The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

*Pseudomonas*物語

古川　謙介

*Pseudomonas*属細菌は1～数本の極鞭毛をもつ好気性グラム陰性桿菌で，自然環境に広く存在し，多様性に富み，多彩な機能をもつことで知られている．近年，16S rRNAの系統解析が進み，これまでに*Pseudomonas*として分類されていた多くの菌株が別の属，あるいは新属へと再分類された．このうち，“true *Pseudomonas*”と呼ばれるグループは*P. aeruginosa*，*P. putida*，*P. fluorescens*および*P. syringae*を含む，いわば*Pseudomonas*のエリート集団である．*Pseudomonas*以外に分類された*Pseudomonas*-likeな菌は小文字でpseudomonadsと表記される．本稿では上記4株を中心に最近の*Pseudomonas*菌の身の上事情を眺めてみたい．

ふきだまり*Pseudomonas*菌の整理・整頓

1984年出版のBergey's Manual of Systematic Bacteriologyには94の*Pseudomonas*菌の記載があった．第二版には61の記載となった．古典的な分類では*Pseudomonas*菌はグラム陰性，桿菌，胞子を形成しない極鞭毛を有し，G＋C含量は50%以上である細菌であるとされていた．最近の系統解析により従来*Pseudomonas*に分類されていた多くの株が別の属名に，あるいは新たな属が新設され再分類された．16S rRNAの相同性に基づく分類では5つに分類されている．

グループI　*P. aeruginosa*，*P. fluorescens*，*P. putida*に代表されるグループで‘true *Pseudomonas*’あるいは“fluorescent pseudomonads”とも呼ばれている．

グループII　*P. cepacia*と*P. mallei*および*P. solanacearum*と*P. picketti*のグループでは，前者は*Burkholderia*，後者は*Ralstonia*に再分類された．

グループIII　*P. testosteroni*は*Comamonas*，*P. acidovorans*は*Delftia*，*P. facilis*は*Acidovorax*，*P. palleronii*は*Hydrogenophaga*に変更された．

グループIV　*P. diminuta*と*P. vesicularis*は*Brevundimonas*になった．

グループV　*P. maltophilia*は*Stenotrophomonas*に変更された．

原核細菌ゲノムのG＋C含量は22～74%である．同じ属であればG＋C含量は10%以内とされる．‘true *Pseudomonas*’ではG＋C含量は59～69%である．pseudomonadsの仲間では*Burkholderia*のG＋C含量は65～69%，*Ralstonia*で64～68%，*Acidovorax*で62～70%，*Comamonas*で62～67%，*Brevundimonas*で65～67%である．

*Pseudomonas*菌は極鞭毛をもつ分解屋

*Pseudomonas*属細菌は活発に運動する．*P. aeruginosa*，*P. alcaligenes*，*P. pseudoalcaligenes*，*P. stutzeri*，*P. mendocina*は1本の極鞭毛を持つ．*P. aeruginosa*以外の蛍光性*Pseudomonas*の多くは複数の極鞭毛を有する．*P. aeruginosa*と*P. putida*は利用できるすべてのアミノ酸，糖類，有機酸，芳香族酸に対して走化性を示す．運動性と走化性は*P. aeruginosa*の病原性に関与し，また，*P. fluorescens*の植物根への付着に重要である．

過去から現在に至るまでに著量の芳香族炭化水素が環境中に放出された．最も簡単な芳香族化合物の1つであるトルエンは自然界に広く存在している．トルエンはベンゼン環の高い共鳴エネルギーをもち，きわめて安定な化合物であるが，トルエンを資化する細菌は自然界から容易に分離することができる．この多くは*Pseudomonas*属細菌および関連細菌である．これらの細菌は酸素添加酵素（オキシゲナーゼ）により芳香環に水酸基を導入して分解を開始する．トルエンの初期酸素添加様式の違いから複数の代謝経路が明らかにされている．このすべてはトルエンをカテコールあるいはメチルカテコールへと変換する経路である．多くの*Pseudomonas*菌は諸種の芳香族化合物を単一の炭素源エネルギー源として利用する．たとえば*P. putida* KT2440は安息香酸，4-ヒドロキシ安息香酸，ベンジルアミン，フェニルアセテート，フェニルアミン，チロシン，フェニルエチルアミン，フェニルヘキサン酸，フェニルヘプタン酸，フェニルオクタン酸，コニフェニルアルコール，フェルラ酸，バニリン酸，ニコチン酸などを資化することが報告されている．

P. putida，*P. aeruginosa*，*P. fluorescens*および*P. syringae*のゲノム解析から芳香族化合物の5つの基本代謝経路が明らかとなった．これらの菌株には共通する代謝経路が存在する場合もあるが，独自の代謝経路をもつ

著者紹介　別府大学食物栄養科学部発酵食品学科（教授），九州大学名誉教授　E-mail: kfurukaw@nm.beppu-u.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

場合もある．たとえばβ-ケトアジピン酸およびホモゲンチゼート経路はすべて4つの*Pseudomonas*菌に存在するが，フェニルアセテート経路は*P. putida*のみに存在する．*P. aeruginosa*は安息香酸，アンスラニル酸，トリプトファン，マンデル酸をカテコールへと変換する遺伝子を持っているが，*P. putida* KT2440は安息香酸代謝遺伝子のみである．多くの*P. putida*株にはKT2440株にない代謝経路が存在する．*P. putida* ATCC 12633株はマンデル酸経路を，*P. putida* F1株はカテコールメタ開環経路をもつ．

塩素化した炭化水素は産業上きわめて有用で多くの化合物が世の中に登場した．炭化水素への塩素の導入はその物理化学的性質に大きく影響し，これが環境に出た場合，微生物分解がきわめて困難となる．微生物が塩素化芳香族化合物を分解することが報告されたのは1960年代のことでクロロフェノキシアセテートがクロロカテコールを経て分解することが明らかにされた．*Pseudomonas* sp. B13株は3-クロロ安息香酸を3-クロロ-および4-クロロカテコールを経由して分解する．ポリ塩化ビフェニル（PCB）の分解はビフェニル代謝酵素による共代謝（コメタボリスム）である．PCBの微生物分解はわが国はもちろん，世界の多くの研究者によってさまざまなビフェニル資化菌が分離され，研究が展開された．1986年，*P. pseudoalcaligenes* KF707株から初めて*bph*遺伝子がクローン化され，その後詳細に解析された．米国のGE社で分離されたPCB分解菌*Burkholderia xenovorans* LB400株（当初は*Pseudomonas*として分離された）は塩素置換の多い広範囲のPCBを分解できる．*Rhodococcus jostii* RHA1株はグラム陽性菌であるが，PCB分解遺伝子は複数の巨大な線状プラスミドに存在する．*Rhodococcus*属細菌にはゲテモノ食いが多いため，冗談でグラム陽性シュードモナスと呼ばれることがある．

善玉*Pseudomonas*菌と悪玉*Pseudomonas*菌

*Pseudomonas*属細菌は環境に広く存在する．*P. putida*は土壌や水圏，特に汚染された土壌から容易に分離することができる．*P. putida* KT2440株はトルエン資化菌である*P. putida* mt-2株のプラスミド（pWW0）脱落株である．米国NIHの‘組換えDNA実験指針’でグラム陰性土壌細菌では最初に安全性の高い宿主として認定された．KT2440株を用いて環境汚染物質分解の新規な代謝系の構築，代謝中間物質の生産，化学合成のためのキラル化合物の製造など，さまざまな応用研究が展開されている．

*P. syringae*と*P. fluorescens*は共に植物に関係深い菌であるが，植物との相互関係は異なっている．*P. syringae*は作物の葉に被害を及ぼす病原菌であるが，*P. fluorescens*は根圏に棲みつき植物の成長を促がす．すなわち，植物病原菌を抑え，植物の病気に対する抵抗性を高める．これら2つの菌の生活環とその生態的地位には基本的な違いが見られる．*P. fluorescens*は根圏の複雑で競争的な環境に適応したが，植物へ寄生することはできなかった．*P. syringae*の植物への寄生はきわめて宿主特異的である．トマト根の先端にコロニーをつくる*P. fluorescens* WCS365株は，根分泌物，アミノ酸，リンゴ酸，クエン酸に走化性を示す．このように*P. fluorescens*は広範囲な条件で生活するジェネラリストである．その大きなゲノムにはフレキシブルな制御ネットワークと栄養摂取，ストレス耐性，抗生物質産生，付着，バイオフィルム形成に関する遺伝子が存在する．一方，*P. syringae*は植物への外部寄生および内部寄生のスペシャリストであり，氷核触媒としても利用されている．

*P. aeruginosa*は日和見感染菌として多くの病原性因子を作る．この細菌は無機物の表面のみならず，上皮細胞へ効率よく定着する．堅固なコロニーを作り，宿主細胞の防御機構を破壊し，深く侵入して炎症を起こす．IV型繊毛，非繊毛アドヘーシン，リポ多糖類，エラスターゼ，エキソトキシンA，フォスフォリパーゼC，プロテアーゼIV，リパーゼ，エキソエンザイムS，T&Y，エキソトキシンU，アルギン酸，ピオシアニン，シデロフォア，青酸，ラムノリピドなどの病原性因子をつくるが，これらの生産にはクォーラムセンシング回路が関与している．

分解系プラスミドとトランスポゾン

*Pseudomonas*属細菌から数kb～400 kbを超える巨大なプラスミドが見いだされている．分解系プラスミドは1970年初期に発見された．これらの初期のものはSAL，OCT，CAMと名付けられたが，それぞれ，サリチル酸，オクタン，カンファー（樟脳）の代謝をコードする．少し遅れてNAH（ナフタレン代謝）およびTOL（トルエン代謝，現在はpWW0）が見いだされた．これらはすべて*Pseudomonas*菌から見いだされたが，これらのプラスミドは80～>300 kbのサイズできわめて大きく，接合伝達に必要な*tra*遺伝子を有し，近縁の細菌に伝達される．pWW0の2つの*xyl*オペロンはトルエンをTCA回路へ導く遺伝子をコードしている．pWW0の116,580 bpのゲノムは2002年に決定された．代謝遺伝子は37.7 kbにおよびプラスミドの約1/3を占める．上流オペロン

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

と下流オペロンは11 kb離れて存在するが，この両オペロンは相同な2つの挿入配列（IS*1246*）により挟まれてトランスポゾン（Tn*4651*，56-kb）として機能する．

除草剤アトラジンは1960年以来毎年50万トンが使用され，環境汚染を引き起した．*Pseudomonas* ADP株はアトラジンを分解し完全に無機化する．これらの分解遺伝子は108,845 bpのプラスミドpADO-1上に存在する．アトラジン分解の最初の3つの遺伝子，*atzA*，*atzB*，*atzC*遺伝子はアトラジンをシアヌル酸に変換する酵素をコードするが，これらはpADP-1の35，45，71 kbに位置に分散して存在する．残りの代謝をコードする遺伝子クラスター*atzDEF*はオペロンを形成し共転写されている．*atzC*のG+C含量は44%であるが，*atzA*（58%）*atzB*（61%）および*atzDEF*の59～61%よりきわめて低い．*atzA*，*atzB*および*atzC*遺伝子の周辺にはいずれもIS*1071*が存在することから3つの遺伝子は起源が異なり，同じベクター上に集合したものと推定されている．アトラジン分解菌として他に*Alcaligenes*，*Ralstonia*，*Agrobacterium*が分離されているが，これらはすべて*atzA*，*atzB*，*atzC*遺伝子を保有しており，pADP-1プラスミドが接合により土壌細菌に自己伝達することが示された．

カルバゾール資化菌*Pseudomonas* CA10株のプラスミドpCAR1は全塩基配列（199,035-bp）が決定された．2つの代謝遺伝子は72.8-kbの巨大なトランスポゾンTn*4676*に存在する．このプラスミドはトルエンプラスミドpWW0と多くの類似性を有している．

接合トランスポゾンは細胞同士の接触を通して水平に伝播する．接合トランスポゾンは染色体から切り出され，環状の中間体を形成，接合により受容菌に入る．プラスミドとは異なり，この環状中間体は複製しない．受容菌に入った環状中間体は染色体に組み込まれる．この切り出しと組み込みは溶原性ファージの部位特異的リコンビナーゼによって生起する反応に似ている．*Pseudomonas* B13株の接合トランスポゾン*clc*エレメントは105-kbでクロロカテコールの代謝に関与する．*P. putida* KF715株からはビフェニルとサリチル酸の代謝遺伝子群をコードする90-kbの*bph-sal*エレメントが見いだされた．このエレメントはきわめて高頻度に他の*P. putida*株に接合伝達する．

バイオコントロール*Pseudomonas*菌

世界の穀物生産の30%が病気や害虫で失われているといわれている．植物根圏（rhyzosphere）には通常の土壌に比べて10～1000倍の細菌が生息している．微生物は根に万遍なく分布しているわけではなく，根の表面の約6%の領域に微小コロニーあるいはバイオフィルムを形成して存在する．根圏土壌1 g中には細菌が1×10^9，放線菌5×10^7，糸状菌1×10^6が存在すると推定されるが，根圏微生物の主役は*Pseudomonas*属細菌である．これらの*Pseudomonas*菌の中には二次代謝物質を生産し，病原性糸状菌の病害を軽減してくれるバイオコントロール菌が存在する．鉄はすべての生物にとって必須な元素であるが，好気的条件で水に難溶性であるため，生物にとってその摂取が困難である．そのため細菌は鉄を取り込むための戦略を進化させた．すなわち，Fe(III)をキレートする“シデロフォア”とよばれる低分子化合物をつくり，その膜輸送系を構築した．シデロフォアは鉄欠乏に応答して合成される．この物質が分泌されると不溶性の鉄は可溶化され，細胞の表面に存在する受容体タンパク質に結合して細胞内に運ばれる．

*Pseudomonas*菌がつくるシデロフォアは4種類が知られている．*P. putida* WCS358株は大量のシデロフォアを生産し，シデロフォア-Fe(III)複合体を取り込む．鉄に対する競合がバイオコントロール*Pseudomonas*菌と病原菌の間で起るが，結果として植物根では病原菌の生育は抑えられる．ある*Pseudomonas*菌はウィルスや植物病原菌に対する植物の防御機構を誘導する．2,4-ジアセチルフロログルシノール生産*Pseudomonas*菌はキウリ，トマト，タバコ，大麦，小麦のような重要な作物の根圏に普遍的に存在し病気を抑制する．

嚢胞性繊維症

嚢胞性繊維症（cystic fibrosis, CF）は欧米で高頻度にみられる遺伝性疾患で常染色体劣性遺伝を示す．塩素イオンチャンネルの遺伝子異常によって鼻汁や汗の粘度が高くなる．アルギン酸生産*P. aeruginosa*のCF患者における病原性については多くの研究がなされている．CF患者の肺気管に感染した*P. aeruginosa*の驚くべき性質はアルギン酸を過剰生産するムコイド株への変異によって生起する．このAlg$^+$株はバイオフィルムを形成して肺の中に棲み着く．この状態では抗生物質が効かなくなり，CF患者は肺炎を繰り返し気管支拡張症をきたす．

*P. aeruginosa*でのムコイド株への変身の分子機構は詳細に研究されている．アルギン酸の生合成遺伝子は12存在するがこの*algD*オペロンはシグマ因子σ^{22}によって認識され転写される．σ^{22}は膜タンパク質であるMucAと結合して存在するが，*mucA*遺伝子に欠失変異が生起するとMucAタンパク質はσ^{22}と結合できなくなり，σ^{22}はフリーとなり*algD*オペロンの転写が開始されムコイ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ド株となる．クォーラムセンシングは*P. aeruginosa*のバイオフィルム形成に大きく関与する．バイオフィルムを形成する抗生物質耐性*P. aeruginosa*はCF患者の肺の中で成長する．

*Pseudomonas*菌のゲノム

これまでに4つの異なる*Pseudomonas*種でゲノム配列が明らかになっている．*Pseudomonas*属細菌のゲノムは6～7Mbpのサイズで他の細菌ゲノムに比べて大きい．G＋C含量は58～62%，およそ5,450（+/－ 100）の遺伝子，4～7のrRNAオペロンが存在する．*P. aeruginosa*ゲノムの大部分は他の*Pseudomonas*と類似しているが，III型分泌系に代表される“virulence”に関わる遺伝子クラスターが存在する．*P. aeruginosa*のゲノム解析から64の二成分系シグナルトランスダクション系の存在が明らかになった．このことがこの細菌の広範で多様な環境への適応を可能にしている要因である．この中でもGacS/GacA二成分系は抗生物質，青酸，分泌酵素，クォーラムセンシング物質の生産に関わり，加えて病原性や生態適応にも関与している．ゲノム配列からこの菌の遺伝子の8.4%は制御に関与する．これは大腸菌のそれの5.8%，枯草菌の5.3%と比較して非常に高い．*P. aeruginosa*の大きなゲノムと遺伝子の複雑さはこの菌の進化・適応を反映している．*P. aeruginosa*と*P. putida*のゲノムは多くの類似遺伝子を有するが，コドンの使われ方が異なっている．

*P. syringae*のゲノムは他の*Pseudomonas*のそれとは際立った違いが認められる．この菌は共生あるいは寄生の生活スタイルに適応するために，比較的短期間に進化したようにみえる．これにはゲノムを通して散在する多くのトランスポゾンが関与したらしい．

*P. fluorescens*はPf 0-1，Pf-5，SBW25の3株でゲノムが解読されている．*P. fluorescens*と*P. syringae*は植物表面に生息するため多くの共通点がみられる．ゲノム解析からこれらの細菌間において多くの遺伝子の交換が生起した証拠が認められる．2つの菌は遺伝子再編，遺伝子伝達，プラスミド伝達などを通して環境に適応してきたようだ．

おわりに

筆者の研究の大部分は*Pseudomonas*菌との出会いであった．*Pseudomonas*菌の“pseudo”は“偽”の意味であるが，筆者が長年つき合ってきたPCB分解菌は*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株である．属名にも種名にも“pseudo”がついている．*Pseudomonas*の名付け親は知らないが，本稿に述べたように*Pseudomonas*属細菌は*Escherichia*，*Bacillus*，*Streptomyces*などの真正な名前のついた細菌と同様，最も研究されているバクテリアである．多様な*Pseudomonas*菌の多彩な機能は基礎面においても応用面においてもきわめて重要であり，この細菌がこれまでも，そしてこれからもきわめて魅力的な“いきもの”でありつづけることはいうまでもない．

最後におことわりを一言．本稿では*Pseudomonas*菌のさまざまな代謝経路が記載されているが，その詳細を示すことができなかった．代謝経路に関してはBiocatalysis/Biodegradation Database（http://umbbd.msl.umn.edu/）から情報を入手いただきたい．また，幾多の文献も割愛した．2004年，Kluwer Academic/Plenum Publisherから“*Pseudomonas*”と題する全3巻，合計2032頁に及ぶ本が出版された．最近の*Pseudomonas*研究を詳しく知りたい方にお薦めしたい．

NII-Electronic Library Service