

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成12年度博士課程 入学
氏名 李 慶範
指導教官名 小柳津 広志

論文題目

Taxonomic Studies of Proteobacteria with Special References to the Genus *Pseudomonas*

(*Pseudomonas* 属を中心としたプロテオバクテリアの分類学的研究)

従来の形態や生理・生化学的形質に基づく分類法と化学分類的方法による細菌の分類・同定は新属新種の分類において欠かせないものだが、微生物の系統学的な分類に用いるには難点がある。近年の遺伝学的な技術の発展に伴い微生物の分類の体系が変化してきた。遺伝形質による分類・同定は生育条件の影響をほとんど受けず、安定したデータが得られるし、そのデータは常に数値により評価しやすい。特に分子時計と呼ばれるリボゾーム RNA(rRNA)は系統学的分類において最も注目され、利用されている。これまで遺伝子 database に報告されてる rRNA(特に 16S rRNA)の数は数万件に至る。

本研究は遺伝学的方法及び遺伝子 database の 16S rRNA 塩基配列の情報を利用して Proteobacteria の alpha, beta, gamma の三つの class に対する系統解析、植物根の蛍光性 *Pseudomonads* の系統的な分類、亜鉛耐性の *Methylobacterium* 属の系統学的関係を行った。

Proteobacteria における 16S rRNA によるの系統分類

16S rRNA の情報は DNA database に莫大な数が保存されているが、ARB database は特に 16S rRNA 配列だけを整理したもので、またアライメントデータや系統解析の情

報も整理されているため、今回の研究ではこの Database の情報を基本として用いた。しかしながら、ARB のアライメントは菌種間で大きく 2 次構造の異なる部分を含めて系統解析が行われており、正確な系統樹を作成するには問題がある。そこで、本解析では GenBank/EMBL/DDBJ databases より引用したデータのうち 1,350bp 以上の塩基配列が決定されているもののみを使用し、系統解析は the program package MOLPHY(version 2.3b3)を用いた最尤法 (maximum likelihood method) を用い、比較した塩基配列は二次構造の変化の激しい部分 (ポジション 70-100、181-219、447-487、1004-1036、1133-1141、1446-1456) と、欠失や解読不能な部分を除いた塩基配列をもとに行った。また、ARB database(ssujun02. arb version)と Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition、www.cme.msu.edu/bergeys/april2001-genus.pdf)を系統解析の比較対象として用いた。

Alphaproteobacteria および Betaproteobacteria の分類体系の提案

本研究で得られた系統関係を模式的に Fig1 に示した。ARB の系統樹とはクラスターのトポロジーは異なる。また、メインとなるクラスター間の中間的な位置にくる菌種を削除するとクラスター間のトポロジーは大きく変化するため、クラスター間のトポロジーは信頼性に欠けるものと考えられた。しかしながら、メインとなるクラスター自体は使用するデータセットを変えても変化しない安定なものであり、また、ARB のクラスターと基本的に同じ集団で構成されるものであった。したがって、メインとなる各クラスターは分類群としてしっかりと隔てられた集団と考えられ、これらを Order および Family の基本単位とすることはなんら問題のないことと判断した。本研究で作成される系統樹は ARB のものと比べてクラスター間を隔てる枝が非常に長くなり、またブートストラップ値も大きなクラスター間ではほとんどが 100%に近い数値を示し信頼性の高いものと判断した。また、本研究において表示された系統関係は Bergey's Manual で示されている分類体系とも異なっていた。

Class Alphaproteobacteria については、Database により引用した約 300 菌種のうち解析不能なものを除いた 239 菌種を用いて系統解析を行った。比較の対象となった塩基数は 919bp である。Bergey's Manual では *Hyphomonas* 属、*Hirschia* 属、*Maricaulis* 属 を含めるクラスターを Rhodobacteraceae 科で分類しているが、本系統解析結果、中間的菌種の存在によって *Hyphomonas* 属のクラスターの位置が変わるのを確認したが、常に他のクラスターからは明瞭に分かれた。そこでこのクラスターを Hyphomonadaceae 科として提案し、Caulobacteraceae 科、Rhodobacteraceae 科の三つの科の一つの

Rhodobacterales 目として提案する。Bergey's Manual では Brucellaceae 科を含める 10 科を Rhizobiales 目に分類したが、本解析の結果 Brucellaceae 科、Bartonellaceae 科、Rhizobiaceae 科、Phyllobacteriaceae 科を Rhizobiales 目として、Bradyrhizobiaceae 科、Methylobacteriaceae 科、*Hyphomicrobium* 属、*Pedomicrobium* 属、*Filomicrobium* 属、*Rhodomicrobium* 属を含める Hyphomicrobiaceae 科、そして *Azorhizobium* 属、*Xanthobacter* 属、*Ancylobacter* 属、*Stakeya* 属を含める Xanthobacteraceae 科の四つの科を合わせて Bradyrhizobiales 目として提案する。

