

Pseudomonas

中央農業総合研究センター ^{いの}井 ^{うえ}上 ^{やす}康 ^{ひろ}宏

はじめに

Pseudomonas 属細菌は環境に対する適応性が高く、土壌や河川など環境中に広く存在する。また、塩湖や南極の表土などのいわゆる極限環境から分離されるものもある。人畜においても常在菌として存在し、院内感染の原因菌として重要視されているものもある。農業分野においても多くの植物病原細菌が含まれることから重要な菌群であり、その感染宿主は草花から樹木、単子葉から双子葉、果てはキノコ類と多岐にわたり、病態においても斑点、がん腫、腐敗など様々である。また植物毒素やホルモンを生産するものもある。一方で、植物病原糸状菌や細菌に対して拮抗的に働いて病害発生を抑制するものもあり、生物農薬等で利用されている。

もともと *Pseudomonas* 属細菌は、好気性のグラム陰性桿菌で極鞭毛をもち有機酸を酸化的に利用することなどを指標として分けられていたため、多くの同様な性質をもつ細菌がいったん本属に分類され、その他の特徴的な形質が見出されると他属として分離されていった。しかし、多くのものが表現形質に属を分ける決定的な根拠がなく、そのまま *Pseudomonas* 属細菌として残され、属内でいくつかのグループに類別されていた。このグループを属に分ける根拠の一つとして、分子系統解析の結果が利用されるようになった。

一方で、*Pseudomonas syringae* の病原型はもともとは別種であったが、細菌命名規約の改定時に一つの種としてまとめられた。しかし、その感染植物や病徴以外にも特徴がありたびたび病原型を別種や亜種に引き上げる提案がなされてきた。その妥当性を図る指標としても分子系統解析の結果が利用されるようになった。

本稿では最近の *Pseudomonas* 属の分類に分子系統解析がどのような役割をもってきたか、また植物病原細菌として重要な *P. syringae* 群細菌の系統解析について解説する。

I 旧 *Pseudomonas* 属の解体

Pseudomonas 属細菌の分類に 16SrRNA の塩基配列の比較をベースとした系統解析を組み込む試みは 1960 年代から行われ始めたが (PALLERONI, 2003), 初期の研究では RNA-DNA ハイブリダイゼーションによって相同性を計るものが主であり、塩基配列を直接比較した系統解析のデータを属の再編に取り入れるようになったのは 1990 年ごろからである。これは PCR 技術の確立と進歩により、多数の検体から目的の遺伝子を効率よく増幅して塩基配列の決定ができるようになったためである。この属の再編により *Burkholderia* 属、*Ralstonia* 属、*Acidovorax* 属の重要な植物病原細菌を含むものが *Pseudomonas* 属から分離された。これら属の詳細については、次回以降に他の著者によって紹介される予定である。

II 16SrRNA を用いた *Pseudomonas* 属の分子系統解析

なぜ 16SrRNA の塩基配列が細菌の系統解析に用いられるのかは、総説で述べられているのでここでは割愛する。重要なことは、得られる結果は細菌を類別するうえでの一つの指標に過ぎず、細菌の分類に利用するうえでは他の遺伝子を用いた系統解析や遺伝子指標を用いた解析と合わせて、総合的に判断する必要があるということをお忘れではない。

Proteobacteria 門に属する細菌は 16SrRNA の塩基配列の比較解析より α , β , γ の三つの subclass に分けられ、現在はこの類別がそのまま分類上の class (綱) として扱われている。ANZAI et al. (2000) は *Proteobacteria* 門に属する細菌種の基準菌株を用いて 16SrRNA 配列の分子系統解析を行っているが、その解析結果によると *Pseudomonas* 属は確かに γ -subclass の中で独立したクラスターを形成している。また、*Pseudomonas* 属細菌は種間においても 16SrRNA 配列に相当の多型が存在し、七つのグループに類別される。このグルーピングに用いた“種”が分類として妥当かどうかは別として、大まかな傾向としては他の指標を用いた場合と一致する。この結果はそのまま *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005) にも転記されているので、どちら

Phylogenetic Analysis of Genus *Pseudomonas*. By Yasuhiro INOUE

(キーワード: *Pseudomonas* 属細菌, *P. syringae* 群細菌, 分子系統解析)

