



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Cupriavidus necator

NH9株のゲノム情報に基づく芳香族塩素化合物分解
に関する遺伝学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森内, 良太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81614

Cupriavidus necator NH9 株のゲノム情報に基づく
芳香族塩素化合物分解に関する遺伝学的研究

2020年

岐阜大学大学院連合農学研究科
生物資源科学
(静岡大学)

森 内 良 太

Cupriavidus necator NH9 株のゲノム情報に基づく
芳香族塩素化合物分解に関する遺伝学的研究

森 内 良 太

略語表

2-CM	2-Chloro- <i>cis,cis</i> -muconate
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetate
3-CB	3-Chlorobenzoate
AAHS	Aromatic acid:H ⁺ symporter
ABC	ATP-binding cassette
ACS	Anion/cation symporter
ANI	Average nucleotide identity
BA	Benzoate
BSM	Basal salts medium
CA	Citric acid
CCM	<i>cis,cis</i> -Muconate
CDSs	Coding sequences
COG	Clusters of orthologous groups
DDH	DNA-DNA hybridization
DEGs	Differentially expressed genes
FDR	False discovery rate
GO	Gene ontology
HBA	Hydroxybenzoate
HPLC	High performance liquid chromatography
Inc	Incompatibility
IS	Insertion sequence
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LogFC	Log fold-change

LTTR	LysR-type transcriptional regulator
MCP	Methyl-accepting chemotaxis protein
MDS	Multi-dimensional scaling
MFS	Major facilitator superfamily
MHS	Metabolite:H ⁺ symporter
MiGAP	Microbial genome annotation pipeline
MLSA	Multilocus sequence analysis
PAGE	Parametric analysis of gene set enrichment
PCBs	Polychlorinated biphenyls
PCR	Polymerase chain reaction
PGAAP	Prokaryotic genome automatic annotation pipeline
PHB	Polyhydroxybutyrate
POCP	Percentage of conserved proteins
ROS	Reactive oxygen species
SOO	Superoxide oxidase
TNA	Tetra-nucleotide analysis
TPM	Transcript per million

目次

第一章

序論.....	9
本研究の目的と概要	22

第二章

<i>Cupriavidus necator</i> NH9 株の全ゲノム配列決定と芳香族化合物分解能の推定	23
2-1 諸言	23
2-2 材料及び方法	23
2-2-1 使用菌株	23
2-2-2 培地及び培養条件	23
2-2-3 ゲノム DNA の調製	25
2-2-4 エタノール沈殿による DNA の濃縮	26
2-2-5 DNA の定量	27
2-2-6 DNA 電気泳動	27
2-2-7 次世代シーケンサーMiSeq に供試するためのライブラリ調製	27
2-2-8 作製したライブラリの評価	27
2-2-9 MiSeq によるゲノム DNA シーケンス解析	28
2-2-10 ドラフトゲノム配列の決定	28
2-2-11 PacBio によるゲノム DNA シーケンス解析	28
2-2-12 全ゲノム配列の決定	29
2-2-13 Polymerase chain reaction (PCR 法)	29
2-2-14 完全ゲノム DNA 配列取得のための PCR	30
2-2-15 アガロースゲルからの DNA の回収	30
2-2-16 サンガー法による DNA 塩基配列決定法	30

2-2-17	アノテーション	30
2-2-18	各レプリコンにおける複製開始点の推定	32
2-2-19	ゲノム情報を用いた機能解析.....	32
2-2-20	芳香族化合物による増殖能の確認	33
2-2-21	芳香族化合物による増殖曲線.....	33
2-2-22	高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による芳香族化合物分解能の解析	34
2-3	結果.....	36
2-3-1	抽出したゲノム DNA のクオリティ	36
2-3-2	ドラフトゲノム配列の決定	36
2-3-3	完全ゲノム配列の決定	42
2-3-4	各レプリコンにおける推定複製開始点.....	42
2-3-5	COG による機能解析.....	47
2-3-6	芳香族化合物分解能の推定	47
2-3-7	芳香族化合物による増殖曲線	54
2-3-8	HPLC による芳香族化合物分解能の解析	54
2-4	考察.....	57
第三章		
3	クロロ安息香酸及び安息香酸分解中に変動する遺伝子及び機能の網羅的解析.....	73
3-1	諸言	73
3-2	材料及び方法	75
3-2-1	培地及び培養条件.....	75
3-2-2	Total RNA 調製のための菌体の回収.....	75
3-2-3	Total RNA の調製.....	75
3-2-4	Total RNA からのゲノム DNA の除去	78

3-2-5	Total RNA の再精製	79
3-2-6	Total RNA の定量	79
3-2-7	Total RNA の電気泳動	79
3-2-8	バイオアナライザによる Total RNA の確認	80
3-2-9	Total RNA からの rRNA の除去	80
3-2-10	MiSeq に供試するためのライブラリ調製	80
3-2-11	作製したライブラリの評価	80
3-2-12	MiSeq による RNA シーケンス解析	83
3-2-13	リードデータのマッピング、カウントと遺伝子発現差解析	83
3-2-14	逆転写 PCR	83
3-2-15	定量的 RT-PCR	85
3-2-16	Gene ontology (GO) エンリッチメント解析	85
3-2-17	スライディングプレートアッセイ	85
3-3	結果	89
3-3-1	抽出した Total RNA のクオリティ	89
3-3-2	RNA シーケンス	89
3-3-3	遺伝子発現差解析	89
3-3-4	芳香族化合物分解遺伝子の発現	96
3-3-5	芳香族化合物の取り込みに関わるトランスポーターの推定	101
3-3-6	ストレス応答遺伝子の発現	106
3-3-7	PHB 合成遺伝子の発現	109
3-3-8	GO エンリッチメント解析による機能変動	109
3-3-9	芳香族化合物に対する走化性	115
3-4	考察	118

第四章

全ゲノム情報を使用した <i>Cupriavidus</i> 属と <i>Ralstonia</i> 属細菌の再分類	124
4-1 諸言	124
4-2 材料及び方法	125
4-2-1 解析に使用した菌株	125
4-2-2 解析に使用したデータのダウンロード	125
4-2-3 系統樹による解析	125
4-2-4 BenA 及び PobA アミノ酸配列による系統解析	130
4-2-5 オーソログ解析による芳香族化合物分解能の推定	130
4-2-6 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析	130
4-2-7 Multilocus Sequence Analysis (MLSA) による系統解析	134
4-2-8 ANI による種分類解析	134
4-2-9 Tetra-nucleotide analysis (TNA) による分類解析	136
4-2-10 Percentage of conserved proteins (POCP) による属分類解析	136
4-3 結果	138
4-3-1 BenA 及び PobA アミノ酸配列による系統解析	138
4-3-2 推定芳香族化合物分解能と分類の関連性	138
4-3-3 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析	138
4-3-4 MLSA による系統解析	143
4-3-5 ANI による種分類解析	143
4-3-6 TNA による分類解析	149
4-3-7 POCP による属分類解析	151
4-3-8 <i>Cupriavidus</i> 属及び <i>Ralstonia</i> 属細菌株の再分類	151
4-4 考察	155

総括.....	158
謝辞.....	162
引用文献.....	164

第一章

序論

芳香族化合物による環境汚染

芳香族化合物は、自然界において最も広範囲に存在する有機化合物の 1 つであり、地球のバイオマスの約 25%が、ベンゼン環を主とした化合物から構成されている (Gibson and Harwood, 2002)。芳香族化合物には、リグニンやフラボノイド、キノン、芳香族アミノ酸などのように、自然由来であるものや生命の維持に重要な役割を果たすもの、またダイオキシンやポリ塩化ビフェニル (PCBs)、芳香族ニトロ化合物などの人工的な化合物が存在する (Rieger *et al.*, 2002)。共鳴構造をとるベンゼン環は構造的・化学的に安定であるため、芳香族化合物の利用や生産は世界中に広まった。例えば、PCBs は熱安定性や電気絶縁性が高く、耐薬品性にも優れているため、熱媒体や電気機器、溶剤などに広く利用されてきた (中地, 2005)。また、2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) は 1940 年代初頭、史上初の有機除草剤として開発され、雑草除去選択制の高さやコストの観点から、世界中で使用されてきた (伊藤, 2016)。しかし構造的に安定であるということは、裏を返せば環境中に残存しやすい (難分解性) ということであり、上記の PCBs やダイオキシン、2,4-D など毒性を持つ多くの芳香族化合物が自然環境に残存し、その結果、世界規模の環境問題を引き起こしている (McLeod and Eltis, 2008; 伊藤, 2016; 中地, 2005)。

芳香族化合物の中でも特に、芳香族塩素化合物は有害な物質である。例えば一部の芳香族塩素化合物は、対応する親芳香族化合物よりも高い毒性 (発がん性、変異原性、催奇性) を有すると報告されている (Kitazawa *et al.*, 2006; Ohura, 2007)。また芳香族化合物を含む有機塩素化合物 (chlorinated organic compound) は除草剤、殺虫剤、溶剤、可塑剤など、世界中で利用されているが、それらは毒性、生物濃縮性、残留性を有する (Fetzner and Lingens, 1994)。このため、米国環境保護局 (U.S.EPA) がまとめた優先汚染物質のリスト (Table 1-1) において、有機塩素化合物 (芳香族塩素化合物も含む) が最も多く掲載されており、利用の規制や排出基準作成のために公表さ

Table 1-1 優先汚染物質のリスト

番号	化合物名
1	アセナフテン
2	アクロレイン
3	アクリロニトリル
4	ベンゼン
5	ベンジジン
6	四塩化炭素
7	クロロベンゼン
8	1,2,4-トリクロロベンゼン
9	ヘキサクロロベンゼン
10	1,2-ジクロロエタン
11	1,1,1-トリクロロエタン
12	ヘキサクロロエタン
13	1,1-ジクロロエタン
14	1,1,2-トリクロロエタン
15	1,1,2,2-テトラクロロエタン
16	クロロエタン
17	ビス(クロロエチル)エーテル
18	2-クロロエチルビニルエーテル
19	2-クロロナフタレン
20	2,4,6-トリクロロフェノール
21	<i>p</i> -クロロ- <i>m</i> -クレゾール
22	クロロホルム
23	2-クロロフェノール
24	1,2-ジクロロベンゼン
25	1,3-ジクロロベンゼン
26	1,4-ジクロロベンゼン
27	3,3-ジクロロベンジジン
28	1,1-ジクロロエチレン
29	1,2-ジクロロエチレン
30	2,4-ジクロロフェノール
31	1,2-ジクロロプロパン
32	1,3-ジクロロプロピレン
33	2,4-ジメチルフェノール

番号	化合物名
34	2,4-ジニトロトルエン
35	2,6-ジニトロトルエン
36	1,2-ジフェニルヒドラジン
37	エチルベンゼン
38	フルオランテン
39	4-クロロジフェニルエーテル
40	4-ブロモジフェニルエーテル
41	ビス(2-クロロイソプロピル)エーテル
42	ビス(2-クロロエトキシ)メタン
43	ジクロロメタン
44	クロロメタン
45	ブロモメタン
46	ブロモホルム
47	ブロモジクロロメタン
48	ジブロモクロロメタン
49	ヘキサクロロブタジエン
50	ヘキサクロロシクロペンタジエン
51	イソホロン
52	ナフタレン
53	ニトロベンゼン
54	2-ニトロフェノール
55	4-ニトロフェノール
56	2,4-ジニトロフェノール
57	4,6-ジニトロ- <i>o</i> -クレゾール
58	N-ニトロソジメチルアミン
59	N-ニトロソジフェニルアミン
60	N-ニトロソジ- <i>n</i> -プロピルアミン
61	ペンタクロロフェノール
62	フェノール
63	フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)
64	フタル酸ブチルベンジル
65	フタル酸ジブチル

れている。このように、有機塩素化合物の負の面が生物圏に及ぼす影響は、特に深刻であると考えられる。

芳香族塩素化合物分解細菌に関する研究

難分解性の芳香族塩素化合物が環境中に残存する一方、これら化合物を分解する細菌が存在する。これまでに数多くの分解細菌が単離されているが、代表としてグラム陰性細菌の *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 株 (Don and Pemberton, 1981) と *Paraburkholderia multivorans* LB400 株 (Bopp, 1986)、グラム陽性細菌の *Rhodococcus jostii* RHA1 株 (Seto *et al.*, 1995) が挙げられる (Table 1-2)。JMP134 株は 2,4-D を分解する細菌であり、詳細は後述する。LB400 株と RHA1 株は、ビフェニルとの共代謝により PCBs を分解する細菌である。これまでの研究より、PCBs の分解遺伝子群や遺伝子群の転写調節機構、及び分解酵素の機能が同定、解析されており、PCBs 分解経路は明らかとなっている (Fig. 1-1) (Furukawa, 2000)。また、LB400 株と RHA1 株の全ゲノム配列は解明されており (Chain *et al.*, 2006; McLeod *et al.*, 2006)、さらにトランスクリプトーム解析 (Denef *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2006) や、プロテオーム解析 (Denef *et al.*, 2005; Patrauchan *et al.*, 2005) といった網羅的な研究も行われ、PCBs 分解に重要な遺伝子や誘導遺伝子が同定されていたり、芳香族化合物分解能取得の進化に関する考察がされている。これらの株は、PCBs 以外にも様々な化合物を分解する (Aukema *et al.*, 2017; Gürtler *et al.*, 2004) ため、バイオレメディエーション (生物学的環境修復) を目指した実環境への応用研究も盛んに行われている (Rodrigues *et al.*, 2006; Watahiki *et al.*, 2019)。

このように、芳香族塩素化合物である PCBs や 2,4-D の分解 (後述) については、精力的に研究が行われてきた。しかし、これらの化合物は有毒であり、特に PCBs は様々な異性体を含む、複雑な物質である。そのため、シンプルな構造と毒性を持たないという理由から、芳香族塩素化合物のモデル化合物として、クロロ安息香酸が使用されている (Bott and Kaplan, 2002)。同様の理由により、芳香族化合物のモデル化合物として、安息香酸が使用されている (Gibson and Harwood, 2002)。Bph 酵素によるビフェニルと PCBs 分解により、中間代謝産物として安息香酸とクロロ安息香酸

Table 1-2 芳香族化合物分解細菌

Genus	Species	Strain	Aromatics	Genome status	Reference
<i>Paraburkholderia</i>					
	<i>xenovorans</i>	LB400	Biphenyl, PCBs	Complete	Bopp, 1986
<i>Rhodococcus</i>	<i>jostii</i>	RHA1	Biphenyl, PCBs	Complete	Seto <i>et al.</i> , 1995
<i>Cupriavidus</i>	<i>basilensis</i>	SBUG 290	Biphenyl, Bisphenol A	N. A.	Wesche <i>et al.</i> , 2005; Zuhlke <i>et al.</i> , 2017
	<i>campinensis</i>	WS	Diphenyl ether, 4-bromodiphenyl ether, 4,4'-dibromodiphenyl ether	Draft	Wang <i>et al.</i> , 2015a
	<i>gilardii</i>	BJ71	2,4-D	N. A.	Han <i>et al.</i> , 2015
	<i>metallidurans</i>	T-1	2,4-D	N. A.	Wu <i>et al.</i> , 2017
	<i>nantongensis</i>	CH34	Toluene	Complete	Espinoza Tofalos <i>et al.</i> , 2018
	<i>necator</i>	X1	Chlorpyrifos	Complete	Fang <i>et al.</i> , 2019
	<i>oxalaticus</i>	NH9	3-CB, BA	N. A.	Ogawa and Miyashita, 1995; Ogawa <i>et al.</i> , 1999
	<i>pampae</i>	X32	2,4-D	Complete	Xiang <i>et al.</i> , 2020
	<i>pauculus</i>	CPDB6	2,4-DB	N. A.	Cuadrado <i>et al.</i> , 2010
	<i>pinatubonensis</i>	P2	TCP	N. A.	Cao <i>et al.</i> , 2012
	sp.	IMP134	2,4-D, 3-CB	Complete	Don and Pemberton, 1981; Pieper <i>et al.</i> , 1993
		a3	2C4NP	N. A.	Tiwari <i>et al.</i> , 2017
		CNP-8	2C4NP, 2C5NP, 2,6-DBNP	N. A.	Min <i>et al.</i> , 2017, 2018, 2019
		CY-1	2,4-D	N. A.	Chang <i>et al.</i> , 2015
		DT-1	Chlorpyrifos, TCP	N. A.	Lu <i>et al.</i> , 2013
		KK10	3-methylindole	N. A.	Fukuoka <i>et al.</i> , 2015
		MTS-7	Phenanthrene, Pyren, Benzo[a]pyren	N. A.	Kuppusamy <i>et al.</i> , 2016
		P-10	Phenol	Draft	Futamura <i>et al.</i> , 2001
		SHE	Indole	Draft	Qu <i>et al.</i> , 2015
		SK-3	4-CB, PCBs	Draft	Kim and Picardal, 2000
		SK-4	Dichlorobiphenyl	Draft	Kim and Picardal, 2001
		ST-14	2- and 4-nitrobenzoates	N. A.	Basu <i>et al.</i> , 2016
		YNS-85	PCNB	N. A.	Teng <i>et al.</i> , 2017

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetate.

2,4-DB, 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid.

2,6-DBNP, 2,6-dibromo-4-nitrophenol.

2C4NP, 2-chloro-4-nitrophenol.

2C5NP, 2-chloro-5-nitrophenol.

BA, benzoate.

CB, chlorobenzoate.

PCBs, polychlorinated biphenyls.

PCNB, pentachloronitrobenzene.

TCP, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol.

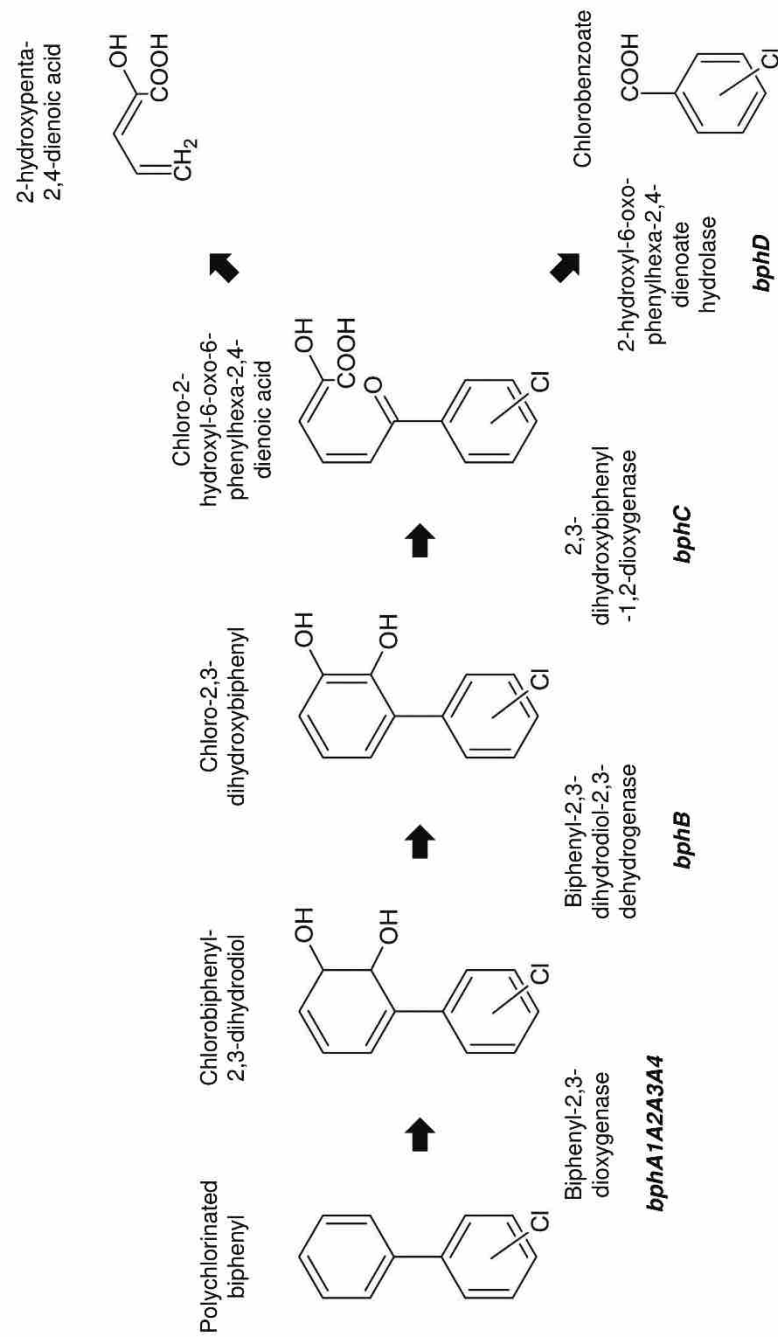


Fig. 1-1 PCBsの分解経路

が産出される (Fig. 1-1) が、多くのビフェニル分解菌はクロロ安息香酸を分解できない (Furukawa, 2000; Saavedra *et al.*, 2010)ため、クロロ安息香酸は環境中の他の細菌により分解される必要がある。興味深いことに、クロロ安息香酸はビフェニル分解菌の生育を阻害し、ストレスタンパク質を誘導するという報告がある (Martínez *et al.*, 2007)。PCBs の完全分解という観点からも、クロロ安息香酸分解 (菌) の研究を進める意義は非常に大きいと考える。

Cupriavidus 属細菌の特徴

*Cupriavidus*属細菌は、 β -プロテオバクテリア綱Burkholderiaceae科に分類されるグラム陰性細菌である。本属細菌は、土壌 (Poehlein *et al.*, 2011)、地下水 (Ray *et al.*, 2015)、活性汚泥 (Shafie *et al.*, 2017)、根粒 (Amadou *et al.*, 2008)などの環境中から単離されることが多く、またヒトの臨床検体 (Monsieurs *et al.*, 2013)や、国際宇宙ステーションの飲料水システム (Monsieurs *et al.*, 2014)からも単離されており、これは本属細菌の多様性の高さを示していると考えられる。実際にList of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatureには、21種が登録されている

(<http://www.bacterio.net/cupriavidus.html>) (2021年1月現在)。*Cupriavidus*属細菌の代表的な特徴として、1. 芳香族化合物分解能、2. 重金属耐性、3. polyhydroxybutyrate (PHB) 産生能、4. CO₂ 固定能の4点が挙げられる。これらの特徴から、バイオレメディエーションや農業資材への利用など、応用研究も積極的に行われている (Saavedra *et al.*, 2010; Zúñiga *et al.*, 2018)。

これまでに、芳香族化合物分解能が知られている*Cupriavidus*属細菌をTable 1-2に、またTable 1-2に記載した細菌が分解する芳香族化合物の一部をFig. 1-2にまとめた。様々な種から、芳香族 (塩素) 化合物分解能を有する細菌が単離されていることがわかる。また分解実験は行われていないが、ゲノム配列から芳香族化合物分解能が推定されている菌株 (Suenaga *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015)も報告されており、この能力が本属細菌の大きな特徴の1つであることがわかる。本属の芳香族塩素化合物分解細菌の代表として、*C. pinatubonensis* JMP134株が挙げられる。本株は2,4-Dを分解し、その分解経路や分解遺伝子は詳細に解析されている (Fig. 1-3)

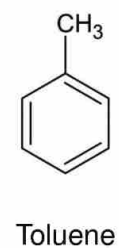
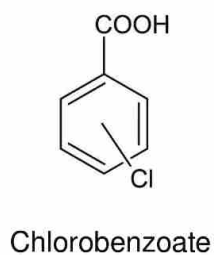
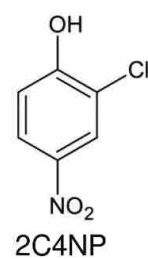
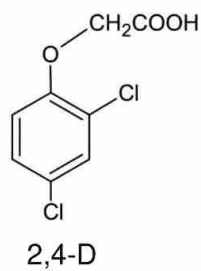
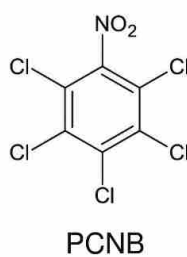
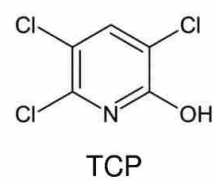
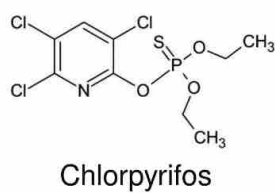
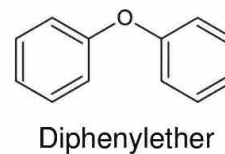
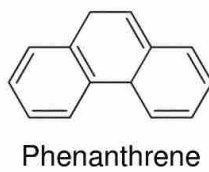
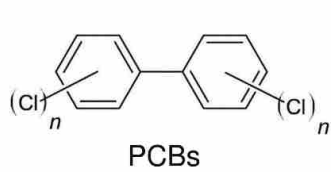


Fig. 1-2 *Cupriavidus*属細菌が分解する芳香族化合物
2,6-DBNP, 2,6-dibromo-4-nitrophenol; 2C4NP, 2-chloro-4-nitrophenol;
PCNB, pentachloronitrobenzene; TCP, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol.

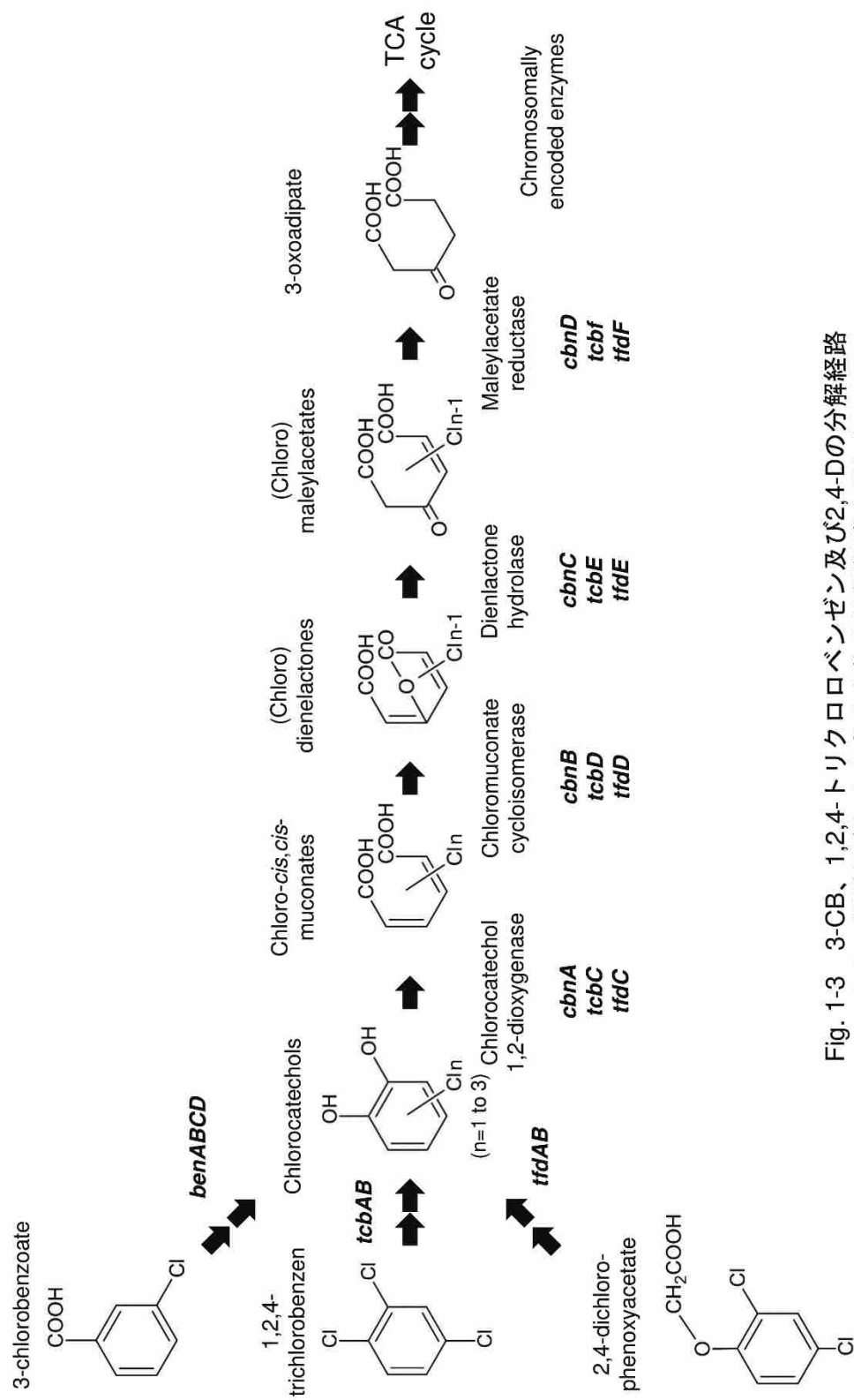


Fig. 1-3 3-CB、1,2,4-トリクロロベンゼン及び2,4-Dの分解経路
オルソ開裂経路による各化合物の分解経路を示した。

(Perez-Pantoja *et al.*, 2008)。2,4-Dの分解に重要な*tfd*遺伝子群はプラスミドpJP4上に存在し、トランスポーター遺伝子*tfdT*も分解遺伝子クラスターに含まれている。またJMP134株は3-クロロ安息香酸 (3-CB) も分解することが知られており、*tfd*遺伝子群が分解に関わっている (Fig. 1-3) (Perez-Pantoja *et al.*, 2008)。しかし3-CBの取り込みに関しては、TfdTではなく染色体上のBenPが担うことがわかっている (Ledger *et al.*, 2009)。JMP134株の全ゲノム配列解析より、60種の芳香族化合物分解能やPHB合成能に関わる遺伝子を有することなど、*Cupriavidus*属細菌としての特徴も報告されている (Lykidis *et al.*, 2010)。これらの基盤的な研究が行われる一方、JMP134株にPCBs分解遺伝子を導入してPCBsを完全に分解させる株の構築 (Saavedra *et al.*, 2010)や、植物ホルモン (インドール-3-酢酸) を合成する遺伝子を導入して植物の成長を促進する研究 (Zúñiga *et al.*, 2018)などの、応用的な研究も広く行われている。これらは、JMP134株が遺伝子操作に適した宿主であることを示している。なお近年には、JMP134株よりも高い2,4-D分解能を持つ*Cupriavidus*属細菌がいくつか単離されており、さらにそれら菌株の全ゲノム配列も明らかになっている (Fang *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2020)。

PHBは3-ヒドロキシ酪酸のポリエステルであり、生物由来かつ生分解性を有するため、バイオプラスチックとして環境問題や資源問題の解決に貢献すると期待されている。PHB合成に関わる遺伝子 (*phaC₁AB₁*オペロン) は*Cupriavidus*属細菌に広く分布し、また保存されていることが報告されている (Kuttralam-Muniasamy and Pérez-Guevara, 2018)。*Cupriavidus necator* H16株は代表的なPHB産生菌であり、生分解性プラスチックの実用化に向けた応用研究に広く使用されている (Kuttralam-Muniasamy and Pérez-Guevara, 2018; Peoples and Sinskey, 1989)。

Cupriavidus 属と *Ralstonia* 属細菌の分類の変遷

Cupriavidus 属細菌の分類はやや複雑な変遷を辿り、近縁の *Ralstonia* 属細菌とも深く関わっている。1987年、アメリカの University Park 周辺土壌より、*Cupriavidus necator* N-1^T 株が単離され、この時初めて *Cupriavidus necator* という学名が登場した (Makkar and Casida, 1987)。この株は様々

なグラム陰性、陽性の土壌細菌及び酵母を捕食し、また銅に耐性があり、銅の濃度を上げること
で増殖の立ち上がりも早くなるという特徴を有していた。Makkar and Casida は、N-1^T株の GC 含
量や形態的、生化学的特徴、栄養特性について調べており、いくつかの特徴が *Alcaligenes* 属細菌
と類似していることを指摘していた。しかし、細菌の分類に一般的に使用されている 16S rRNA 配
列による解析は、行っていなかった。1995 年、薮内らによって *A. eutrophus*、*Burkholderia pickettii*、
Burkholderia solanacearum の 3 種が、*Ralstonia* 属として再編された (Yabuuchi *et al.*, 1995)。表現型
の特徴、細胞脂質分析、脂肪酸分析、16S rDNA 塩基配列による系統解析、rRNA-DNA ハイブリ
ダイゼーションといった様々な手法を組み合わせることで複数種が同属になり、*A. eutrophus* は
Ralstonia eutropha になった。2001 年 De Baere らは、*Ralstonia* 属細菌は、表現型及び遺伝型におい
て明らかな 2 つの異なるグループを形成すると指摘した (De Baere *et al.*, 2001)。2004 年、Vanechotte
らの解析 (16S rRNA 遺伝子配列による系統解析、表現型の違い、DNA-DNA ハイブリダイゼーシ
ョン)により、*Ralstonia* 属は *Wautersia* 属と *Ralstonia* 属に分離され、*R. eutropha* は *Wautersia eutropha*
に変わった (Vanechotte *et al.*, 2004)。しかし同年、N-1^T株と *Wautersia* 属細菌の分類実験 (16S
rRNA 遺伝子配列による系統解析、全タンパク質の泳動、DNA-DNA ハイブリダイゼーション、
GC 含量比較、表現型の比較)が行われ、N-1^T株と *W. eutropha* の基準株は、系統的に同一である
ことがわかった。さらに国際原核生物命名規約 (the International Code of Nomenclature of Bacteria)
の Rule 15、17、23a、37a (1) より、*Wautersia* よりも *Cupriavidus* の方が、優先順位が高い (学
名の登場が早かった) ということが理由となり、*W. eutropha* から *Cupriavidus necator* に分類名が
変わった (Vandamme and Coenye, 2004)。ここに述べた分類の変遷を、Fig. 1-4 にまとめた。このよ
うに、*Cupriavidus* 属の分類はやや複雑であり、また現在の *Ralstonia* 属と同じ分類になった経緯が
あるため、分類名が変わらずにデータベースに登録されていたり、分類が誤っている株が存在す
る。

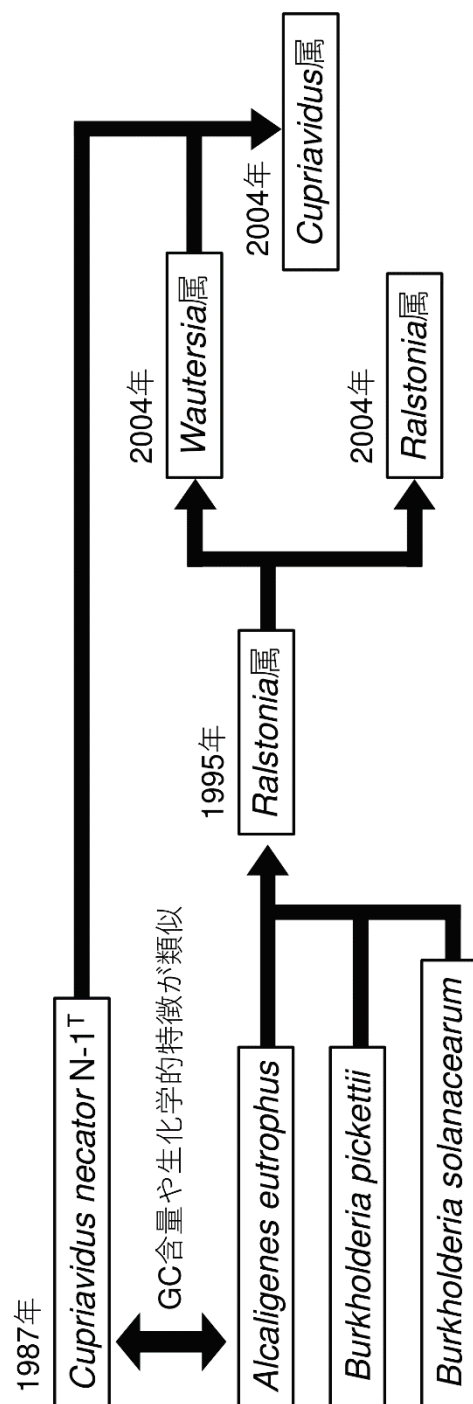


Fig. 1-4 *Cupriavidus*属細菌の分類の変遷
西暦は単離、あるいは再分類の論文が発表された年を示す。

3-CB 分解細菌 *Cupriavidus necator* NH9 株に関する研究

3-CB を用いた集積培養により、農業環境技術研究所 (現・農研機構農業環境変動研究センター) の土壌から、3-CB 分解細菌 *Cupriavidus necator* (以前は *Alcaligenes eutrophus* または *Ralstonia eutropha*) NH9 株が単離された (Ogawa and Miyashita, 1995)。本菌株は 2 つのプラスミドを有しており、小さなプラスミド pENH91 上に、1,2,4-トリクロロベンゼン分解遺伝子群 (*tcb* 遺伝子群) (van der Meer *et al.*, 1991) とアミノ酸レベルで 95% 以上の identity、2,4-D 分解に関わる *tfd* 遺伝子群とアミノ酸レベルで 52% 以上の identity を有していた *cbn* 遺伝子群が存在した (Ogawa and Miyashita, 1999)。これらの高い相同性から、*cbn* 遺伝子群は 3-CB の中間代謝産物である 3-クロロカテコール分解を担うと推測された (Fig. 1-3)。*cbn* 遺伝子群の転写は、転写調節因子 CbnR によって活性化され、その誘導物質はカテコールの中間代謝産物である *cis,cis*-ムコン酸 (CCM) と 3-クロロカテコールの中間代謝産物である 2-クロロ *cis,cis*-ムコン酸 (2-CM) ということが明らかにされた (Fig. 1-5) (Ogawa *et al.*, 1999)。その後、CbnR 単独の結晶構造解析 (Muraoka *et al.*, 2003)、及び CbnR とプロモーター DNA 領域の共結晶構造解析 (Koentjoro *et al.*, 2018) が行われ、CbnR の特徴的な構造やその構造に由来した転写活性化モデル、プロモーター配列認識の選択性の違いなどが明らかとなった。さらに CbnR の構造情報を元にした部位特異的変異導入法により、DNA 結合及び誘導物質認識に重要なアミノ酸残基が生化学的に同定された (Moriuchi *et al.*, 2017)。一方、*cbnA* 遺伝子をイネ (Shimizu *et al.*, 2002) やポプラ (Ohmiya *et al.*, 2009) に導入して 3-クロロカテコール分解を試みる研究や、CbnA と TcbC 間において、基質認識の差異に重要なアミノ酸残基を同定する研究 (Liu *et al.*, 2005) など、クロロカテコール分解遺伝子そのものに着目した研究成果も報告されている。このように NH9 株に関しては、3-クロロカテコール分解遺伝子及びその転写調節因子と機構について、詳細な研究が進められてきた。

なお NH9 株は、加藤博士によって *Alcaligenes eutrophus* と同定 (Ogawa and Miyashita, 1995) され、その後 *Ralstonia eutropha*、*Cupriavidus necator* と分類の変遷に従い、実験による確認の無いまま学名が変わった。