Class Betaproteobacteria については、Database により引用した約 150 菌種のうち解析不能なものを除いた 136 菌種を用いて系統解析を行った。比較の対象となった塩基数は 983bp である。Bergey's Manual では Nitrosomonadaceae 科、Spirillaceae 科、Gallionellaceae 科を Nitrosomonadales 目、Methylophilaceae 科を Methylophilales 目、Neisseriaceae 科を Neisseriales 目、そして Rhodocyclaceae 科を Rhodocyclales 目として分類したが、本系統解析の結果この 4 目を一つの目として統合し 3 つの科 Nitrosomonadaceae 科、Neisseriaceae 科、Rhodocyclaceae 科を置くことを提案する。

植物根に生息する蛍光性 *Pseudomonads* の分類

植物根の蛍光性 *Pseudomonads* は植物に対して病原菌に対する拮抗性及び植物病原性作用、植物ホルモン調節などの多様な報告があるが、系統学的な分類の報告は少ない。系統学的な分類の理解は植物と蛍光性 *Pseudomonads* の相互作用の理解の基礎となる。そこで、本研究では植物根からできるだけ多くの蛍光性 *Pseudomonads* を分離し、それらの系統的分類を行った。長野県の伍賀、北大井、洗馬、木祖村、埼玉県の籠原(農業試験場)、東京都の弥生で土壌を採取し、キャベツ、ハクサイ、レタス、ニンジン、トマト、ダマネギ、ソラマメを栽培し、その植物根から蛍光性 *Pseudomonads* 選択培地 P-1 を用いて菌を分離した。分離した 471 株に対して蛍光性 *Pseudomonads* biovar を識別する生理・生化学試験を行った。生理・生化学試験から選別した菌株に対して 16S rRNA の部分塩基配列により系統解析を行った。Type strain 及び Typical strain を用いた DNA-DNA hybridization 法で 16S rRNA の部分塩基配列より作成した系統樹内の菌株のグループ間の類縁性を調べた。生理・生化学試験と 16S rRNA 塩基配列の系統樹では非常に多様な蛍光性 *Pseudomonads* の存在が確認された。さらに、DNA-DNA hybridization では、既知の種や *P. fluorescens* の 5 つの biovar および *P. putida* の 2 つの biovar と種レベルの類縁性を示さない非常に多様な種を含むことが示された。