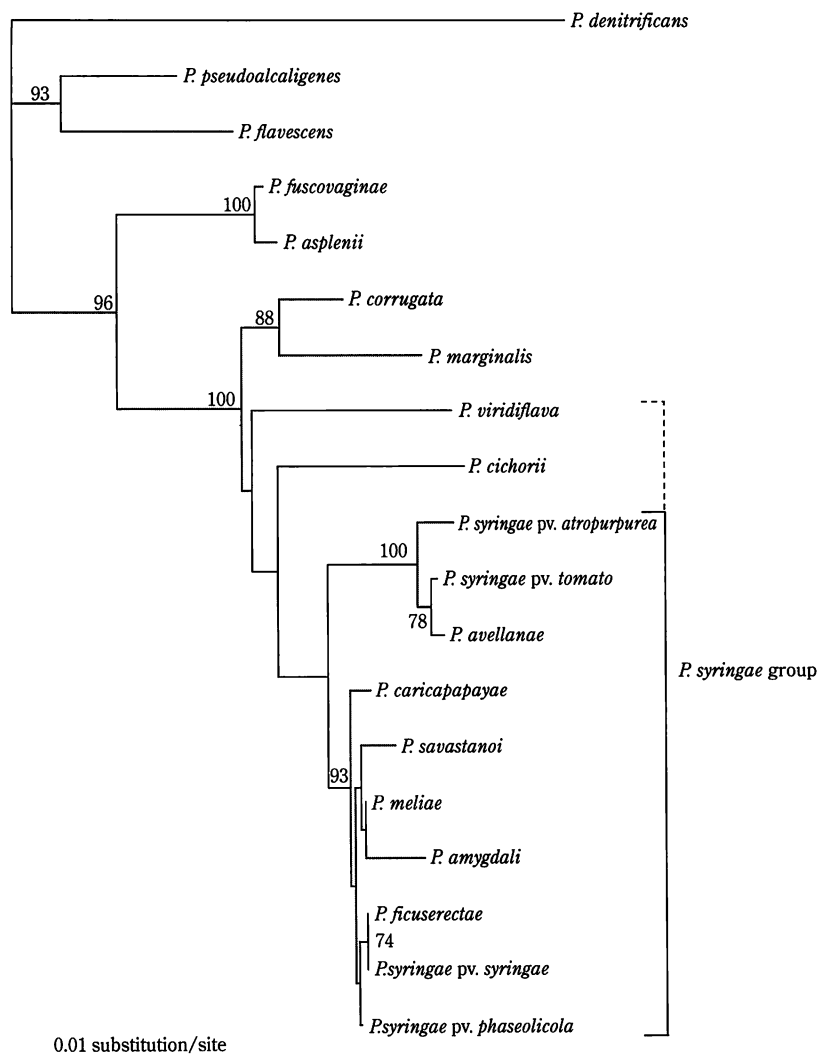


図-1 植物病原性 *Pseudomonas* 細菌の 16SrRNA 配列を用いた系統樹

近隣結合法を用いて作成した。系統樹中にある数値はブートストラップ値で70%以上のみ記載した。*P. denitrificans* は植物病原菌ではないが、ANZAI et al. (2000) の系統樹と合わせるため、本系統樹の中に用いた。

かを参照いただきたい。*Pseudomonas* 属全体の解析結果は本稿では割愛し、植物病原性の種を用いた系統解析の結果を図-1に示す。

多くの植物病原細菌は *P. syringae* グループに属し、*P. cichorii*, *P. viridiflava* を除くほとんどの種は 16SrRNA の塩基配列が99%以上一致している。角田ら (2004)、澤田ら (2005) は *AccD*, *AtpD*, *gltB*, *recA*, *rpoD* の配列を用いて、YAMAMOTO et al. (2000) は *gyrB* と *rpoD* を用いて *Pseudomonas* 属細菌の分子系統解析を行っているが、その結果でも *P. syringae* グループは単系統群にまとめられている。

そのほかの植物病原細菌は *Pseudomonas* 属全体の中で一つの集団を形成しているわけではなく、腐生性菌を含めた属全体の各系統に散在している。これは *gyrB*, *rpoD* の解析でも同様である。つまり、細菌の分子進化と植物病原性の獲得には相関がないといえる。これらの種がどのようにして植物に対する病原性を獲得したかは非常に興味深い。これら細菌種は細菌学的性状によってもその独自性が担保されていたが、分子系統解析により種間の関係がより明らかとなった。例えば *P. corrugata* は蛍光色素非産生で PHB を蓄積するという特徴をもつが、分子系統解析により *P. fluorescens* に近いグループに

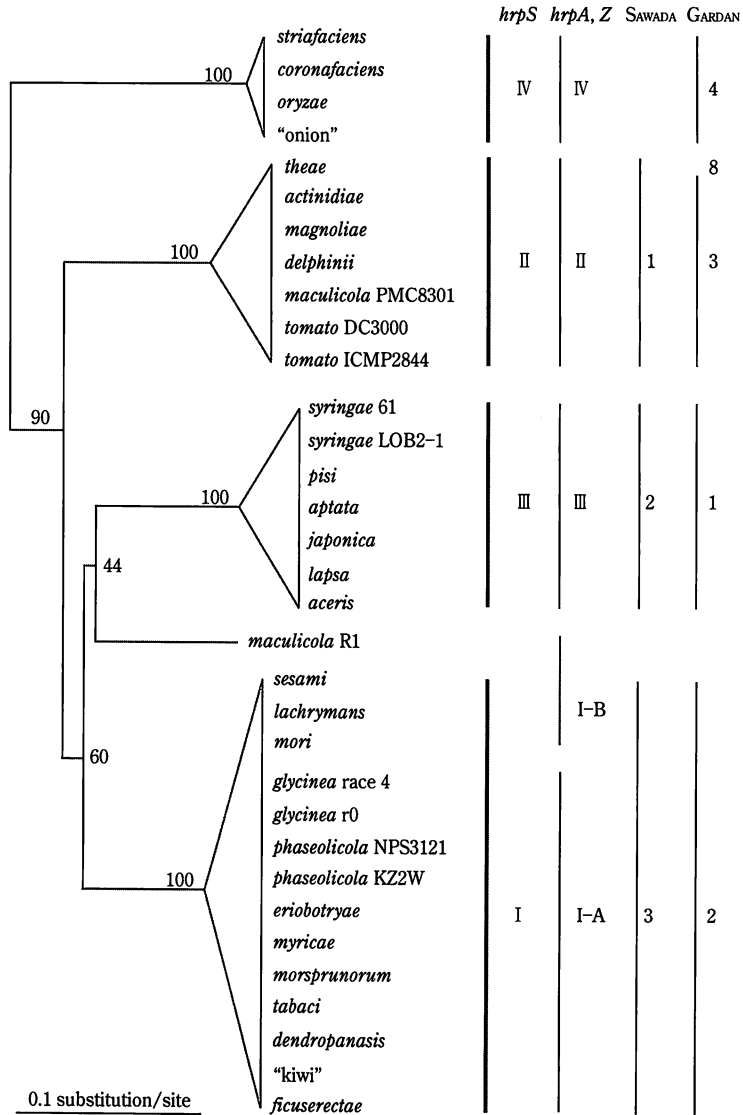


図-2 *Pseudomonas syringae* 群細菌の *hrpS* 配列を用いた系統樹
 INOUE and TAKIKAWA (2006) の結果を改変した。系統樹中にある数値はブートストラップ値を示す。同時に *hrpA* および *hrpZ* による系統解析の結果、SAWADA et al. (1999) による系統解析の結果、GARDAN et al. (1999) による DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果によるグループも同時に示した。

属することが明らかとなった。

III *Pseudomonas syringae* グループ内の多様性解析

16SrRNA を指標とすると *P. syringae* グループに属する菌は似通っているといえるが、他の指標を用いて詳細な検討をした場合どうなのか。GARDAN et al. (1999) は DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果より、*P.*

syringae グループの菌を九つの genomespecies として分類している。その中で *P. savastanoi*, *P. meliae*, *P. ficuserectae*, *P. amygdali* と *P. syringae* の複数の病原型は同一の genomespecies として分類されており、これらの種は極めて近縁であるといえる。

澤田ら (1995; 1996) は 16SrRNA-23SrRNA 遺伝子間のスペーサー領域を用いて *P. syringae* 病原型間の比較を行ったが、同一病原型の菌株間でも多様性が認めら

れることを報告している。次に SAWADA et al. (1999) は、19 病原型 56 菌株を用いて Housekeeping 遺伝子といわれている *gyrB*, *rpoD* 遺伝子と、病原性に深く関与している *hrp* 遺伝子群の制御遺伝子である *hrpL* および *hrpS* 遺伝子について *P. syringae* 細菌の分子系統樹を作成した。その結果、いずれの遺伝子を用いても *P. syringae* 細菌は三つのクラスターに分けられることを示した。

INOUE and TAKIKAWA (2006) は *P. syringae* の 27 病原型と *P. ficusectae* を用いて *hrpS* から *hrpB* までの遺伝子領域を用いて系統解析を行った。*hrpS* の解析結果、*P. syringae* 細菌は四つのクラスターに分けられることが示された (図-2)。これは前述の GARDAN et al., SAWADA et al. の結果および *hrp* 遺伝子群のサザンハイブリによる比較解析 (INOUE and TAKIKAWA, 1999; 2000) の結果とも一致している。また、*hrpA* や *hrpZ* などの病原性因子の遺伝子では、*hrpS* での系統解析の結果に従いながらもさらに変異に富んでいることが示された。INOUE and TAKIKAWA (2006) は *hrpZ* 遺伝子の多様性を利用し、*P. syringae* 細菌を五つに類別できる PCR プライマーを作成している。

P. syringae グループの中でも *P. cichorii*, *P. viridiflava* は他の菌とは若干異なっている。どちらも 16SrRNA やその他の指標を用いた分子系統解析で他の菌との分岐位置が離れており、細菌学的性状 (オキシダーゼ活性, ジャガイモ腐敗能), *hrp* 遺伝子の相同性でも他の *P. syringae* グループの菌とは異なっている (北条ら, 2003; 古谷・瀧川, 2005)。ただし、*P. viridiflava* は菌株によってその結果が異なるようである。

IV *P. syringae* 細菌の分類

16SrRNA 配列の分子系統解析より得られる *P. syringae* グループは、実際のところどのように分類されるのが妥当であろうか。*P. cichorii*, *P. viridiflava* は前述のとおり明らかにほかとは異なっており、種として扱うことは妥当と考える。しかし、他の種においては非常に似通っており、種として分ける根拠に乏しい。GARDAN et al. (1999) は DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果より、これらを *genomospecies* として分けること

を提案している。同種の定義を DNA-DNA ハイブリダイゼーションの値が 70% 以上と規定すれば、確かに *genomospecies* は妥当に思われる。しかし、16SrRNA-23SrRNA 遺伝子間のスペーサー領域や *hrpZ* などの病原性関連遺伝子の解析結果を考えると、*P. syringae* グループの菌は分子進化速度の速い菌群であると考えられる。筆者としては、*P. syringae* 種の亜種以下での分類として *genomospecies* あるいは *genomovar* という分類のほうがより妥当ではないかと考えている。

おわりに

現在、*Pseudomonas* 属の細菌では 4 種 8 株の全ゲノム解析が終了しており、データベースから利用できるよになっている。特に *P. syringae* では 3 病原型の 4 菌株が解析されており、ゲノム間の比較解析ができるよになっている。比較ゲノム解析の結果は病原性遺伝子の探索や病原性発現のメカニズム解明に役立つばかりでなく、今後の *Pseudomonas* 属の分類や分子進化の考察に寄与することと思われる。

本原稿の執筆に当たっては農業環境技術研究所の澤田宏之氏にご助言いただいた。記してお礼申し上げる。

引用文献

- 1) ANZAI, Y. et al. (2000): Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1563 ~ 1589.
- 2) 古谷明彦・瀧川雄一 (2005): 日植病報 71: 292.
- 3) GARDAN, L. et al. (1999): Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 469 ~ 478.
- 4) GARRITY, G. M. et al. (2005): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed., Vol. Two, Part B, Springer, N. Y., p. 323 ~ 379.
- 5) 北条 広ら (2003): 日植病報 69: 314.
- 6) INOUE, Y. and TAKIKAWA, Y. (1999): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65: 32 ~ 41.
- 7) _____ (2000): J. Gen. Plant. Pathol. 66: 238 ~ 241
- 8) _____ (2006): ibid. 72 (1) (in press).
- 9) 角田 淳ら (2004): 日植病報 70: 289.
- 10) PALLERONI, N. J. (2003): Microbiol. 149: 1 ~ 7.
- 11) SAWADA, H. et al. (1999): J. Mol. Evol. 49: 627 ~ 644.
- 12) 澤田宏之ら (1995): 日植病報 61: 262 ~ 263
- 13) _____ (1996): 同上 62: 308.
- 14) _____ (2005): 日本植物病理学会第 23 回植物細菌病談話会 論文集, p. 98 ~ 110.
- 15) YAMAMOTO, S. et al. (2000): Microbiol. 146: 2385 ~ 2394.