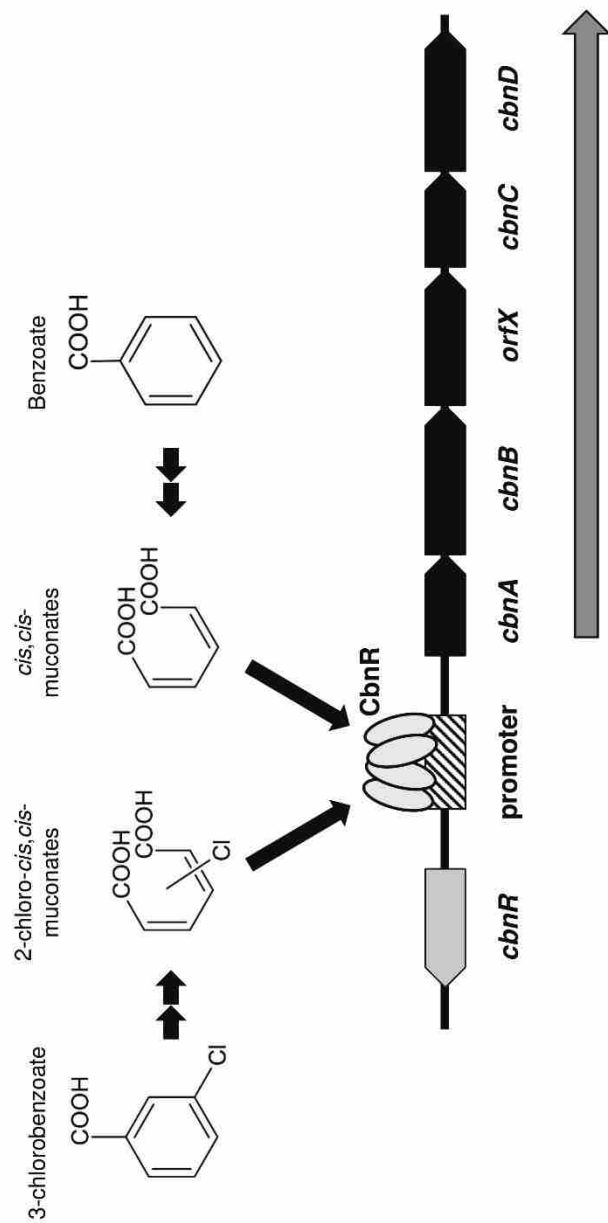


Fig. 1-5 CbnRによる*cbn*遺伝子群の転写調節モデル
 四量体であるCbnRが約60塩基対のプロモーター領域を認識し、さらに代謝産物である2-クロロ*cis,cis*-ムコン酸または*cis,cis*-ムコン酸が結合することにより、クロロカテコール分解遺伝子群*cbnABCD*の転写を活性化させる。

本研究の目的と概要

上述の通り、これまでに様々な分解細菌が研究されてきたが、芳香族塩素化合物（特にクロロ安息香酸）分解細菌について、その分解能力をゲノムレベルで解析した研究例は少なく、芳香族塩素化合物分解細菌を分解細菌たらしめるゲノム上の特徴や、芳香族塩素化合物の分解能力に関わる遺伝子群の全貌、及びその進化に関しては明らかになっていない。芳香族塩素化合物のモデル化合物である 3-CB を分解する細菌 *C. necator* NH9 株は、3-クロロカテコール分解遺伝子やその調節因子について、構造的、生化学的、分子生物学的解析が行われてきた。しかし、NH9 株の全ゲノム情報や分解遺伝子の発現などの基盤情報は、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、主にゲノム情報を使用して、NH9 株の 3-CB 分解に関わる遺伝子や分解能の特徴を明らかにすることを目的とした。まず NH9 株の全ゲノム情報を明らかにし、3-CB や他の芳香族化合物分解遺伝子、及び分解能を推定、確認した（第二章）。次に RNA-seq により、分解遺伝子の発現を確認するとともに、3-CB によって変動する遺伝子や機能の特徴を探った（第三章）。またゲノム情報を使用した解析により分類を整理し、比較実験が可能な基盤を構築した（第四章）。最後に、NH9 株の 3-CB 分解能獲得の進化（適応）について考察した（総括）。

第二章

Cupriavidus necator NH9 株の全ゲノム配列決定と

芳香族化合物分解能の推定

2-1 諸言

C. necator NH9 株は、3-CB を分解する細菌である。NH9 株の 3-CB 分解に関わる遺伝子について、これまでに 3-クロロカテコール分解遺伝子群が同定され、それら遺伝子群が pENH91 プラスミド上に存在することや、その塩基配列及びアミノ酸配列が明らかにされている (Ogawa and Miyashita, 1995; 1999)。しかし、それ以外の分解遺伝子については全く明らかになっていない。また NH9 株は、3-CB と安息香酸 (BA) を分解できることが報告されているが (Ogawa *et al.*, 1999)、それ以外の芳香族化合物分解能についても不明である。他の芳香族化合物分解能を明らかにすることで、3-CB 分解能の特徴を捉えることができると考えたため、本章ではまず、次世代シーケンサーを使用して NH9 株の全ゲノム配列を決定し、全遺伝情報を明らかにすることを目的とした。また得られたゲノム情報を使用して、NH9 株の芳香族化合物分解遺伝子及び分解能を推定し、3-CB 分解能の特徴を捉えることも目的とした。

2-2 材料及び方法

2-2-1 使用菌株

本章で使用した菌株を、Table 2-1 に示した。

2-2-2 培地及び培養条件

本章で使用した培地の組成を、Table 2-2 に示した。液体培地を用いる場合には、振とう機 CI-610 (アドバンテック東洋) を使用して回転培養を行った。寒天平板培地を用いる場合には、寒天粉末を 1.5% (w/v) で添加した。菌体の長期保存は、終濃度 15% になるようにグリセロール

Table 2-1 本章で使用了菌株

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>Cupriavidus necator</i> NH9	pENH91, pENH92, 3-CB ⁺	Ogawa and Miyashita, 1995

Table 2-2 本章で使用了培地とその組成

Basal salts medium (無機塩類培地)	
per liter :	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.1 g
K ₂ HPO ₄	2.29 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ ·4~6H ₂ O	0.025 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005 g
L-ascorbic acid	0.005 g

を加えて、 -80°C で保存した。

2-2-3 ゲノム DNA の調製

ゲノム DNA の調製には、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用い、操作は下記の通り行った。なお遠心操作は、全て室温で行った。また下線部は、より純度を上げるためにマニュアルから変更した部分である。

操作

- ① 終濃度 5 mM の 3-CB (Wako) を含む無機塩類培地 (BSM) (平板) に NH9 株を植菌し、 30°C で 2 日間培養した。
- ② 終濃度 5 mM の 3-CB を含む 100 ml の BSM に、平板で培養していた菌体を、白金耳を用いて接種した。 30°C 、120 rpm の条件で培養を行った。
- ③ 培養開始後 24 時間または 30 時間経過した菌体 1 ml を、1.5 ml チューブに複数本回収し、7,500 rpm で 10 分間遠心して上清を捨てた。なお DNA 抽出に使用しない菌体は、 -80°C のフリーザーで保存した。
- ④ 180 μl の Buffer ATL を添加し、vortex でペレットを再懸濁した。
- ⑤ 20 μl の Proteinase K を添加し、vortex で混合した後、 55°C で 2 時間インキュベートした。15 分に 1 回程度の頻度で、vortex により混合した。
- ⑥ 4 μl の RNase A (100 mg/ml) を加えて vortex で混合し、室温で 2 時間インキュベートした。
- ⑦ 10 秒間 vortex で混合し、15,000 rpm で 5 分間遠心した後、上清を回収した。
- ⑧ 180 μl の Buffer AL を添加し、vortex で混合した。
- ⑨ 200 μl の 100%エタノールを添加し、vortex で十分に混合した。
- ⑩ サンプル溶解液を、DNeasy Mini Spin Column に移した。エタノールの添加により白色の沈殿物が生じることがあるが、沈殿物もすべてカラムに移した。
- ⑪ 10,000 rpm で 2 分間遠心し、チューブと溶液を捨てた。

- ⑫ 新しいチューブにセットし、500 μ l の Buffer AW1 を加えた。10,000 rpm で 2 分遠心し、溶液を捨てた。
- ⑬ ⑫をもう一度繰り返した。
- ⑭ 新しいチューブにセットし、500 μ l の Buffer AW2 を加えた。15,000 rpm で 2 分遠心し、溶液を捨てた。
- ⑮ ⑭をもう一度繰り返した。
- ⑯ 再度、15,000 rpm で 2 分遠心した。
- ⑰ カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、50 μ l の Buffer AE をメンブレンに添加して、室温で 2 分間インキュベートした。
- ⑱ 15,000 rpm で 2 分遠心し、さらに 50 μ l の Buffer AE を添加した。
- ⑲ 15,000 rpm で 2 分遠心し、チューブに回収した溶液をゲノム DNA 溶液とした。

2-2-4 エタノール沈殿による DNA の濃縮

エタノール沈殿の操作は、下記の通り行った。

操作

- ① 100 μ l の DNA を 1.5 ml チューブに取り、10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムを添加して、ピペッティングで混合した。
- ② 十分に冷えた 100%エタノールを 250 μ l 添加し、指ではじいて混合した。
- ③ 氷水にチューブを差し込み、10 分間静置した。
- ④ 15,000 rpm で 40 分間、室温で遠心した。
- ⑤ 沈殿物を吸わないように、上清をピペット操作で取り除いた。
- ⑥ 十分に冷えた 70%エタノールを 100 μ l 添加し、指ではじいて混合した。
- ⑦ 15,000 rpm で 5 分間、室温で遠心した。
- ⑧ 上清を完全に取り除き、遠心エバポレーターで 2 分間遠心した。

⑨ 25 μ l の 10 mM Tris-HCl を、ペレットに触れるように添加し、指ではじいて混合した。

2-2-5 DNA の定量

Infinite N200 (TECAN) を使用して吸光度を測定し、 A_{260}/A_{280} 比と A_{260}/A_{230} 比を算出した。また Qubit dsDNA HS アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用し、蛍光色素による定量も行った。操作は添付の説明書に従って行った。

2-2-6 DNA 電気泳動

DNA のアガロース電気泳動には、Tris-Acetate-EDTA buffer と 0.7% Agarose を用い、ミュービッド小型電気泳動槽を用いて 100 V で泳動した。

2-2-7 次世代シーケンサーMiSeq に供試するためのライブラリ調製

次世代 DNA シーケンサーMiSeq に供試するためのゲノム DNA ライブラリは、KAPA HyperPlus Kit (日本ジェネティクス) を使用して調製した。シーケンス解析に使用するゲノム DNA のクオリティは、DNA 量が 1 ng-1 μ g、 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 、電気泳動でスメアが無いという条件であった。必要なクオリティを満たした 500 ng のゲノム DNA をライブラリ調製に使用し、また酵素による断片化反応は 5 分とした。操作は添付の説明書に従って行った。

2-2-8 作製したライブラリの評価

作製したライブラリは、2100 Bioanalyzer (Agilent) による波形の確認 (定性的確認)、及び LightCycler 480 (Roche) を使用した qPCR による濃度の確認 (定量的確認) により評価した。Bioanalyzer のチップは、Agilent DNA7500 キットまたは High Sensitivity DNA キットを使用した。ライブラリの定量には、KAPA Library Quantification Kits (日本ジェネティクス) を使用した。全ての操作は、添付の説明書に従って行った。

2-2-9 MiSeq によるゲノム DNA シーケンス解析

作製したライブラリを使用して、静岡大学グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム機能解析部の MiSeq により、ゲノム DNA シーケンス解析を行った。シーケンスキットは、MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) を使用し、paired-end 法によりシーケンス解析を実施した。

2-2-10 ドラフトゲノム配列の決定

MiSeq より出力された生リードデータを使用して、NH9 株のドラフトゲノム配列を決定した。まず Trimmomatic (version 0.36) (Bolger *et al.*, 2014)ソフトウェアを使用して、生リードのアダプター配列、最後の 301 塩基目の配列、低クオリティリード (quality score < 15) 及び 150 bp 以下のリードを除去し、high quality reads を取得した。次にアセンブラーである SPAdes (version 3.6.2) (Bankevich *et al.*, 2012)を使用して、high quality reads のアセンブリを行った。使用したオプションは、“--careful”、“--cov-cutoff auto”、“--only-assembler”とした。出力された contig のうち、500 bp 以下かつ Coding Sequence (CDSs) が存在しないものは除去した。またアセンブリされた 5,513 bp の contig は、コントロールであるバクテリオファージ PhiX の DNA 配列であるため除去した。残った contig を NH9 株のドラフトゲノム配列とし、Bandage ソフトウェア (Wick *et al.*, 2015)により可視化した。

2-2-11 PacBio によるゲノム DNA シーケンス解析

第三世代 DNA シーケンサーPacBio RSII によるシーケンス解析は、マクロジェン (株) に委託した。シーケンス解析に使用するゲノム DNA のクオリティは、DNA 量 $\geq 8 \mu\text{g}$ 、DNA 濃度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 、 $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ 、電気泳動でスメアが無いという条件であった。エタノール沈殿により濃縮精製した、NH9 株のゲノム DNA 数本を 1 本のチューブにまとめ、クオリティをチェックした。必要なクオリティを満たしたゲノム DNA をマクロジェン・ジャパン (京都府京

都市) に送り、ライブラリ調製と DNA シーケンス解析を依頼した。出力された配列生データを、納品産物として受け取った。

2-2-12 全ゲノム配列の決定

PacBio により出力された生リードデータを使用して、NH9 株の全ゲノム配列を決定した。生リードデータのフィルタリングやその後のアセンブリは、SMRT Analysis Software (version 2.3.0) (Chin *et al.*, 2013)を使用した。まず RS HGAP Assembly.3 の PreAssembler Filter v1 を使用して、Minimum Polymerase Read Quality cut-off = 0.75、Minimum Subread Length = 7.5 Kbp の条件で生リードデータをフィルタリングした。取得した high quality subreads と HGAP.3 (Chin *et al.*, 2013)を使用して、アセンブリを行った。この時、Minimum Seed Read Length = 15 Kbp とした。出力された contig を、AssemblyPolishing v1 Quiver (RS HGAP Assembly.3 Protocol) と Arrow (<https://github.com/PacificBiosciences/GenomicConsensus>) を使用して polish (エラーの補正) した。その後、Circlator (version 1.1.1) (Hunt *et al.*, 2015)を使用して各 Polished contig の両末端をマージし、環状の contig を取得した。最終的な塩基配列のエラーの確認には、MiSeq により取得したショートリードを使用した。BWA-MEM (Li, 2013)を使用して、環状 contig に対して MiSeq より取得した high quality reads をマッピングし、Integrative Genomics Viewer (Thorvaldsdottir *et al.*, 2013)を使用して可視化し、エラーを確認した。エラーがあった場合、*in silico* で修正できる領域は修正を行い、修正できない場合は該当する領域を PCR で増幅し、サンガー法によりシーケンスして配列を確認した。エラーがあった箇所をマニュアルで修正し、NH9 株の完全ゲノム DNA 配列とした。

2-2-13 Polymerase chain reaction (PCR 法)

PCR には PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) を用い、操作は添付の説明書に従って行った。

2-2-14 完全ゲノム DNA 配列取得のための PCR

操作

- ① プライマーの合成は、オリゴ DNA 合成サービス（ファスマック社）に依頼した。作製したプライマー配列を、Table 2-3 に示した。
- ② 作製したプライマーを用いて、Table 2-4 に示した組成、及び Table 2-5 に示した条件で PCR を行った。Template は、NH9 株のゲノム DNA を用いた。
- ③ PCR 後の反応液を電気泳動で泳動し、目的の長さのバンドを切り出して DNA を回収した。
- ④ Qubit により濃度を測定し、DNA シーケンス解析に供試できる DNA 量を確保できたか、確認した。
- ⑤ サンガー法による DNA シーケンス解析より、塩基配列を確認した。

2-2-15 アガロースゲルからの DNA の回収

電気泳動後の Agarose gel からの DNA 回収は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（TaKaRa）を用い、添付の説明書に従って行った。

2-2-16 サンガー法による DNA 塩基配列決定法

サンガー法による DNA 塩基配列の決定は、静岡大学グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム機能解析部の外部受託を介して行った。塩基配列の解析には、Chromas ver. 2.6（Technelysium）を用いた。

2-2-17 アノテーション

NCBI の Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline（PGAAP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Table 2-3 PCRに使用したプライマー配列

Primer	Sequence (5' → 3')	Length (mer)
1885000F	TACCGCGGCTTCCTGTTCGG	20
1885800R	CTCGTCGGCACCTTCGATCC	20
3709000F	CGGACCGGGCGATCCTATAAGG	22
3710100R	GTACGGCTCGAGTGACCGCTTC	22

Table 2-4 PCR反応組成

H ₂ O	18 µl
Primer F (5 µM)	2.5 µl
Primer R (5 µM)	2.5 µl
Template (50 pg/µl)	2 µl
PrimeSTAR Max DNA Polymerase Premix (TaKaRa)	25 µl
	50 µl

Table 2-5 PCR反応条件

94 °C	1 min	
98 °C	10 sec	} 30 cycles
x °C	5 sec	
72 °C	5 sec	
72 °C	1 min	

アニーリング温度について、プライマー188~を使用した場合は65°C、
プライマー37~を使用した場合は58°Cに設定した。

genome/annotation_prok/) (Tatusova *et al.* 2016)、国立遺伝学研究所の Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP, <http://www.migap.org>)、バクテリア用アノテーションツールの Prokka (version 1.11) (Seemann, 2014)を使用して、アノテーションを行った。PGAAP アノテーションの結果を基準として MiGAP と Prokka アノテーションの結果を比較し、開始コドンや missing gene の修正を行った。修正には、ゲノム解析ソフト GenomeMatcher (Ohtsubo *et al.*, 2008)のアノテーション支援機能を使用した。

オーソログ解析ツールの LS-BSR (Sahl *et al.*, 2014)を使用して、NH9 株と他の *Cupriavidus* 属細菌及び *Ralstonia* 属細菌の遺伝子を比較した結果、NH9 株特異的な遺伝子を同定した。これらの遺伝子について、BLASTP 解析 ($E\text{-value} < 1e^{-6}$) や InterProScan (Jones *et al.*, 2014)によるドメイン検索を行い、遺伝子であるかどうか総合的に判断した。遺伝子と考えられないものは、除去した。

2-2-18 各レプリコンにおける複製開始点の推定

各レプリコンにおいて、DnaA タンパク質が結合する DnaA box [TT(A/T)TNCACA] (Schaper and Messer, 1995)、Rep タンパク質が結合する iteron DNA 配列[CGC(A/T)GA(A/T)(A/T)(C/T)(A/C/G)GGT(A/T)CG(C/G)] (Janssen *et al.*, 2010)及び TrfA タンパク質が結合する iteron DNA 配列 [(A/C/G)(A/C/T)GCCCC(C/T)CA(A/T)GTGTCA] (Norberg *et al.*, 2014)を調べ、複製開始点を推定した。

2-2-19 ゲノム情報を用いた機能解析

NH9 株がコードする全タンパク質を、Clusters of Orthologous Groups (COGs) によって機能分類した。RPS-BLAST (Altschul *et al.*, 1997)を使用してアノテーションを行い、各レプリコンにおいて、全タンパク質のうち各機能に分類されたタンパク質の割合を算出した。またフィッシャーの

正確確率検定を使用して統計解析を行い、染色体同士またはプラスミド同士で有意に差がある機能を調べた。検定により算出した P-value は、多重比較検定により補正した。

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) の BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016)を使用して、NH9 株の芳香族化合物分解能を推定した。

2-2-20 芳香族化合物による増殖能の確認

終濃度 5 mM の 3-CB、BA、2-, 3-, 4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA) 及びアントラニル酸 (いずれも Wako) を含む BSM (平板) に NH9 株を植菌し、30 °C で 3 日間培養した。ポジティブコントロールとして、クエン酸 (CA) (Wako) を終濃度 5 mM 添加した BSM への植菌、及びネガティブコントロールとして芳香族化合物を含まない BSM への植菌も行い、増殖能を比較した。

2-2-21 芳香族化合物による増殖曲線

3-CB、BA、3-HBA 及び CA による NH9 株の増殖曲線を取得した。また培養開始後 6 時間の地点において、対応のある *t* 検定 (Paired *t*-test) を行い、増殖速度に有意な差があるかどうかを調べた。

操作

- ① 終濃度 5 mM の 3-CB、BA、3-HBA または CA を含む BSM (平板) に NH9 株を植菌し、30°C で 2 日間培養した。
- ② 終濃度 5 mM の 3-CB、BA、3-HBA または CA を含む 20 ml の BSM に、平板で培養していた菌体を、白金耳を用いて接種した。30°C、120 rpm の条件で前培養を行った。
- ③ 24 時間程度培養した菌体を、OD₆₀₀ = 0.1 となるように希釈した。
- ④ 終濃度 5 mM の 3-CB、BA、3-HBA または CA を含む 90 ml の BSM に、希釈した菌体懸濁液 10 ml を接種し、OD₆₀₀ = 0.01 の菌体懸濁液が 100 ml 入っているようにした。

- ⑤ 30℃、120 rpm の条件で本培養を行い、一定時間ごとに OD₆₀₀ を測定した。濁度の測定には分光光度計 Ultrospec 3000 (Pharmacia) を使用し、3 連で行った。

2-2-22 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による芳香族化合物分解能の解析

HPLC 解析により、NH9 株の 3-CB、BA 及び 3-HBA 分解能を調べた。また培養開始後 6 時間の地点において、対応のある *t* 検定 (Paired *t*-test) を行い、分解速度に有意な差があるかどうかを調べた。

操作

- ① 一定時間ごとに菌体培養液 300 µl を回収し、メタノール (Wako, HPLC grade) を 100 µl 添加して vortex でよく混合して、反応を停止した。
- ② 10,000 rpm、3 分間、4℃ で遠心し、上清を孔径 0.2 µm の親水性 PTFE メンブレンフィルター (Merck Millipore) でろ過して、1.5 ml 容バイアル瓶に入れた。
- ③ キャップをパラフィルムで覆い、HPLC に供試するまで -20℃ で保存した。
- ④ HPLC 解析には SCL-10A VP system (島津) を使用し、波長検出器は SPD-10AVi (島津)、カラムは YMC-Triart C18 カラム (150 mm × 4.6 mm, 5 µm, YMC) を用いた。各化合物の解析条件は、下記の通りであった。なお、カラム温度及び流速は、いずれの条件もそれぞれ 37℃、1 ml/min であった。

【3-CB】

移動相 水 : アセトニトリル : 酢酸 = 45 : 50 : 5 (v/v)

Injection 20 µl

波長 200 nm

【BA】

移動相 水 : アセトニトリル : 酢酸 = 75 : 20 : 5 (v/v)

Injection 30 µl

波長 254 nm

【3-HBA】

移動相 水：アセトニトリル：酢酸 = 90 : 5 : 5 (v/v)

Injection 20 μ l

波長 285 nm

検量線の作製及びデータ解析は、下記の通り行った。

操作

- ① 10 ml のメスフラスコを使用して、3-CB、BA 及び 3-HBA のストック溶液から 1、2、3、4、5 mM の標準品を作製した。希釈液には、BSM を使用した。
- ② 標準品 600 μ l に対しメタノールを 200 μ l 加え、Vortex でよく混合した。
- ③ 10,000 rpm、3 分間、4°C で遠心し、上清を孔径 0.2 μ m の親水性 PTFE メンブレンフィルターでろ過して、1.5 ml 容バイアル瓶に入れた。
- ④ キャップをパラフィルムで覆い、HPLC に供試するまで -20°C で保存した。
- ⑤ HPLC 用解析ソフトウェア Smart Chrom（ケーワイエーテクノロジー）を使用して、測定したサンプルの面積値を算出した。標準品の濃度と面積値から検量線を作製し、この検量線と各サンプルの面積値を使用して、溶液中に含まれる各化合物の濃度を求めた。結果は、3 連の平均で示した。

2-3 結果

2-3-1 抽出したゲノム DNA のクオリティ

抽出したゲノム DNA の吸光度測定及び定量結果を Table 2-6 に、電気泳動図を Fig. 2-1 に示した。吸光度と蛍光色素による定量結果に大きな乖離があると不純物の混入が疑われるが、大きな差は無かったため、純度が高いと判断した。また電気泳動図において、10 Kbp 以上に明確なバンドが確認できた。スメアも確認できたが、次世代シーケンス用のライブラリ調製には問題ないと判断した。総じて、次世代シーケンサーに供試するには十分な純度・濃度のゲノム DNA を調製できた。

2-3-2 ドラフトゲノム配列の決定

バイオアナライザによるゲノム DNA ライブラリの泳動図を、Fig. 2-2 に示した。ライブラリのサイズは 150-4,103 bp、平均鎖長は 921 bp、ピークトップの鎖長は 1,278 bp であった。また qPCR の結果、ライブラリ濃度は 7.0 nM であった。MiSeq でシーケンスを行うには、十分な質と量のライブラリを作製できた。

MiSeq より出力された生リードデータ、及びアセンブリに使用した high quality reads データ情報を Table 2-7 に示した。De novo assembly には、十分量のリード量を得ることができた。

High quality reads を使用してアセンブリした結果を Table 2-8 に、Bandage により可視化した結果を Fig. 2-3 に示した。NH9 株のゲノムサイズ及び GC 含量は、同種菌株との比較により想定していた数値と大きな乖離は無かった。contig 数は 177 個であり、つながり状態は良くなかった。つまり、illumina によるショートリードでは、完全ゲノム配列を得ることが困難なゲノム DNA 配列であることが明らかとなった。ただし染色体と考えられる contig (Fig. 2-3A) とは別に、3 つの contig が 1 つの環状 DNA を形成していた (Fig. 2-3B)。アノテーション情報より、これらはプラスミド pENH91 を形成する contig であると推定された。リピート領域と考えられる真ん中の contig (NODE_129) は、カバレッジを考慮して 2 つにし、さらにリピート領域の向きに注意し

Table 2-6 抽出したゲノムDNAのクオリティ

Sample name	O. D. 260/230	O. D. 260/230	Concentration measured by Infinite M200 (ng/ μ l)	Concentration measured by Qubit (ng/ μ l)	Concentration ratio (Qubit/Infinite M200)	Volume (μ l)	Total quantity (μ g)
NH9 gDNA	2.0	1.8	68.0	61.8	0.909	204	12.6

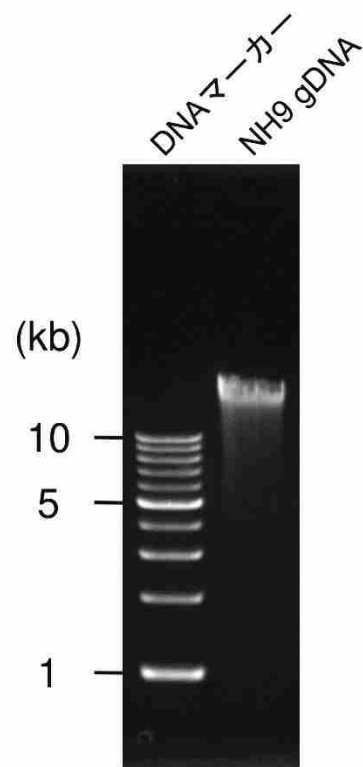


Fig. 2-1 抽出したゲノムDNAの電気泳動図
約250 ngのDNAをアプライした。電気泳動は、100 Vで30分
行った。アガロースの濃度は0.7%であった。DNAマーカーは、
1 kb DNA Ladder (TaKaRa)を使用した。

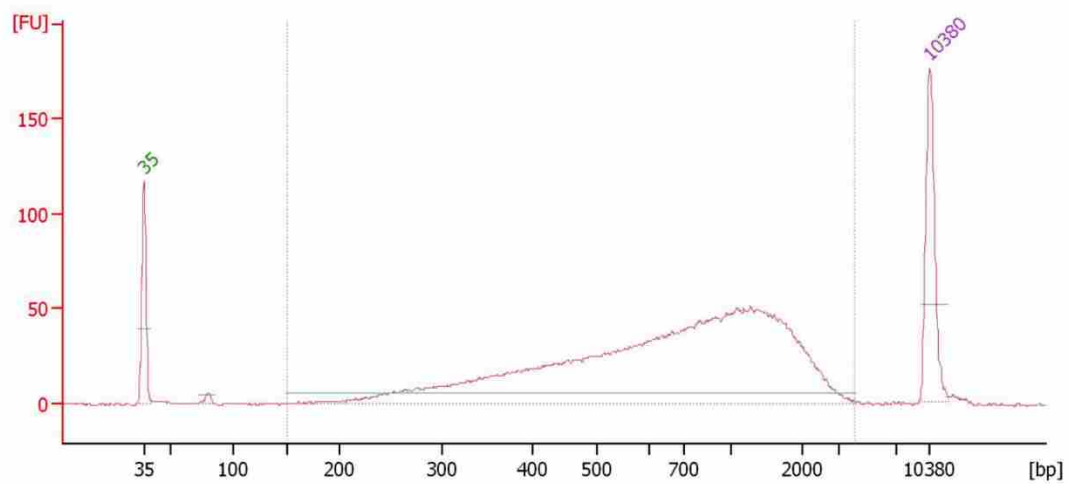


Fig. 2-2 調製したゲノムDNAライブラリのバイオアナライザ測定
左端の35はLower Marker、右端の10380はUpper Markerを示す。
横軸は塩基長、縦軸はシグナル強度を示す。

Table 2-7 MiSeqより出力されたリード及び解析に使用したリード情報

	Total numbers	Total bases (bp)	Max length (bp)	Average length (bp)	Min length (bp)	Coverage
Raw reads	6,873,910	1,977,432,353	301	288	35	240
High quality reads	4,610,262	1,133,629,397	300	246	150	137

Table 2-8 NH9株のドラフトゲノム情報

	Result
Number of contigs	177
N50 length (bp)	112,111
GC content (%)	65.6
Total sequence length (bp)	8,085,838
Max sequence length (bp)	651,961
Min sequence length (bp)	449
Average sequence length (bp)	45,683
Median sequence length (bp)	18,866

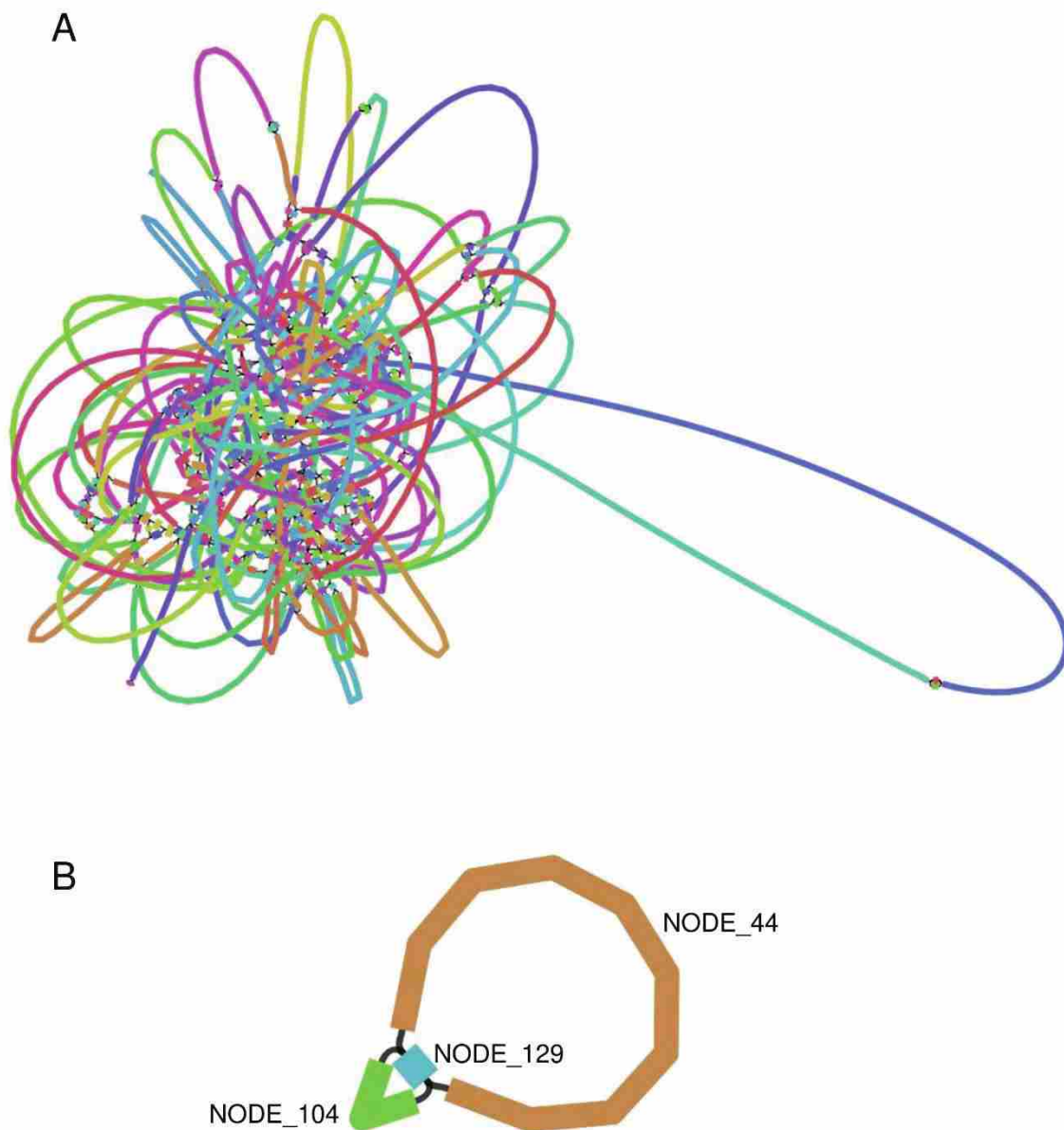


Fig. 2-3 *C. necator* NH9株のドラフトゲノムの可視化
 (A) 染色体を構成すると考えられるcontig。
 (B) pENH91を構成すると考えられるcontig。サイズの大きさ順に、
 NODE_44 (62,761 bp)、NODE_104 (9,879 bp)、NODE_129 (2,520 bp)
 の3つから構成されていた。

ながら 127 bp のオーバーラップ配列を削除することで、pENH91 と考えられる環状 DNA 配列を決定することができた。

2-3-3 完全ゲノム配列の決定

マクロジェン・ジャパンにおいてもゲノム DNA のクオリティチェックが行われたが、問題なく通過した。PacBio より出力された生リードデータ、及びアセンブリに使用した high quality subreads データ情報を Table 2-9 に示した。*De novo assembly* には、十分量のリード量を得ることができた。

完全ゲノム配列を決定した NH9 株のゲノム情報を Table 2-10 に、Circular map を Fig. 2-4 に示した。NH9 株は 2 つの染色体と 2 つのプラスミド、計 4 つのレプリコンを有していた。染色体の GC 含量は 65–66%であったが、プラスミドの GC 含量は 61–65%であり、染色体よりも低かった。NH9 株のゲノム上には 68 個の tRNA 遺伝子が存在し、ほとんどは染色体 1 及び 2 上に存在していたが、pENH92 にも 2 つの tRNA 遺伝子が存在した。また rRNA 遺伝子オペロン (5S、16S、23S) は、染色体 1 上に 3 つ、染色体 2 上に 2 つ存在した。また染色体 1 のみ、1 つの tmRNA 及び 3 つの ncRNA を有していた。

2-3-4 各レプリコンにおける推定複製開始点

各レプリコンにおける DnaA、RepA 及び TrfA 結合領域を、Fig. 2-5 に示した。染色体 1 には、DnaA 配列結合部位のみが存在した。染色体 2 には DnaA 配列に加え、RepA が結合すると考えられる iteron 配列が 20 個存在した。さらに、プラスミドの分配に関わる *parAB* 遺伝子も、近接していた。pENH91 は TrfA をコードする遺伝子を有しており、また推定 TrfA 結合 iteron 配列が存在した。pENH92 は、*repB* 遺伝子や *parAB* 遺伝子が存在したが、iteron 配列が見つからなかった。

Table 2-9 PacBioより出力されたリード及び解析に使用したリード情報

	Total numbers	Total bases (bp)	Max length (bp)	Average length (bp)	Min length (bp)	Coverage
Raw reads	181,370	1,398,403,297	41,609	7,710	35	170
Filtered subreads	86,406	1,050,061,719	41,609	12,153	7,500	127
Filtered subreads seeds	13,423	249,093,927	41,609	18,557	15,373	30

Table 2-10 NH9株の完全ゲノム配列情報

	Chromosome 1	Chromosome 2	pENH91	pENH92	Genome
Accession number	CP017757	CP017758	CP017760	CP017759	-
Sequence length (bp)	4,347,557	3,395,604	77,172	426,602	8,246,935
GC (%)	65.8	65.5	64.2	61.8	65.5
tRNA genes	57	9	0	2	68
tmRNA genes	1	0	0	0	1
ncRNA genes	3	0	0	0	3
rRNA gene operons	3	2	0	0	5
Coding (%)	87.3	86.7	92.2	85.2	87.0
Total number of CDSs	3,912	2,932	78	368	7,290
CDSs assigned to COGs	3,166 (80.9%)	2,300 (78.4%)	46 (59.0%)	249 (67.7%)	5,761 (79.0%)
CDSs assigned to KEGG Ontology	2,828 (72.3%)	1,901 (64.8%)	52 (66.7%)	236 (64.1%)	5,017 (68.8%)

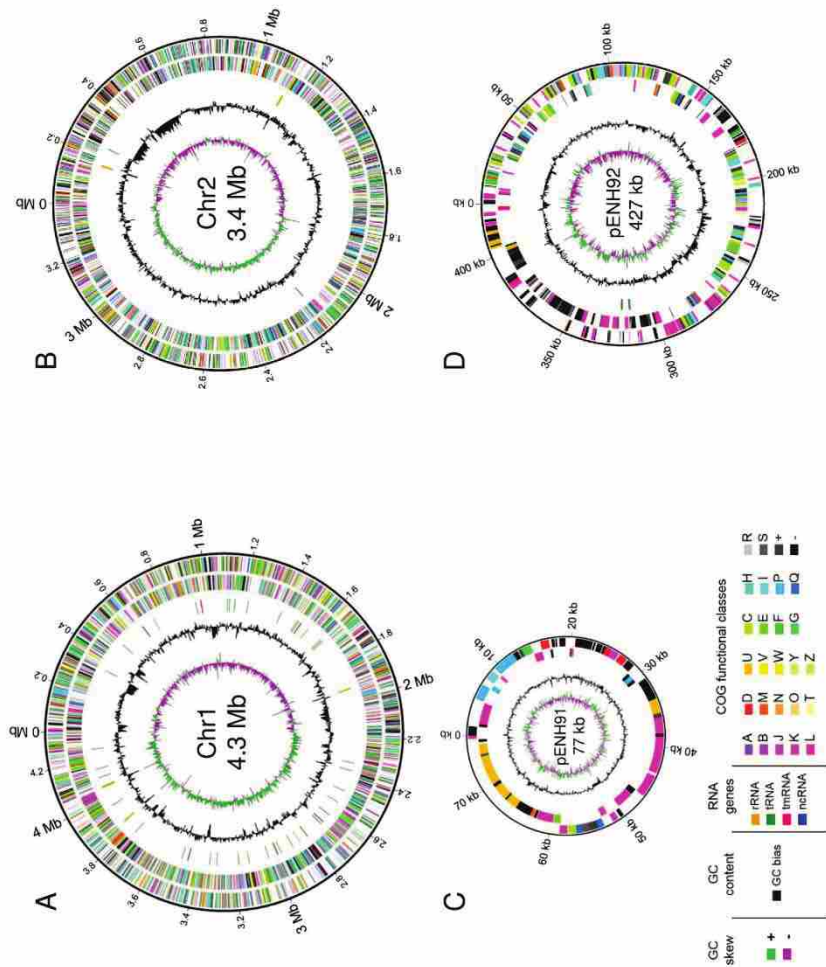


Fig. 2-4 NH9株のレプリコンのcircular map
 (A) 染色体1、(B) 染色体2、(C) pENH91、(D) pENH92を示す。各レプリコンの円は内側から、GC skew、GC含量、RNA遺伝子 (pENH91を除く)、CDS (reverse strand)、CDS (forward strand)を示す。

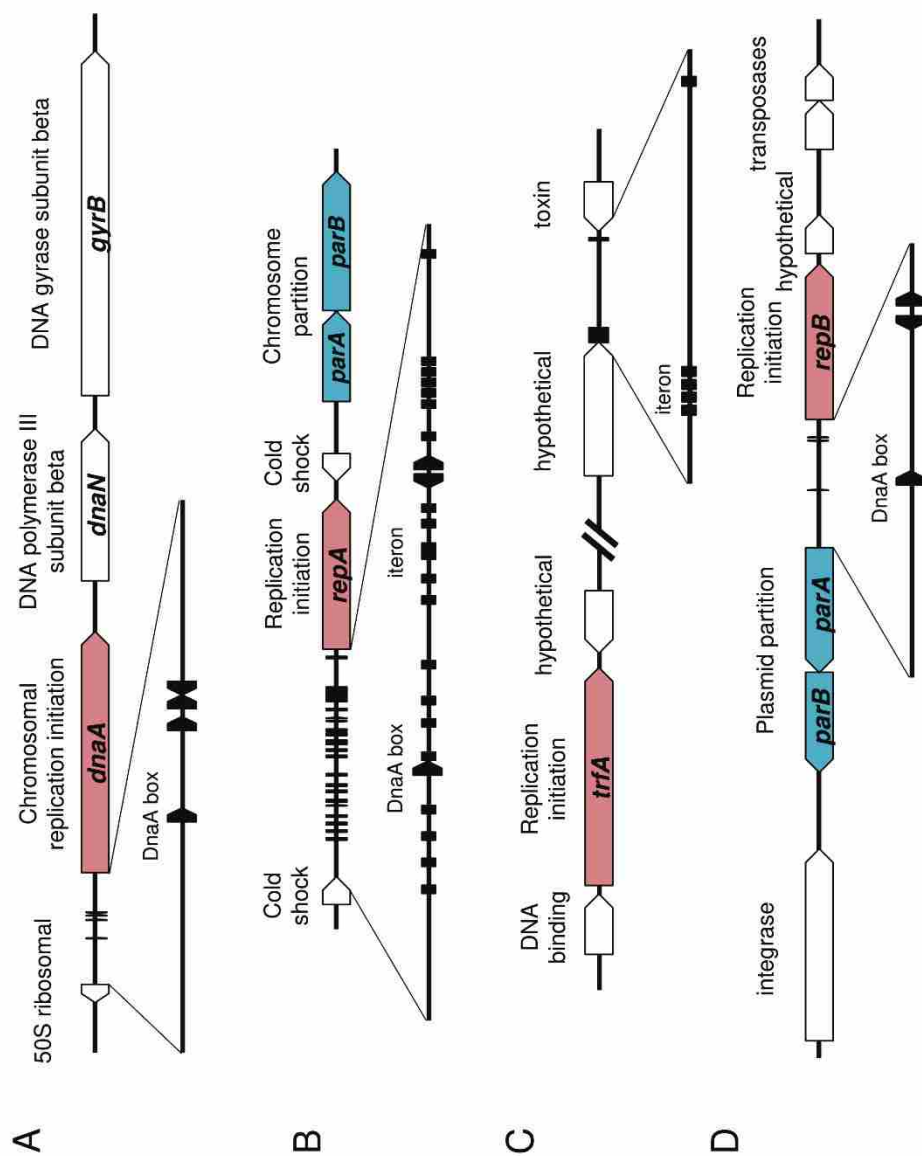


Fig. 2-5 各レプリコンにおける推定複製開始点及び複製開始タンパク質をコードする遺伝子の周辺領域
 (A) 染色体1、(B) 染色体2、(C) pENH91、(D) pENH92を示す。推定複製開始遺伝子を赤、分配遺伝子を青、それ以外の遺伝子を白抜きで示した。またDnaA boxは五角形、iteron配列は四角形で示した。

2-3-5 COG による機能解析

COG 解析の結果を、Fig. 2-6 と Table 2-11 に示した。染色体 1 には protein processing (class O)、translational machinery (class J)、DNA replication and repair (class L)、amino acid metabolism (class E)、nucleotide metabolism (class F) などのコアな機能が、染色体 2 と比較して有意に多く存在した。染色体 2 では、cell motility (class N)、transcription (class K)、energy metabolism (classes C, I, and Q) のカテゴリーにおいて染色体 1 と有意な差があり、適応 (adaptation) と生存 (survival) に関連するタンパク質をコードする遺伝子を多く有していた。2 つのプラスミドは両方とも、partitioning (class D)、プラスミド複製 (class L)、unknown function (class -) のカテゴリーにおいて、染色体よりも高い存在割合を示した。pENH91 では、intracellular trafficking and secretion (class U) に関わるタンパク質が有意に多く存在した。一方 pENH92 では有意に差のあるカテゴリーはなかったが、アミノ酸、核酸、糖質、補酵素、脂質代謝を含むエネルギー代謝 (class C、E、F、G、H、I) に機能的バイアスが見られた。

2-3-6 芳香族化合物分解能の推定

KEGG pathway 解析より、NH9 株は 3-CB、BA、2-, 3-, 4-HBA、アントラニル酸、2,3-, 2,5-, 3,4-ジヒドロキシ安息香酸、ベンゾイルギ酸、ベンズニトリルの分解に関わる遺伝子を有すると推定された (Fig. 2-7)。また安息香酸を分解する経路は、カテコールを介する経路の他に epoxybenzoyl-CoA 経路 (Ismail and Gescher, 2012) も存在した (Fig. 2-8)。なお多くの *Cupriavidus* 属細菌が有するフェノール分解遺伝子は無かった。

3-CB、BA、3-HBA、4-HBA 及びアントラニル酸の分解に関わる遺伝子群を Fig. 2-9 に、各遺伝子の詳細な情報を Table 2-12 に示した。*ben* 遺伝子群 (Fig. 2-9A)、*catB* (Fig. 2-9B)、3-クロロカテコール (Fig. 2-9C)、3-HBA (Fig. 2-9G) 分解遺伝子群、及び 4-HBA の *pca* 遺伝子群 (Fig. 2-9H) の上流には、LysR 型転写調節因子 (LTTR) が逆向きに存在した。またトランスポ

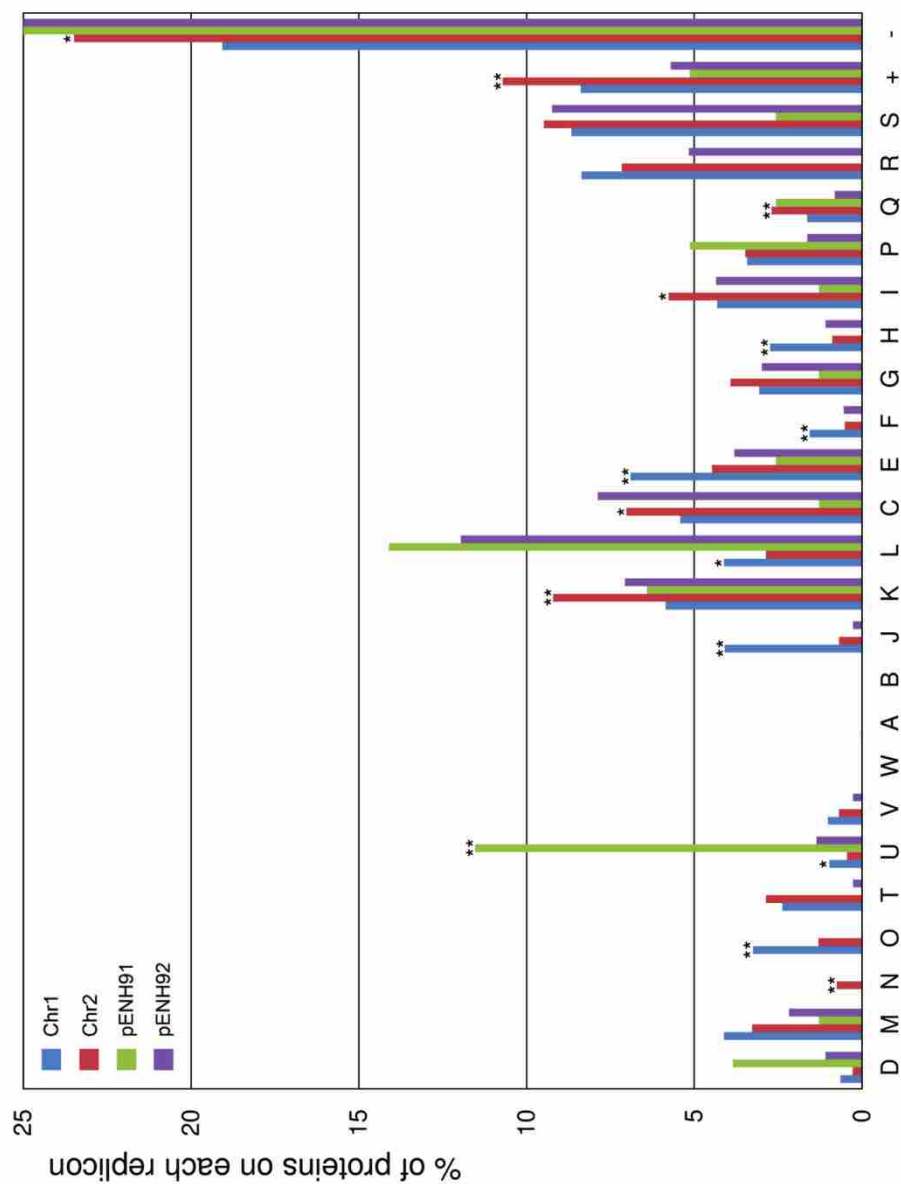


Fig. 2-6 COGカテゴリーに基づくタンパク質の機能的分類
 横軸はCOGカテゴリー、縦軸は各COGカテゴリーに分類されたタンパク質の割合を示す。
 各レプリコンごとに示した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。詳細はTable 2-11参照。

Table 2-11 各レブリコンにおける機能割合の分布

Class	Functional annotation		Chr1		Chr2		P-value ^a		pENH91		pENH92		P-value ^a	
	Count	Percentage	Count	Percentage	Count	Percentage			Count	Percentage	Count	Percentage		
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING														
D Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	25	0.64	8	0.27	5.65E-02	3	3.85	4	1.09	0.442				
M Cell wall/membrane/envelope biogenesis	161	4.12	96	3.27	0.100	1	1.28	8	2.17	1				
N Cell motility	0	0.00	22	0.75	9.51E-08 **	0	0.00	0	0.00	1				
O Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	127	3.25	38	1.30	6.32E-07 **	0	0.00	0	0.00	1				
T Signal transduction mechanisms	93	2.38	84	2.86	0.273	0	0.00	1	0.27	1				
U Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	38	0.97	13	0.44	2.67E-02 *	9	11.54	5	1.36	2.39E-03 **				
V Defense mechanisms	40	1.02	20	0.68	0.198	0	0.00	1	0.27	1				
W Extracellular structures	0	0.00	0	0.00	1	0	0.00	0	0.00	1				
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING														
A RNA processing and modification	1	0.03	0	0.00	1	0	0.00	0	0.00	1				
B Chromatin structure and dynamics	0	0.00	0	0.00	1	0	0.00	0	0.00	1				
J Translation, ribosomal structure and biogenesis	160	4.09	20	0.68	5.50E-15 **	0	0.00	1	0.27	1				
K Transcription	229	5.85	270	9.21	8.33E-07 **	5	6.41	26	7.07	1				
L Replication, recombination and repair	161	4.12	84	2.86	1.42E-02 *	11	14.10	44	11.96	1				
METABOLISM														
C Energy production and conversion	212	5.42	206	7.03	1.42E-02 *	1	1.28	29	7.88	0.393				
E Amino acid transport and metabolism	270	6.90	131	4.47	7.97E-05 **	2	2.56	14	3.80	1				
F Nucleotide transport and metabolism	61	1.56	15	0.51	1.17E-04 **	0	0.00	2	0.54	1				
G Carbohydrate transport and metabolism	120	3.07	115	3.92	9.41E-02	1	1.28	11	2.99	1				
H Coenzyme transport and metabolism	107	2.74	26	0.89	1.15E-07 **	0	0.00	4	1.09	1				
I Lipid transport and metabolism	169	4.32	169	5.76	1.42E-02 *	1	1.28	16	4.35	0.912				
P Inorganic ion transport and metabolism	134	3.43	102	3.48	1	4	5.13	6	1.63	0.393				
Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	64	1.64	79	2.69	7.61E-03 **	2	2.56	3	0.82	0.661				
POORLY CHARACTERIZED														
R General function prediction only	327	8.36	210	7.16	0.100	0	0.00	19	5.16	0.393				
S Function unknown	339	8.67	278	9.48	0.297	2	2.56	34	9.24	0.393				
+ Multiple assign	328	8.38	314	10.71	3.89E-03 **	4	5.13	21	5.71	1				
- No similarity	746	19.07	632	21.56	2.21E-02 *	32	41.03	119	32.34	0.532				
Total	3,912	100	2,932	100	-	78	100	368	100	-				

^aP-values were calculated by Fisher's test with false discovery rate adjustments. *P-values <0.05, **P-values <0.01.

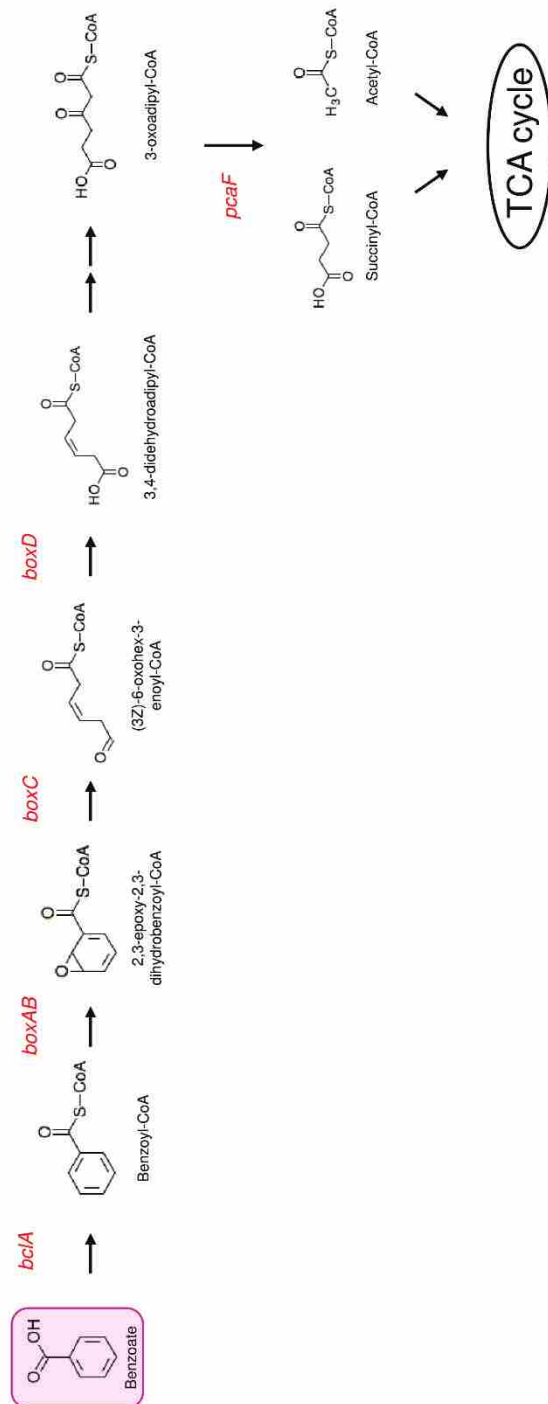


Fig. 2-8 Epoxybenzoyl-CoA経路によるBAの分解

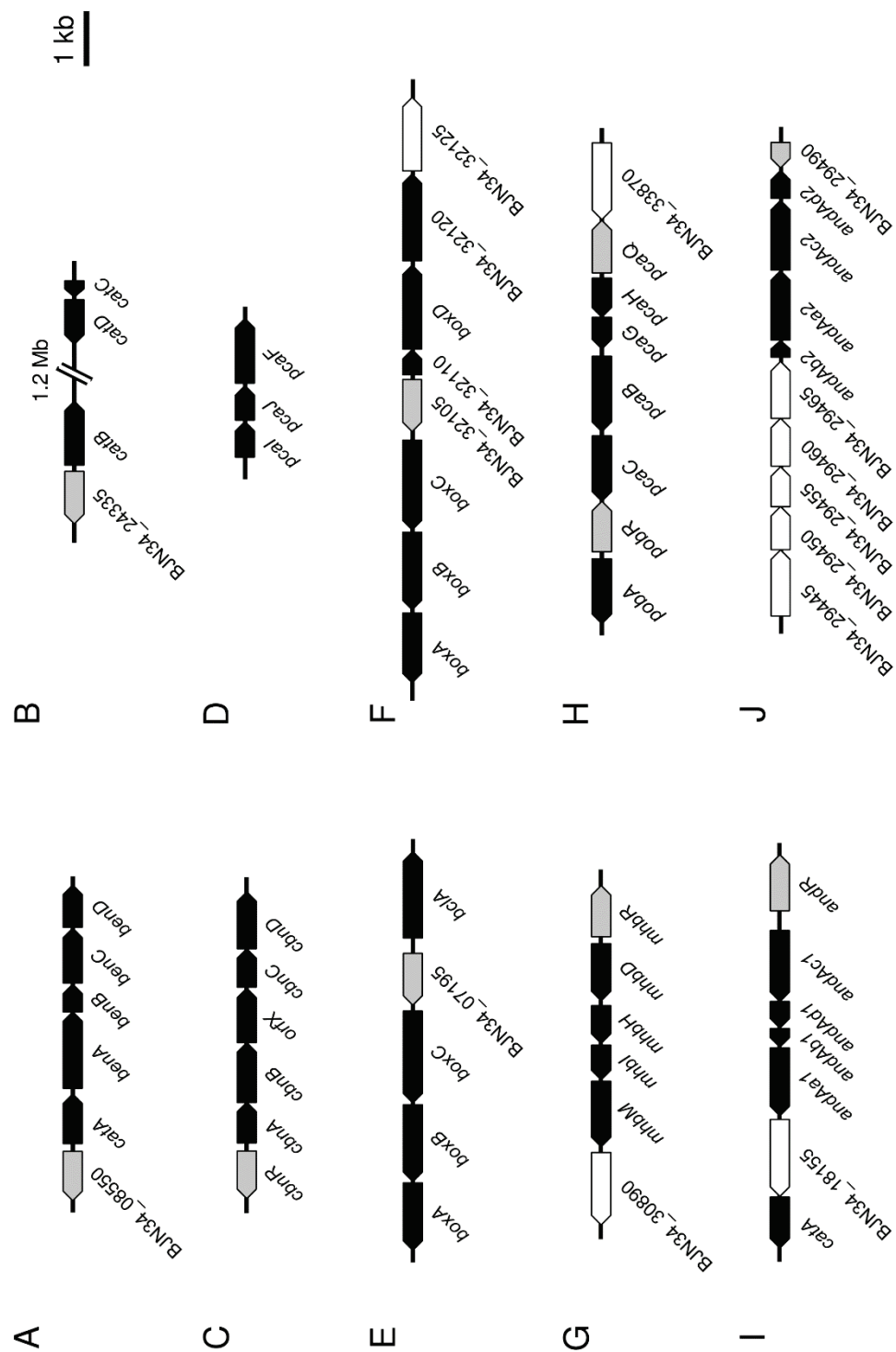


Fig. 2-9 芳香族化合物分解遺伝子群
トランスポーター、転写調節因子、及びそれ以外の機能をコードする
遺伝子をそれぞれ、白、灰色、黒で示した。各遺伝子の詳細は、Table 2-12参照。

Table 2-12 NH9株の芳香族及び関連化合物分解遺伝子

Compound name	Gene designation ^a	K number	EC number	Definition ^a	Annotated genes ^{b,c}
Anthranilate	<i>andAc</i>	K16319	EC:1.14.12.1	Anthranilate 1,2-dioxygenase large subunit	BJN34_18175 (C1), 29480 (C2)
	<i>andAd</i>	K16320	EC:1.14.12.1	Anthranilate 1,2-dioxygenase small subunit	BJN34_18170 (C1), 29485 (C2)
	<i>andAb</i>	K18248	-	Anthranilate 1,2-dioxygenase ferredoxin component	BJN34_18165 (C1), 29470 (C2)
	<i>andAa</i>	K18249	EC:1.18.1.-	Anthranilate 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component	BJN34_18160 (C1), 29475 (C2)
Benzonitrile	<i>nthA</i>	K01721	EC:4.2.1.84	Nitrile hydratase alpha subunit	BJN34_31490 (C2)
	<i>nthB</i>	K20807	EC:4.2.1.84	Nitrile hydratase beta subunit	BJN34_31495 (C2)
	<i>amiE</i>	K01426	EC:3.5.1.4	Amidase	BJN34_07485 (C1), 23735 (C2), 30640 (C2), 33905 (C2), 34230 (C2)
Benzoylformate	<i>mdlC</i>	K01576	EC:4.1.1.7	Benzoylformate decarboxylase	BJN34_05885 (C1)
	<i>mdlD</i>	K00141	EC:1.2.1.28	Benzaldehyde dehydrogenase	BJN34_05890 (C1)
Benzoate	<i>benA</i>	K05549	EC:1.14.12.10	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit	BJN34_08560 (C1)
	<i>benB</i>	K05550	EC:1.14.12.10	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit	BJN34_08565 (C1)
	<i>benC</i>	K05784	EC:1.14.12.10	Benzoate 1,2-dioxygenase reductase component	BJN34_08570 (C1)
	<i>benD</i>	K05783	EC:1.3.1.25	1,6-Dihydroxycyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase	BJN34_08575 (C1)
2-Hydroxybenzoate (Salicylate)	<i>nahG</i>	K00480	EC:1.14.13.1	Salicylate hydroxylase	BJN34_24950 (C2)
3-Hydroxybenzoate	<i>nhbM</i>	K22270	EC:1.14.13.24	3-Hydroxybenzoate 6-monoxygenase	BJN34_30895 (C2)
	<i>nhbD</i>	K00450	EC:1.13.11.4	Genisate 1,2-dioxygenase	BJN34_30910 (C2)
	<i>nhbI</i>	K01801	EC:5.2.1.4	Maleylpyruvate isomerase	BJN34_30900 (C2)
	<i>nhbH</i>	K16165	EC:3.7.1.20	Fumarylpyruvate hydrolase	BJN34_30905 (C2)
4-Hydroxybenzoate	<i>pobA</i>	K00481	EC:1.14.13.2	4-Hydroxybenzoate 3-monoxygenase	BJN34_33835 (C2)
	<i>pcaG</i>	K00448	EC:1.13.11.3	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit	BJN34_33855 (C2)
	<i>pcaH</i>	K00449	EC:1.13.11.3	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	BJN34_33860 (C2)
	<i>pcaB</i>	K01857	EC:5.5.1.2	3-Carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	BJN34_33850 (C2)
2,3-Dihydroxybenzoate	<i>pcaC</i>	K14727	EC:4.1.1.44	4-Carboxymuconolactone decarboxylase	BJN34_33845 (C2)
	<i>dhbD</i>	K14333	EC:4.1.1.46	2,3-Dihydroxybenzoate decarboxylase	BJN34_29435 (C2)
3-Chlorocatechol	<i>cbnA</i>	K15253	EC:1.13.11.-	Chlorocatechol 1,2-dioxygenase	BJN34_37380 (p1)
	<i>cbnB</i>	K01860	EC:5.5.1.7.	Chloromuconate cycloisomerase	BJN34_37385 (p1) ^d
	<i>cbnC</i>	K01061	EC:3.1.1.45	Dienelactone hydrolase	BJN34_37395 (p1)
	<i>cbnD</i>	K00217	EC:1.3.1.32	Maleylacetate reductase	BJN34_37400 (p1) ^d
Catechol	<i>catA</i>	K03381	EC:1.13.11.1	Catechol 1,2-dioxygenase	BJN34_08555 (C1), 18150 (C1), 26685 (C2), 28970 (C2), 30600 (C2)
	<i>catB</i>	K01856	EC:5.5.1.1	Muconate cycloisomerase	BJN34_24340 (C2)
	<i>catC</i>	K03464	EC:5.3.3.4	Muconolactone isomerase	BJN34_29745 (C2)
	<i>catD</i>	K01055	EC:3.1.1.24	3-Oxoadipate enol-lactonase	BJN34_29740 (C2)
3-Oxoadipate	<i>pcaI</i>	K01031	EC:2.8.3.6	3-Oxoadipate CoA-transferase, alpha subunit	BJN34_21015 (C2)
	<i>pcaJ</i>	K01032	EC:2.8.3.6	3-Oxoadipate CoA-transferase, beta subunit	BJN34_21020 (C2)
	<i>pcaF</i>	K00632	EC:2.3.1.16	3-Oxoadipyl-CoA thiolase	BJN34_21025 (C2) ^d

^aGene designation and definition from KEGG annotation were manually modified.^bGenes listed in this table were manually selected.^cGene location was shown as below; C1, Chromosome 1; C2, Chromosome 2; p1, pENH91.^d2nd best hit.

ーターをコードする遺伝子が、安息香酸 (Fig. 2-9F)、3-HBA (Fig. 2-9G)、4-HBA (Fig. 2-9H)、及びアントラニル酸 (Fig. 2-9I and J) 分解遺伝子群に近接して存在した。

3-CB、BA、HBA、アントラニル酸及び CA を添加した培地において、NH9 株の明らかな増殖を確認した (Fig. 2-10)。NH9 株はこれらの化合物を分解し、エネルギー源及び炭素源としていと推測した。また炭素源を加えていないネガティブコントロールにおいても、5 日間培養するとコロニーが確認できた。

2-3-7 芳香族化合物による増殖曲線

3-CB、BA、3-HBA 及び CA による増殖曲線を、Fig. 2-11A に示した。CA 培養区は培養開始後 12 時間まで、3-CB 及び BA 培養区は 18 時間まで、3-HBA 培養区は 24 時間まで、活発な増殖を示した。それ以降は増殖が落ち着き、また濁度が大きく減少することは無かった。培養開始後 6 時間の地点において、3-CB 及び 3-HBA による増殖は、BA や CA と比較して有意 ($p < 0.01$) に遅れていた。

2-3-8 HPLC による芳香族化合物分解能の解析

3-CB、BA 及び 3-HBA の分解曲線を、Fig. 2-11B に示した。3-CB 及び BA は、培養開始後 18 時間以内には完全に分解された。一方、3-HBA は 18 時間経過しても残存していたが、24 時間で完全に分解された。また増殖曲線と同様に、培養開始後 6 時間の地点において、3-CB 及び 3-HBA の分解は、BA と比較して有意 ($p < 0.05$) に遅かった。

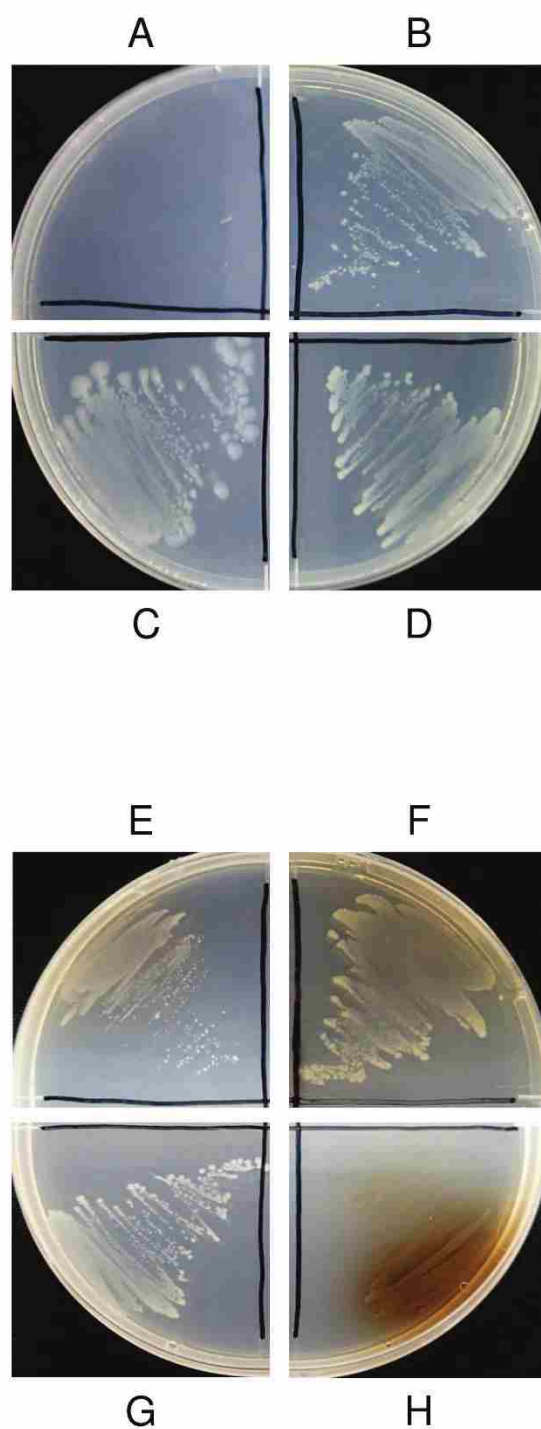


Fig. 2-10 芳香族化合物による増殖能の確認
 (A) BSMに炭素源を加えなかった培地、及び(B) CA、(C) 3-CB、(D) BA、
 (E) 2-HBA、(F) 3-HBA、(G) 4-HBA、(H) アントラニル酸 (すべて終濃度
 5 mM)を加えた培地。

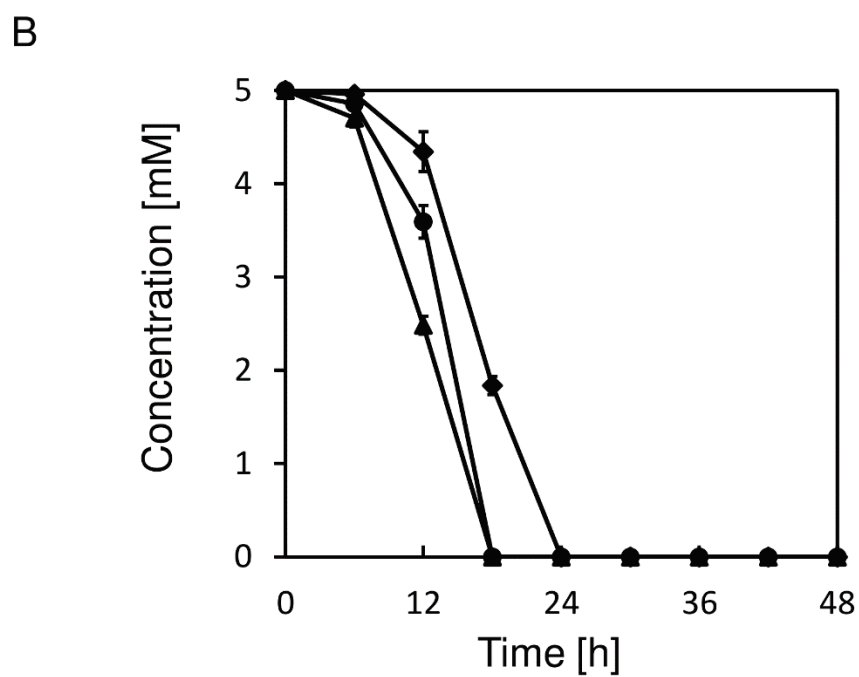
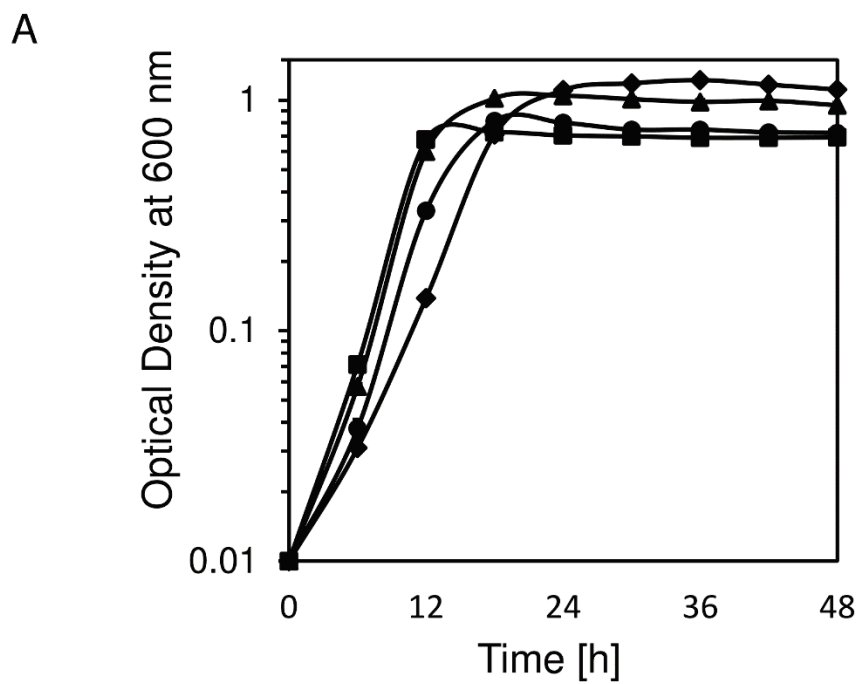


Fig. 2-11 (A) NH9株の増殖曲線と(B) 芳香族化合物分解曲線
各記号と物質の対応は、次の通りである。3-CB (●)、BA (▲)、
3-HBA (◆)、CA (■)。

2-4 考察

ゲノム配列の決定により、NH9 株には 2 つの環状染色体が存在することが明らかとなった (Fig. 2-4)。また染色体 2 の推定複製開始点付近には、RepA が結合する iteron 配列が多数存在し、近くには *parAB* 遺伝子も存在していた (Fig. 2-5) ことから、染色体 2 はプラスミド様の複製機構を有していると考ええる。これら染色体の特徴は、同属の細菌でも報告されている (Janssen *et al.*, 2010; Pohlmann *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015b)。また COG による機能解析で見られた染色体の特徴も、他の *Cupriavidus* 属細菌と同様であった (Janssen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015b) ことから、NH9 株の染色体は一般的な *Cupriavidus* 属細菌の特徴を有していると考えられる。MUMmer 3 (Kurtz *et al.*, 2004) を使用して、NH9 株と近縁株のゲノム構造比較を行ったところ、染色体 1 は、少なくとも同属間において similarity が高い傾向であったが、染色体 2 は similarity 及びシニテニーが低い傾向であった (Fig. 2-12)。さらに、NH9 株と *C. necator* N-1^T 株の染色体同士を、Mauve (Darling *et al.*, 2004) を使用して比較したところ、染色体 1 の全体的な構造は類似していたが、染色体 2 は保存領域がシャッフルしている構造になっていた (Fig. 2-13)。これらの結果から、*Cupriavidus* 属細菌の染色体 1 は全体的にある程度保存されている一方で、染色体 2 に関しては様々な進化イベント (例えば、遺伝子重複や外来遺伝子の獲得、組換えなど) を経て、種あるいは株独自の進化をしている可能性があると考えた。

pENH91 の TrfA は、Inc (Incompatibility) P-1 β グループに属するプラスミドである pA81 (*Achromobacter xylosoxidans* A8 株) (Jencova *et al.*, 2008) の TrfA と、アミノ酸レベルで 100% の identity を示した。プラスミドの Inc グループは、複製開始タンパク質のアミノ酸配列の相同性により分類できるという報告がある (Shintani *et al.*, 2015)。また過去の不和合性実験より、pENH91 は IncP1 グループに属する可能性が高いと報告されている (Ogawa and Miyashita, 1995)。さらに、pENH91 (77,172 bp) と pA81 (98,192 bp) の塩基配列を比較したところ、74,985 bp (97.2%) の塩基配列が 100% 一致していた (Fig. 2-14)。これらの結果より、pENH91 は IncP-1 β グループに属すると考える。

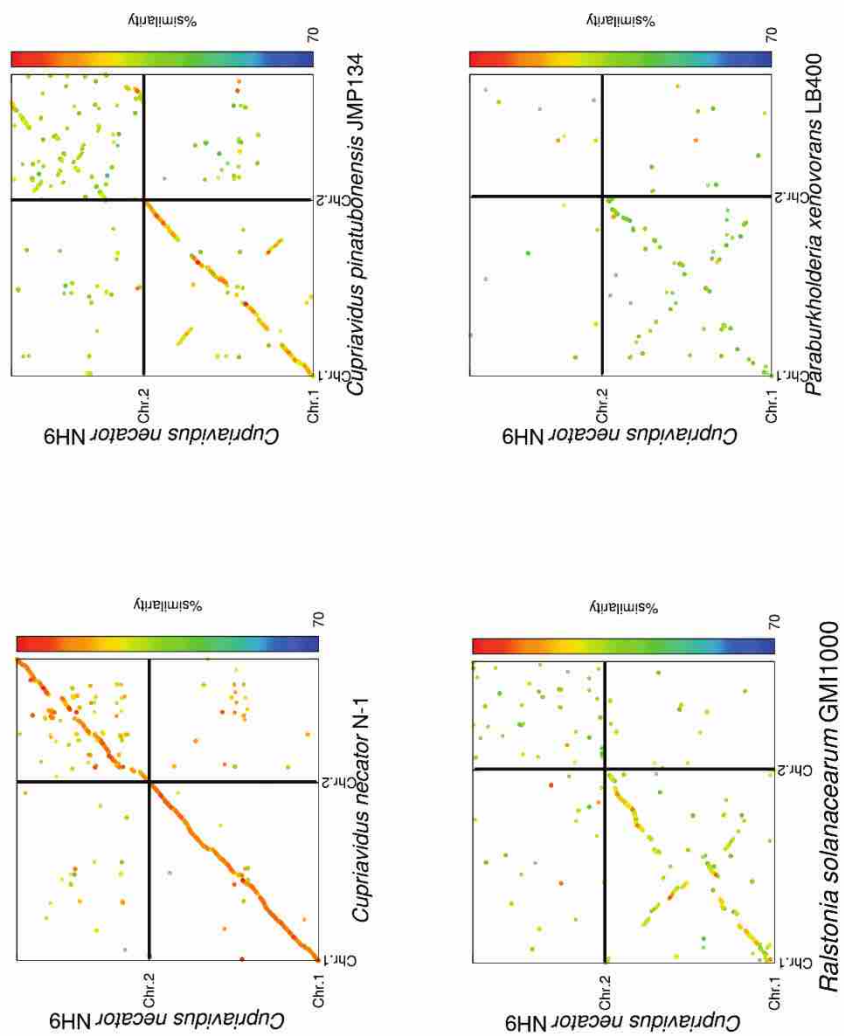


Fig. 2-12 NH9株と近縁種のドットプロット解析
MUMmer 3により、各株の染色体を使用してドットプロット解析を行った。

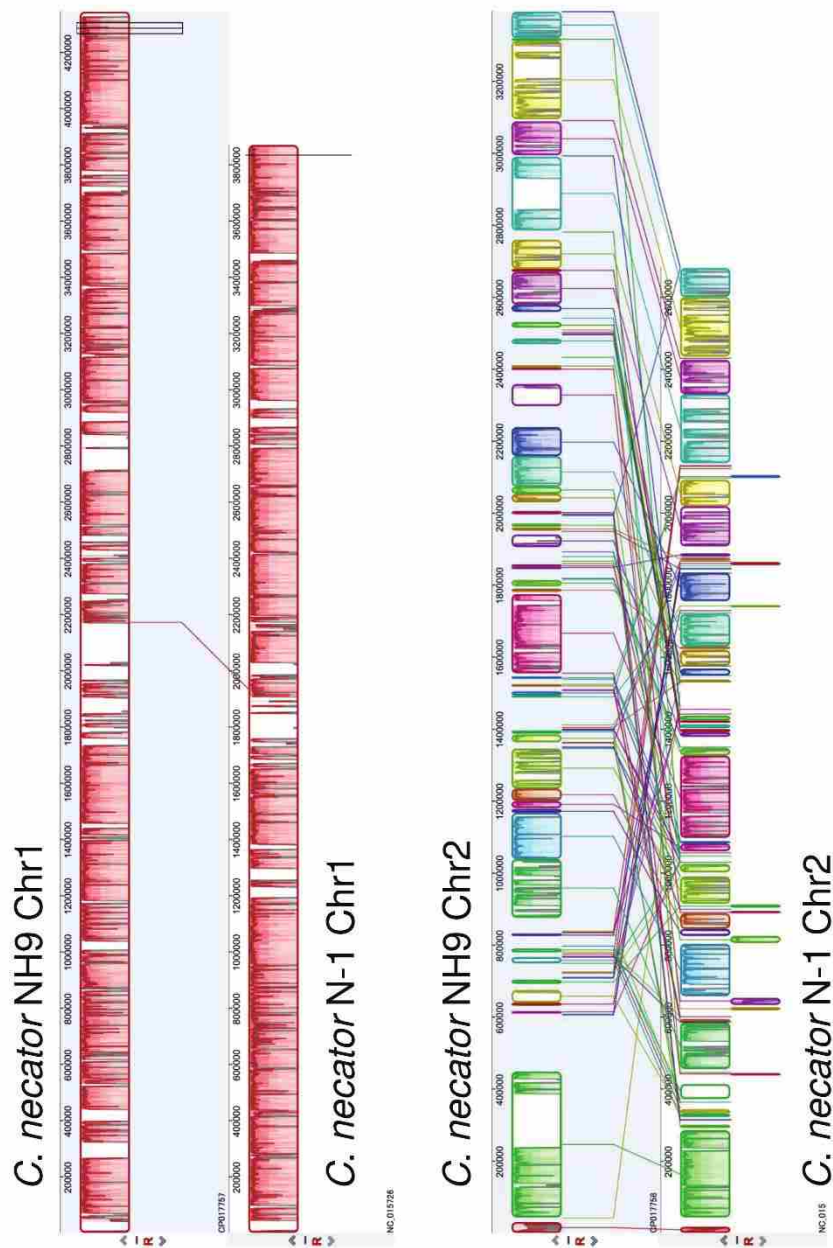


Fig. 2-13 NH9株とN-1株のゲノム比較
 Mauveにより、NH9株とN-1株の染色体同士を比較した。色のついた領域は、
 Locally Collinear Blocks (LCBs)と呼ばれる保存された領域を示す。

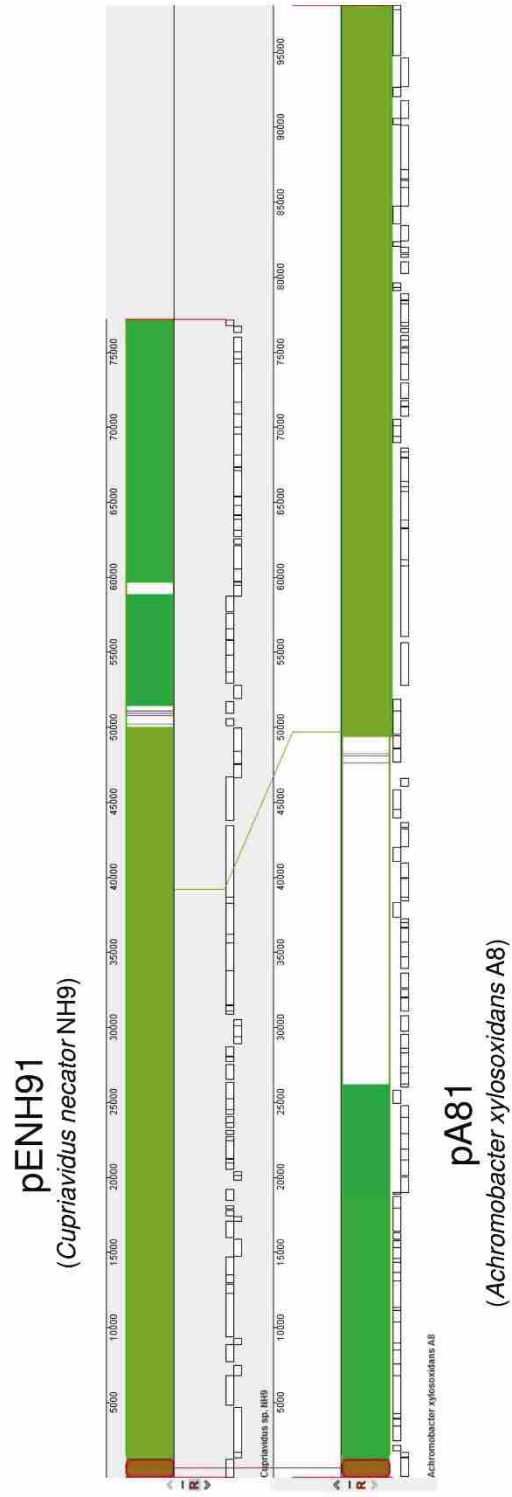


Fig. 2-14 pENH91とpA81のDNA塩基配列比較
Mauveを使用して、pENH91 (CP017760)とpA81 (CP002288)の比較を行った。
上下で色が同じ部分は保存された領域を示す。

pENH92 の RepB 及び ParAB のアミノ酸配列を調べたところ、*Cupriavidus* 属細菌のプラスミドよりも、*Burkholderia* 属や *Paraburkholderia* 属細菌が有するプラスミドの RepB 及び ParAB 配列と、相同性が高かった (Fig. 2-15)。pENH92 のこれら領域の両端は、integrase や transposases という可動性遺伝因子が存在した (Fig. 2-5)。このため、水平伝播によってこれらの領域を獲得した可能性がある。もしそうであれば、*Cupriavidus* 属が有していない Inc グループのプラスミドであるかもしれないが、これを明らかにするためには関連するすべてのプラスミドの複製開始タンパク質間の相同性を調べたり、不和合性実験を行う必要がある。

HPLC 解析より、NH9 株は 3-CB、BA 及び 3-HBA を完全分解することが明らかとなった (Fig. 2-11B)。2,5-dihydroxybenzoate (ゲンチジン酸) は 3-HBA の中間代謝産物であるため (Fig. 2-7)、この化合物も完全分解すると考える。3-CB を 3-クロロカテコールに変換する機能をコードする遺伝子は、過去の報告より *benABCD* であると考えられ (Ogawa *et al.*, 2003)、これは染色体 1 上に存在した。3-クロロカテコール分解遺伝子群 (*cbn* 遺伝子群) は、これまでの報告の通り pENH91 上に存在 (Ogawa and Miyashita, 1995, 1999) し、その両端には Insertion sequences (IS) が存在していた (Fig. 2-16)。つまり 3-クロロカテコール分解能は、*cbn* 遺伝子群の導入、あるいは *cbn* 遺伝子群を持つプラスミドの導入により獲得した機能であるといえる。それ以外の分解遺伝子群は、染色体 1 または 2 上に存在しており、染色体 2 上の方が多かった (Table 2-12)。これらより、NH9 株の 3-CB 分解には pENH91 が必須であり、また芳香族化合物分解には染色体上の関連遺伝子が、重要な役割を担っていると考ええる。

CbnA のアミノ酸配列をクエリーとして BLASTP 解析を行い、トップヒットしたアミノ酸配列 50 個を使用して系統樹を作成したところ、CbnA は β 及び γ -Proteobacteria 由来のクラスターに位置していた (Fig. 2-17)。CbnA が含まれるクラスターを拡大した図 (Fig. 2-18)、及びクロロカテコール分解遺伝子群のアミノ酸配列の相同性を比較した結果 (Fig. 2-19) から、*cbn* 遺伝子群は *Pseudomonas* sp. P51 株の *tcb* 遺伝子群や、*Pseudomonas chlororaphis* RW71 株の *tet* 遺伝子群、*Delftia acidovorans* P4a 株の *tfd* 遺伝子群と非常に高い相同性を有することがわかった。クロロカ

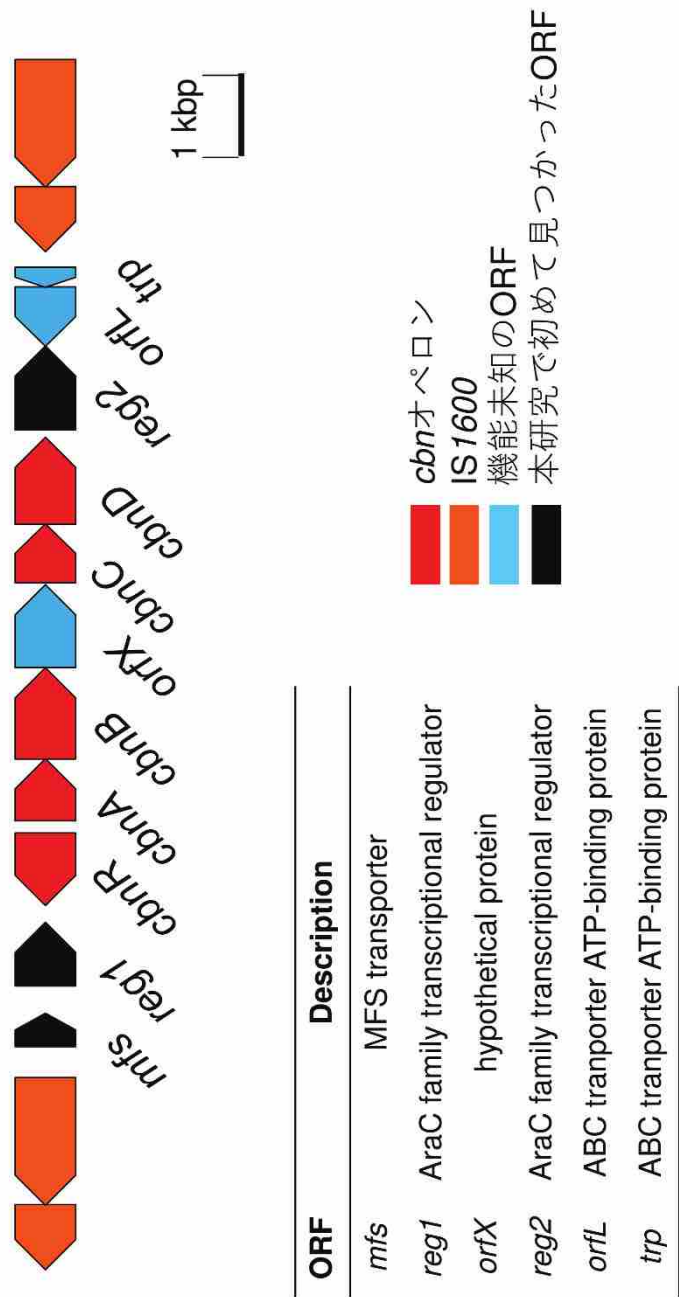


Fig. 2-16 pENH91上の3-クロロカテコール分解遺伝子群とその周辺の遺伝子

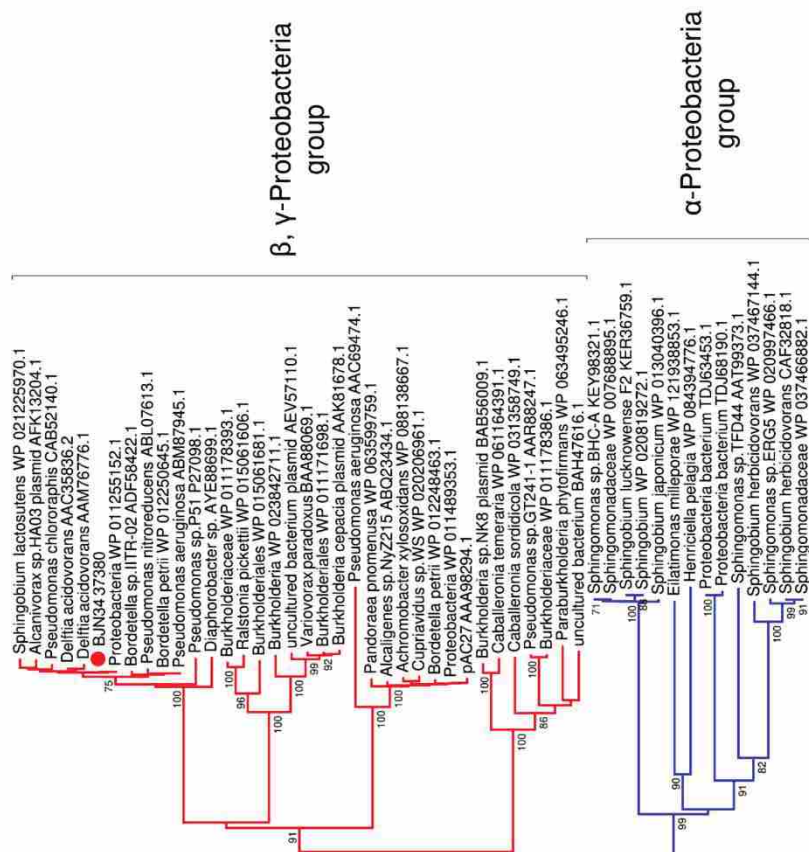


Fig. 2-17 CbnAと相同なタンパク質による系統解析 Neighbor-joining法により、系統樹を作成した。CbnAを赤い丸で示した。

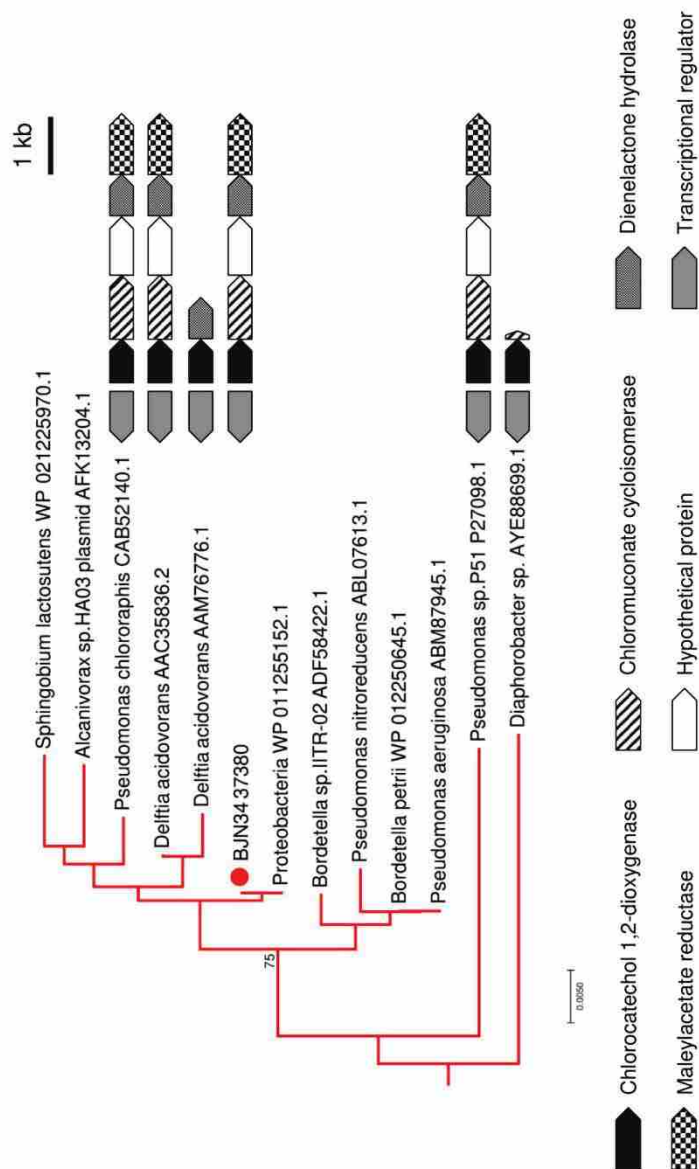


Fig. 2-18 CbnAと相同なタンパク質による系統解析
 Fig. 2-17のCbnAが含まれるクラスターを拡大した図。
 系統樹の右側に、各菌株が持っているクロロカロール分解遺伝子群の図を示した。

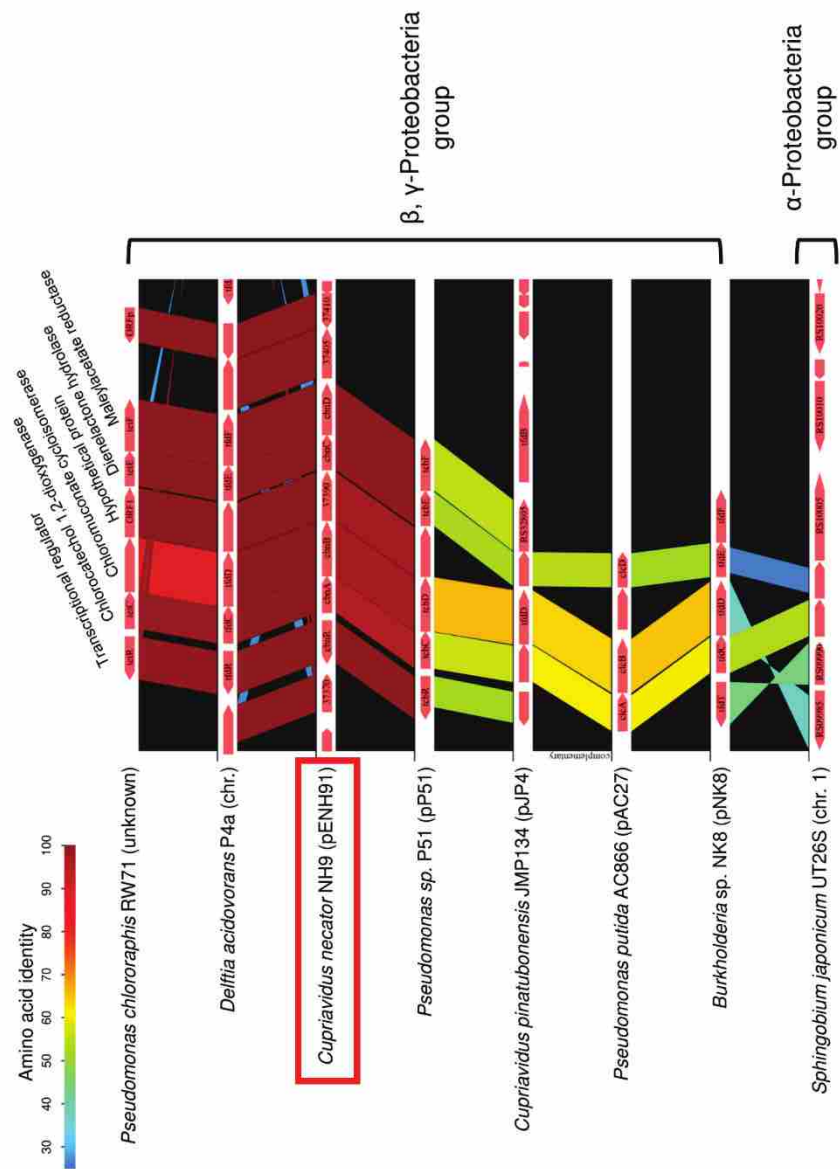


Fig. 2-19 クロロカタコール分解遺伝子群の相同性比較
GenomeMatcherのCompareSequence機能を使用し、NH9株のクロロカタコール分解遺伝子群と、
他の株のクロロカタコール分解遺伝子群や相同な遺伝子をアミノ酸レベルで比較した。

テコール分解遺伝子群は主にプラスミド上に存在するが、例えば *D. acidovorans* P4a 株の *tfd* 遺伝子群は染色体上に存在し、その遺伝子群の両端には IS が存在していた (Hoffmann *et al.*, 2003)。これらの結果からクロロカテコール分解遺伝子群は、プラスミドやトランスポゾンなどの可動性遺伝因子、あるいは細菌間の組換えによって Proteobacteria 間を伝播していることが推測される。今回の解析結果やこれまでの系統解析 (Ogawa *et al.*, 2003) から、上記の *cbn*、*tcb*、*tet*、*tfd* 遺伝子群には共通祖先が存在すると考えられ、*cbn* 遺伝子群の由来を推測することは、現時点では困難である。大規模なゲノム配列比較解析や、トランスポゾンやプラスミドを介した水平伝播に関連する実験を行うことで、*cbn* 遺伝子の祖先や由来を考えるヒントが得られるかもしれない。

LTTR は、様々な芳香族化合物分解遺伝子群の転写調節を担うことが知られている (Maddocks and Oyston, 2008)。*ben* 遺伝子群、*catB*、3-クロロカテコール、3-HBA 分解遺伝子群、及び 4-HBA 分解に関わる *pca* 遺伝子群の発現は、その位置関係より、LTTR により調節されていると推測する (Fig. 2-9)。またこれまでに知られている多くのトランスポーターをコードする遺伝子は、分解遺伝子群の一部、あるいは近傍に存在することが多い (Table 3-15 参照)。安息香酸、3-HBA、4-HBA、及びアントラニル酸分解遺伝子群の上流または下流には、トランスポーターをコードする遺伝子が存在したため (Fig. 2-9)、これらの取り込みに関与している可能性がある。

3-HBA 分解遺伝子群は、*mhb* 遺伝子群 (Lin *et al.*, 2010) と *nag* 遺伝子群 (Jeon *et al.*, 2006) が知られている。NH9 株の場合、*mhb* 遺伝子群のアミノ酸配列と相同性が高かったため (Fig. 2-20)、以降は NH9 株のこれらの遺伝子を *mhb* 遺伝子群と呼ぶ。またアントラニル酸分解遺伝子 (*andAcAdAbAa*) は、染色体 1 と 2 上にそれぞれ 1 クラスターずつ存在した。染色体 1 上の *and* 遺伝子群 (*and1* または *andAc1Ad1Ab1Aa1*) のアミノ酸配列は、既知の And タンパク質 (Chang *et al.*, 2003) と比較的高い相同性 (43.9%–73.3% の identity) を示し、また転写調節因子も同じ AraC/XylS family であった。そのため、NH9 株の *and1* もアントラニル酸分解に関わると考える。一方、染色体 2 上の *and* 遺伝子群 (*and2* または *andAc2Ad2Ab2Aa2*) のアミノ酸配列は、

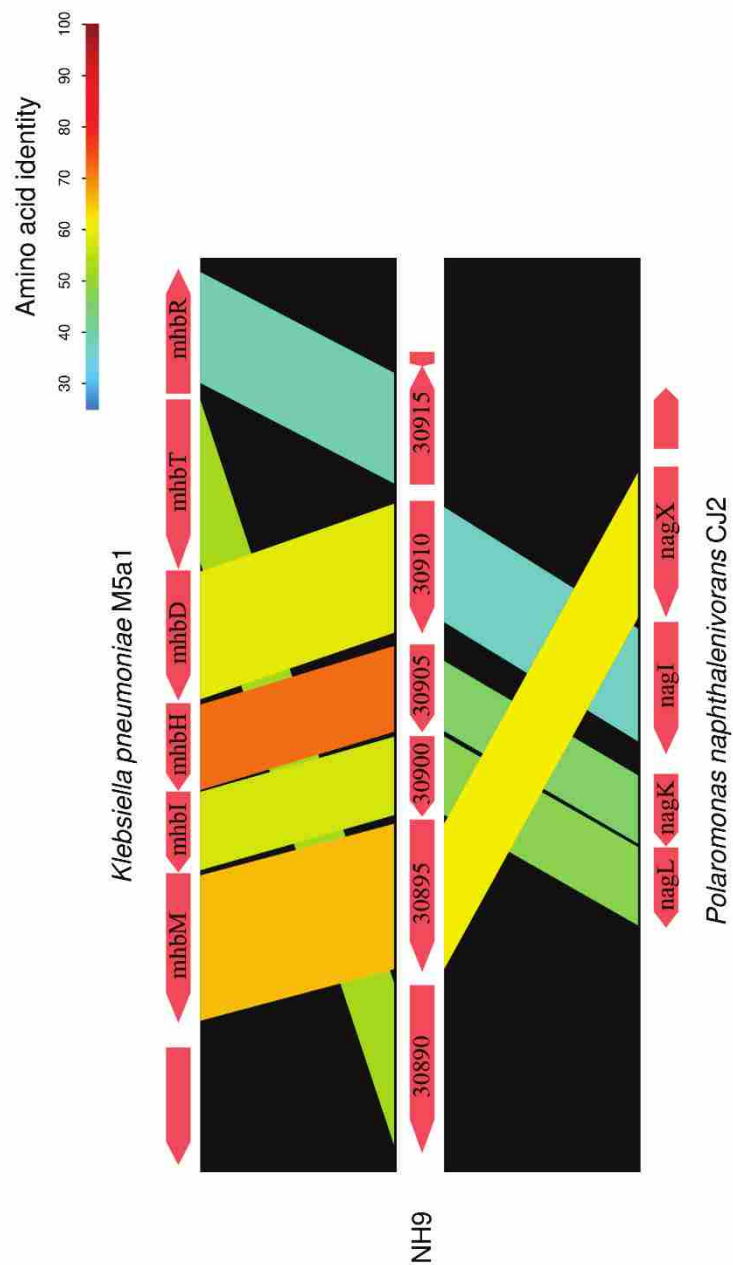


Fig. 2-20 3-HBA分解タンパク質の比較
GenomeMatcherのCompareSequences機能を使用し、NH9株の3-HBA分解関連タンパク質 (CP017758) と、*Klebsiella pneumoniae* M5a1 のMhbタンパク質 (AY648560) 及び *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 のNagタンパク質 (DQ167475) 間のアミノ酸配列を比較した。

and1 のアミノ酸配列と比べると相同性は低く (identity < 45%)、転写調節因子も MarR family であり、既知のものと異なっていた (Fig. 2-21)。したがって、*and2* 遺伝子がアントラニル酸分解に関わるかどうかは、現時点では不明である。

NH9 株は 2-, 4-HBA またはアントラニル酸を唯一のエネルギー源、炭素源として加えた平板培地において増殖を示し (Fig. 2-10)、また KEGG アノテーションより、これらの分解遺伝子が NH9 株のゲノム上に存在することがわかった (Fig. 2-7)。KEGG データベースは、文献等から集約した知識をパスウェイマップ等で表現しているため、アノテーションが付与された遺伝子は、その機能を有している可能性が非常に高い。このため NH9 株は、2-, 4-HBA 及びアントラニル酸も分解する可能性が高いと考える。

NH9株を3-CBやBA、3-HBA及びCAで培養し定常期になっても、濁度は大きく変化しなかった (Fig. 2-11)。これはおそらく、PHB合成が行われているためであると推測する。NH9株の染色体上には、H16株のPHB合成遺伝子 (*phaC₁AB₁*) とアミノ酸レベルで93%以上のidentityを有する遺伝子が存在していた (Table 3-18参照)。PHBは、栄養が不足した状況やストレス状況下において、エネルギー貯蔵物質としてアセチル-CoAから合成されることがわかっており (Chen, 2009)、アセチル-CoAはこれら芳香族化合物の分解により産生される。芳香族化合物分解が、細菌のストレス応答遺伝子の発現を上昇させることが報告されているため (Puglisi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011b)、これらの化合物がNH9株に対してストレスを与え、その結果としてPHB合成を促進させているかもしれない。

興味深いことに、NH9 株は炭素源を含まない BSM でも増殖した。このような細菌はいくつか報告されており (Inaba *et al.*, 2020; Yoshida *et al.*, 2007)、空気中の CO₂ を固定していると思われる。実際に *C. necator* H16 株や *C. necator* N-1 株は、CO₂ 固定に関する *cbb* オペロンをゲノム上に持っていることが報告されている (Poehlein *et al.*, 2011; Pohlmann *et al.*, 2006)。NH9 株のゲノム配列を調べたところ、*cbb* オペロンを有しており、そのアミノ酸配列の identity は、H16 株や N-1 株の Cbb タンパク質と 90%以上であった (Fig. 2-22)。これら遺伝子が発現しているのか、また合

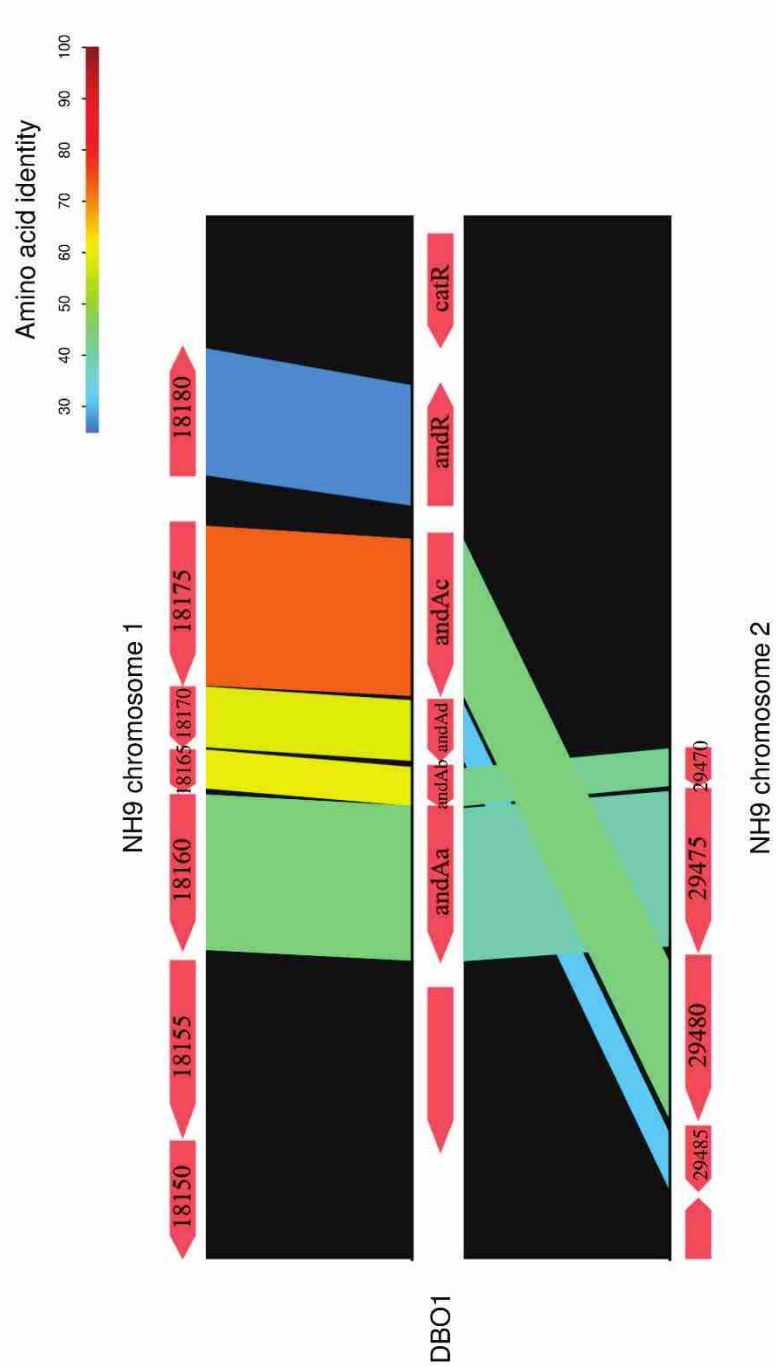


Fig. 2-21 アントラニル酸分解タンパク質の比較
GenomeMatcherのCompareSequences機能を使用し、NH9株の染色体1 (CP017757)及び2 (CP017758)上のAndタンパク質と、*Burkholderia cepacia*株 (AY223539)のAndタンパク質の配列を比較した。

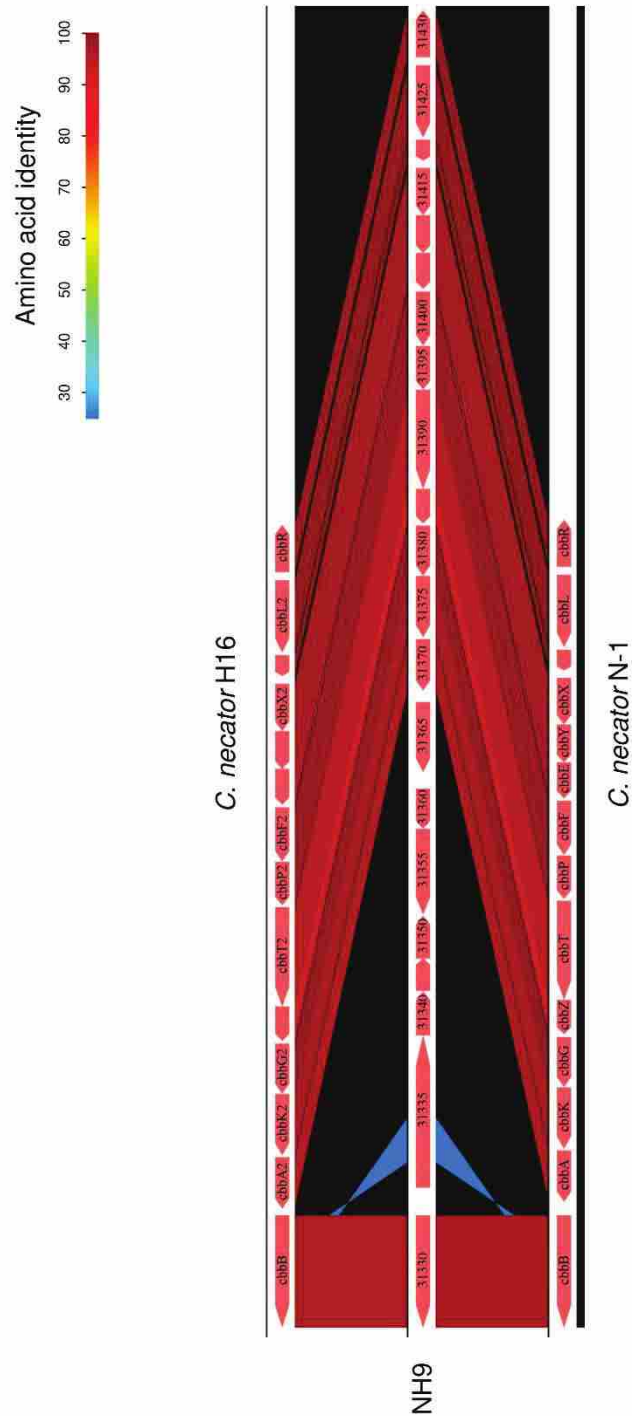


Fig. 2-22 Cbbタンパク質の比較

成されたタンパク質が機能しているのかは不明であるが、少なくとも理論的に説明可能な遺伝子を有することがわかった。

第三章

3-クロロ安息香酸及び安息香酸分解中に変動する 遺伝子及び機能の網羅的解析

3-1 諸言

第二章において、NH9 株の芳香族化合物分解遺伝子を推定した。セントラルドグマの考えに基づいた場合、次のステップとして、推定した遺伝子が発現しているかどうかを調べることは重要である。トランスクリプトーム解析は、様々な環境下における生物の遺伝子発現を網羅的に観察することが可能な手法である。芳香族化合物分解時における細菌のトランスクリプトーム解析 (DNA マイクロアレイ及び RNA-seq) については、多くの報告がある (Table 3-1)。これらの研究では、芳香族化合物分解能、細胞質内への輸送、ストレス応答、転写調節因子等に関連する発現変動遺伝子が明らかにされている。しかしこれまでの研究において、シンプルな構造の芳香族塩素化合物と、塩素原子が無いアナログ化合物間の発現変動遺伝子を確認したものは無い。また、芳香族塩素化合物を分解する *Cupriavidus* 属細菌に着目した場合、全ゲノム配列が解明されているものは NH9 株、*Cupriavidus nantongensis* X1 株 (Fang *et al.*, 2019)、*Cupriavidus oxalaticus* X32 株 (Xiang *et al.*, 2020) 及び *C. pinatubonensis* JMP134 株 (Pérez-Pantoja *et al.*, 2015) の 4 株であり、さらにトランスクリプトーム解析が行われているものは、JMP134 株のみである (Table 3-1)。

以上より、本研究においても主に上記の機能をコードする遺伝子に着目し、NH9 株の 3-CB 分解時における発現変動遺伝子を網羅的に捉えることを目的として、次世代シーケンサーを使用したトランスクリプトーム解析を行った。比較実験区として、コントロールの CA 区だけでなく、塩素原子が無い BA 区も用意し、より NH9 株の 3-CB 分解の特徴を見出すことを目的とした。さらに遺伝子の変動だけでなく、エンリッチされる機能の違いも調べた。

Table 3-1 芳香族化合物を使用した細菌のトランスクリプトーム解析に関する研究

Strain	Substrate	Reference
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	Hydroxylated PCBs, methoxylated PCBs, PCBs	Sun <i>et al.</i> , 2018
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	4-hydroxybenzoate, protocatechuate, vanillate, vanillin	Ito <i>et al.</i> , 2006
<i>Comamonas testosteroni</i> WDL7	3-chloroaniline	Wu <i>et al.</i> , 2016
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	Dennis <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycobacterium</i> sp. A1-PYR	Phenanthrene, pyrene	Yuan <i>et al.</i> , 2018
<i>Novosphingobium</i> sp. LH128	Phenanthrene	Fida <i>et al.</i> , 2017
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> LB400	Benzoate, biphenyl, PCBs, phenylacetate	Denef <i>et al.</i> , 2004, 2006; Parnell <i>et al.</i> , 2006; Patrauchan <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	3-chlorobenzoate, carbazole	Miyakoshi <i>et al.</i> , 2007; Miyazaki <i>et al.</i> , 2018; Wang <i>et al.</i> , 2011b
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24	Biphenyl, PCBs	Puglisi <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Benzoate, biphenyl, ethylbenzene, phthalate, terephthalate	Goncalves <i>et al.</i> , 2006; Hara <i>et al.</i> , 2007; Iino <i>et al.</i> , 2012
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Indole-3-acetic acid	Imperluni <i>et al.</i> , 2009
<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1	Carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazine, paraquat, pentachlorophenol, toluene	Flood and Copley, 2018

PCBs, polychlorinated biphenyls.

3-2 材料及び方法

3-2-1 培地及び培養条件

使用した機器、培地及び培養条件は、特に断りのない限り第二章に準じた。

3-2-2 Total RNA 調製のための菌体の回収

菌体の回収は RNeasy Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) を用い、操作は下記の通り行った。

操作

- ① CA、BA、3-CB、3-HBA を使用して、30°C、120 rpm の条件で NH9 株を培養した。
- ② 対数増殖中期と考えられる濁度 ($OD_{600} = 0.2 - 0.5$) になった時点で、15 ml の菌体を 50 ml 容遠心チューブに複数本回収し、 $10,000 \times g$ で 5 分、4°C で遠心した。
- ③ 上清を捨てた後、1 ml の MilliQ 水を加えてペレットを懸濁し、2 倍量の RNeasy Protect Bacteria Reagent を加えて、すぐに vortex で 5 秒間混合した。
- ④ 室温で 5 分間インキュベートした後、 $8,000 \times g$ で 10 分間、室温で遠心した。
- ⑤ 上清を捨てた後、ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去した。
- ⑥ 遠心チューブを -80°C で保存した。なお保存期間は最大 4 週間とした。

3-2-3 Total RNA の調製

Total RNA の調製には RNeasy Mini Kit (QIAGEN) または NucleoSpin RNA Plus (TaKaRa) を用い、操作は下記の通り行った。遠心操作は全て室温で行った。また下線部は、より純度を上げるためにマニュアルから変更した部分である。

操作 (RNeasy Mini Kit を用いた場合)

- ① 15 mg/ml のリゾチームを含んだ TE buffer (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) 100 μ l に、15 μ l の QIAGEN Proteinase K を添加し、この混合液 115 μ l を室温に戻した回収菌体ペレットに添加した。ピペッティング操作により、ペレットを慎重に再懸濁した。
- ② Vortex で 10 秒間懸濁し、その後 37°C で 10 分間インキュベートした。この時、少なくとも 2 分毎に 10 秒間 vortex により混合した。
- ③ 懸濁液を 1.5 ml チューブに移し、350 μ l の Buffer RLT (β -メルカプトエタノールを含む) を添加して、vortex により 1 分間激しく混合した。
- ④ 最高速度で 2 分間遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブに移した。
- ⑤ 250 μ l の 100%エタノールを添加し、ピペッティング操作により懸濁した。
- ⑥ 沈殿を含む溶解液 (最大) 700 μ l を、2 ml のコレクションチューブにセットした RNeasy スピンカラムにアプライした。
- ⑦ チューブのフタを静かに閉めて、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心し、フロースルーを捨てた。
- ⑧ 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy Mini スピンカラムにアプライし、チューブのフタを静かに閉めて 8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心した。
- ⑨ カラムがフロースルーに触れないように、コレクションチューブから慎重にカラムを取り除き、コレクションチューブを捨てた。
- ⑩ 新しいコレクションチューブを用意し、500 μ l の Buffer RPE をカラムに添加した。
- ⑪ チューブのフタを静かに閉めて、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心し、フロースルーを捨てた。
- ⑫ 500 μ l の Buffer RPE をカラムに添加し、チューブのフタを静かに閉めて、8,000 $\times g$ 以上で 15 秒間遠心後、フロースルーを捨てた。
- ⑬ エタノールが完全に乾くように、8,000 $\times g$ 以上で 2 分間遠心した。
- ⑭ カラムがフロースルーに触れないように、コレクションチューブから慎重にカラムを取り除いた。コレクションチューブは捨てた。
- ⑮ カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、フタを開けて最大速度で 2 分間遠心した。

- ⑩ カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、25 μ l の RNase-free 水をメンブレンに直接添加した。
- ⑪ 1 分間インキュベーションし、フタを静かに閉めて 8,000 $\times$ g 以上で 1 分間遠心した。
- ⑫ ⑩及び⑪の操作をもう一度繰り返し、最終的に 1 サンプルあたり 50 μ l の Total RNA を抽出した。

操作 (NucleoSpin RNA Plus を用いた場合)

- ① 15 mg/ml のリゾチームを含んだ TE buffer (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) 100 μ l を、室温に戻した回収菌体ペレットに添加した。ピペッティング操作により、ペレットを慎重に再懸濁した。
- ② Vortex で 10 秒間懸濁し、その後 37°C で 10 分間インキュベートした。この時、少なくとも 2 分毎に 10 秒間 vortex により混合した。
- ③ 350 μ l の Buffer LBP を添加し、10 秒間 vortex により混合した。
- ④ 最高速度で 2 分間遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブに移した。
- ⑤ 2 ml のコレクションチューブに、NucleoSpin gDNA Removal Column をセットした。
- ⑥ 上清をカラムに加え、11,000 $\times$ g で 30 秒遠心し、カラムを捨てた。
- ⑦ 130 μ l の Binding Solution BS をフロースルーに加え、数回ピペッティングを行って混合した。
- ⑧ NucleoSpin RNA Plus カラムに、450 μ l のライセートに移し、11,000 $\times$ g で 15 秒遠心し、フロースルーを捨てた。
- ⑨ 200 μ l の Buffer WB1 をカラムに加え、11,000 $\times$ g で 15 秒遠心した。
- ⑩ コレクションチューブごとフロースルーを捨て、新しい 2 ml コレクションチューブにカラムをセットした。
- ⑪ 600 μ l の Buffer WB2 をカラムに加え、11,000 $\times$ g で 15 秒遠心し、フロースルーを捨てた。

- ⑫ 250 μ l の Buffer WB2 をカラムに加え、11,000 $\times g$ で 15 秒遠心し、フロースルーを捨てた。
- ⑬ 11,000 $\times g$ で 2 分遠心し、その後 1.5 ml コレクションチューブにカラムをセットした。
- ⑭ 30 μ l のフリー水をメンブレンに添加し、1 分後、11,000 $\times g$ で 1 分遠心した。
- ⑮ ⑭の操作をもう一度繰り返し、最終的に 1 サンプルあたり 60 μ l のゲノム DNA 除去済みの Total RNA を抽出した。

3-2-4 Total RNA からのゲノム DNA の除去

RNeasy Mini Kit から抽出した Total RNA は、TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、ゲノム DNA を除去した。操作は下記の通り行った。

操作

- ① Total RNA サンプルを、10 μ g/50 μ l (=200 ng/ μ l) に希釈した。
- ② 0.1 倍量の 10 $\times$ TURBO DNase Buffer と、0.5 μ l の TURBO DNase を添加し、ピペッティング操作により穏やかに混合した。
- ③ 37°C で 30 分間インキュベートし、0.5 μ l の TURBO DNase を添加後、さらに 30 分間インキュベートした。
- ④ 0.1 倍量（少なくとも 2 μ l 以上）の DNase Inactivation Reagent を添加し、ピペッティング操作により混合した。
- ⑤ 室温で 5 分間インキュベートした。この時、30 秒に 1 回の頻度で、指ではじいて軽く混合した。
- ⑥ 10,000 $\times g$ で 90 秒間遠心し、沈殿物を吸わないように注意しながら上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。

3-2-5 Total RNA の再精製

TURBO DNA-free Kit を用いてゲノム DNA 除去処理を行った Total RNA サンプルは、RNeasy Mini Kit を使用して再精製を行った。操作は下記の通り行った。また下線部は、より純度を上げるためにマニュアルから変更した部分である。

操作

- ① 100 μ l の DNase 処理済み Total RNA に、350 μ l の Buffer RLT を添加してよく混合した。
- ② 250 μ l の 100%エタノールを添加し、ピペッティング操作によりよく混合した。
- ③ サンプル 700 μ l を RNeasy Mini スピンカラムにアプライした。フタを静かに閉めて、8,000 $\times$ g 以上で 15 秒間遠心した。
- ④ 遠心後、カラムがフロースルーに触れないように、コレクションチューブから慎重にカラムを取り除いた。コレクションチューブは捨てた。
- ⑤ 以降は、3-2-3 Total RNA の調製の操作⑩-⑱と同様の操作を行った。

3-2-6 Total RNA の定量

インフィニット N200 または Varioskan LUX マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を使用して吸光度を測定し、 A_{260}/A_{280} 比と A_{260}/A_{230} 比を算出した。また Qubit RNA HS アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用し、蛍光色素を用いた定量も行った。操作は添付の説明書に従って行った。

3-2-7 Total RNA の電気泳動

ホルムアルデヒドアガロース電気泳動により、Total RNA を泳動した。1 倍量の 5 $\times$ RNA loading bufer と 4 倍量の RNA サンプルを混合し、3-5 分間 65 $^{\circ}$ C でインキュベートした。氷冷後、ミューピッド小型電気泳動槽 (ミューピッド) を用いて 100 V で泳動した。泳動に使用した 10 $\times$ FA

(ホルムアルデヒド) gel buffer、アガロースゲル、1×FA gel running buffer 及び 5×RNA loading buffer の組成をそれぞれ Table 3-2、3-3、3-4、3-5 に示した。

3-2-8 バイオアナライザによる Total RNA の確認

2100 Bioanalyzer を使用して、調製した Total RNA の総合的な品質を確認した。チップは、Agilent RNA6000 ナノキットを使用した。操作は添付の説明書に従って行った。

3-2-9 Total RNA からの rRNA の除去

Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Gram-Negative Bacteria) (Illumina) を使用して Total RNA から rRNA を除去し、その後 RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を使用して精製した。Ribo-Zero rRNA Removal Kit には、5 µg の Total RNA を供試した。操作は添付の説明書に従って行った。

3-2-10 MiSeq に供試するためのライブラリ調製

MiSeq に供試するための mRNA ライブラリは、KAPA Stranded mRNA-Seq Library Preparation Kit (日本ジェネティクス) を使用して調製した。50 ng の rRNA 除去済み RNA をライブラリ調製に使用し、断片化反応は 94°C で 6 分、Index の濃度は 500 nM、PCR サイクル数は 11 とした。操作は添付の説明書に従って行ったが、最初のステップの mRNA 回収作業 (mRNA capture protocol) については、省略した。

3-2-11 作製したライブラリの評価

Bioanalyzer のチップは、Agilent DNA1000 キットを使用した。その他の評価方法や使用したキット等は、特に断りのない限り第二章に準じた。

Table 3-2 10×FA gel bufferの組成

MOPS	200 mM
Sodium acetate	50 mM
EDTA	10 mM
pH to 7.0 with NaOH.	

Table 3-3 アガロースゲルの組成

Agarose	1.2 g
10×FA gel buffer	10 ml
RNase-free water	90 ml
37% Formaldehyde	1.8 ml

Table 3-4 1×FA gel running bufferの組成

10×FA gel buffer	35 ml
37% Formaldehyde	7 ml
RNase-free water	308 ml

Table 3-5 5×RNA loading bufferの組成

Saturated aqueous bromophenol blue solution	16 µl
500 mM EDTA (pH 8.0)	8 µl
37% Formaldehyde	72 µl
100% Glycerol	200 µl
Formamide	304 µl
10×FA gel buffer	400 µl

3-2-12 MiSeq による RNA シーケンス解析

作製したライブラリを使用して、静岡大学グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム機能解析部の MiSeq により、シーケンス解析を行った。シーケンスキットは、MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycles) を使用し、paired-end 法によりシーケンス解析を実施した。

3-2-13 リードデータのマッピング、カウントと遺伝子発現差解析

Trimmomatic (version 0.36) ソフトウェアを使用して、生リードデータのアダプター配列、最後の 76 塩基目の配列、低クオリティリード (quality score < 15) 及び 50 bp 以下のリードを除去し、high quality reads を取得した。次に HISAT2 (version 2.1.0) (Kim *et al.*, 2015)を使用して、NH9 株の完全ゲノム配列 (CP017757–CP017760) に high quality reads をマッピングした。使用したオプションは、“--dta”、“--rna-strandness RF”とした。その後、StringTie (version 1.3.5) (Pertea *et al.*, 2015)を使用して、マッピングされたリードをカウントし、TPM (transcripts per million) 値を算出した。この時、ストランドオプション “--rf”を使用した。prepDE.py スクリプト (<http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/dl/prepDE.py>) を使用して、遺伝子発現差解析に使用するためのリードカウントデータを出力した。遺伝子発現差解析には edgeR (version 3.24.3) (Robinson *et al.*, 2010)を使用し、log fold-change (logFC) > 2 または < -2、かつ false discovery rate (FDR) < 0.05 を満たす遺伝子を、有意に変動した遺伝子 (DEGs: differentially expressed genes) とした。

3-2-14 逆転写 PCR

PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa) を使用して逆転写 PCR を行い、cDNA を合成した。抽出した Total RNA 1 µg 使用し、また逆転写反応は、(30°C で 10 分、42°C で 30 分、95°C で 5 分) の条件で行った。合成された cDNA は、Qubit dsDNA HS アッセイキットを使用して定量した。cDNA 合成後の PCR 反応組成及び反応条件を Table 3-6 及び Table 3-7 に示し、cDNA は 10 ng となるように供試した。それ以外の操作は、添付の説明書に従って行った。

Table 3-6 PCR反応組成

10×PCR Buffer II	2.5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Primer F (10 μM)	1 μl
Primer R (10 μM)	1 μl
Ex Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
cDNA template	x μl
H ₂ O	y μl
	25 μl

※x + y = 19.25 μl

Table 3-7 PCR反応条件

94 °C	1 min		
94 °C	30 sec	}	40 cycles
60 °C	30 sec		
72 °C	30 sec		
72 °C	10 min		

3-2-15 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR は LightCycler 480 (Roche) を用いて行い、反応試薬は PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。定量的 RT-PCR の反応組成及び反応条件を Table 3-8 及び Table 3-9 に示した。解析対象の遺伝子ごとにプライマーを設計し、また融解曲線分析によりプライマーの特異性を評価した。標的配列の検出に用いたプライマーセットを、Table 3-10 に示した。内部コントロールにはハウスキーピング遺伝子の *gyrB* を使用し、転写レベルは実際の PCR 効率を考慮して計算した。全ての実験区において、3 連で行った。

3-2-16 Gene ontology (GO) エンリッチメント解析

hmmscan (<http://hmmer.org/>) を用いて、Pfam データベース (release 32.0) (Mitchell *et al.*, 2015) に対し、NH9 株の全タンパク質のアノテーションを行った。Pfam ID から GO term (Ashburner *et al.*, 2000) への変換には、pfam2go 変換テーブル (<http://current.geneontology.org/ontology/external2go/pfam2go>) を使用した。変動した遺伝子セットと機能は Parametric analysis of genes set enrichment (PAGE) 法 (Kim and Volsky, 2005) により検出し、FDR < 0.05 の GO タームを統計的に有意に変動している GO とした。

3-2-17 スイミングプレートアッセイ

芳香族化合物に対する NH9 株の走化性を調べるために、スイミングプレートアッセイ (Yamamoto-Tamura *et al.*, 2015) を行った。

操作

- ① 終濃度 5 mM の CA を使用し、NH9 株を定常期初期 (OD₆₀₀ ~0.8 程度) まで培養した。
- ② 培養液 100 ml を、1,600 × g、5 分間 4°C で遠心した。
- ③ 4°C の炭素源を含まない BSM 25 ml で、2 回洗浄した。
- ④ 0.2% の寒天を加えた炭素源を含まない BSM 25 ml で、ペレットを再懸濁した。

Table 3-8 定量的RT-PCR反应组成

Primer F (2 μ M)	2 μ l
Primer R (2 μ M)	2 μ l
PowerUp SYBR Green Master Mix (2 $\times$)	5 μ l
cDNA template (1 ng/ μ l)	1 μ l
	10 μ l

Table 3-9 定量的RT-PCR反应条件

UDG activation	50 °C	2 min		
Dual-Lock DNA polymerase	95 °C	2 min		
Denature	95 °C	15 sec	}	40 cycles
Anneal/extend	60 °C	1 min		
Melting curve	95 °C	15 sec		
	60 °C	1 min		
	95 °C	Continuous		
Cooling	40 °C	30 sec		

Table 3-10 定量的RT-PCRに使用したプライマー配列

Primer	Sequence (5' → 3')	Length (mer)	Product size (bp)
NH9_gyrB_F	GCTGTCACGTGTTGTGGATA	20	160
NH9_gyrB_R	ATCATTAACAGCCGCCCCAA	20	
NH9_mhbM_F	AGCAAGACCCAAAACGCGAC	20	270
NH9_mhbM_R	CACGATCACCTGTGTGTCGA	20	
NH9_mhbD_F	CGGCCTATTACGAACAGATC	20	106
NH9_mhbD_R	CAGATGGCAGGAACGATCTG	20	
NH9_mhbH_F	TACGTCTTTACGCCCCCAGC	20	239
NH9_mhbH_R	TAGTGGTAGTTCTGCGTCTG	20	
NH9_mhbI_F	AGAAGGACGCGTGGTATCGC	20	94
NH9_mhbI_R	CCAAAGCACCACTTGCCATG	20	

- ⑤ 5 ml の菌懸濁液を、直径 60 mm のプラスチックシャーレ (Thermo Fisher Scientific) に注ぎ入れた。
- ⑥ あらかじめ滅菌しておいた 8 mm 径のペーパーディスク (ADVANTEC) に、20 μ l の 3-CB、BA、3-HBA (全て 500 mM) を滴下し、菌液を注いだシャーレの中央に置いた。ポジティブコントロールには 5% カザミノ酸溶液を用い、ネガティブコントロールには炭素源を含まない BSM を使用した。
- ⑦ 25°C に設定したインキュベーターにシャーレを静置し、走化性反応としての菌の移動円の形成を観察した。
- ⑧ 全ての試験は独立に 3 回繰り返し、再現性を確認した。

3-3 結果

3-3-1 抽出した Total RNA のクオリティ

抽出した Total RNA の吸光度測定及び定量結果を Table 3-11 に、電気泳動図を Fig. 3-1 に、バイオアナライザ泳動図を Fig. 3-2 に示した。純度は高く、また電気泳動及びバイオアナライザによる測定において 2 本の明瞭なピークが確認でき、ゲノム DNA のコンタミネーションは見られなかった。収量も以降の実験に使用するには十分であり、総じて高純度、高収量の Total RNA を取得することができた。

3-3-2 RNA シーケンス

作製した cDNA ライブラリのバイオアナライザ泳動図を、Fig. 3-3 に示した。ライブラリの鎖長は平均 359 bp であり、qPCR の結果、ライブラリの濃度は平均 19.7 nM であった。MiSeq でシーケンスを行うには、十分な質と量のライブラリを作製できた。

RNA シーケンスの結果、及び解析に使用した high quality reads データ情報を Table 3-12 に示した。各サンプルにおいて 400 万リードペア以上の high quality reads データを取得でき、また rRNA 由来のリードは、各サンプル 5%以下であった。以上より、発現差解析を行うには十分な質と量のデータを取得することができた。

3-3-3 遺伝子発現差解析

遺伝子発現差解析の前に、各サンプルにおける全遺伝子発現の類似性を調べ、各実験区の 3 連サンプル間の相関を調べた。リードカウントデータをインプットとして、多次元尺度構成法 (Multi-dimensional scaling : MDS) とデンドログラムによる解析を行った結果、各実験区の 3 連サンプルは近くに集まっていた (Fig. 3-4)。これらの結果より、3 連のサンプル間に大きな変動は見られないとわかった。

Table 3-11 抽出したTotal RNAのクオリティ

Lane Number	Sample name	O.D.260/230	O.D.260/280	Concentration ^a (ng/μl)	Volume (μl)	Total quantity (ng)
1	CA1	2.5	1.9	660	33	21,780
2	CA2	1.8	2.0	330	33	10,890
3	CA3	2.2	2.0	540	33	17,820
4	BA1	2.3	2.0	560	33	18,480
5	BA2	2.4	2.0	436	33	14,388
6	BA3	1.1	2.0	495	33	16,335
7	3-CB1	1.9	2.0	479	33	15,807
8	3-CB2	1.2	2.0	364	33	12,012
9	3-CB3	1.4	2.0	214	33	7,062

^aMeasured by Qubit.

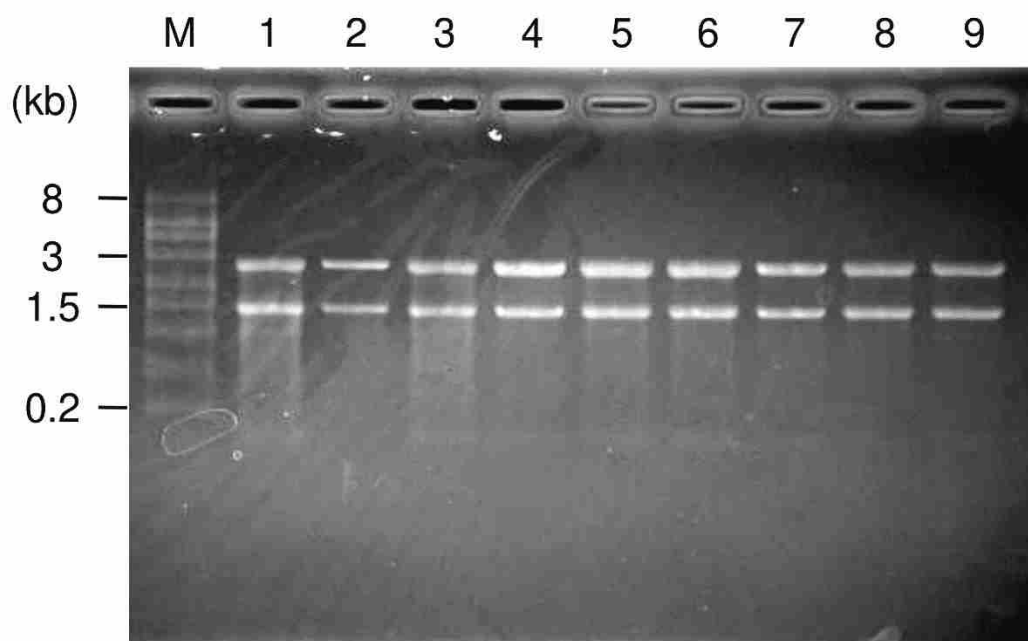


Fig. 3-1 抽出したTotal RNAの電気泳動図
 各サンプル3 μ lアプライした。電気泳動は、100 Vで30分行った。
 アガロースの濃度は1.2%であった。マーカー (M)は、RNA High
 Ladder Marker (BioDynamics)を使用した。1.クエン酸-1, 2. ク
 エン酸-2, 3. クエン酸-3, 4. BA-1, 5. BA-2, 6. BA-3, 7. 3-CB-1, 8.
 3-CB-2, 9. 3-CB-3.

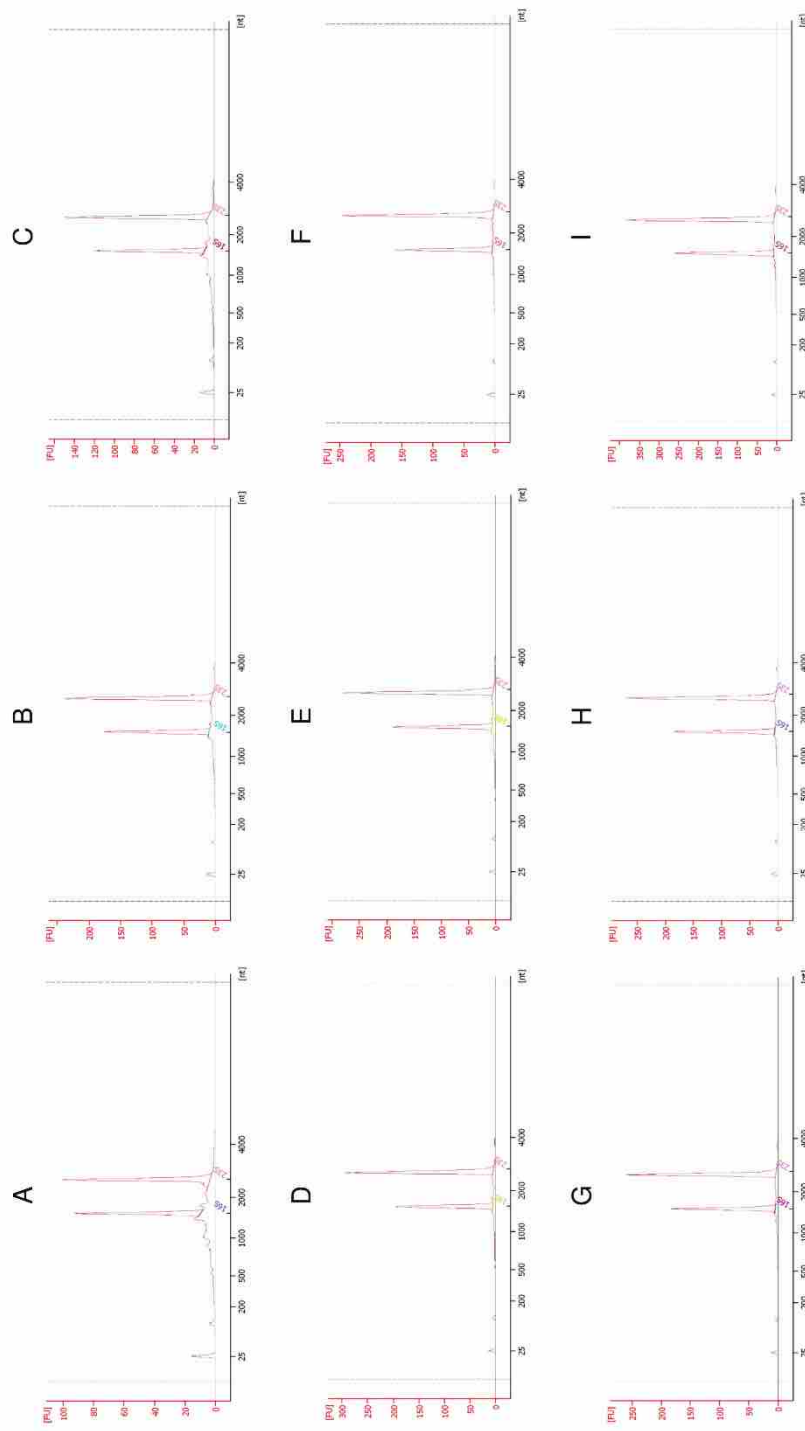


Fig. 3-2 Total RNAのバイオアナライザ測定結果
 (A) CA-1, (B) CA-2, (C) CA-3, (D) BA-1, (E) BA-2, (F) BA-3, (G) 3-CB-1, (H) 3-CB-2, (I) 3-CB-3.
 横軸は長さ、縦軸はシグナル強度を示す。各サンプルで縦軸の範囲が異なることに注意。

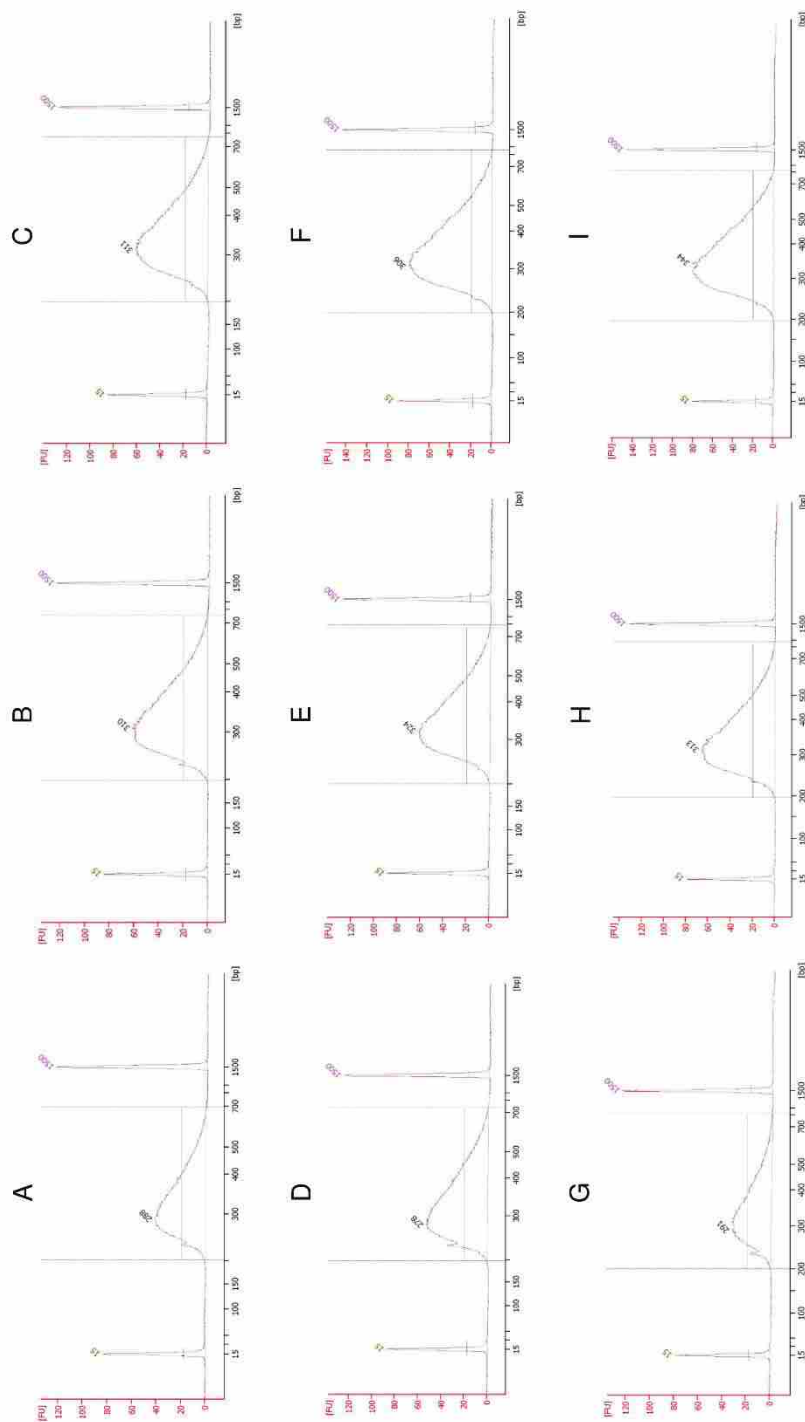


Fig. 3-3 cDNAライブラリのバイオアナライザ測定結果
 (A) CA-1, (B) CA-2, (C) CA-3, (D) BA-1, (E) BA-2, (F) BA-3, (G) 3-CB-1, (H) 3-CB-2, (I) 3-CB-3.
 横軸は長さ、縦軸はシグナル強度を示す。各サンプルで縦軸の範囲が異なることに注意。

Table 3-12 RNAシーケンスの結果

Substrate	Replicate	Total numbers of raw reads ^a	Total numbers of filtered reads ^a	Total bases of filtered reads ^a (bp)	Average read coverage ^b	Total numbers of mapped reads ^a	Total numbers of rRNA reads ^a	Accession number
CA	1	4,278,198	4,215,380	315,422,818	38.2	4,179,859 (99.2%)	103,433 (2.5%)	DRR232377
	2	4,469,226	4,393,456	328,723,313	39.9	4,341,530 (98.8%)	157,478 (3.6%)	DRR232378
	3	4,240,250	4,172,854	312,306,760	37.9	4,141,094 (99.2%)	68,860 (1.7%)	DRR232379
BA	1	4,726,910	4,657,486	348,453,632	42.3	4,622,278 (99.2%)	181,549 (3.9%)	DRR232380
	2	4,494,100	4,435,928	332,010,152	40.3	4,407,455 (99.4%)	65,971 (1.5%)	DRR232381
	3	4,533,626	4,450,798	333,099,568	40.4	4,412,173 (99.1%)	97,939 (2.2%)	DRR232382
3-CB	1	4,470,112	4,396,122	328,961,687	39.9	4,366,446 (99.3%)	196,339 (4.5%)	DRR232374
	2	4,477,266	4,409,332	329,953,800	40.0	4,381,299 (99.4%)	161,452 (3.7%)	DRR232375
	3	4,587,986	4,519,530	338,284,464	41.0	4,483,673 (99.2%)	109,326 (2.4%)	DRR232376

^aPaired-end reads.^bCalculated from total bases of filtered reads (bp) / genome size of strain NH9 (8,246,935 bp).

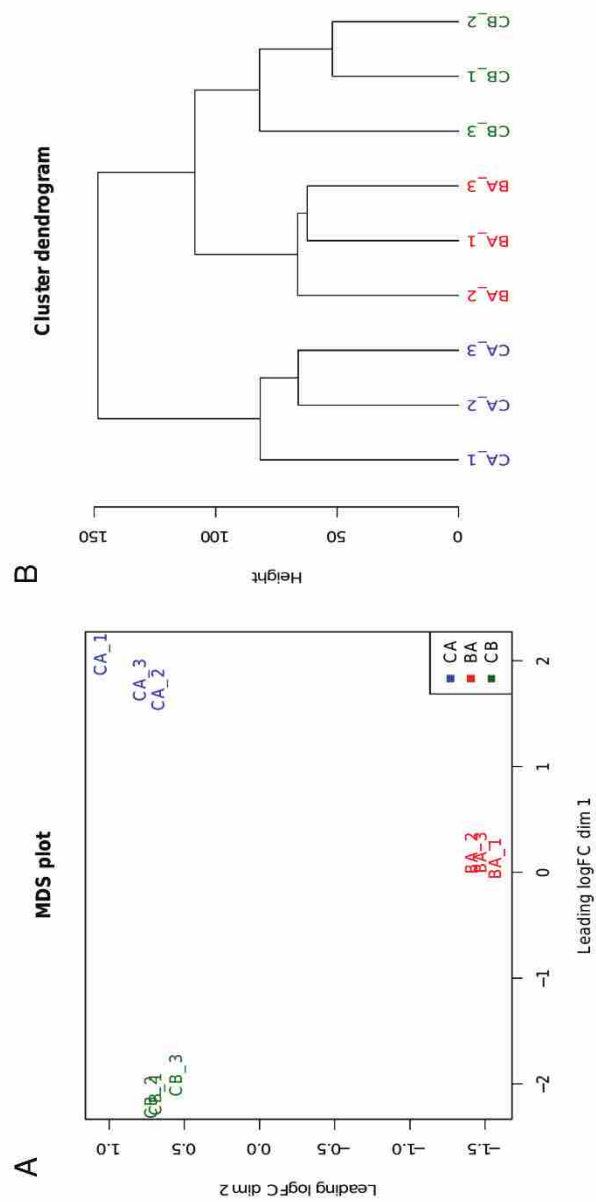


Fig. 3-4 遺伝子発現プロファイリングの相関の評価
 (A) リードカウントデータを使用した多次元尺度構成法 (Multi-dimensional scaling plot: MDS)。
 (B) Log2 counts per million (CPM) データを使用したクラスターデンドログラム。
 BAは安息香酸、CAはクエン酸、CBは3-クロロ安息香酸を示す。

遺伝子発現差解析の結果、3-CB vs. CA 比較実験区では 591 個の遺伝子が有意に変動しており、374 個が 3-CB で上方制御、217 個が下方制御されていた。この比較実験区が、最も多い DEGs を含んでいた。BA vs. CA 比較実験区では 281 個の遺伝子が有意に変動しており、228 個が BA で上方制御、53 個が下方制御されていた。さらに 3-CB vs. BA 比較実験区も解析を行い、137 個が 3-CB で上方制御、126 個が下方制御されていた。

3-3-4 芳香族化合物分解遺伝子の発現

3-CB 及び BA 分解遺伝子の発現と logFC 値を、Table 3-13 と Fig. 3-5 に示した。*benABCD* 遺伝子は、3-CB と BA による培養で高発現 (logFC 値 8.0-8.5) していた。BenABCD 酵素は 3-CB、BA と反応するため (Ogawa *et al.*, 2003)、これは妥当な結果であった。3-クロロカテコール分解遺伝子 (*cbnABCD*) は、3-CB で高発現 (logFC 値 9.4-9.9) していた。BA でも有意に発現 (logFC 値 1.3-1.5) していたが、3-CB ほどではなかった。カテコール及び 3-オキシアジピン酸分解遺伝子 (*catA*, *catB*, *catDC*, *pcaIJF*) は、3-CB と BA 間で、ほとんど同じレベルの発現であった。また epoxybenzoyl-CoA 経路による BA 分解では、*boxABCD* 遺伝子の発現が、BA において有意に上昇していた。

HBA 及びアントラニル酸分解遺伝子の発現と logFC 値を、Table 3-13 と Fig. 3-6 に示した。2-、または 4-HBA 分解遺伝子は、3-CB と BA による影響はほとんどなかった (*pobA* 遺伝子のみ、BA で高発現していた)。しかし興味深いことに、3-HBA 及びアントラニル酸分解遺伝子 (*and1* と *and2* 両方) の発現が、3-CB のみで有意に上昇していた。

NH9 株を 3-HBA で培養し、*mhb* 遺伝子群の発現を定量的 RT-PCR により解析した (Fig. 3-7)。その結果、*mhb* 遺伝子群の発現は、CA 培養区と比較して 3-HBA 培養区で有意に上昇していた。

Table 3-13 芳香族化合物分解に関わる遺伝子の発現

Compound	Replicon	Locus	Gene ^a	K number	Definition ^a	BA vs CA			3-CB vs CA			3-CB vs BA		
						LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR	LogFC ^d	FDR	LogFC ^d	FDR	FDR
3-Chlorobenzoate Benzoate	Chr. 1		<i>benA</i>	BJN34_08560	Benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit	8.1	5.6E-79	8.2	1.2E-80	0.92	9.0E-01			
			<i>benB</i>	BJN34_08565	Benzoate 1,2-dioxygenase beta subunit	8.0	5.1E-88	8.2	1.2E-91	0.20	7.2E-01			
			<i>benC</i>	BJN34_08570	Benzoate 1,2-dioxygenase reductase component	8.3	4.9E-135	8.5	6.1E-140	0.19	6.7E-01			
			<i>benD</i>	BJN34_08575	1,6-Dihydroxyvelvetoxin-2,4-diene-1-carboxylate dehydrogenase	8.4	4.4E-118	8.4	1.7E-117	-0.048	9.4E-01			
Benzoate	Chr. 1		<i>boxA</i>	BJN34_07180	Benzoyl-CoA 2,3-epoxidase subunit A	3.5	1.1E-25	1.3	2.8E-04	-2.2	2.9E-12			
			<i>boxB</i>	BJN34_07185	Benzoyl-CoA 2,3-epoxidase subunit B	4.0	1.9E-23	1.1	9.9E-03	-2.9	2.9E-14			
			<i>boxC</i>	BJN34_07190	Benzoyl-CoA-dihydrodiol lyase	2.4	2.5E-05	0.0052	9.9E-01	-2.4	2.3E-05			
			<i>bclA</i>	BJN34_07200	Benzoate-CoA ligase	1.8	5.2E-02	0.67	4.8E-01	-1.2	2.8E-01			
			<i>boxA</i>	BJN34_32090	Benzoyl-CoA 2,3-epoxidase subunit A	4.0	4.2E-23	0.56	3.3E-01	-3.5	1.1E-19			
			<i>boxB</i>	BJN34_32095	Benzoyl-CoA 2,3-epoxidase subunit B	4.4	5.2E-24	0.51	3.5E-01	-3.8	1.8E-20			
3-Chlorocatechol pENH91	Chr. 2		<i>boxC</i>	BJN34_32100	Benzoyl-CoA-dihydrodiol lyase	3.8	3.2E-13	0.49	4.5E-01	-3.3	6.5E-11			
			<i>boxD</i>	BJN34_32115	3,4-Dihydroxyphenyl-CoA semialdehyde dehydrogenase	4.9	6.9E-16	0.20	8.3E-01	-4.7	2.0E-15			
			<i>cbnA</i>	BJN34_37380	Chlorocatechol 1,2-dioxygenase	1.3	2.5E-05	9.9	7.5E-151	8.6	2.5E-126			
			<i>cbnB</i>	BJN34_37385	Chloromuconate cycloisomerase	1.5	3.4E-04	9.8	2.2E-90	8.3	2.0E-73			
			<i>cbnC</i>	BJN34_37395	Denelactone hydrolase	1.4	3.1E-05	9.5	7.4E-148	8.2	2.2E-123			
			<i>cbnD</i>	BJN34_37400	Maleylacetate reductase	1.5	2.9E-05	9.4	1.7E-122	7.9	8.9E-100			
Catechol	Chr. 1		<i>catA</i>	BJN34_08555	Catechol 1,2-dioxygenase	6.2	9.8E-80	6.0	5.8E-77	-0.18	7.3E-01			
			<i>catB</i>	BJN34_24340	Muconate cycloisomerase	6.7	1.1E-19	5.6	2.9E-15	-1.2	1.7E-01			
			<i>catD</i>	BJN34_29740	3-Oxoadipate enol-lactonase	6.0	8.8E-68	6.0	1.7E-67	-0.044	9.5E-01			
			<i>catC</i>	BJN34_29745	Muconolactone isomerase	5.9	7.7E-54	5.9	7.7E-54	-0.077	9.1E-01			
3-Oxoadipate	Chr. 2		<i>pcaI</i>	BJN34_21015	3-Oxoadipate CoA-transferase alpha subunit	4.7	3.8E-24	4.5	2.9E-23	-0.14	8.6E-01			
			<i>pcaJ</i>	BJN34_21020	3-Oxoadipate CoA-transferase beta subunit	5.3	2.7E-26	5.5	1.9E-28	0.24	7.6E-01			
			<i>pcaF</i>	BJN34_21025	3-Oxoadipyl-CoA thiolase	5.4	3.3E-36	5.9	1.8E-41	0.48	4.1E-01			
2-Hydroxybenzoate	Chr. 2		<i>nahG</i>	BJN34_24950	Salicylate hydroxylase	0.42	6.0E-01	1.1	3.3E-02	0.67	3.3E-01			
3-Hydroxybenzoate	Chr. 2		<i>nahM^e</i>	BJN34_30895	3-Hydroxybenzoate 6-monoxygenase	2.1	6.1E-03	5.3	3.5E-14	3.2	1.1E-06			
			<i>nahJ^e</i>	BJN34_30900 ^a	Maleylpyruvate isomerase	1.2	8.2E-03	4.2	9.9E-39	3.1	8.9E-26			
			<i>nahH^e</i>	BJN34_30905	Funarypyruvate hydrolase	1.3	1.8E-03	4.1	1.5E-34	2.8	3.2E-20			
			<i>nahD^e</i>	BJN34_30910	Genistate 1,2-dioxygenase	0.70	3.2E-01	2.8	1.8E-08	2.1	4.9E-05			
4-Hydroxybenzoate	Chr. 2		<i>pobA</i>	BJN34_33835	4-Hydroxybenzoate 3-monoxygenase	3.6	5.2E-12	0.75	2.1E-01	-2.9	2.0E-08			
			<i>pcaC^e</i>	BJN34_33845	4-Carboxymuconolactone decarboxylase	0.34	4.9E-01	0.99	1.5E-03	0.65	8.6E-02			
			<i>pcaB</i>	BJN34_33850	3-Carboxy- <i>cis</i> - ϵ -muconate cycloisomerase	0.089	9.0E-01	0.24	5.9E-01	0.15	8.2E-01			
			<i>pcaG</i>	BJN34_33855	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit	-0.51	5.1E-01	-0.060	9.3E-01	0.45	5.7E-01			
			<i>pcaH</i>	BJN34_33860	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	-0.62	2.8E-01	-0.043	9.4E-01	0.58	3.3E-01			
			<i>andA1</i>	BJN34_18160	Anthrillate 1,2-dioxygenase ferredoxin reductase component	-0.44	5.7E-01	3.7	3.5E-26	4.1	8.4E-32			
Anthrillate	Chr. 1		<i>andA1</i>	BJN34_18165	Anthrillate 1,2-dioxygenase ferredoxin component	-1.6	1.6E-01	3.9	1.2E-10	5.4	4.4E-16			
			<i>andA1</i>	BJN34_18170	Anthrillate 1,2-dioxygenase small subunit	-0.23	8.8E-01	4.1	6.5E-10	4.3	9.0E-11			
			<i>andA1</i>	BJN34_18175	Anthrillate 1,2-dioxygenase large subunit	-0.32	8.1E-01	4.3	5.1E-10	4.6	5.0E-11			
			<i>andA2</i>	BJN34_29470	3-Phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase ferredoxin component ^a	8.0	2.0E-20	1.4	2.2E-01	6.5	1.5E-16			
			<i>andA2</i>	BJN34_29475	3-Phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase component ^a	8.9	6.4E-44	2.2	3.9E-03	6.7	2.5E-33			
			<i>andA2</i>	BJN34_29480	Anthrillate 1,2-dioxygenase large subunit ^a	8.3	2.0E-81	1.5	9.9E-04	6.8	4.3E-65			
			<i>andA2</i>	BJN34_29485	Anthrillate 1,2-dioxygenase small subunit ^a	7.9	8.8E-47	0.96	1.7E-01	6.9	1.6E-40			

^aGene designation and definition from KEGG annotation were manually modified.^bLog fold change values calculated from BA/CA.^cLog fold change values calculated from 3-CB/CA.^dLog fold change values calculated from 3-CB/BA.