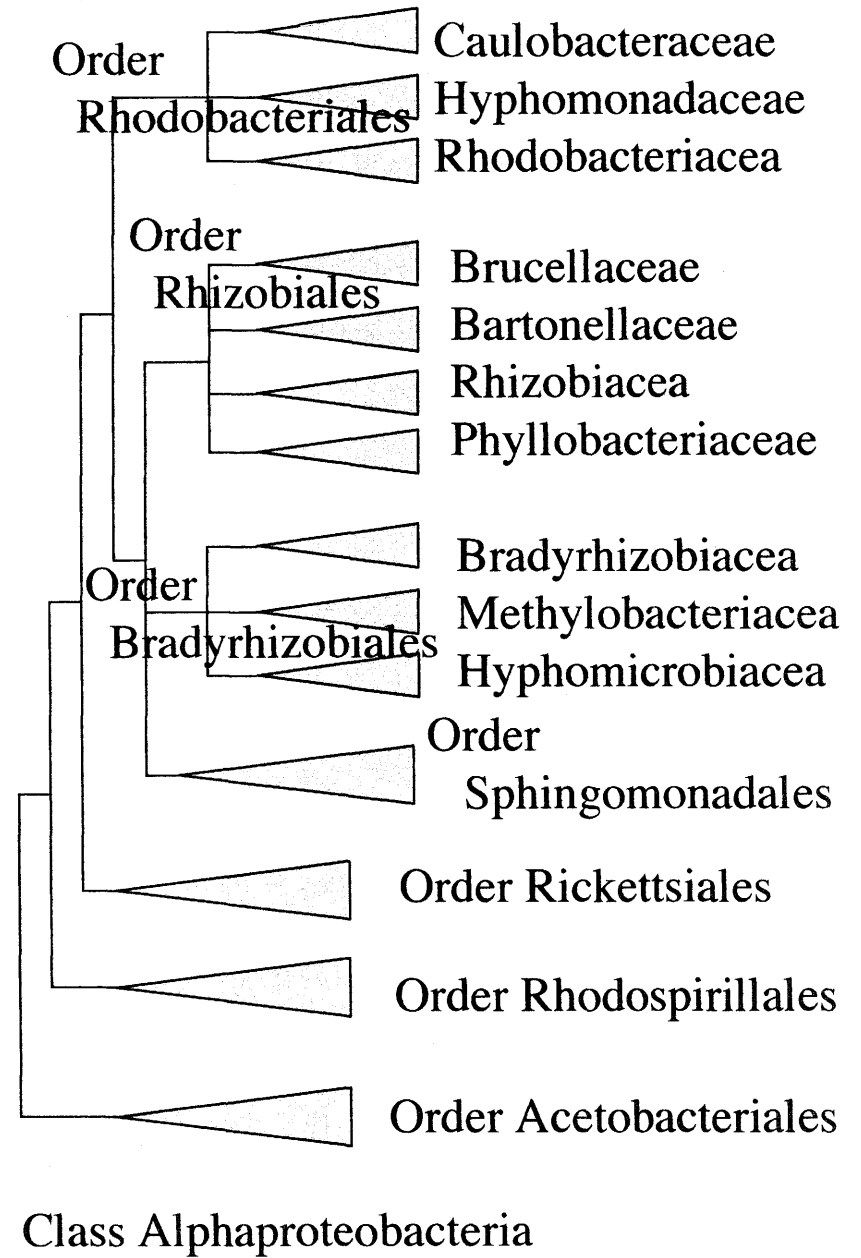
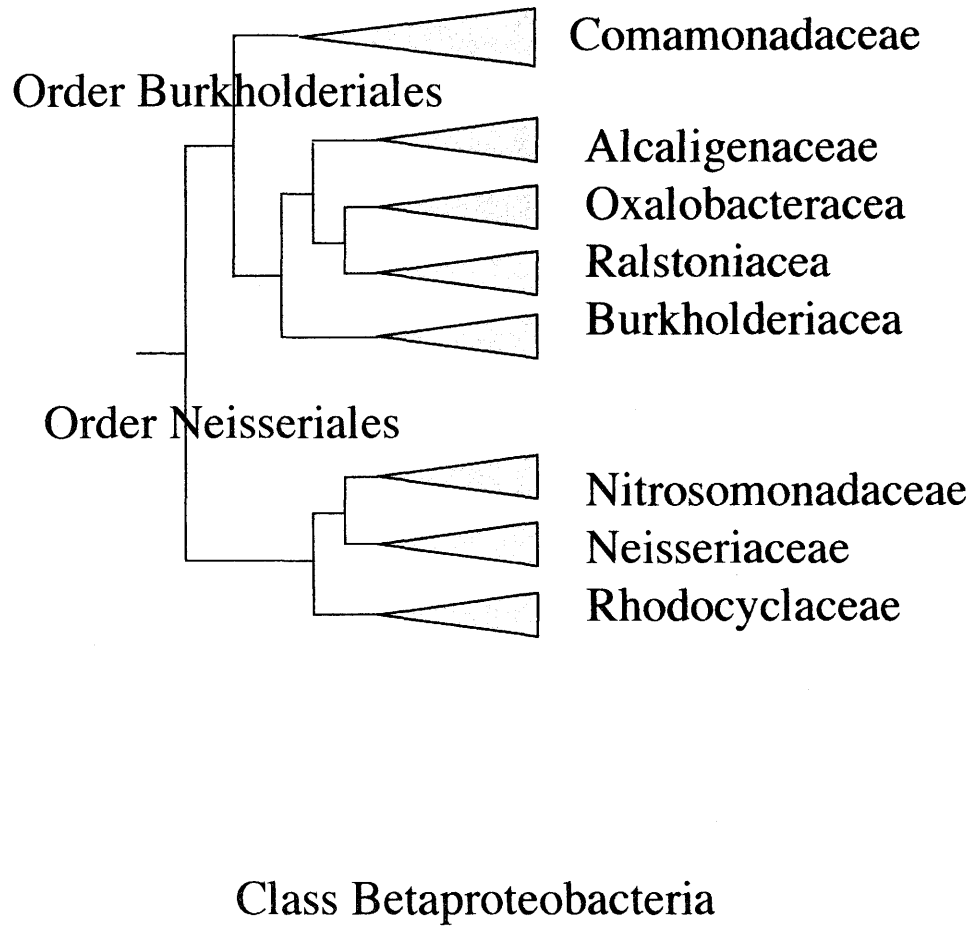


Fig. 1 Proposed System for Classes Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria