 株では、*prn* クラスター及びその周辺配列はほぼ一致していたが、Eqa60 株のゲノム上には、他の菌株の *prn* クラスター周辺配列の一部は保存されていたものの、*prn* クラスターを含む約 16 kbp が欠失しており、その内部には推定トランスポザーゼ遺伝子の一部を含む 8 kbp ほどの配列が挿入されていた。このことから、Eqa60 株においては、*prn* クラスターが存在する部位にトランスポゾンが転移し、その後の組み換え等により、*prn* クラスターを含む約 16 kbp の領域が欠失してしまったものと推察される。

PLT の生合成に関わる遺伝子群である *plt* クラスターは、17 個の遺伝子から構成されている。*plt* クラスターは、OTU HLR のゲノム上にのみ存在していた。そこで、先程と同様に Cab57 株、Boi14 株、Eqa60 株、CHA0 株のゲノム上に存在する *plt* クラスター及びその周辺配列の比較を行った (Fig. 3-5B)。CHA0 株、Cab57 株、Eqa60 株では、*plt* クラスター及びその周辺配列はほぼ一致していたが、Boi14 株のゲノム上には、*plt* クラスターを含む約 36kbp の領域が欠失していた。また、Eqa60 株における *prn* クラスターとは異なり、トランスポゾンに関連する挿入配列は見られず、*plt* クラスターを含む領域は完全に消失していた。

PHZ の生合成に関わる遺伝子群である *phz* クラスターは、10 個の遺伝子から構成されている。*phz* クラスターは、OTU RZ のゲノム上にのみ存在しており、*phz* クラスターの配列は、OTU RZ に分類される Tre132 株と *P. chlororaphis* DSM19603 株の間でほぼ一致していた。また、*prn* クラスター、*plt* クラスターとは異なり、近縁種も含めてこの領域が欠失した菌株は見られなかった。

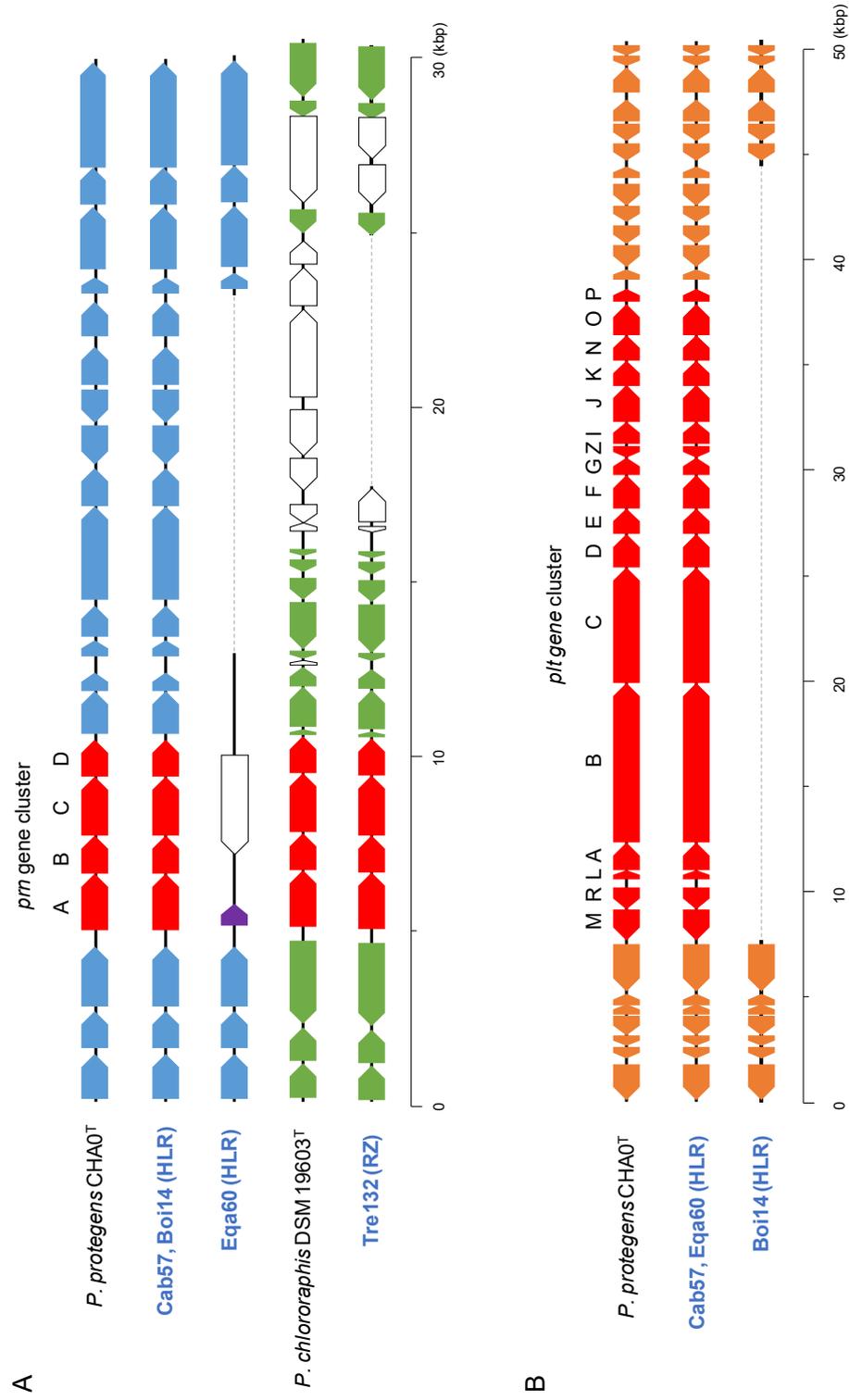


Fig. 3-5. *pm* クラスター (A) 及び *plt* クラスター (B) 周辺の遺伝子の配置。五角形矢印は遺伝子の方向を示し、*pm* 及び *plt* クラスターは赤色、相同性のある遺伝子は同色、相同性のない遺伝子は白で示す。本研究または前研究でゲノム配列を決定した菌株名は青で示す。(Sakuraoka *et al.* Microb Environ 36: ME21034, 2021 より引用)

### 3.3.5. 抗菌物質生合成遺伝子クラスターと植物保護効果の関連性

先行研究において、各 OTU に分類される菌株について植物病原性真菌 (*R. solani*) に対するキャベツ苗の保護効果を調べたところ、OTU HLR、OTU RZ、OTU H7 に分類される 5 株のうち、Eqa60 株以外の 4 株 (Cab57 株、Boi14 株、Tre132 株及び Ost2 株) が植物保護効果を示し、特に OTU HLR、OTU RZ に分類される 3 株が高い植物保護効果を示すことを明らかにしている (Someya *et al.* 2020)。この原因を考察するため、まず PHL に着目すると、PHL は *R. solani* によって引き起こされる植物病害の阻害において極めて重要な役割を果たすことが報告されている (He *et al.* 2004)。しかしながら、OTU HLR、OTU H7 に分類される菌株は *phl* クラスターを有するにも関わらず、PHL の生産量は低レベルであった (Fig. 3-4)。また、OTU H2、H5 株に分類される菌株は高レベルの PHL を生産するものの、明確な植物保護効果は見られなかった (Table 3-2)。以上の結果より、*phl* クラスターを有する全ての菌株が、植物表面で PHL を効果的に生産できる訳ではないと考えられ、ゲノム上に *phl* クラスターが存在するか確認するだけでは、高い植物保護効果を有する菌株を選抜できないものと考えられる。この問題を解決するためには、植物表面の環境中で *phl* クラスターを安定して発現させるような新たな技術開発が必要であると考えられる。

植物保護効果を示した OTU HLR と RZ の大部分の菌株は、共通して *prn* クラスターを有していた。PRN は *R. solani* によって引き起こされる植物病害に対して高い抑制効果を発揮することが報告されている (Cartwright *et al.* 1995)。本研究では、OTU HLR に属する菌株の中でも、Boi14 株は最も高い植物保護効果を示した一方で、Boi14 株と同じ OTU HLR に属する Eqa60 株は植物保護効果を示さなかった (Table 3-1)。今回の比較ゲノム解析では、Eqa60 株が *prn* クラスターを、Boi14 株が *plt* クラスターをそれぞれ欠失していることが明らかとなった。以上より、PLT ではなく PRN の生産が、*R. solani* による植物病害に対する生物的防除活性にとって重要であることを示唆している。また、OTU RZ のみ *phz* クラスターを有しているが、*phz* クラスターを持たない OTU HLR においても、OTU RZ と同等の高い植物保護効果を有する株が多かったことから、PRN の生産が特に有効である可能性が考えられる。例外として、*prn* 遺伝子クラスターを持たない OTU H7 に分類される Ost2 株も、僅かに植物保護効果を示していた (Table 3-

1)。この理由としては、生物的防除活性に関与する未知の遺伝子が Ost2 のゲノムにコードされている可能性が考えられる。

### 3.4. 小括

本章では、多種多様な抗菌物質を生産し、高い植物保護効果を有することが報告されている蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌において、抗菌物質生合成遺伝子の多様性と分布を比較ゲノム解析により明らかにすることを目的とした。本研究に先駆けて、我々の研究グループでは、日本各地から採取した様々な植物の根から 3000 株以上の蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌を単離してきた。その中から、抗菌物質生合成遺伝子を有する 55 菌株を選定し、16S rRNA 遺伝子配列を決定したところ、10 個の操作的分類単位 (OTU) に分類できることが明らかとなった。これらの菌株による植物保護効果について、キャベツと植物病原菌 *R. solani* を用いたアッセイ系で調べたところ、PHL、PRN、PLT を生産する OTU HLR と、PHZ と PRN を生産する OTU RZ に分類される株の多くが高い植物保護効果を示すことが明らかとなった。次に、10 種類の OTU の代表株の全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析を行ったところ、OTU HLR に属する菌株の中に、PLT 生合成遺伝子クラスターが欠落した Boi14 株、PRN 生合成遺伝子クラスターが欠落した Eqa60 株が含まれていることが明らかとなった。特に Eqa60 株は、高い植物保護効果を有する OTU HLR の中で唯一、植物保護効果が見られない株である。さらに、同じく高い植物保護効果を有する OTU RZ においては、PRN 生合成遺伝子クラスターが完全な形で保存されていた。以上の比較ゲノム解析から、*R. solani* に対する植物保護効果には、抗菌物質の中でも特に PRN の生産が重要である可能性が示唆された。

本研究では、PRN が *R. solani* による植物病害の防除において最も効果的な抗菌物質であることを示唆している。PRN 以外の抗菌物質において、特に PHL に関しては、OTU HLR 以外の OTU で *phl* クラスターを保有する菌株の多くは、本章の実験条件下では高い PHL 生産レベルを示したものの、キャベツと *R. solani* を用いたアッセイ系では高い生物的防除活性を示さなかったため、*phl* クラスターの発現が植物の表面で効果的に行われないう可能性がある。過去の研究では、生物的防除の有効性は、実験室環境のようなコントロール条件下と、圃場のような

非コントロール条件下では大きく異なり、非コントロール条件下では、植物保護細菌の効果が低レベルに留まるとの報告もある (Guetsky *et al.* 2001)。より効果的な生物的防除剤を開発するには、単にゲノム配列上の抗菌物質生合成遺伝子クラスターの存在について調査するだけでなく、非コントロール条件下でも抗菌物質生合成遺伝子クラスターの発現を活性化及び安定化する試みが必要であると考えられる。

### 3.5. 参考文献

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1990.
2. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol* 31: 1077-1088, 2014.
3. Bultreys A, Gheysen I, Wathelet B, Maraite H, De Hoffmann E. High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 69: 1143-1153, 2003.
4. Cartwright DK, Chilton WS, Benson DM. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 211-216, 1995.
5. Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep* 26: 1408-1446, 2009.
6. Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinoor A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627, 2001.
7. He Y, Suzuki S, Aono T, Oyaizu H. Importance of 2,4-DAPG in the biological control of brown patch by *Pseudomonas fluorescens* HP72 and newly identified genes involved in 2,4-DAPG biosynthesis. *Soil Sci Plant Nutr*. 50: 1287-1293, 2004.
8. Höfte M, Altier N. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res Microbiol* 161: 464-471, 2010.
9. Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69: 480-482, 1979.
10. Howell CR, Stipanovic RD. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70: 712-715, 1980.
11. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC*

- Bioinformatics 11: 119, 2010.
12. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27: 722-736, 2017.
  13. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* 32: 11-16, 2004.
  14. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9: 1132-1147, 2009.
  15. Priyam A, Woodcroft BJ, Rai V, Moghul I, Munagala A, Ter F, Chowdhary H, Pieniak I, Maynard LJ, Gibbins MA, Moon H, Davis-Richardson A, Uludag M, Watson-Haigh NS, Challis R, Nakamura H, Favreau E, Gómez EA, Pluskal T, Leonard G, Rumpf W, Wurm Y. Sequenceserver: a Modern graphical user interface for custom BLAST databases. *Mol Biol Evol* 36: 2922-2924, 2019.
  16. Someya N, Kubota M, Takeuchi K, Unno Y, Sakuraoka R, Morohoshi T. Diversity of antibiotic biosynthesis gene-possessing rhizospheric fluorescent pseudomonads in Japan and their biocontrol efficacy. *Microb Environ* 35: ME19155, 2020.
  17. Takeuchi K, Noda N, Someya N. Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS One* 9: e93683, 2014.
  18. Takeuchi K, Noda N, Katayose Y, Mukai Y, Numa H, Yamada K, Someya N. Rhizoxin analogs contribute to the biocontrol activity of a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 333-342, 2015.
  19. Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34: 1037-1039, 2018.