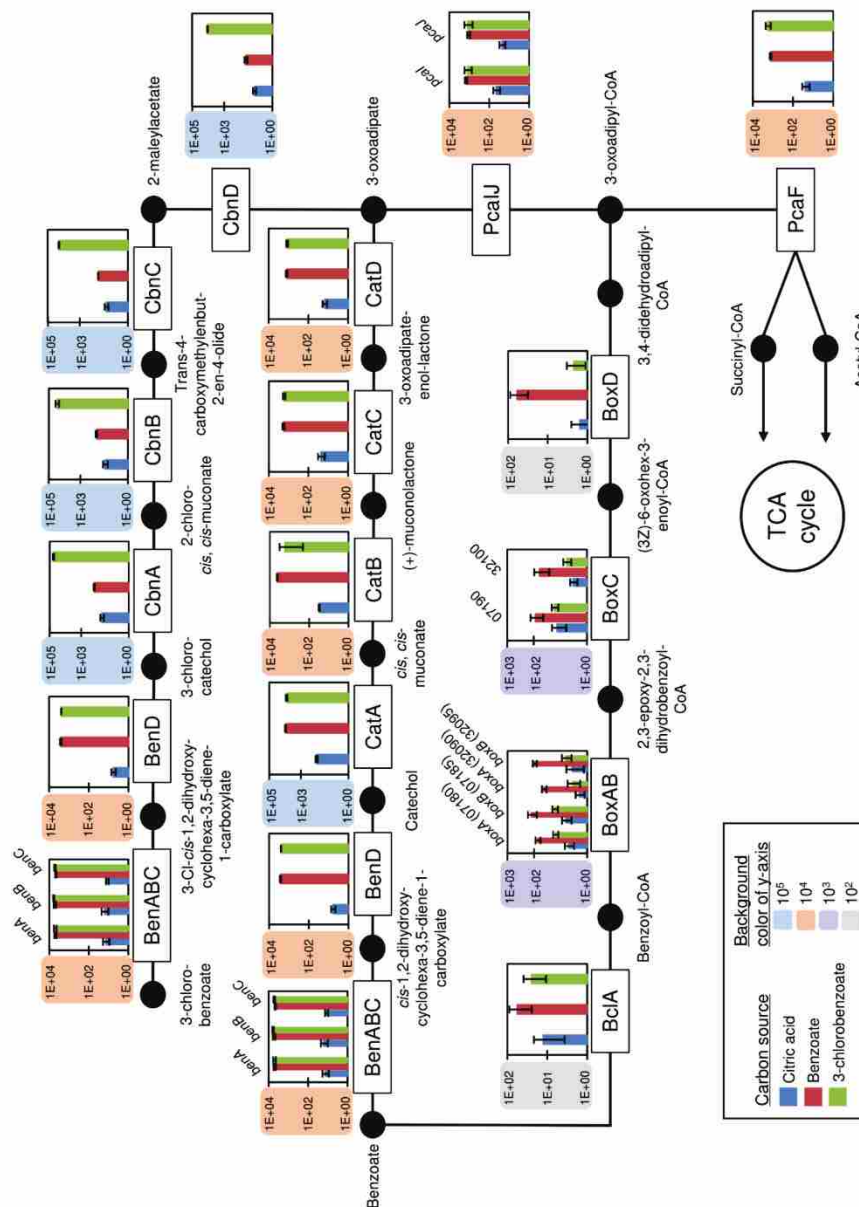


Fig. 3-5 3-CBとBAの分解に関わる遺伝子の発現
白抜きのは箱は酵素、黒い丸は化合物を示す。各遺伝子のTPM値の平均を算出し、棒グラフで示した。
各棒グラフのY軸のスケールは、4つのグループで示した: 青、10⁵; オレンジ、10⁴; 紫、10³; 灰色、10²。

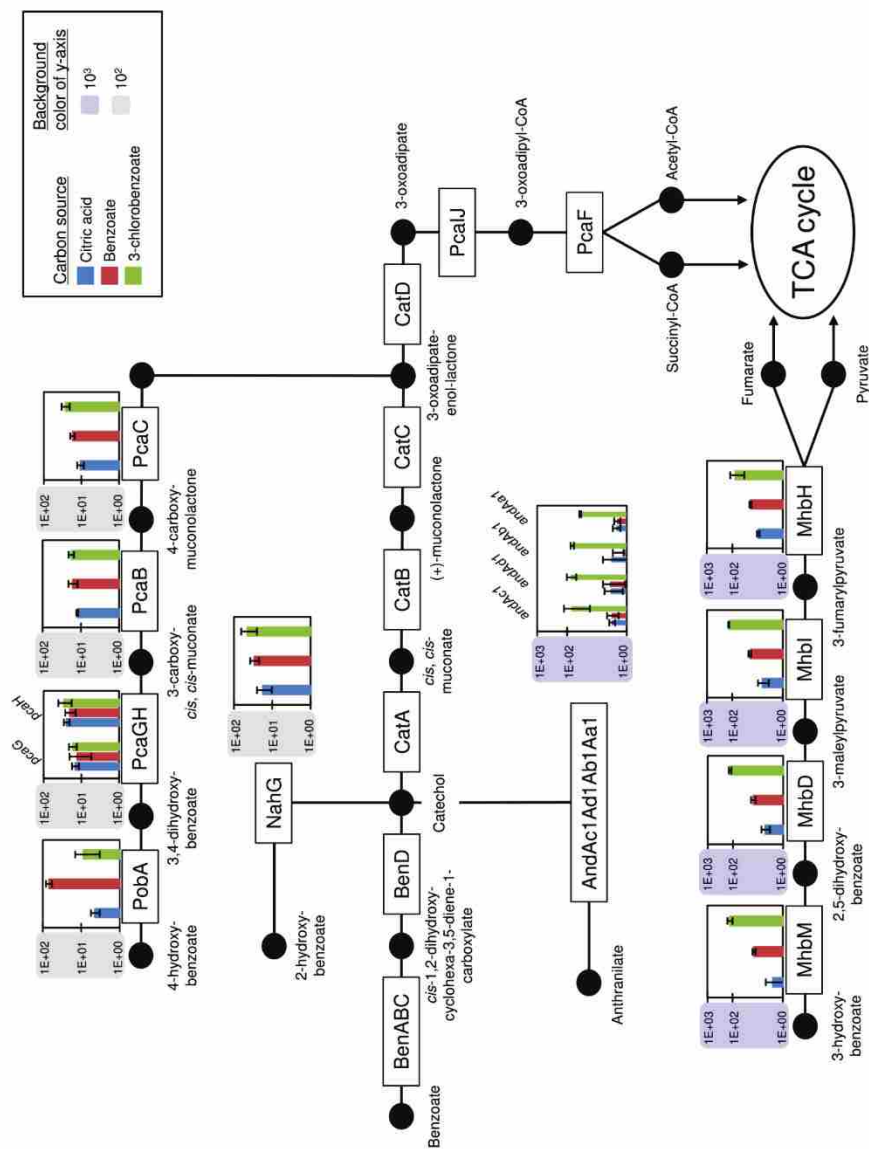


Fig. 3-6 HBAとアントラニル酸の分解に関わる遺伝子の発現
白抜きは箱は酵素、黒い丸は化合物を示す。各遺伝子のTPM値の平均を算出し、棒グラフで示した。各棒グラフのY軸のスケールは、2つのグループで示した: 紫、10³; 灰色、10²。
benABC、*catA*、*catB*、*catC*、*catD*、*pcaJ*、*pcaF*遺伝子の棒グラフは、Fig. 3-5に示した。

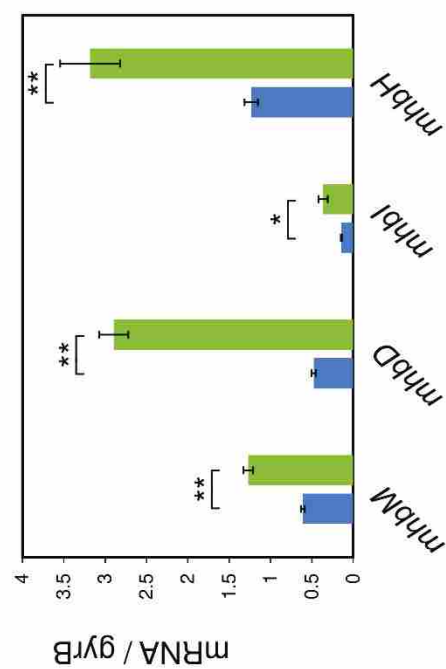


Fig. 3-7 3-HBA分解時の*mhb*遺伝子群の発現
棒グラフはそれぞれ、CA培養区（青）及び3-HBA培養区（緑）を示す。mRNA発現レベルは、*gryB*遺伝子との発現比から算出した。*と**はそれぞれ、対応のあるt検定（paired ttest）において、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ で有意差があることを示す。全ての実験は、3連で行った。

3-3-5 芳香族化合物の取り込みに関わるトランスポーターの推定

NH9 株の全タンパク質を KEGG BRITE により機能分類した結果、348 の遺伝子が輸送機能 (“Transporters”, ko02000) をコードしていることがわかった。そこで、3-CB 及び BA によって有意に上方制御されている遺伝子 ($\log FC \geq 2$ かつ $FDR < 0.05$) を抽出した結果、8 つの major facilitator superfamily (MFS) トランスポーターと、12 セットの ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターを抽出できた (Table 3-14)。

MFS トランスポーターでは、BJN34_12320、BJN34_18155、BJN34_30890 が BA と比較して 3-CB で高発現しており、BJN34_32125 は逆の結果を示した。他の 4 つの遺伝子の $\log FC$ 値は、BA vs. CA と 3-CB vs. CA 間ではほとんど変わらなかった。これらトランスポーターと、これまでに機能が実験的に証明、あるいは調べられているトランスポーター (Table 3-15) を比較するために、BLASTP 解析を行った。BJN34_18155 と BJN34_32125 の産物は BenP (3-CB トランスポーター) (Ledger *et al.*, 2009) と 70%以上の identity を示した。また BJN34_30890 と BJN34_33870 の産物はそれぞれ、MhbT (3-HBA トランスポーター) (Xu *et al.*, 2012a)、PcaK (3-HBA トランスポーター) (Harwood *et al.*, 1994; Nichols and Harwood, 1997) と 50%以上の identity を示した。次に、MFS トランスポーター間の関係を調べるために、進化解析を行った (Fig. 3-8)。

BJN34_18155 と BJN34_32125 の産物は、進化的にも BenP と近い関係であった。BJN34_30890 と BJN34_33870 の産物はそれぞれ、MhbT と PcaK に近接していた。これら 4 つのトランスポーターは、aromatic acid:H⁺ symporter (AAHS) family に属していた。3 つのトランスポーター遺伝子

(BJN34_11715、BJN34_12320、BJN34_26825) は、Anion/cation symporter (ACS) family のタンパク質と、また BJN34_20520 は Metabolite:H⁺ symporter (MHS) family のタンパク質に近い関係を示した。これらトランスポーター遺伝子における、ゲノム上の位置関係を調べたところ、

BJN34_32125、BJN34_30890、BJN34_33870、BJN34_18155 はそれぞれ、BA、3-HBA、4-HBA、アントラニル酸分解遺伝子群の隣に存在していた (Fig. 2-9)。他の MFS トランスポーターをコードする遺伝子の周囲には、芳香族化合物分解遺伝子群はなかった。

Table 3-14 BA及び3-CBで高発現したMFS及びABCトランスポーター遺伝子

Replicon	Locus	Component ^a	K number	Protein	Accession number	% Amino acid identity	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA		
							LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR	LogFC ^d	FDR	
Major facilitator superfamily (MFS)													
Aromatic acid:H ⁺ symporter (AAHS) family													
Chr.1	BJN34_18155	-	K05548	BenP	AAZ63295.1	70.4	0.12	8.9E-01	3.1	3.4E-20	2.9	4.9E-20	
	BJN34_30890	-	K08195	MhbT	AAW63412.1	52.1	0.019	9.9E-01	4.2	1.3E-20	4.1	2.6E-21	
	BJN34_32125	-	K05548	BenP	AAZ63295.1	77.2	4.5	4.4E-24	0.14	8.6E-01	-4.3	3.8E-24	
Chr.2	BJN34_33870	-	K08195	PcaK	AAA85137.1	55.1	1.3	2.0E-02	2.9	8.7E-09	1.5	6.5E-03	
Drug:H ⁺ antiporter-2 (14 spanner) (DHA2) family													
Chr.1	BJN34_11715	-	K03446	PcaK	CAG68551.1	25.8	1.8	1.5E-05	2.0	2.2E-07	0.24	7.2E-01	
	BJN34_12320	-	K19577	MhpT	APC50650.1	29.3	-0.064	9.3E-01	2.1	6.4E-11	2.1	1.3E-11	
Metabolite:H ⁺ symporter (MHS) family													
Chr.2	BJN34_20520	-	K03761	MopB	AAB41509.1	31.5	2.1	1.7E-06	2.7	2.5E-10	0.57	3.4E-01	
Cyanate porter (CP) family													
Chr.2	BJN34_26825	-	K03449	HpaX	ADT77978.1	26.8	3.2	1.6E-07	2.9	1.4E-06	-0.36	7.2E-01	
ATP-binding cassette (ABC)													
Branched-chain amino acid transporter													
Chr.1	BJN34_01710	NBD	K01995	HmgG	AAAY18213.1	40.0	2.1	5.0E-06	2.8	1.2E-11	0.74	1.2E-01	
	BJN34_01715	TMD	K01997	HmgE	AAAY18215.1	28.3	2.2	1.2E-02	2.7	5.5E-04	0.46	6.9E-01	
	BJN34_01720	TMD	K01998	HmgF	AAAY18214.1	31.4	1.5	4.3E-03	1.9	2.9E-05	0.40	5.2E-01	
	BJN34_01725	SBP	K01999	-	-	-	1.4	1.5E-04	1.9	9.6E-09	0.53	2.3E-01	
	BJN34_01730	NBD	K01996	HmgH	AAAY18212.1	44.3	1.6	1.8E-02	2.1	3.0E-04	0.49	5.6E-01	
	BJN34_07675	SBP	K01999	-	-	-	2.0	3.9E-06	1.8	1.2E-05	-0.17	8.3E-01	
	BJN34_07680	TMD	K01997	HmgE	AAAY18215.1	24.6	1.3	1.1E-02	0.51	3.2E-01	-0.75	1.9E-01	
	BJN34_07685	TMD	K01998	PcaV	CAC49878.1	24.9	1.4	3.9E-03	0.91	4.9E-02	-0.48	4.6E-01	
	BJN34_07690	NBD	K01995	PcaW	CAC49877.1	34.3	3.6	1.4E-03	0.062	9.7E-01	-3.5	2.0E-03	
	BJN34_07695	NBD	K01996	HmgH	AAAY18212.1	40.7	0.98	5.9E-02	1.0	2.4E-02	0.030	9.8E-01	
	BJN34_11495	TMD	K01998	PcaV	CAC49878.1	30.6	2.1	7.3E-08	2.7	4.2E-13	0.63	2.0E-01	
	BJN34_11500	TMD	K01997	HmgE	AAAY18215.1	29.5	2.3	7.7E-09	3.0	9.7E-15	0.72	1.6E-01	
	BJN34_11505	NBD	K01996	HmgH	AAAY18212.1	37.4	2.4	2.4E-11	3.0	2.9E-18	0.66	1.3E-01	
	BJN34_11510	NBD	K01995	PcaW	CAC49877.1	40.2	0.39	7.6E-01	0.72	3.6E-01	0.34	7.7E-01	
	BJN34_11515	SBP	K01999	PcaM	CAC49880.1	23.5	2.3	1.5E-09	3.2	1.7E-17	0.90	5.0E-02	
Chr.2	BJN34_29445	SBP	K01999	PcaM	CAC49880.1	27.7	1.5	3.8E-02	9.4	1.0E-89	7.9	6.9E-80	
	BJN34_29450	NBD	K01995	PcaW	CAC49877.1	35.8	3.8	1.4E-05	11.0	2.3E-85	7.3	1.8E-67	
	BJN34_29455	NBD	K01996	PcaX	CAC49876.1	40.3	0.91	3.8E-01	8.9	5.3E-91	8.0	4.4E-88	
	BJN34_29460	TMD	K01997	PcaN	CAC49879.1	33.3	1.5	5.6E-01	8.1	3.8E-05	6.6	1.1E-03	
	BJN34_29465	TMD	K01998	PcaV	CAC49878.1	32.4	0.47	7.3E-01	7.7	2.5E-27	7.2	8.9E-26	
	BJN34_32550	TMD	K01997	HmgE	AAAY18215.1	38.5	0.55	3.4E-01	0.56	2.3E-01	0.0051	1.0E+00	
	BJN34_32555	TMD	K01998	HmgF	AAAY18214.1	27.3	2.2	2.7E-04	2.5	5.4E-06	0.30	7.0E-01	
	BJN34_32560	NBD	K01995	HmgG	AAAY18213.1	41.9	1.5	4.6E-03	1.3	1.4E-02	-0.27	7.2E-01	
	BJN34_32565	NBD	K01996	HmgH	AAAY18212.1	45.5	2.2	2.2E-03	2.5	1.0E-04	0.29	7.4E-01	
	BJN34_32570	SBP	K01999	HmgD	AAAY18216.1	28.4	1.0	7.0E-03	1.6	1.1E-06	0.57	1.8E-01	
	NiT/TauT family transporter												
	Chr.1	BJN34_09335	SBP	K02051	-	-	-	0.40	7.0E-01	1.3	2.9E-02	0.89	2.3E-01
BJN34_09340		NBD	K02049	PatA	ABG99217.1	41.4	0.82	3.4E-01	2.3	5.1E-06	1.5	3.1E-03	
BJN34_09345		TMD	K02050	PatC	ABG99215.1	27.0	1.2	2.0E-01	2.2	8.8E-04	1.0	1.9E-01	
pENH92	BJN34_36080	SBP	K02051	-	-	-	-1.2	3.9E-01	1.2	1.9E-01	2.4	2.5E-02	
	BJN34_36095	TMD	K02050	PatB	ABG99216.1	26.9	-0.018	9.9E-01	2.5	4.6E-04	2.5	7.9E-04	
	BJN34_36100	NBD	K02049	PatA	ABG99217.1	44.1	1.8	1.2E-01	2.9	3.5E-04	1.2	1.8E-01	
Glycerol transporter													
Chr.1	BJN34_13400	SBP	K17321	-	-	-	1.4	2.3E-03	2.3	4.3E-09	0.97	4.3E-02	
	BJN34_13410	TMD	K17323	-	-	-	1.6	2.2E-03	2.0	2.3E-05	0.35	5.8E-01	
	BJN34_13415	TMD	K17322	-	-	-	1.6	3.3E-03	1.6	1.5E-03	-0.0088	9.9E-01	
	BJN34_13420	NBD	K17325	OphH	BAG45601.1	34.9	1.4	1.9E-01	2.2	1.3E-02	0.74	5.7E-01	
	BJN34_13425	NBD	K17324	PatA	ABG99217.1	30.3	1.1	6.2E-03	1.2	7.3E-04	0.11	8.6E-01	
Putative polar amino acid transporter													
Chr.1	BJN34_14830	TMD	K02029	-	-	-	-0.40	7.2E-01	2.7	4.9E-07	3.1	1.5E-08	
	BJN34_14835	TMD	K02029	-	-	-	1.2	3.1E-01	3.7	1.1E-05	2.5	5.4E-03	
	BJN34_14840	NBD	K02028	OphH	BAG45601.1	35.3	1.1	5.6E-02	2.7	1.6E-10	1.7	1.1E-04	
	BJN34_14845	SBP	K02030	-	-	-	0.70	2.2E-01	2.0	9.1E-07	1.3	3.7E-03	
ABC-2 type transporter													
Chr.2	BJN34_25255	NBD	K01990	OphH	BAG45601.1	31.9	2.3	2.5E-01	3.5	1.7E-02	1.1	4.9E-01	
	BJN34_25270	TMD	K01992	-	-	-	4.7	3.5E-02	4.8	1.2E-02	0.14	9.5E-01	
Ribose transporter													
Chr.2	BJN34_29355	NBD	K10441	HmgG	AAAY18213.1	28.3	2.0	6.6E-07	2.6	1.3E-11	0.61	2.4E-01	
	BJN34_29360	TMD	K10440	HmgE	AAAY18215.1	26.0	2.4	5.0E-07	2.6	2.6E-08	0.17	8.4E-01	
	BJN34_29365	SBP	K10439	-	-	-	2.6	3.0E-10	2.5	6.2E-10	-0.077	9.2E-01	
Other ABC transporters													
Chr.1	BJN34_11055	NBD, TMD	K02471	HmgG	AAAY18213.1	38.0	1.6	2.0E-01	2.4	1.1E-02	0.85	5.2E-01	

^aNBD, nucleotide binding domain; SBP, substrate binding protein; TMD, transmembrane domain.^bLog fold change values calculated from BA/CA.^cLog fold change values calculated from 3-CB/CA.^dLog fold change values calculated from 3-CB/BA.

Table 3-15 これまでに研究されている芳香族化合物トランスポーター

Family	Protein	Accession number	Component ^a	Strain	Substrate or putative substrate	Reference
Major facilitator superfamily (MFS)						
Aromatic acid/H ⁺ symporter (AAHS) family						
BenK ^b	CAG68298.1	-	-	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Benzoate	Collier <i>et al.</i> , 1997
BenK ^b	WP_011015098.1	-	-	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Benzoate	Wang <i>et al.</i> , 2011a
BenK ^b	WP_037061762.1	-	-	<i>Pseudomonas putida</i> CSV86	Benzoate	Choudhary <i>et al.</i> , 2017
BenP ^b	AAZ63295.1	-	-	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	3-chlorobenzoate	Ledger <i>et al.</i> , 2009
GaiI ^b	CBJ94499.1	-	-	<i>Pseudomonas putida</i> KTGAL	Gallate	Nogales <i>et al.</i> , 2011
GenK ^b	WP_011015577.1	-	-	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	2,5-dihydroxybenzoate	Xu <i>et al.</i> , 2012b
MhbT ^b	AA_W63412.1	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	3-hydroxybenzoate	Xu <i>et al.</i> , 2012a
MhpT ^b	APC50650.1	-	-	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. W3110	3-(3-hydroxyphenyl) propionate	Xu <i>et al.</i> , 2013
PeaK ^b	CAG68551.1	-	-	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	3,4-dihydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, Vanillate	D'Argenio <i>et al.</i> , 1999; Pernstich <i>et al.</i> , 2014
PeaK ^b	AA_A85137.1	-	-	<i>Pseudomonas putida</i> PRS2000	3,4-dihydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate	Harwood <i>et al.</i> , 1994; Nichols and Harwood, 1997
TidK ^b	AAZ65767.1	-	-	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	2,4-dichlorophenoxyacetate	Leveau <i>et al.</i> , 1998
Metabolic:H ⁺ symporter (MHS) family						
CouI ^c	ABG96912.1	-	-	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	<i>p</i> -coumarate, Ferulate	Otani <i>et al.</i> , 2014
MopB	AA_B41509.1	-	-	<i>Burkholderia cepacia</i> Pe701	4-methyl- <i>p</i> -phthalate, Phthalate	Saint and Romas, 1996
PhdI ^c	BAB97676.1	-	-	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	3-(4-hydroxyphenyl)-3-propionate, <i>p</i> -coumarate, Caffeate, Ferulate	Kallscheuer <i>et al.</i> , 2016
Anion/cation symporter (ACS) family						
HpaX ^b	ADT77978.1	-	-	<i>Escherichia coli</i> W	4-hydroxyphenylacetate	Prieto and Garcia, 1997
OphD ^b	BAG45577.1	-	-	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	Phthalate	Chang and Zylstra, 1999

Table 3-15の続き

Family	Protein	Accession number	Component ^a	Strain	Substrate or putative substrate	Reference
ATP-binding cassette (ABC)						
Hydrophobic amino acid uptake transporter (HAA-T) family						
	PcaM ^c	CAC49880.1	SBP	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	3,4-dihydroxybenzoate	Mackean <i>et al.</i> , 2011
	PcaN ^c	CAC49879.1	TMD			
	PcaV ^c	CAC49878.1	TMD			
	PcaW ^c	CAC49877.1	NBD			
	PcaX ^c	CAC49876.1	NBD		2,5-dihydroxyphenylacetate	Arias-Barrau <i>et al.</i> , 2005
	HmgD ^c	AAV18216.1	SBP	<i>Pseudomonas putida</i> U		
	HmgE ^c	AAV18215.1	TMD			
	HmgF ^c	AAV18214.1	TMD			
	HmgG ^c	AAV18213.1	NBD			
	HmgH ^c	AAV18212.1	NBD			
Taurine uptake transporter (TauT) family						
	OpiA ^b	BAG45603.1	SBP	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	Phthalate	Chang <i>et al.</i> , 2009
	OpiG	BAG45602.1	TMD			
	OpiH	BAG45601.1	NBD			
	PatA	ABG99217.1	NBD	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1		
	PatB ^b	ABG99216.1	TMD		Phthalate	Hara <i>et al.</i> , 2010
	PatC	ABG99215.1	TMD			
	PatD	ABG99218.1	SBP			
Benzoate/H ⁺ symporter (BenE) family						
	BenE1	AAN67649.1	-	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Benzoate	Nishikawa <i>et al.</i> , 2008
	BenE2	AAN68775.1	-			
Divalent anion/Na ⁺ symporter (DASS) family						
	GaeP ^c	CCC80015.1	-	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Gallate	Reverón <i>et al.</i> , 2017
Solute/sodium symporter (SSS) family						
	Paal ^b	AAC24338.1	-	<i>Pseudomonas putida</i> U	Phenylacetate	Olivera <i>et al.</i> , 1998
Tripartite ATP-independent periplasmic transporter (TRAP-T) family						
	FebT1 ^b	AAF16407.1	SBP	<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4-chlorobenzoate	Chae and Zytsira, 2006
	FebT2 ^b	AAF16408.1	SC			
	FebT3 ^b	AAF16409.1	LC			
	TarP	CAE27223.1	SBP	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> CGA009		
	TarQ	CAE27224.1	SC		<i>p</i> -Coumarate, Caffeate, Cinnamate, Ferulate	Salmon <i>et al.</i> , 2013
	TarM	CAE27225.1	LC			
Tripartite triarboxylate transporter (TIT) family						
	TpaA ^b	BAN66716.1	LC	<i>Comamonas</i> sp. E6	Terephthalate	Hosaka <i>et al.</i> , 2013
	TpaB ^b	BAN66715.1	SC			
	TpaCII	BAE47084.1	SBP			

^aLC, large component; NBD, nucleotide binding domain; SBP, substrate binding protein; SC, small component; TMD, transmembrane domain.

^bThe function of transporters was experimentally verified by uptake assays with radiolabeled substrates, biosensors or reconstituted proteoliposomes.

^cThe function of transporters was experimentally examined by genetic disruption/complementation.

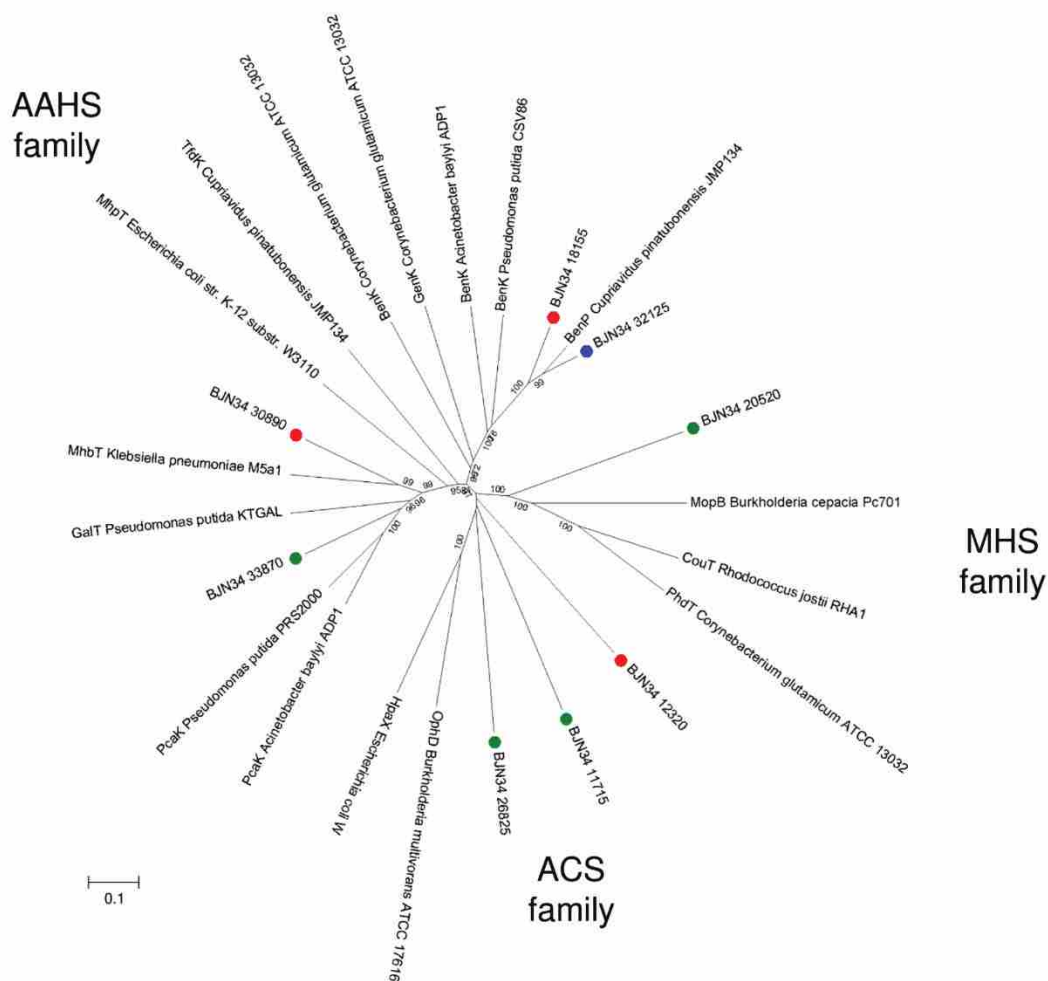


Fig. 3-8 MFSトランスポーターの進化解析

Neighbor-joining法により、解析を行った。NH9株において3-CB特異的、BA特異的、共通に発現したMFSトランスポーター遺伝子をそれぞれ赤、青、緑の丸で示した。AAHS familyは、BenK (*Acinetobacter baylyi* ADP1)、BenK (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032)、BenK (*Pseudomonas putida* CSV86)、BenP (*Cupriavidus pinatubonensis* JMP134)、GalT (*P. putida* KTGAL)、GenK (*C. glutamicum* ATCC 13032)、MhbT (*Klebsiella pneumoniae* M5a1)、MhpT (*Escherichia coli* K-12 substr. W3110)、PcaK (*A. baylyi* ADP1)、PcaK (*P. putida* PRS2000)、TfdK (*C. pinatubonensis* JMP134)を含む。ACS familyは、HpaX (*E. coli* W)とOphD (*Burkholderia multivorans* ATCC 17616)を含む。MHS familyは、CouT (*Rhodococcus jostii* RHA1)、MopB (*Burkholderia cepacia* Pc701)、PhdT (*C. glutamicum* ATCC 13032)を含む。解析に使用したタンパク質の詳細は、Table 3-15に記載した。

3-CB と BA は、ABC トランスポーターをコードする多くの遺伝子の発現を誘導した (Table 3-14)。ほとんどの ABC トランスポーター遺伝子の logFC 値は、BA vs. CA と 3-CB vs. CA 間において、大きく変わらなかった。しかし、BJN34_29445-BJN34_29465 クラスターの遺伝子発現は、3-CB で大きく上昇 (logFC 値 7.7-11.0) しており、NH9 株において、3-CB 特異的に誘導された遺伝子であることを示唆する。これらのアミノ酸配列は、3,4-ジヒドロキシ安息香酸の輸送に関わる Pca (MacLean *et al.*, 2011) と 27.7-40.3% の identity を示した。

BLSATP 解析より、他の family のトランスポーター遺伝子も探し、発現を調べた (Table 3-16)。いくつかの遺伝子 (BJN34_08680 や BJN34_26835) は 3-CB と BA により有意に上昇していたが、ほとんどの遺伝子は、大きく変動しなかった、あるいは下方制御されていた。

3-3-6 ストレス応答遺伝子の発現

3-CB 及び BA により、上方制御されたストレス応答遺伝子を調べた (Table 3-17)。分子シャペロンをコードする 4 つの遺伝子、*dnaK* (BJN34_09490)、*groEL* (BJN34_09495)、*groES* (BJN34_09500)、*clpB* (BJN34_11475) が、3-CB と BA で 2 倍以上発現した。*hslV* (BJN34_00915)、*hslU* (BJN34_00920)、*grpE* (BJN34_06000)、*dnaK* (BJN34_16500) は、BA のみで有意に発現した。これまでの研究において、45 mM の BA に対する *Pseudomonas putida* KT2440 株のストレス応答が DNA マイクロアレイによって調べられており、いくつかの遺伝子がストレス応答遺伝子として同定された (Reva *et al.*, 2006)。そこで、NH9 株においてもそれらの遺伝子を KEGG データベースより探索し、Table 3-17 にまとめた (Benzoate stress response genes の項目)。期待とは逆に、調べた多くの遺伝子は下方制御されていた。しかし、リン酸トランスポーター PstBACS (BJN34_13095-BJN34_13110) と superoxide oxidase (SOO) (BJN34_16665) がそれぞれ、3-CB と BA で上方制御されていた。

Table 3-16 MFS及びABCトランスポーター以外のトランスポーター遺伝子の発現

Replicon	Locus	Component ^a	Protein	Accession number	% Amino acid identity	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA	
						LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR	LogFC ^d	FDR
Benzoate/H ⁺ symporter (BenE) family											
Chr.1	BJN34_14300	-	BenE2	AAN68775.1	47.1	-0.26	6.0E-01	-0.26	4.8E-01	0.00093	1.0E+00
Divalent anion/Na ⁺ symporter (DASS) family											
Chr.1	BJN34_03715	-	GacP	CCC80015.1	20.9	-0.15	8.5E-01	-1.4	7.1E-04	-1.2	8.9E-03
Solute/sodium symporter (SSS) family											
Chr.1	BJN34_08680	-	PaaL	AAC24338.1	65.1	3.2	3.0E-16	3.1	1.5E-15	-0.11	8.9E-01
	BJN34_13555	-			32.6	0.32	5.2E-01	0.32	4.0E-01	-0.0016	1.0E+00
Chr.2	BJN34_22225	-			60.4	1.8	2.0E-02	1.4	4.8E-02	-0.35	7.2E-01
	BJN34_26835	-			24.1	2.4	7.0E-03	2.6	9.5E-04	0.26	8.6E-01
	BJN34_29130	-			64.3	-2.2	6.1E-02	-1.3	2.1E-01	0.87	5.8E-01
	BJN34_32040	-			77.9	0.37	8.2E-01	-1.9	6.2E-02	-2.3	4.8E-02
Tripartite A TP-independent periplasmic transporter (TRAP-T) family											
Chr.1	BJN34_06770	SC	TarQ	CAE27224.1	16.7	0.27	6.5E-01	-0.20	6.7E-01	-0.47	3.6E-01
	BJN34_06775	LC	TarM	CAE27225.1	29.3	-0.23	6.6E-01	-0.30	4.0E-01	-0.075	9.0E-01
	BJN34_06780	SBP	TarP	CAE27223.1	23.0	-0.44	2.7E-01	-0.74	1.6E-02	-0.30	5.2E-01
Chr.2	BJN34_30790	SBP	FcbT1	AAF16407.1	22.3	-0.63	2.3E-01	-0.59	1.8E-01	0.040	9.6E-01
	BJN34_30795	SC	FcbT2	AAF16408.1	17.1	-1.2	2.3E-01	-0.73	3.8E-01	0.44	7.3E-01
	BJN34_30800	LC	FcbT3	AAF16409.1	30.9	-0.62	4.1E-01	-1.5	4.4E-03	-0.92	2.0E-01
Tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family											
Chr.1	BJN34_14920	SBP	TphCII	BAE47084.1	33.9	-0.27	5.2E-01	-0.30	3.2E-01	-0.038	9.5E-01
	BJN34_14930	SC	TpiB	BAN66715.1	41.0	2.5	6.5E-05	0.69	3.2E-01	-1.8	6.4E-03
	BJN34_14935	LC	TpiA	BAN66716.1	76.1	1.8	7.6E-04	0.45	4.6E-01	-1.4	1.9E-02
	BJN34_19840	SBP	TphCII	BAE47084.1	25.2	-4.8	3.2E-12	-4.2	3.8E-10	0.62	5.4E-01
	BJN34_19845	SC	TpiB	BAN66715.1	21.1	-4.6	2.8E-11	-4.7	9.4E-12	-0.071	9.6E-01
	BJN34_19850	LC	TpiA	BAN66716.1	46.1	-4.6	1.3E-15	-4.6	8.3E-16	0.0061	1.0E+00

^aLC, large component; SBP, substrate binding protein; SC, small component.

^bLog fold change values calculated from BA/CA.

^cLog fold change values calculated from 3-CB/CA.

^dLog fold change values calculated from 3-CB/BA.

Table 3-17 ストレス応答遺伝子の発現

Replicon	Locus	Gene ^a	K number	Description	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA	
					LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR	LogFC ^d	FDR
Stress response genes										
Chr.1	BJN34_00915	<i>hslI'</i>	K01419	HslU--HslIV peptidase proteolytic subunit	1.8	6.8E-03	1.1	9.8E-02	-0.76	3.8E-01
	BJN34_00920	<i>hslU</i>	K03667	HslU--HslIV peptidase ATPase subunit	2.0	1.9E-02	1.2	1.4E-01	-0.80	4.6E-01
	BJN34_04025	<i>groES</i>	K04078	chaperonin GroES ^e	0.47	4.7E-01	0.78	9.8E-02	0.30	6.8E-01
	BJN34_04030	<i>groEL</i>	K04077	chaperonin GroEL ^e	0.47	4.7E-01	0.85	6.1E-02	0.38	5.8E-01
	BJN34_06000	<i>grpE</i>	K03687	molecular chaperone GrpE ^e	1.7	7.8E-03	0.85	1.6E-01	-0.81	2.9E-01
	BJN34_07555	<i>clpP</i>	K01358	ATP-dependent Clp endopeptidase, proteolytic subunit ClpP	-0.56	9.1E-02	-0.68	1.5E-02	-0.11	8.2E-01
	BJN34_07560	<i>clpX</i>	K03544	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	-0.36	3.0E-01	-0.031	9.3E-01	0.33	3.7E-01
	BJN34_09490	<i>dnaK</i>	K04043	molecular chaperone DnaK	2.0	1.6E-04	1.8	4.4E-04	-0.24	7.9E-01
	BJN34_09495	<i>groEL</i>	K04077	chaperonin GroEL ^e	1.8	3.3E-04	1.4	2.7E-03	-0.37	6.2E-01
	BJN34_09500	<i>groES</i>	K04078	chaperonin GroES ^e	2.1	3.9E-03	1.8	5.7E-03	-0.25	8.3E-01
	BJN34_11475	<i>clpB</i>	K03695	ATP-dependent chaperone ClpB	2.2	1.8E-03	1.5	2.1E-02	-0.68	4.9E-01
	BJN34_16310	<i>clpA</i>	K03694	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	0.60	1.9E-01	0.68	7.2E-02	0.074	9.2E-01
BJN34_16495	<i>dnaJ</i>	K03686	molecular chaperone DnaJ	0.79	1.2E-01	-0.18	7.4E-01	-0.97	5.2E-02	
BJN34_16500	<i>dnaK</i>	K04043	molecular chaperone DnaK	1.5	2.4E-02	0.54	4.2E-01	-0.94	2.2E-01	
Benzoate stress response genes										
BJN34_02220	<i>cyoE</i>	K02257	protoheme IX farnesyltransferase	-0.39	4.4E-01	-0.98	5.4E-03	-0.58	2.1E-01	
BJN34_03315	<i>sucC</i>	K01903	succinyl-CoA synthetase beta subunit ^e	-1.3	7.5E-04	-1.4	3.6E-05	-0.16	8.0E-01	
BJN34_03320	<i>sucD</i>	K01902	succinyl-CoA synthetase alpha subunit ^e	-1.4	9.4E-05	-1.4	2.9E-05	-0.015	9.9E-01	
BJN34_13095	<i>psbB</i>	K02036	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	0.15	8.7E-01	1.2	7.6E-03	1.1	4.9E-02	
BJN34_13100	<i>psbA</i>	K02038	phosphate ABC transporter, permease protein PstA	-0.26	8.4E-01	1.4	3.2E-02	1.6	2.6E-02	
BJN34_13105	<i>psbC</i>	K02037	phosphate ABC transporter permease subunit PstC	-0.50	6.0E-01	1.5	1.0E-02	2.0	1.6E-03	
BJN34_13110	<i>psbS</i>	K02040	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS	-0.43	4.1E-01	1.4	4.1E-05	1.9	1.4E-07	
BJN34_15890	<i>btaB</i>	K16092	TonB-dependent receptor	-0.72	1.7E-01	-1.3	2.0E-03	-0.54	3.5E-01	
BJN34_16665	<i>cybB</i>	K12262	superoxide oxidase ^e	1.9	1.2E-10	-0.20	6.0E-01	-2.1	5.7E-13	
BJN34_16755	<i>bamE</i>	K06186	outer membrane protein assembly factor BamE	-0.53	2.8E-01	-1.5	3.4E-05	-0.96	2.7E-02	
BJN34_23155	<i>kdpD</i>	K07646	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase KdpD ^e	-0.53	7.7E-01	-0.24	8.6E-01	0.29	8.8E-01	
BJN34_25760	<i>lpxL</i>	K02517	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	-0.14	9.0E-01	-1.0	9.8E-02	-0.86	2.7E-01	

^aGene designation from KEGG annotation were manually modified.^bLog fold change values calculated from BA/CA.^cLog fold change values calculated from 3-CB/CA.^dLog fold change values calculated from 3-CB/BA.^eKEGG definition.

3-3-7 PHB 合成遺伝子の発現

PHB 合成遺伝子 (*phaC₁AB₁*) の発現を調べ、TPM 値を Table 3-18 に示した。*pha* 遺伝子群は、全遺伝子の TPM 値の中央値よりも高い遺伝子発現 (TPM 値) を示し、これはどの培養区においても変わらなかった。

3-3-8 GO エンリッチメント解析による機能変動

生物学的機能の変化を観察するために、GO エンリッチメント解析を行った。3-CB vs. CA、BA vs. CA、3-CB vs. BA の比較において、それぞれ 22、22、15 の GO タームがエンリッチされた (FDR < 0.05) (Fig. 3-9)。“ferric iron binding” (GO:0008199)、“metal ion binding”

(GO:0046872)、“2 iron, 2 sulfur cluster binding” (GO:0051537) は 3-CB のみで上方制御され、“nucleotide binding” (GO:0000166)、“peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity” (GO:0003755) は 3-CB のみで下方制御された。一方、“peptide transport” (GO:0015833) と“bacterial-type flagellum-dependent cell motility” (GO:0071973) は BA のみで上方制御され、“GTPase activity”

(GO:0003924)、“porin activity” (GO:0015288)、“oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor” (GO:0016616)、BA のみで下方制御された。興味深いことに、“chemotaxis” (GO:0006935)、“signal transduction” (GO:0007165)、“bacterial-type flagellum-dependent cell motility” (GO:0071973) は、BA と比較して 3-CB で下方制御された。これは NH9 株の細胞運動性や走化性が、3-CB と比較して BA で高いことを示唆する。他の GO タームの変動傾向は、3-CB vs. CA と BA vs. CA 間でほとんど同じであった。

“signal transduction”、“chemotaxis”、“bacterial-type flagellum-dependent cell motility”に分類されている遺伝子の情報を Table 3-19 にまとめ、どの遺伝子が増動しているのかを調べた。“signal transduction”に分類された 72 の遺伝子は主に、走化性やヒスチジinkinナーゼに関連するタンパク質をコードしていた。特にメチル基受容走化性タンパク質 (methyl-accepting chemotaxis protein: MCP) (Bi and Sourjik, 2018; Parales *et al.*, 2015) という、外界のシグナルを感知するために重要な

Table 3-18 全遺伝子のTPM値の中央値、安息香酸ストレレス応答遺伝子及びPHB合成遺伝子の発現

Replicon	Locus	Gene ^a	K number	Description	TPM values											
					3-CB_1	3-CB_2	3-CB_3	BA_1	BA_2	BA_3	CA_1	CA_2	CA_3			
The median TPM values of all genes					31.3	30.3	26.0	29.5	26.1	29.9	15.4	20.5	20.1			
Benzoate stress response genes																
Chr.1	BJN34_02220	<i>cyoE</i>	K02257	protoheme IX farnesyltransferase	40.8	35.1	39.3	58.0	69.8	47.8	70.4	45.6	67.7			
	BJN34_03315	<i>sucC</i>	K01903	succinyl-CoA synthetase beta subunit ^b	582.1	546.4	840.9	699.2	896.9	693.4	1320.4	1597.8	1476.6			
	BJN34_03320	<i>sucD</i>	K01902	succinyl-CoA synthetase alpha subunit ^b	687.8	668.1	920.7	750.8	926.0	700.9	1226.6	2113.9	1810.7			
	BJN34_13095	<i>pstB</i>	K02036	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	50.7	58.6	28.3	21.4	22.9	21.1	23.1	9.7	12.8			
	BJN34_13100	<i>pstA</i>	K02038	phosphate ABC transporter, permease protein PstA	24.5	28.7	10.7	7.2	8.9	4.0	10.3	3.1	5.8			
	BJN34_13105	<i>pstC</i>	K02037	phosphate ABC transporter permease subunit PstC	34.4	35.8	13.3	7.7	8.3	4.5	11.6	7.3	4.1			
	BJN34_13110	<i>pstS</i>	K02040	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS	242.7	264.4	136.4	49.6	65.3	63.0	78.1	57.3	53.1			
	BJN34_15890	<i>batB</i>	K16092	TonB-dependent receptor	173.0	157.7	273.6	280.1	390.2	246.3	421.2	352.3	432.5			
	BJN34_16665	<i>cybB</i>	K12262	superoxide oxidase ^b	73.1	65.7	71.8	328.6	359.8	239.6	65.5	64.7	67.3			
	BJN34_16755	<i>bamE</i>	K06186	outer membrane protein assembly factor BamE	141.4	127.3	154.3	303.1	265.9	282.6	440.4	245.8	273.9			
Chr.2	BJN34_23155	<i>kdpD</i>	K07646	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase KdpD ^b	2.4	2.7	2.6	0.0	3.2	3.2	2.0	2.3	3.3			
	BJN34_25760	<i>lpxL</i>	K02517	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	7.3	9.8	7.3	16.9	14.8	13.5	22.1	6.8	9.3			
Polyhydroxybutyrate synthesis genes																
Chr.1	BJN34_07300	<i>phaC</i>	K03821	polyhydroxyalkanoate synthase subunit PhaC ^b	1130.6	1089.0	965.8	972.3	721.9	1066.8	315.5	782.4	611.1			
	BJN34_07305	<i>phaA</i>	K00626	acetyl-CoA acetyltransferase	1917.9	2140.1	1892.6	1889.9	1837.3	2006.4	429.7	1330.5	1160.5			
	BJN34_07310	<i>phaB</i>	K00023	acetoacetyl-CoA reductase ^b	4493.9	4633.5	3001.0	3295.7	3061.7	3414.5	701.4	1900.6	1801.6			
	BJN34_07315	<i>phaR</i>	-	polyhydroxyalkanoate synthesis repressor PhaR	1004.4	1146.0	796.2	778.5	608.5	819.4	602.0	659.1	931.0			

^aGene designation from KEGG annotation were manually modified.^bKEGG definition.

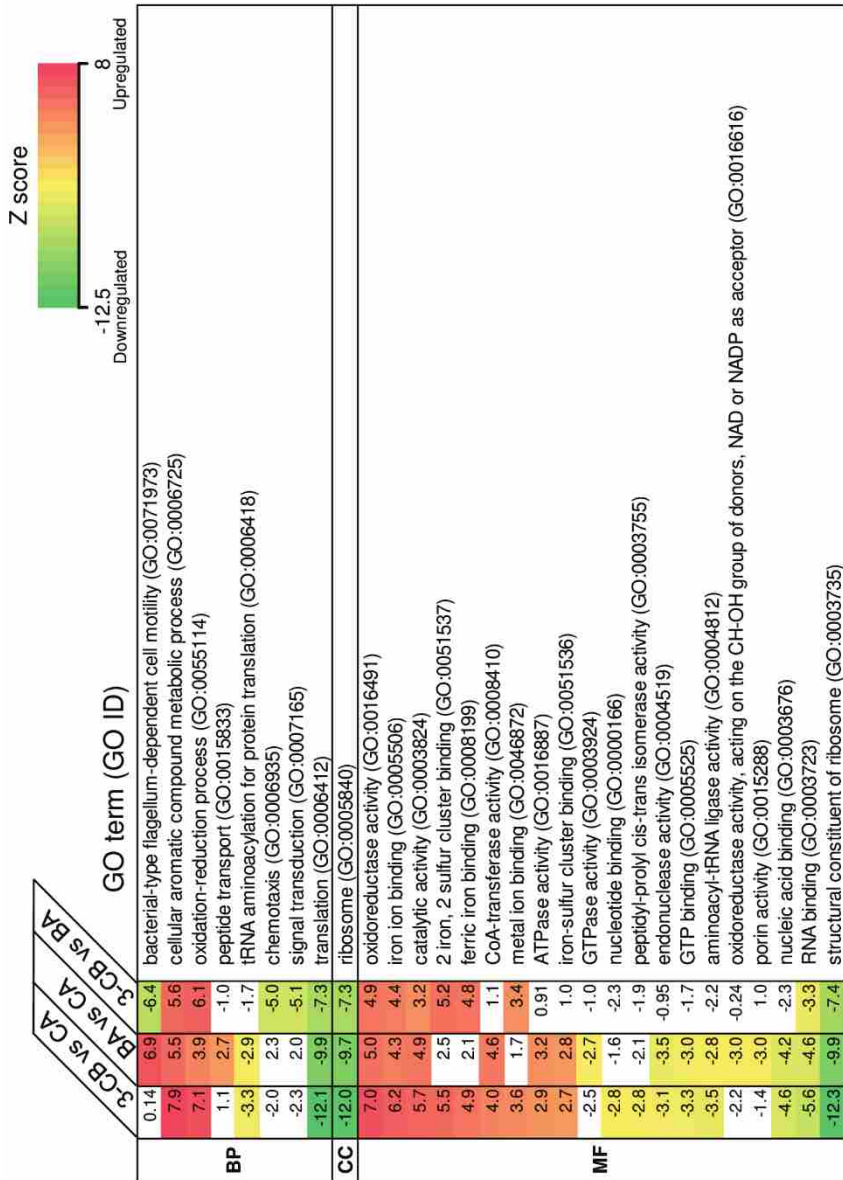


Fig. 3-9 GOエンリッチメント解析結果

計算したZスコアに応じて、ヒートマップの色わけを行った。またFDR < 0.05のみ、色をつけた。

BPはbiological process (生物学的プロセス)、CCはcellular component (細胞構成要素)、MFはmolecular function (分子機能)を示す。

Table 3-19 GO:0006935、GO:0007165、GO:0071973に分類された遺伝子の発現

Locus	Replicon	Gene	K number	KEGG definition	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA	
					LogFC ^a	FDR	LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR
bacterial-type flagellum-dependent cell motility (GO:0071973)										
B/JN34_22000		<i>flgB</i>	K02387	flagellar basal-body rod protein FlgB	2.3	2.1E-02	1.5	1.0E-01	-0.80	5.5E-01
B/JN34_22005		<i>flgC</i>	K02388	flagellar basal-body rod protein FlgC	2.5	5.8E-03	1.7	4.7E-02	-0.84	4.9E-01
B/JN34_22015		<i>flgE</i>	K02390	flagellar hook protein FlgE	2.0	4.4E-02	0.77	4.3E-01	-1.2	2.8E-01
B/JN34_22020		<i>flgF</i>	K02391	flagellar basal-body rod protein FlgF	2.1	3.6E-02	0.65	5.2E-01	-1.5	1.9E-01
B/JN34_22025		<i>flgG</i>	K02392	flagellar basal-body rod protein FlgG	2.2	2.2E-02	0.71	4.7E-01	-1.5	1.7E-01
B/JN34_22030		<i>flgH</i>	K02393	flagellar L-ring protein precursor FlgH	2.3	1.2E-02	0.54	5.7E-01	-1.8	7.7E-02
B/JN34_22035	Chr.2	<i>flgI</i>	K02394	flagellar P-ring protein precursor FlgI	2.4	1.6E-02	0.57	5.8E-01	-1.8	8.9E-02
B/JN34_22045		<i>flgK</i>	K02396	flagellar hook-associated protein 1 FlgK	1.7	5.7E-02	-1.7	3.0E-02	-3.4	3.2E-05
B/JN34_22050		<i>flgL</i>	K02397	flagellar hook-associated protein 3 FlgL	2.3	9.6E-03	-1.4	8.8E-02	-3.7	1.3E-05
B/JN34_24450		<i>flhM</i>	K02416	flagellar motor switch protein FlhM	1.8	8.6E-03	0.55	4.5E-01	-1.3	1.0E-01
B/JN34_24455		<i>flhI</i>	K02417	flagellar FlhI protein	1.8	8.8E-03	0.61	3.9E-01	-1.2	1.2E-01
B/JN34_34110		<i>flhC</i>	K02406	flagellin	1.1	1.6E-01	-2.6	4.4E-05	-3.7	1.9E-08
B/JN34_34145		<i>flhE</i>	K02408	flagellar hook-basal body complex protein FlhE	2.3	6.8E-03	1.2	1.5E-01	-1.1	2.8E-01
B/JN34_34170		<i>flhJ</i>	K02413	flagellar FlhJ protein	1.7	9.3E-02	0.17	8.8E-01	-1.5	1.6E-01
chemotaxis (GO:0006935)										
B/JN34_04180		<i>pilI</i>	K02659	twitching motility protein PilI	0.43	3.0E-01	0.80	9.4E-03	0.36	4.0E-01
B/JN34_04190	Chr.1	<i>chpA</i>	K06596	chemosensory pili system protein ChpA	0.24	6.1E-01	0.062	8.8E-01	-0.17	7.2E-01
B/JN34_11685		<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	0.60	2.7E-01	-0.75	9.4E-02	-1.3	3.0E-03
B/JN34_21800		<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	1.6	2.6E-03	-2.3	2.6E-06	-3.9	7.0E-15
B/JN34_21835		<i>cheW</i>	K03408	purine-binding chemotaxis protein CheW	1.3	1.9E-01	-2.6	1.2E-03	-3.9	4.0E-06
B/JN34_21875		<i>cheA</i>	K03407	two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA	1.5	1.8E-04	-1.2	1.4E-03	-2.7	4.1E-13
B/JN34_21880		<i>cheW</i>	K03408	purine-binding chemotaxis protein CheW	1.6	8.4E-04	-1.1	1.3E-02	-2.7	1.0E-09
B/JN34_21890		<i>cheD</i>	K03411	chemotaxis protein CheD	1.6	1.1E-06	-0.63	7.6E-02	-2.2	2.0E-12
B/JN34_21895		<i>cheB</i>	K03412	two-component system, chemotaxis family, protein-glutamate methyltransferase/glutaminase	1.4	1.6E-06	-0.84	5.7E-03	-2.3	2.0E-15
B/JN34_24455	Chr.2	<i>flhI</i>	K02415	flagellar FlhI protein	1.8	8.8E-03	0.61	3.9E-01	-1.2	1.2E-01
B/JN34_27975		-	K02484	two-component system, OmpR family, sensor kinase	0.00058	1.0E+00	0.16	6.2E-01	0.16	7.2E-01
B/JN34_32590		<i>wspB</i>	K13488	chemotaxis-related protein WspB	-0.36	7.2E-01	0.63	3.3E-01	0.99	1.8E-01
B/JN34_32600		<i>wspD</i>	K13489	chemotaxis-related protein WspD	-0.63	3.7E-01	-0.12	8.6E-01	0.51	5.0E-01
B/JN34_32605		<i>wspE</i>	K13490	two-component system, chemotaxis family, sensor histidine kinase and response regulator WspE	-0.49	3.2E-01	-0.041	9.3E-01	0.45	3.8E-01
B/JN34_32610		<i>wspF</i>	K13491	two-component system, chemotaxis family, response regulator WspF	-0.50	1.8E-01	-0.084	8.3E-01	0.41	3.0E-01
B/JN34_33670		<i>cheV</i>	K03415	two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheV	1.7	7.4E-03	-1.7	2.4E-03	-3.4	3.9E-09

Table 3-19の続き

Locus	Replicon	Gene	K number	KEGG definition	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA	
					LogFC ^a	FDR	LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR
signal transduction (GO:0007165)										
BIN34_00285		<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	0.11	9.2E-01	-2.7	1.3E-06	-2.8	8.7E-07
BIN34_01755		<i>creC</i>	K07641	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase CreC	0.18	7.1E-01	-0.25	4.6E-01	-0.44	2.6E-01
BIN34_01935		-	K02484	two-component system, OmpR family, sensor kinase	0.17	7.8E-01	0.0086	9.9E-01	-0.16	7.9E-01
BIN34_03290		<i>tcIE</i>	K07649	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase TcIE	0.21	6.6E-01	0.65	2.8E-02	0.43	2.6E-01
BIN34_03520		<i>envZ</i>	K07638	two-component system, OmpR family, osmolarity sensor histidine kinase EnvZ	-0.12	8.6E-01	0.13	7.6E-01	0.25	6.3E-01
BIN34_04180		<i>pilI</i>	K02659	twitching motility protein PilI	0.43	3.0E-01	0.80	9.4E-03	0.36	4.0E-01
BIN34_04185		<i>pilJ</i>	K02660	twitching motility protein PilJ	0.11	8.9E-01	-0.094	8.6E-01	-0.20	7.6E-01
BIN34_04190		<i>chpA</i>	K06596	chemosensory pilI system protein ChpA	0.24	6.1E-01	0.062	8.8E-01	-0.17	7.2E-01
BIN34_07255		<i>qseC</i>	K07645	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase QseC	0.08	8.9E-01	0.010	9.8E-01	-0.071	9.0E-01
BIN34_07405		<i>envZ</i>	K07638	two-component system, OmpR family, osmolarity sensor histidine kinase EnvZ	0.17	7.3E-01	-0.51	7.9E-02	-0.68	3.7E-02
BIN34_08650		-	-	chemotaxis protein ^d	-1.9	1.1E-02	-1.9	5.0E-03	-0.00035	1.0E+00
BIN34_09575		<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	1.3	6.2E-03	-4.4	2.3E-23	-5.6	9.9E-35
BIN34_11685		<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	0.60	2.7E-01	-0.75	9.4E-02	-1.3	3.0E-03
BIN34_11890		<i>glnL</i>	K07708	two-component system, NtrC family, nitrogen regulation sensor histidine kinase GlnL	-0.64	1.3E-01	-0.058	9.0E-01	0.58	1.9E-01
BIN34_12140	Chr.1	<i>tcIE</i>	K07649	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase TcIE	0.02	9.8E-01	-0.066	9.3E-01	-0.090	9.3E-01
BIN34_13080		<i>phoR</i>	K07636	two-component system, OmpR family, phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR	-0.03	9.6E-01	0.15	6.6E-01	0.18	6.9E-01
BIN34_13375		-	-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	2.5	4.7E-02	3.0	6.4E-03	0.46	7.9E-01
BIN34_13395		-	-	sensor domain-containing diguanylate cyclase ^d	0.88	4.7E-02	1.0	5.6E-03	0.17	8.0E-01
BIN34_13925		<i>kdpD</i>	K07646	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase KdpD	0.11	8.3E-01	0.14	6.7E-01	0.032	9.5E-01
BIN34_16260		-	-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	-0.13	8.4E-01	0.32	4.0E-01	0.45	3.3E-01
BIN34_16640		<i>phcR</i>	K19622	two-component system, response regulator PhcR	0.56	1.2E-01	0.53	8.7E-02	-0.030	9.6E-01
BIN34_16645		<i>phcS</i>	K19621	two-component system, sensor histidine kinase PhcS	0.18	7.1E-01	0.21	5.1E-01	0.036	9.5E-01
BIN34_17005		<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	0.016	9.9E-01	-0.019	9.9E-01	-0.035	9.8E-01
BIN34_17200		<i>pilS</i>	K02668	two-component system, NtrC family, sensor histidine kinase PilS	-0.026	9.7E-01	-0.10	7.8E-01	-0.070	8.9E-01
BIN34_18130		-	K02484	two-component system, OmpR family, sensor kinase	0.39	5.6E-01	0.77	8.3E-02	0.38	5.6E-01
BIN34_19640		-	-	histidine kinase ^d	0.42	2.8E-01	1.1	1.7E-04	0.64	6.6E-02
BIN34_19710		-	-	PAS domain-containing sensor histidine kinase ^d	-0.062	9.0E-01	-0.42	1.4E-01	-0.36	3.3E-01
BIN34_19875		<i>tcIE</i>	K07649	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase TcIE	0.23	6.2E-01	-0.57	6.8E-02	-0.80	1.6E-02

Table 3-19の続き

Locus	Replicon	Gene	K number	KEGG definition	BA vs CA		3-CB vs CA		3-CB vs BA	
					LogFC ^a	FDR	LogFC ^b	FDR	LogFC ^c	FDR
signal transduction (GO:0007165)										
BN34_21375	-	<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	-0.10	8.9E-01	-0.86	2.4E-02	-0.76	1.0E-01
BN34_21525	-		K02482	two-component system, NtrC family, sensor kinase	0.18	9.1E-01	0.27	8.0E-01	0.086	9.6E-01
BN34_21800	-	<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	1.6	2.6E-03	-2.3	2.6E-06	-3.9	7.0E-15
BN34_21835	-	<i>cheW</i>	K03408	purine-binding chemotaxis protein CheW	1.3	1.9E-01	-2.6	1.2E-03	-3.9	4.0E-06
BN34_21840	-	<i>aer</i>	K03776	aerotaxis receptor	1.4	7.4E-02	-2.8	1.7E-05	-4.2	8.0E-10
BN34_21845	-	<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	1.4	7.8E-02	-2.9	9.7E-06	-4.3	4.3E-10
BN34_21875	-	<i>cheA</i>	K03407	two-component system, chemotaxis family, sensor kinase CheA	1.5	1.8E-04	-1.2	1.4E-03	-2.7	4.1E-13
BN34_21880	-	<i>cheW</i>	K03408	purine-binding chemotaxis protein CheW	1.6	8.4E-04	-1.1	1.3E-02	-2.7	1.0E-09
BN34_22870	-		-	two-component sensor histidine kinase ^d	0.27	6.7E-01	1.1	3.2E-03	0.80	6.7E-02
BN34_23155	-	<i>kdpD</i>	K07646	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase KdpD	-0.53	7.7E-01	-0.24	8.6E-01	0.29	8.8E-01
BN34_23640	-		-	two-component sensor histidine kinase ^d	0.10	8.6E-01	0.57	6.2E-02	0.46	2.2E-01
BN34_23675	-	<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	1.0	8.1E-02	-1.8	1.4E-04	-2.8	5.1E-09
BN34_23945	-		-	two-component sensor histidine kinase ^d	0.12	8.4E-01	0.16	6.9E-01	0.038	9.5E-01
BN34_24020	-	<i>cqsS</i>	K10916	two-component system, CAX-1 autoinducer sensor kinase/phosphatase CqsS	-0.29	5.2E-01	-0.078	8.5E-01	0.21	6.6E-01
BN34_24350	-	<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	4.6	2.9E-49	4.2	1.3E-43	-0.36	4.2E-01
BN34_25245	-	<i>aer</i>	K03776	aerotaxis receptor	1.8	1.6E-05	-1.6	1.6E-04	-3.4	1.9E-16
BN34_26260	-	<i>rcsC</i>	K07677	two-component system, NarL family, capsular synthesis sensor histidine kinase RscC	-0.48	3.6E-01	-0.46	2.7E-01	0.017	9.9E-01
BN34_27085	-	<i>evgS</i>	K07679	two-component system, NarL family, sensor histidine kinase EvgS	0.27	8.2E-01	0.56	4.4E-01	0.30	7.8E-01
BN34_27885	-		-	chemotaxis protein ^d	-1.3	3.0E-01	-0.39	7.4E-01	0.94	5.2E-01
BN34_27975	-		K02484	two-component system, OmpR family, sensor kinase	0.00588	1.0E+00	0.16	6.2E-01	0.16	7.2E-01
BN34_28775	-	<i>cusS</i>	K07644	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	0.85	1.5E-01	0.91	6.3E-02	0.062	9.5E-01
BN34_28820	Chr. 2	-	-	sensor histidine kinase ^d	0.50	3.6E-01	0.61	1.5E-01	0.11	8.8E-01
BN34_29045	-		-	PAS domain S-box protein ^d	0.50	1.2E-01	0.77	3.6E-03	0.27	5.2E-01
BN34_29565	-		-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	0.49	3.8E-01	1.4	3.3E-04	0.88	6.0E-02
BN34_29890	-	<i>cusS</i>	K07644	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	0.45	4.1E-01	0.71	6.8E-02	0.26	6.6E-01
BN34_31545	-		K02482	two-component system, NtrC family, sensor kinase	0.84	1.6E-01	1.3	4.5E-03	0.50	4.7E-01
BN34_31830	-	<i>tcfE</i>	K07649	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase TcfE	-2.5	6.7E-08	-1.7	1.1E-04	0.77	2.3E-01
BN34_32190	-	<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	1.5	2.7E-03	-1.8	4.7E-05	-3.3	3.0E-13
BN34_32420	-	<i>rcsC</i>	K07677	two-component system, NarL family, capsular synthesis sensor histidine kinase RscC	0.78	2.1E-01	0.048	9.5E-01	-0.73	2.6E-01
BN34_32585	-	<i>wspA</i>	K13487	methyl-accepting chemotaxis protein WspA	-0.36	4.1E-01	0.20	5.8E-01	0.56	1.5E-01
BN34_32590	-	<i>wspB</i>	K13488	chemotaxis-related protein WspB	-0.36	7.2E-01	0.63	3.3E-01	0.99	1.8E-01
BN34_32600	-	<i>wspD</i>	K13489	chemotaxis-related protein WspD	-0.63	3.7E-01	-0.12	8.6E-01	0.51	5.0E-01
BN34_32605	-	<i>wspE</i>	K13490	two-component system, chemotaxis family, sensor histidine kinase and response regulator WspE	-0.49	3.2E-01	-0.041	9.3E-01	0.45	3.8E-01
BN34_33085	-	<i>rcsC</i>	K07677	two-component system, NarL family, capsular synthesis sensor histidine kinase RscC	0.034	9.8E-01	-0.81	4.1E-01	-0.84	5.1E-01
BN34_33100	-	<i>rcsC</i>	K07677	two-component system, NarL family, capsular synthesis sensor histidine kinase RscC	0.25	6.0E-01	0.26	4.6E-01	0.0057	9.9E-01
BN34_33185	-	<i>tsr</i>	K05874	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	0.84	2.1E-01	-2.8	7.8E-08	-3.7	7.7E-12
BN34_33425	-	<i>cusS</i>	K07644	two-component system, OmpR family, heavy metal sensor histidine kinase CusS	0.18	7.8E-01	0.32	4.2E-01	0.14	8.2E-01
BN34_33670	-	<i>cheV</i>	K03415	two-component system, chemotaxis family, chemotaxis protein CheV	1.7	7.4E-03	-1.7	2.4E-03	-3.4	3.9E-09
BN34_33995	-	<i>narX</i>	K07673	two-component system, NarL family, nitrate/nitrite sensor histidine kinase NarX	-0.18	8.2E-01	-0.37	4.4E-01	-0.19	7.9E-01
BN34_34065	-		-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	-0.0015	1.0E+00	0.38	3.1E-01	0.38	4.3E-01
BN34_34080	-		-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	0.19	9.1E-01	0.60	5.5E-01	0.41	7.8E-01
BN34_34800	-	<i>mcp</i>	K03406	methyl-accepting chemotaxis protein	0.72	2.9E-01	-3.0	9.6E-09	-3.7	2.0E-12
BN34_35100	-		K02484	two-component system, OmpR family, sensor kinase	1.0	6.9E-01	0.060	9.8E-01	-0.99	7.1E-01
BN34_36140	pENH92	-	-	hybrid sensor histidine kinase/response regulator ^d	0.37	5.6E-01	1.5	1.4E-04	1.1	1.4E-02

^aLog fold change values calculated from BA/C.A.^bLog fold change values calculated from 3-CB/C.A.^cLog fold change values calculated from 3-CB/BA.^dAnnotation from GenBank.

タンパク質をコードする 12 の遺伝子が、含まれていた。12 のうち 8 つの遺伝子は 3-CB vs. BA の DEG であり、3-CB で下方制御されていた。さらに 8 つのうち 3 つの遺伝子 (BJN34_09575、BJN34_21800、BJN34_32190) は、BA によって (CA と比較して) 2 倍以上 ($FDR < 0.05$) 上方制御されていたため、これらは BA または関連化合物をリガンドとして認識すると考えられる。1 つの MCP コード遺伝子 (BJN34_24350) は、3-CB と BA により 16 倍以上も有意に発現が上昇したため、3-CB と BA またはそれらの関連化合物と反応すると思われる。“chemotaxis”に分類された遺伝子の多くは、“signal transduction”にも分類されていた。16 のうち 7 つの遺伝子は、3-CB vs. BA の DEG であり、特に 6 つの遺伝子は CA と比較して BA で 2 倍以上 ($FDR < 0.05$) 発現上昇していた。これら 6 つの遺伝子は、CheABDVW タンパク質と 1 つの MCP タンパク質をコードしていた。“bacterial-type flagellum-dependent cell motility”では、14 のうち 11 遺伝子の発現が、CA と比較して BA で 2 倍以上 ($FDR < 0.05$) 上昇していた。これらの遺伝子は、鞭毛を構成するタンパク質 (hook、hook-filament junction、distal rod、proximal rod、L リング、P リング、C リングの一部) をコードしていた。これらの結果は、MCP、Che、鞭毛を構成するタンパク質をコードする遺伝子が BA で上方制御され、3-CB によって下方制御あるいは大きく変動しないことを示していた。これらの結果より、3-CB と BA 間の走化性あるいは運動性の違いが検出された。

3-3-9 芳香族化合物に対する走化性

スィミングプレートアッセイの結果を、Fig. 3-10 に示した。本実験において、もし同心円状の輪が形成されれば、細菌が誘引物質の周囲に集まり、走化性を示したことになる。NH9 株はカザミノ酸 (ポジティブコントロール) と BA、3-HBA に対して、それぞれ 3 時間、6 時間、6 時間の静置で明らかな輪を形成した (Fig. 3-10A、B、C)。3-CB に対しても輪を形成したが、観察できたのは静置後 14 時が経過した後であった (Fig. 3-10D)。なお、炭素源を含まない BSM (ネガティブコントロール) に対しては、輪を形成しなかった (Fig. 3-10E)。これらの結果より、

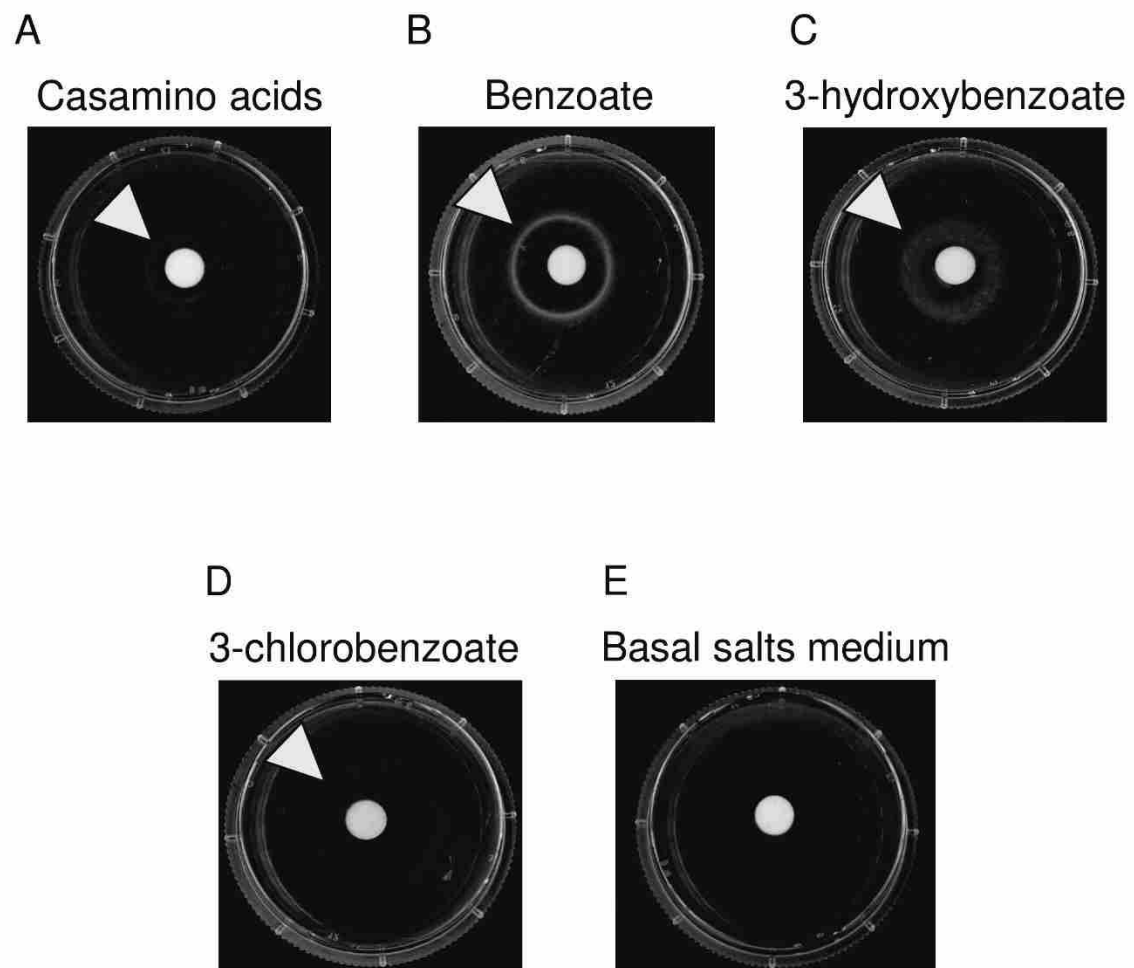


Fig. 3-10 スイミングプレートアッセイによるNH9株の走化性反応
 (A)カザミノ酸、(B) BA、(C) 3-HBA、(D) 3-CB、(E) 無機塩類培地
 を誘引物質として使用した。それぞれ、3時間、6時間、6時間、14
 時間、14時間培養した。三角形の矢印は、同心円状の輪を示す。全
 ての実験は、3連で行った。

NH9 株は BA と 3-HBA には（相対的に）強い走化性を示したが、3-CB に対しては弱い走化性を示した。

3-4 考察

RNA-seq により、第二章で推定した 3-CB と BA 分解関連遺伝子の発現を確認できた。3-クロロカテコール分解遺伝子群 (*cbnABCD*) は 3-CB と BA で発現しており、特に 3-CB で高発現していた (Fig. 3-5、Table 3-13)。この結果は、以前の β -ガラクトシダーゼ実験結果とは異なっていた。 β -ガラクトシダーゼ実験では、宿主細菌 *Pseudomonas putida* PRS4020 株をグルコース + BA で培養した時、またグルコース + 3-CB で培養した時と比較して、*cbnA* プロモーターからの活性が高かった (Ogawa *et al.*, 1999)。 β -ガラクトシダーゼ実験は人工的な環境 (*in vitro*) であり、一方 RNA-seq は細胞内の実際の環境 (*in vivo*) を反映していると考え、妥当な結果であると考え。今回の RNA-seq 結果を、下記のように解釈した。pENH91 上の *cbnABCD* 遺伝子の転写調節因子 CbnR は、2-CM と CCM (それぞれ 3-クロロカテコールとカテコールの中間代謝産物) を誘導物質として認識する (Ogawa *et al.*, 1999)。一方、NH9 株における BA とカテコール分解遺伝子の転写調節因子やその誘導物質は明らかになっていないが、*Acinetobacter baylyi* ADP1 株の BA 分解に関わる転写調節因子 BenM と CatM の転写は、CCM と (または) BA によって活性化されると報告されている (Ezezika *et al.*, 2006)。BA 存在下では、BenABCD タンパク質によって BA がカテコールに変換され、*ben* オペロンの隣の *catA* 遺伝子から産生される CatA によって CCM になる。その結果、*benABCD* と *catA* 遺伝子が高発現する。CbnR は残りの CCM と反応し、*cbnABCD* 遺伝子発現の緩やかな誘導を促す。3-CB 存在下では、BenABCD が 3-CB を分解して 3-クロロカテコールを産生し、それが CbnA と結合する。この反応により 2-CM が産生され、CbnR が *cbnABCD* 遺伝子の高発現を引き起こす。*catB*、*catDC* 遺伝子もまた、BA 及び 3-CB によって高発現している。しかし、これらの遺伝子は *benABCD* と *catA* 遺伝子とは異なる染色体に存在し、また *catDC* の転写調節因子は不明である。そのため、これら遺伝子の高発現を説明することは、現段階では難しいと考えた。

BA 分解に関与する *boxABCD* 遺伝子は、CA と比較して BA で遺伝子発現が上昇した (Fig. 3-5、Table 3-13)。しかしそれらの発現レベルは、*ben* 遺伝子や *cat* 遺伝子と比較して低かった。今

回の実験条件において NH9 株は、*bclA* 遺伝子と *boxABCD* 遺伝子よりも、*ben* 遺伝子と *cat* 遺伝子を介して BA を分解するということが示唆された。他の条件、例えば酸素レベルが低い状態、あるいは他の炭素源による増殖時において、*bclA* 遺伝子と *boxABCD* 遺伝子の発現が *ben* 遺伝子や *cat* 遺伝子よりも高くなるかもしれない (Denef *et al.*, 2004, 2006)。

3-HBA の分解遺伝子群 *mhbDHIMT* の発現は、転写調節因子 MhbR によって制御され、また誘導物質は 3-HBA であると報告されている (Lin *et al.*, 2010)。第二章の結果より、NH9 株は 3-HBA を分解し (Fig. 2-11)、また本章の定量 RT-PCR 解析により、これら遺伝子群が 3-HBA によって誘導されるという結果を得た (Fig. 3-7)。これらのことは、NH9 株の *mhbDHIMT* 遺伝子群は 3-HBA によって発現が誘導され、分解に関わることを示唆する。RNA-seq において、NH9 株の *mhbDHIMT* 遺伝子発現が 3-CB によって有意に上昇していたことから、NH9 株の MhbR が構造的に類似する 3-CB (またはその中間代謝産物) を認識し、*mhb* 遺伝子群の発現を誘導したと考える。今後、レポーターアッセイを行うことで、MhbR と 3-CB の関連性が明らかになると考える。3-HBA と 3-CB は置換基が異なるアナログであるため、この現象は予測できる範囲である。しかし、3-CB はアントラニル酸分解遺伝子 (*and1* と *and2*) の発現も明らかに誘導した (Fig. 3-6、Table 3-13)。つまり、アントラニル酸分解遺伝子群の転写調節因子が、3-CB あるいはその中間代謝産物を認識し、遺伝子発現を誘導したと考えられる。これらの事実は、芳香族化合物分解遺伝子群の転写調節因子の進化を考える上で、興味深い結果である。

