

昆虫共生細菌 *Proffttella Dco* の特異なポリケチド合成系

中鉢 淳¹, Jörn Piel², Igor Malenovsky³, Ilia Gjonov⁴, 広瀬 佑¹ (豊技大, ²チューリッヒ工科大, ³マサリク大, ⁴ソフィア大)

私どものEII RISプロジェクト研究では、昆虫共生細菌からの新規二次代謝産物の獲得と、その応用利用を目指した機能解析を進めている。これまでに、1) 重要害虫「ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*, 半翅目・キジラミ上科)」のオルガネラ様共生細菌 *Candidatus Proffttella armatura* (*Proffttella*_DC, Gammaproteobacteria: Burkholderiales) が、新規ポリケチド「ディアフォリン」を産生して宿主昆虫を天敵から防衛していること、2) ディアフォリンが抗腫瘍活性を示すこと、などを明らかにしている。今回は、ミカンキジラミ近縁種からの *Proffttella* 姉妹系統 (*Proffttella*_Dco) の発見と、このゲノム解析に基づくユニークなポリケチド合成系の発見について報告する。

1. *Proffttella* 姉妹系統の探索と発見

ミカンキジラミの同属2種 *Diaphorina cf. continua* (フランス・コルシカ島個体群) および *Diaphorina lycii* (ブルガリア個体群) よりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を標的とした 16S_341Fmod (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGYYTAMGGRNCGCWCAG-3') 16S_805R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') プライマーセット、シーケンサー-MiSeqシステム (Illumina)、QIIME2ソフトウェアおよびSILVAデータベースを用いたアンプリコン解析を行った。

→ *D. cf. continua*, *D. lycii* の両者が⁶, *Proffttella* の姉妹系統を保有することが明らかとなった。

その他、栄養共生体 *Carsonella*、柑橘病の病原体に近縁な *Liberibacter*、昆虫の生殖を攪乱する *Wolbachia*、ヒト病原体に近縁な *Diplorickettsia* などの存在を明らかにした。動物-植物-細菌間の相互作用について新たな洞察をもたらし、ミカンキジラミの新規防除法開発の基盤となる成果。

(Microb Ecol 2020, 80(2):410-422)

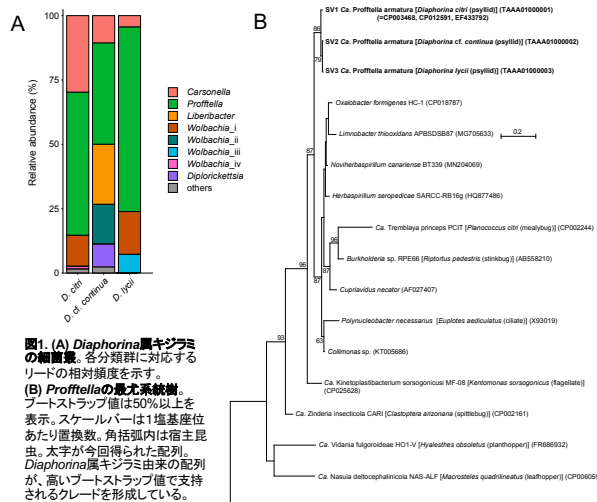


図1. (A) *Diaphorina* 属キジラミの細菌叢。各分類群に対応するリードの相対頻度を示す。(B) *Proffttella* の最大系統樹。ブートストラップ値は50%以上を示す。スケールバーは1塩基置換あたり置換数。角括弧内は宿主昆虫。太字が今回得られた配列。*Diaphorina* 属キジラミ由来の配列が、高いブートストラップ値で支持されるクラスを形成している。

2. *D. cf. continua* 由来 *Proffttella* 姉妹系統のゲノム解析

上記 *D. cf. continua* より抽出したDNAをMiSeqにより解析し、*Proffttella* 姉妹系統 (*Proffttella*_Dco) および *Candidatus Carsonella ruddi* (*Carsonella*_Dco) のゲノム構造を決定した。比較ゲノム解析により、1) *Proffttella*_Dcoにもディアフォリン合成経路が存在すること、2) ただし **複数の合成酵素でアシルキリタンパク質ドメインが異常に増幅していること**、などが明らかとなった。有用物質の工業生産効率改善にヒントを与える成果と言える。(その他、*Proffttella*_Dcoと*Proffttella*_DCでのヘモリシン相同遺伝子や、ビタミン、カロテノイド合成系遺伝子の保存や、*Proffttella* および *Carsonella* 系統のゲノムのシンテニー、安定性などを解明した。)

(Genome Biol Evol 2020, 12(11):1975-1987)

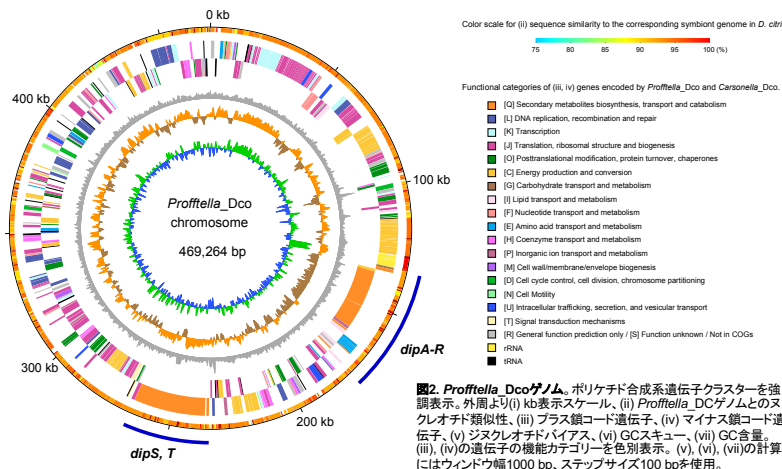


図2. *Proffttella*_Dcoゲノム。ポリケチド合成系遺伝子クラスターを強調表示。外周より(i) kb表示スケール、(ii) *Proffttella*_DCゲノムとのヌクレオチド類似性、(iii) プラス鎖コード遺伝子、(iv) マイナス鎖コード遺伝子、(v) ジンクロナドバイス、(vi) GCスケー、(vii) GC含量、(iii)、(iv) の遺伝子の機能カテゴリーを色別表示。(v)、(vi) の計算にはウィンドウ幅1000 bp、ステップサイズ100 bpを使用。

表1. *D. cf. continua* および *D. citri* 由来 *Proffttella* のゲノムの概要。

	<i>Proffttella</i> _Dco	<i>Proffttella</i> _DC
Chromosome size (bp)	469,264	459,399
Plasmid size (bp)	>5,952	5,458
G+C content (plasmid) (%)	24.4 [23.1]	24.2 [23.9]
CDS (plasmid)	355 [4]	365 [6]
rRNA	3	3
tRNA	34	34



図3. *Proffttella*_Dcoのポリケチド合成系(Dip_Dco)の構造とディアフォリン合成の推定経路。比較のため、*Proffttella*_DCおよび *Paederus* 共生体の相同酵素 (Dip_DC および Dip_DC) をDip_Dco上に反転で示す。A, 非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)アデニル化ドメイン; C, NRPS連鎖ドメイン; DH, 脱水酵素; GNAT, GCN5-関連 N-アセチル基転移酵素スーパーファミリー; ECH, エチル-CoA還元酵素様ドメイン; KR, ケト還元酵素; KS, ケト合成酵素; KS, 非伸長性KS; MT, C-メチル基転移酵素; PS, ペンタ合成酵素; OXY, 酸素添加酵素; TE, テオオステル加水分解酵素; ?, 機能未知領域。灰色で示すドメインは、活性部位残基の喪失により不活性と推定される。黒丸はACP (アシルキリタンパク質) やPCP (NRPSペプチドキリタンパク質) などのキリタンパク質ドメイン。Dip_DcoとDip_DCでACPが異常に増幅(赤で強調)していることが分かる。

図4. KSドメインから推定されるDipO_Dco, DipP_DcoおよびDipT_Dcoの系統的位置。各括弧内は細菌の上位分類階層で、αはプロテオバクテリア門の綱を表す。シス-AT PKSのKS配列を外群とした。*Proffttella* の配列は赤字で、*Proffttella*_DCの配列は赤太字で示す。