## 第4章 結論

### 4.1. 本研究のまとめ

本研究では、比較ゲノム解析を用いて、細菌の抗菌物質生合成遺伝子クラスター及びその発現制御機構の多様性を明らかにすることで、抗菌物質による微生物制御技術開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。*S. marcescens* 35 菌株の全ゲノム配列を用いた比較ゲノム解析では、AHL 合成遺伝子と AHL レセプター遺伝子の塩基配列及びゲノム上の配置はそれぞれ 4 つのパターンに分類可能であり、*pig* クラスターはゲノム配列の相同性が近い一部のグループのみが有しているものの、QS との関係性は見られなかった。また、*S. marcescens* AS-1 株のみ、AHL 合成遺伝子が内在性プラスミド上に存在しており、その周囲にはトランスポゾン様配列が存在していた。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌における抗菌物質生合成遺伝子の比較ゲノム解析では、抗菌物質生合成遺伝子を有する 55 菌株は 10 個の OTU に分類可能であるが、植物保護効果を有する種は限定的であることがわかった。また、高い植物保護効果を有する菌株には PRN 生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかになった。

### 4.2. 今後の展望

#### 4.2.1. プロディジオシン生合成遺伝子と Quorum Sensing の関係

第2章では、*S. marcescens* AS-1 株の全ゲノム配列を明らかにするとともに、全 35 菌株の *S. marcescens* のゲノム配列を用いた比較ゲノム解析により、*luxI* 遺伝子と *pig* クラスターの多様性解析を行った。その結果、*pig* クラスターは特定の分類群しか有しておらず、AS-1 株のように *luxI* 遺伝子と *pig* クラスターの両方を有する菌株はごく少数であったことから、*S. marcescens* において、プロディジオシン生産は必ずしも QS により制御されるものではないことが明らかになった。また、AS-1 株の *spnI* 遺伝子の周辺配列には推定トランスポザーゼ遺伝子が存在していたことや、*spnI* 遺伝子が染色体ではなく内在性プラスミドに存在していたことから、AS-1 株はトランスポゾン転移により QS 遺伝子群を獲得し、それに伴ってプロディジオシン生産が QS の制御下へと変化した可能性が考えられる。今回の *S. marcescens* におけるプロディジオシン生産のように、他の細

菌種においても、抗菌性二次代謝産物が QS の制御下へと変化した事例が存在する可能性は大いに考えられる。今後は、他の細菌種についても比較ゲノム解析を実施し、QS 遺伝子群の獲得過程を明らかにすることができれば、細菌における抗菌物質生産制御機構の進化の解明に繋がる可能性が考えられる。

#### 4.2.2. 蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が生産する抗菌物質の植物保護効果

第 3 章では、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌における植物保護効果と OTU による分類との関係性と、ゲノム中に存在する抗菌物質生合成遺伝子の多様性を明らかにするため、各 OTU の代表株による比較ゲノム配列を行った。その結果、植物保護効果を示す菌株は特定の OTU に分類されることや、*prn* クラスターの有無が植物保護効果に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。その一方で、PRN を生産しないが植物保護活性を示す OTU H7 のような存在も確認されたことから、PRN 以外の抗菌物質も植物保護効果に様々な影響を及ぼす可能性が考えられる。また、*R. solani* に対して高い増殖阻害効果を示す PHL については、試験管培養では高い生産レベルを示す OTU が存在していたものの、キャベツと *R. solani* を用いたアッセイ系では保護効果がみられなかったことから、これらの OTU では、植物表面で PHL の生合成が効果的に行われていない可能性が考えられる。植物保護細菌を実環境中で使用する際の大きな問題点となるのが、植物保護効果の不安定性である。今後は、実験室環境で研究を行うだけでなく、圃場等の実際の環境下で抗菌物質生合成遺伝子クラスターがどのように発現するかを明らかにすることで、植物保護細菌を用いた微生物農薬の効果を安定化させる技術開発に繋がるものと期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、論文作成や研究発表について多くのご指導ご鞭撻を賜りました諸星知広准教授に深く感謝いたします。また、ご多忙の中、再三に渡り本論文審査に時間を割いて頂いた副指導教員の加藤紀弘教授、大庭亨教授、審査委員の飯村兼一教授、玉田洋介准教授に深く感謝いたします。また、副専門研修においてご指導を賜りました古澤毅教授、手塚慶太郎准教授に深く感謝いたします。

博士後期課程進学にあたり、背中を押してくれた宇都宮大学長の池田宰先生に深く感謝いたします。また、機器分析や遺伝子解析を行うにあたり、ご協力を頂いた宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの謝肖男准教授及び鈴木智大准教授に深く感謝いたします。蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌に関する研究を実施するにあたり、菌株の分譲や実験のご指導など、様々な面でご協力頂いた農研機構の染谷信孝博士、竹内香純博士に深く感謝いたします。

博士課程の進学や論文作成など様々な面でご協力頂いた、前職の植木与四郎前栃木県農業試験場長及び現職の公益財団法人競走馬理化学研究所の安齊了理事長始め研究所の皆様に深く感謝いたします。