KEGG BRITE 機能分類と BLSATP 解析により、多くの 3-CB と (または) BA トランスポーターの候補遺伝子を見つけることができた。MFS トランスポーターをコードする BJN34_18155 と BJN34_32125 の産物は、進化的に BenP と近いため (Fig. 3-8)、3-CB の取り込みに関わると推測する。また BJN34_18155、BJN34_30890、BJN34_32125、BJN34_33870 はそれぞれ、アントラニル酸、3-HBA、BA、4-HBA 分解遺伝子群の一部であると考えられるため (Fig. 2-9)、これら化合物の取り込みに関与すると推測する。ABC トランスポーターをコードする BJN34_29445–BJN34_29465 は、3-CB により劇的に遺伝子発現を上昇させた (Table 3-14)。これまでの研究に

において、3-CB の取り込みに関わる ABC トランスポーターは発見されていないため、これらは新規の 3-CB トランスポーター遺伝子かもしれない。興味深いことに、これら遺伝子の隣には、3-CB によって誘導されたアントラニル酸分解遺伝子 (*and2*) が位置していた (Fig. 2-9J)。そのため、元々はアントラニル酸の取り込みに関与する遺伝子かもしれない。これまでに多くの MFS 及び ABC トランスポーターが、芳香族化合物の取り込みに関与すると報告されているが、他の family の芳香族化合物トランスポーターも報告されている (Chae and Zylstra, 2006; Hosaka *et al.*, 2013; Olivera *et al.*, 1998; Reverón *et al.*, 2017)。しかし本実験の結果から、NH9 株の 3-CB と BA の取り込みには、MFS 及び ABC トランスポーターが重要な役割を担っていると考ええる。本実験では多くの芳香族化合物トランスポーターを推定できたため、将来的には破壊株の作製や ¹⁴C 標識した基質の取り込み実験を行い、本当に取り込みに関与しているのかどうか、調べるのが重要であると考ええる。

3-CB と (または) BA により、分子シャペロン (DnaK、GrpE、GroESL、ClpB) とプロテアーゼ (HslVU) をコードする遺伝子がストレス応答遺伝子として発現上昇した (Table 3-17)。これらのタンパク質は、様々なストレス状況下 (例えば塩、酸、熱、冷却、酸化ストレス) において、急速に誘導されると知られている (Gaucher *et al.*, 2019)。NH9 株が 3-CB や BA の分解中、誤って折りたたまれたタンパク質を再び折りたたむ、またタンパク質凝集の悪影響を減少させるために、これらの遺伝子発現が上昇したのかもしれない。リン酸トランスポーター PstBACS と SOO をコードする遺伝子はそれぞれ、3-CB と BA によって誘導された。ストレス状況下におけるリン酸の取り込みは、細胞内の pH を維持する、また膜構成成分やエネルギー豊富な中間体を合成するという点で重要である (Reva *et al.*, 2006)。SOO は、DNA やタンパク質、脂質などの様々な細胞構成物質を損傷させ、また好気代謝中に産生される超酸化物 (スーパーオキシド) を酸化する役割を持つ (Lundgren *et al.*, 2018)。好気性微生物のオキシゲナーゼによる芳香族化合物分解は、活性酸素種 (ROS) を生成すると言われており (Flood and Copley, 2018; Tamburro *et al.*, 2004)、また ROS は様々なストレス応答遺伝子の発現を上昇させる (Chávez *et al.*, 2004; Deneff *et*

al., 2006; Puglisi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011b)。3-CB と BA の取り込みと好氣的分解により、細胞内 pH が変化したり、ROS の蓄積を含むストレス状況下にさらされると思われる。*P. putida* KT2440 株や *P. xenovorans* LB400 株のトランスクリプトーム解析の報告において、それぞれ 3-CB と BA、BA とビフェニル及び PCB によって、様々なストレス応答遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Denef *et al.*, 2006; Parnell *et al.*, 2006; Reva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011b)。本研究で得られた、芳香族（塩素）化合物が pH や酸化ストレスに関与する遺伝子の発現を誘導するという結果は、これまでの上記の報告と一致している。本研究で調べた（KT2440 株で報告されていた）BA ストレス応答遺伝子の半分以上（BJN34_02220、BJN34_03315、BJN34_03320、BJN34_15890、BJN34_16755、BJN34_23155、BJN34_25760）は、3-CB と BA において低く発現しているように見えた（Table 3-17）。5 つの遺伝子（BJN34_02220、BJN34_03315、BJN34_03320、BJN34_15890、BJN34_16755）の TPM 値は CA で最も高かったが、3-CB と BA 両方において、全遺伝子の TPM 値の中央値よりも高かった（Table 3-18）。このことは、5 つの遺伝子は 3-CB と BA で発現しているが、CA による早い増殖のために、最も強いストレスがかかったことを示唆する。なお、CA による増殖によって引き起こされるストレスの性質は、現段階では不明である。

3-CB と BA の分解時において、PHB 合成遺伝子は全遺伝子の TPM 値の中央値よりも高い遺伝子発現を示した（Table 3-18）。これは、芳香族化合物分解中に PHB の合成が行われていることを示唆していると考ええる。芳香族化合物が分解された後は合成された PHB を使用していると考え、またこの推測は増殖実験において定常期が大きく減少しなかったこと（Fig. 2-11）と一致する。

GO エンリッチメント解析より、“cellular aromatic compound metabolic process”、“iron ion binding”、“2 iron, 2 sulfur cluster binding”、“ferric ion binding”という 4 つの GO タームが、BA 及び 3-CB で上方制御されていた（Fig. 3-9）。特に 3-CB は、多くのジオキシゲナーゼをコードする遺伝子の発現を誘導した。ジオキシゲナーゼは、Rieske [2Fe-2S]クラスターと、mononuclear iron-

containing catalytic ドメインという 2 つの保存された領域を含み、好気性環境における様々な芳香族化合物分解の開始に重要な役割を担っている (Mason and Cammack, 1992)。ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を含む機能の上昇は、NH9 株が芳香族汚染環境の浄化に適していることを示唆する。

走化性実験において、NH9 株は 3-CB よりも BA に対して強い走化性を示した (Fig. 3-10)。この結果は、走化性遺伝子が 3-CB よりも BA で発現上昇したと一致する。NH9 株の BA に対する走化性モデルを、Fig. 3-11 に示した。走化性の開始には、まず MCP がリガンドを認識するところから始まる (Parales *et al.*, 2015)。NH9 株では MCP をコードする 12 の遺伝子のうち、少なくとも BJN34_09575 (K05874)、BJN34_21800 (K05874)、BJN34_24350 (K05874)、BJN34_32190 (K03406) の 4 つが、BA または関連する化学物質を認識すると考える。誘導物質が結合すると MCPs の構造が変わり、ヒスチジinkinナーゼ CheA (BJN34_21875) からレスポンスレギュレーター CheY (BJN34_21830 と BJN34_21900) へのリン酸基転移が開始する (Bi and Sourjik, 2018)。その後、リン酸化された CheY はべん毛モーターのスイッチタンパク質 FliM (BJN34_24450) (Welch *et al.*, 1993)、FliN (BJN34_24445) (Sarkar *et al.*, 2010)、FliG (BJN34_34155) (Nishikino *et al.*, 2018) と相互作用する。その結果、細菌の動きは BA (誘引物質) に向かって移動する。これら走化性に必要な遺伝子の発現上昇は、これらのタンパク質が BA に対する正の走化性に関連することを示唆する。

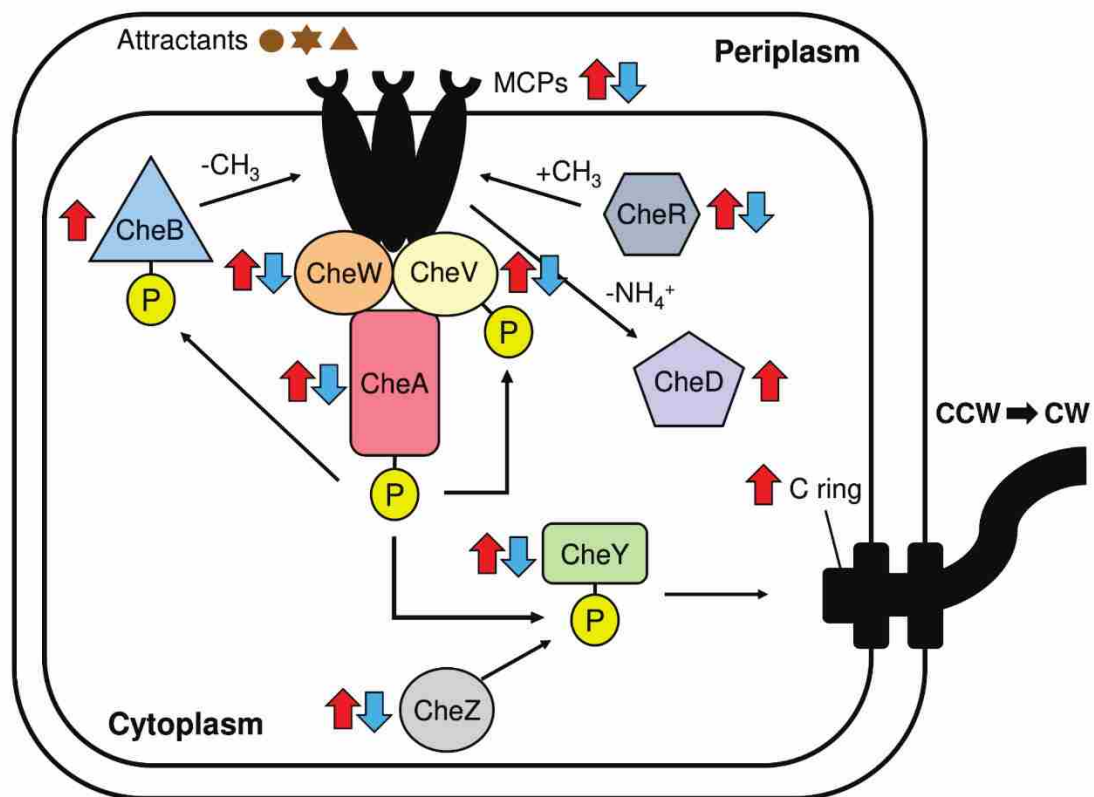


Fig. 3-11 NH9株のBAに対する走化性経路モデル図

MCP (BJN34_09575、BJN34_21800、BJN34_24350、BJN34_32190)、CheAヒスチジンキナーゼ (BJN34_21875)、及びCheYレスポンスレギュレーター (BJN34_21830とBJN34_21900)をコードする遺伝子の役割は、本文を参照。CheB (BJN34_21895)、CheD (BJN34_21890)、CheR (BJN34_21885)はそれぞれ、走化性受容体の脱メチル化、メチル化、脱アミド化に関わる。CheW (BJN34_21835とBJN34_21880)はCheAの自己リン酸化活性を制御し、CheV (BJN34_33670)はCheWと類似する機能であるが、リン酸化機能も有している。CheZ (BJN34_21905)はCheY-Pの脱リン酸化活性を持つ。赤い矢印は、BAによって2倍以上 ($FDR < 0.05$) 上方制御された遺伝子、青い矢印は3-CBによって2倍以上 ($FDR < 0.05$) 下方制御された遺伝子を示す。CCWは鞭毛モーターの回転方向がデフォルトの反時計回り (counterclockwise)、CWは時計回り (clockwise)を示す。1つのMCPをコードする遺伝子 (BJN34_24350)は、BAと3-CB両方によって上方制御された。*cheW* (BJN34_21835)は2倍以上 ($FDR > 0.05$) 上方制御され、また*cheY* (BJN34_21900)は2倍以下の発現上昇であった。

第四章

全ゲノム情報を使用した *Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属細菌の再分類

4-1 諸言

次世代シーケンサーが登場して以降、バクテリアのドラフトゲノム配列は容易に取得できるようになり、また第3世代以降のロングリードを取得可能な次世代シーケンサーの登場により、全ゲノム配列の取得も比較的容易となった。これにより、公共データベース上に登録される配列も増加している。また近年は、これらのゲノム情報を使用して改めて分類を整理する、見直すという研究が多く報告されている。例えば、乳酸菌であるガセリ菌 (*Lactobacillus gasseri*) として登録されている75株を使用して、average nucleotide identity (ANI) 解析 (Goris *et al.*, 2007) というゲノム配列を比較する解析を行ったところ、ANI値94%を境に2グループにわかれた (Tada *et al.*, 2017)。生化学的な解析より、一方は従来のガセリ菌であり、もう一方は新種であると同定された (Tanizawa *et al.*, 2018)。つまりこれは、データベースから新種を発見できた研究である。また *Burkholderia cepacia* complex は、*B. cepacia* や *B. multivorans* などを含む20種以上からなる細菌グループであるが、表現型が類似しているために種分類が困難となっている。系統解析やゲノム配列を使用した解析を行って分類を整理したところ、255株を36のクラスターに分類でき、そのうち14のクラスターは新種であると推測された (Jin *et al.*, 2020)。このように、ゲノム情報を使用した解析は分類整理が可能であり、また新種の発見につながる可能性を持つ、有益な手法である。

Cupriavidus 属と *Ralstonia* 属の細菌は系統的に近縁であり、また第一章でも述べたようにやや複雑な分類の歴史がある。このため、データベース上において誤分類が生じている株の存在が示唆された。NH9株の特徴を調べる場合、同属や近縁の株あるいは他の分解菌との比較実験が有効であるが、そのためにはNH9株及び比較に使用する菌株の分類が正しいという前提が必要である。そこで本章では、ゲノム情報を使用した解析により、*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属細菌の分類を整理することを目的とした。

まずは BA と 4-HBA の初発分解酵素である BA 1,2-dioxygenase (BenA) と 4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (PobA) のアミノ酸配列による系統解析、及び KEGG pathway 解析とオーソログ解析による芳香族化合物分解能により、分類整理が可能かどうか検討した。次に、全ゲノム配列を使用した解析を複数組み合わせ、分類整理を検討した。

4-2 材料及び方法

4-2-1 解析に使用した菌株

本章で使用した菌株を、Table 4-1 と 4-2 に示した。オーソログ解析に使用した菌株は、KEGG データベースに登録されている全ての *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌株とした。また全ゲノム情報による解析に使用した菌株は、assembly summary report ファイル (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ASSEMBLY_REPORTS/assembly_summary_refseq.txt) に掲載されている全ての *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌株とした。ただし、*R. pickettii* DTP0602 株をマニュアルで加えた。また *R. solanacearum* BBAC-C1 株は、ゲノムシーケンスカバレッジが低く、解析結果に不明瞭な影響を与えたため、全ての解析から除いた。

4-2-2 解析に使用したデータのダウンロード

Table 4-1 及び 4-2 に示した *Cupriavidus* 属細菌 44 株、及び *Ralstonia* 属細菌 108 株のゲノム配列、GenBank ファイル、protein coding 配列、アミノ酸配列及び RNA 遺伝子配列を、NCBI FTP site (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/>) よりダウンロードした (2018 年 5 月)。

4-2-3 系統樹による解析

系統解析には、MEGA ソフトウェア version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)を使用した。

Table 4-1 オーソログ解析及びBenAとPobAの系統樹解析に使用した菌株

Genus	Species	Strain	Orthology analysis ^a	BenA ^a	PobA ^a
<i>Cupriavidus</i>	<i>basilensis</i>	4G11	+	+	+
	<i>gilardii</i>	CR3	+	-	-
	<i>metallidurans</i>	CH34	+	+	+
	<i>necator</i>	H16	+	+	+
		N-1	+	+	+
		NH9	+	+	+
	<i>pinatubonensis</i>	JMP134	+	+	+
	<i>taiwanensis</i>	LMG19424	+	-	-
	sp.	USMAA1020	+	+	+
		USMAA2-4	+	+	+
<i>Ralstonia</i>		USMAHM13	+	+	+
	<i>insidiosa</i>	FC1138	+	+	+
	<i>mannitolilytica</i>	SN82F48	+	+	+
	<i>pickettii</i>	12D	+	+	+
		12J	+	+	+
		DTP0602	+	+	+
	<i>pseudosolanacearum</i>	RS 476 ^b	+	-	-
	<i>solanacearum</i>	CFBP2957 ^b	+	-	-
		CMR15	+	-	+
		FQY 4	+	-	+
		GMI1000	+	-	+
		Po82	+	+	+
		PSI07	+	+	+

^a「+」は解析に使用した株、「-」は解析に含めなかった(含めることができなかった)株

^b全ゲノム配列を用いた分類には使用していない株

Table 4-2 全ゲノム配列を使用した分類解析に使用した菌株

Genus	Species	Strain	Phylotype Sequevar	# assembly_accession	ANI cluster	TNA cluster
<i>Cupriavidus</i>	<i>alkaliphilus</i>	ASC-732 ^a	-	GCF_900094595.1	3	B
	<i>basilensis</i>	4G11	-	GCF_000832305.1	7	E
		KF708	-	GCF_000876015.1	9	C
		OR16	-	GCF_000243095.1	7	E
	<i>gilardii</i>	CR3	-	GCF_001281465.1	10	I
		JZ4	-	GCF_001658125.1	10	I
	<i>metallidurans</i>	CH34 ^a	-	GCF_000196015.1	16	L
		Ni-2	-	GCF_002944765.1	16	L
		H1130	-	GCF_000496715.1	16	L
		NA1	-	GCF_000709025.1	16	L
		NA4	-	GCF_000709045.1	16	L
		NBRC 101272	-	GCF_001598775.1	16	L
		NDB3NO24	-	GCF_001543455.1	16	L
		NE12	-	GCF_000709065.1	16	L
	<i>nantongensis</i>	X1 ^a	-	GCF_001598055.1	3	B
	<i>necator</i>	H16	-	GCF_000009285.1	1	D
		N-1 ^a	-	GCF_000219215.1	1	D
		NH9	-	GCF_002011925.2	1	D
		A5-1	-	GCF_000744095.1	2	G
		NBRC 102504	-	GCF_001598755.1	1	D
		PHE3-6	-	GCF_001853325.1	1	D
	<i>oxalaticus</i>	NBRC 13593	-	GCF_001592245.1	4 ^c	B ^c
	<i>pauculus</i>	KF709	-	GCF_000974605.1	15 ^c	K ^c
		UM1	-	GCF_002858765.1	14	J
	<i>pinatubonensis</i>	JMP134	-	GCF_000203875.1	6 ^c	K ^c
	<i>taiwanensis</i>	LMG19424 ^a	-	GCF_000069785.1	3	B
		STM 6018	-	GCF_000472465.1	3	B
		STM6070	-	GCF_000372525.1	3	B
	sp.	USMAA1020	-	GCF_001854325.1	11	A
		USMAA2-4	-	GCF_001854305.1	11	A
		USMAHM13	-	GCF_001854285.1	11	A
		amp6	-	GCF_000426345.1	4	G
		BIS7	-	GCF_000292345.1	17 ^c	K ^c
		D384	-	GCF_001652915.1	14	J
		GA3-3	-	GCF_000389805.1	1	D
		HMR-1	-	GCF_000319775.1	16	L
		HPC(L)	-	GCF_000307735.3	10	I
		IDO	-	GCF_000812465.1	5	G
		OV038	-	GCF_900112215.1	12	H
		OV096	-	GCF_900115455.1	12	H
		SHE	-	GCF_000812445.1	16	L
		SK-3	-	GCF_000611145.1	8	F
		SK-4	-	GCF_000611125.1	1	D
		UYPR2.512	-	GCF_000379565.1	1	D
		WS	-	GCF_000395345.1	9	C
		YR651	-	GCF_900101625.1	13 ^c	K ^c

Table 4-2の続き

Genus	Species	Strain	Phylotype Sequevar	# assembly_accession	ANI cluster	TNA cluster
<i>Ralstonia</i>	<i>insidiosa</i>	ATCC 49129	-	GCF_001663855.1	20	N
		FC1138	-	GCF_001653935.1	20	N
		WCHRI065162	-	GCF_002939165.1	20	N
		WCHRI065437	-	GCF_002939035.1	20	N
	<i>mannitolilytica</i>	SN82F48	-	GCF_000954135.1	19	O
		SN83A39	-	GCF_001628775.1	19	O
		GML-Rals1-TR	-	GCF_002863525.1	19	O
		MRY14-0246	-	GCF_000953875.1	19	O
		WCHRM065694	-	GCF_002939115.1	19	O
		WCHRM065837	-	GCF_002939145.1	19	O
	<i>pickettii</i>	I2D	-	GCF_000023425.1	18	M
		I2J	-	GCF_000020205.1	18	M
		DTP0602	-	GCF_000471925.1	2	G
		FDAARGOS_410	-	GCF_002393485.1	19	O
		52	-	GCF_002849525.1	18	M
		5_7_47FAA	-	GCF_000165085.1	18	M
		ATCC 27511 ^a	-	GCF_000743455.1	18	M
		CW2	-	GCF_000607185.1	18	M
		H2Cu2	-	GCF_001699795.1	18	M
		H2Cu5	-	GCF_001699815.1	18	M
		ICMP-8657	-	GCF_002516395.1	18	M
		NBRC 102503	-	GCF_001544155.1	18	M
		OR214	-	GCF_000372665.1	18	M
		SSH4	-	GCF_000607165.1	18	M
	<i>solanacearum</i>	GMI1000	I-18	GCF_000009125.1	23	P
		CQPS-1	I	GCF_002220465.1	23	P
		EP1	I	GCF_001891105.1	23	P
		FJAT-91	I	GCF_002155245.1	23	P
		FJAT-1458	I	GCF_001887535.1	23	P
		FQY_4	I	GCF_000348545.1	23	P
		Rs-09-161	I	GCF_000671335.1	23	P
		Rs-10-244	I	GCF_000671315.1	23	P
		P781	I-14	GCF_001644865.1	23	P
		UW757	I-14	GCF_001645725.1	23	P
		CaRs-Mep	I	GCF_001855495.1	23	P
		SD54	I	GCF_000430925.2	23	P
		Y45	I	GCF_000223115.1	23	P
		UW25 ^a	IIA-7	GCF_002251695.1	25	P
		Grenada 9-1	IIA-6	GCF_000825845.1	25	P
		B50	IIA-24	GCF_000825785.1	25	P
		IBSBF1900	IIA-24	GCF_001373275.1	25	P
		CIP120	IIA-38	GCF_001644795.1	25	P
		P597	IIA-38	GCF_001644805.1	25	P
		UW551	IIB-1	GCF_002251655.1	25	P
		UY031	IIB-1	GCF_001299555.1	25	P
		IBSBF1503	IIB-4	GCF_001587155.1	25	P
		Po82	IIB-4	GCF_000215325.1	25	P
		UW163	IIB-4	GCF_001587135.1	25	P
		CFBP3858	IIB-1	GCF_001373335.1	25	P
		IPO1609	IIB-1	GCF_001050995.1	25	P
		NCPPB 909	IIB-1	GCF_000710695.1	25	P
		POPS2	IIB-1	GCF_000750585.1	25	P
		RS2	IIB-1	GCF_001373295.1	25	P
		UW365	IIB-1	GCF_001696865.1	25	P
		UW491	IIB-1	GCF_001696845.1	25	P
		NCPPB 282	IIB-2	GCF_000750575.1	25	P
		CFBP1416	IIB-3	GCF_000825925.1	25	P
		CIP417	IIB-3	GCF_000825825.1	25	P
		MolK2	IIB-3	GCF_000212635.3	25	P
		CFBP6783	IIB-4	GCF_001644815.1	25	P
		P673	IIB-4	GCF_000525615.1	25	P
		UW179	IIB-4	GCF_000825805.1	25	P
		23-10BR	IIB-27	GCF_000749995.1	25	P
		CFBP7014	IIB-59	GCF_001373255.1	25	P
		CFIA906	IIB	GCF_000710135.2	25	P

Table 4-2の続き

Genus	Species	Strain	Phylotype Sequevar	# assembly_accession	ANI cluster	TNA cluster
<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>	CMR15	III	GCF_000427195.1	23	P
		CFBP3059	III-48	GCF_001644855.1	23	P
		PSI07 ^a	IV	GCF_000283475.1	24	P
		KACC10709	NA ^b	GCF_001708525.1	23	P
		KACC 10722	NA ^b	GCF_001586135.1	24	P
		OE1-1	NA ^b	GCF_001879565.1	23	P
		RS 488	NA ^b	GCF_002501565.1	25	P
		RS 489	NA ^b	GCF_002549815.1	25	P
		RSCM	NA ^b	GCF_002894285.1	23	P
		SEPPX05	NA ^b	GCF_002162015.1	23	P
		YC40-M	NA ^b	GCF_001663415.1	23	P
		58_RSOL	NA ^b	GCF_001065525.1	20	N
		GEO_6	NA ^b	GCF_002894765.1	25	P
		GEO_55	NA ^b	GCF_002894845.1	25	P
		GEO_57	NA ^b	GCF_002029885.1	25	P
		GEO_81	NA ^b	GCF_002894785.1	25	P
		GEO_96	NA ^b	GCF_002029895.1	25	P
		GEO_99	NA ^b	GCF_002029865.1	25	P
		GEO_230	NA ^b	GCF_002894795.1	25	P
		GEO_304	NA ^b	GCF_002894775.1	25	P
		PSS4	NA ^b	GCF_001876985.1	23	P
		PSS190	NA ^b	GCF_001870825.1	23	P
		PSS216	NA ^b	GCF_001876975.1	23	P
		PSS1308	NA ^b	GCF_001870805.1	23	P
		RD15	NA ^b	GCF_001854265.1	23	P
		Rs-T02	NA ^b	GCF_001484095.1	23	P
		UTT-25	NA ^b	GCF_002930085.1	23	P
		UW24	NA ^b	GCF_001696855.1	25	P
		UW181	NA ^b	GCF_001373315.1	25	P
	sp.	25mfco4.1	-	GCF_900104095.1	14	J
		5_2_56FAA	-	GCF_000227255.2	18	M
		A12	-	GCF_000801955.1	22	N
		AU12-08	-	GCF_000442475.1	20	N
		MD27	-	GCF_001078575.1	21	N
		NFACC01	-	GCF_900115545.1	18	M
		NT80	-	GCF_001485395.1	20	N
		PBA	-	GCF_000272025.1	NA ^{b,c}	K ^c
		UNC404CL21Col	-	GCF_000620465.1	18	M
		UNCCL144	-	GCF_900099845.1	18	M

^aType strains that are proposed in List of prokaryotic names with standing in nomenclature (<http://www.bacterio.net/index.html>).

^bNot assigned.

^cContradictory clusterings between ANI analysis and TNA.

4-2-4 BenA 及び PobA アミノ酸配列による系統解析

BenA と PobA のアミノ酸配列を使用して、系統解析を行った。*Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌以外に、*Klebsiella pneumoniae* 32192 株、*P. xenovoans* LB400 株及び *P. putida* KT2440 株の BenA 及び PobA も加えた。ClustalW により各アミノ酸配列のアラインメントを行い、LG + G 置換モデルを使用した maximum likelihood 法により、系統解析を行った。系統樹のトポロジーを評価するために、1,000 反復のブートストラップ解析を行った。

4-2-5 オーソログ解析による芳香族化合物分解能の推定

3-CB、BA、フェノール、2-、3-、または 4-HBA、2,3-ジヒドロキシ安息香酸、ベンゾニトリル、ベンゾイルギ酸、カテコール分解遺伝子のオーソログ遺伝子は、KEGG データベースを用いて探索した。また BLASTP 解析を用いて、KEGG データベースにアノテーションされなかった遺伝子を探索した。これらの結果より各株の芳香族化合物分解能を推定し、ヒートマップとデンドログラムで可視化した。デンドログラムは完全連結法を用いて、R version 3.4.4 (<https://www.r-project.org/>) により作成した。

4-2-6 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析

Table 4-2 に示した菌株に加え、下記の type strain (*C. basilensis*、*C. gilardii*、*C. oxalaticus*、*C. pauculus*、*C. pinatubonensis*、*R. insidiosa*、*R. mannitolilytica*) の 16S rRNA 遺伝子配列を、NCBI データベースよりダウンロードした。解析に使用した配列情報を、Table 4-3 に示した。ClustalW によりアラインメントを行い、GTR + G 置換モデルを使用した maximum likelihood 法により系統解析を行った。アラインメントには全長の 16S rRNA 遺伝子配列を使用した。が、*C. metallidurans* NE12 株、*C. oxalaticus* NBRC 13593 株、*C. taiwanensis* STM 6018 株、*C. taiwanensis* STM 6070 株、*Cupriavidus* sp. amp6 株、*Cupriavidus* sp. GA3-3 株、*Cupriavidus* sp. IDO 株、

Table 4-3 系統解析に使用した配列

Genus	Species	Strain	Accession number			
			16S rRNA	apd	gyrB	leuS
<i>Cupriavidus</i>	<i>alkaliphilus</i>	ASC-732 ^T	NZ_FNAD01000025.1	NZ_FNAD01000014.1	NZ_FNAD01000010.1	NZ_FNAD0100001.1
	<i>basilisensis</i>	LMG 18990 ^T	AF312022.1	-	-	-
	4G11	NZ_CP010536.1	NZ_CP010536.1	NZ_CP010536.1	NZ_CP010536.1	NZ_CP010536.1
	KF708	NZ_BBQ01000049.1	NZ_BBQ01000049.1	NZ_BBQ01000007.1	NZ_BBQ01000022.1	NZ_BBQ01000034.1
<i>glandii</i>	OR16	NZ_AHJE01000064.1	NZ_AHJE01000064.1	NZ_AHJE01000017.1	NZ_AHJE01000087.1	NZ_AHJE01000020.1
	LMG 5886 ^T	AF076645.1	-	-	-	-
	CR3	NZ_CP010516.1	NZ_CP010516.1	NZ_CP010516.1	NZ_CP010516.1	NZ_CP010516.1
	JZ4	NZ_LVXY01000022.1	NZ_LVXY01000003.1	NZ_LVXY01000003.1	NZ_LVXY01000007.1	NZ_LVXY01000011.1
<i>metallidurans</i>	CH34 ^T	NC_007973.1	NC_007973.1	NC_007973.1	NC_007973.1	NC_007973.1
	N1-2	NZ_CP026544.1	NZ_CP026544.1	NZ_CP026544.1	NZ_CP026544.1	NZ_CP026544.1
	H1130	NZ_AXBU01000001.1	NZ_AXBU01000006.1	NZ_AXBU01000006.1	NZ_AXBU01000010.1	NZ_AXBU01000081.1
	NA1	NZ_JFZD01000042.1	NZ_JFZD01000025.1	NZ_JFZD01000020.1	NZ_JFZD01000071.1	NZ_JFZD01000036.1
	NA4	NZ_JFZE01000060.1	NZ_JFZE01000020.1	NZ_JFZE01000020.1	NZ_JFZE01000033.1	NZ_JFZE01000051.1
	NBRC 101272	NZ_BCZO01000040.1	NZ_BCZO01000012.1	NZ_BCZO01000003.1	NZ_BCZO01000006.1	NZ_BCZO01000011.1
	NDB3NO24	NZ_LQAD01000022.1	NZ_LQAD01000022.1	NZ_LQAD01000022.1	NZ_LQAD01000020.1	NZ_LQAD01000002.1
	NE12	NZ_JFZF01000060.1	NZ_JFZF01000060.1	NZ_JFZF01000010.1	NZ_JFZF01000077.1	NZ_JFZF01000007.1
<i>nantongensis</i>	X1 ^T	NZ_CP014844.1	NZ_CP014844.1	NZ_CP014844.1	NZ_CP014844.1	NZ_CP014844.1
	H16	NC_008313.1	NC_008313.1	NC_008313.1	NC_008313.1	NC_008313.1
	N-1 ^T	NC_015726.1	NC_015726.1	NC_015726.1	NC_015726.1	NC_015726.1
	NH9	CP017757.2	CP017757.2	CP017757.2	CP017757.2	CP017757.2
	A5-1	NZ_JQLJ01000003.1	NZ_JQLJ01000008.1	NZ_JQLJ01000008.1	NZ_JQLJ01000008.1	NZ_JQLJ01000003.1
	NBRC 102504	NZ_BCZN01000114.1	NZ_BCZN01000067.1	NZ_BCZN01000033.1	NZ_BCZN01000018.1	NZ_BCZN01000044.1
	PHE3-6	NZ_LVWN01000084.1	NZ_LVWN01000042.1	NZ_LVWN01000026.1	NZ_LVWN01000072.1	NZ_LVWN01000041.1
	LMG 2235 ^T	AF155567.1	-	-	-	-
<i>oxalaticus</i>	NBRC 13593	-	NZ_BCWO01000026.1	NZ_BCWO01000020.1	NZ_BCWO01000036.1	NZ_BCWO01000030.1
	LMG 3244 ^T	AF085226.1	-	-	-	-
	KF709	NZ_BBQN01000185.1	NZ_BBQN01000008.1	NZ_BBQN01000047.1	NZ_BBQN01000021.1	NZ_BBQN01000029.1
	UM1	NZ_PIRP01000002.1	NZ_PIRP01000001.1	NZ_PIRP01000001.1	NZ_PIRP01000002.1	NZ_PIRP01000002.1
<i>pinambonensis</i>	1245 ^T	AB121221.1	-	-	-	-
	JMP134	NC_007347.1	NC_007347.1	NC_007347.1	NC_007347.1	NC_007347.1
	LMG19424 ^T	NC_010528.1	NC_010528.1	NC_010528.1	NC_010528.1	NC_010528.1
	STM 6018	-	NZ_AXAK01000016.1	NZ_AXAK01000012.1	NZ_AXAK01000005.1	NZ_AXAK01000014.1
sp.	STM6070	NZ_CP017754.1	NZ_AQUR01000095.1	NZ_AQUR01000099.1	NZ_AQUR01000096.1	NZ_AQUR01000083.1
	USMAA1020	NZ_CP017754.1	NZ_CP017754.1	NZ_CP017754.1	NZ_CP017754.1	NZ_CP017754.1
	USMAA2-4	NZ_CP017748.1	NZ_CP017748.1	NZ_CP017748.1	NZ_CP017748.1	NZ_CP017748.1
	USMAHM13	NZ_CP017751.1	NZ_CP017751.1	NZ_CP017751.1	NZ_CP017751.1	NZ_CP017751.1
	amp6	-	NZ_AUFE01000011.1	NZ_AUFE01000011.1	NZ_AUFE01000025.1	NZ_AUFE01000022.1
	Bis7	NZ_ALOU01000103.1	NZ_ALOU01000049.1	NZ_ALOU01000098.1	NZ_ALOU01000060.1	NZ_ALOU01000064.1
	D384	NZ_BBQ01000113.1	NZ_BBQ01000059.1	NZ_BBQ01000024.1	NZ_BBQ01000009.1	NZ_BBQ01000005.1
	GA3-3	-	NZ_KB944501.1	NZ_KB944501.1	NZ_KB944461.1	NZ_KB944467.1
	HMR-1	NZ_ANKP01000124.1	NZ_ANKP01000232.1	NZ_ANKP01000123.1	NZ_ANKP01000027.1	NZ_ANKP01000042.1
	HPC(L)	NZ_AMPR02000205.1	NZ_AMPR0200157.1	NZ_AMPR0200257.1	NZ_AMPR0200017.1	NZ_AMPR02000427.1
	IDO	-	NZ_JWMA01000044.1	NZ_JWMA01000044.1	NZ_JWMA01000190.1	NZ_JWMA01000007.1
	OV038	NZ_FOKX01000025.1	NZ_FOKX01000015.1	NZ_FOKX01000006.1	NZ_FOKX01000012.1	NZ_FOKX01000031.1
	OV096	NZ_FOWM01000024.1	NZ_FOWM01000014.1	NZ_FOWM01000002.1	NZ_FOWM01000011.1	NZ_FOWM01000012.1
	SHE	NZ_JWMB01000057.1	NZ_JWMB01000008.1	NZ_JWMB01000004.1	NZ_JWMB01000001.1	NZ_JWMB01000060.1
	SK-4	NZ_JFJW02000241.1	NZ_JFJW01000144.1	NZ_JFJW01000050.1	NZ_JFJW01000036.1	NZ_JFJW01000047.1
	UYPR2.512	NZ_JFJW01000221.1	NZ_KB903142.1	NZ_KB903165.1	NZ_KB903042.1	NZ_KB903162.1
	WS	NZ_AQPL01000608.1	NZ_AQPL01000011.1	NZ_AQPL01000246.1	NZ_AQPL01000523.1	NZ_AQPL01000217.1
	YR651	NZ_FMYZ01000040.1	NZ_FMYZ01000006.1	NZ_FMYZ01000006.1	NZ_FMYZ01000001.1	NZ_FMYZ01000031.1

Table 4.3の続き

Genus	Species	Strain	16S rRNA	atpD	grrB	lucS	rplB
<i>Ralstonia</i>	<i>insidiosa</i>	LMG 21421 ^T	AF488779.1	-	-	-	-
		ATCC 49129	NZ_CP016022.1	NZ_CP016022.1	NZ_CP016022.1	NZ_CP016022.1	NZ_CP016022.1
		FC1138	NZ_CP012605.1	NZ_CP012605.1	NZ_CP012605.1	NZ_CP012605.1	NZ_CP012605.1
		WCHRI065162	NZ_PKPC01000027.1	NZ_PKPC01000010.1	NZ_PKPC01000015.1	NZ_PKPC01000013.1	NZ_PKPC01000011.1
		WCHRI065437	NZ_PKPB01000025.1	NZ_PKPB01000004.1	NZ_PKPB01000004.1	NZ_PKPB01000005.1	NZ_PKPB01000007.1
	<i>mannitolilytica</i>	LMG 6866 ^T	AJ270258.1	-	-	-	-
		SN82F48	NZ_CP010799.1	NZ_CP010799.1	NZ_CP010799.1	NZ_CP010799.1	NZ_CP010799.1
		SN83A39	NZ_CP011257.1	NZ_CP011257.1	NZ_CP011257.1	NZ_CP011257.1	NZ_CP011257.1
		GML-Rab1-TR	NZ_PJFY01000001.1	NZ_PJFY01000003.1	NZ_PJFY01000003.1	NZ_PJFY01000001.1	NZ_PJFY01000001.1
		MRY14-0246	NZ_BBUP01000006.1	NZ_BBUP01000006.1	NZ_BBUP01000006.1	NZ_BBUP01000006.1	NZ_BBUP01000007.1
<i>pickettii</i>	<i>WCHRM065694</i>	WCHRM065694	NZ_PKPD01000033.1	NZ_PKPD01000010.1	NZ_PKPD01000011.1	NZ_PKPD01000006.1	NZ_PKPD01000019.1
		WCHRM065837	NZ_PKPA01000024.1	NZ_PKPA01000009.1	NZ_PKPA01000010.1	NZ_PKPA01000003.1	NZ_PKPA01000008.1
		12D	NC_012856.1	NC_012856.1	NC_012856.1	NC_012856.1	NC_012856.1
		12J	NC_010682.1	NC_010682.1	NC_010682.1	NC_010682.1	NC_010682.1
		DTP0602	NC_022513.1	NC_022513.1	NC_022513.1	NC_022513.1	NC_022513.1
	<i>FDAARGOS_410</i>	52	NZ_CP023537.1	NZ_CP023537.1	NZ_CP023537.1	NZ_CP023537.1	NZ_CP023537.1
		5_7_47FAA	NZ_PKQE01000012.1	NZ_PKQE01000001.1	NZ_PKQE01000001.1	NZ_PKQE01000004.1	NZ_PKQE01000007.1
		ATCC 27511 ^T	NZ_GL52031.1	NZ_GL52018.1	NZ_GL52018.1	NZ_GL52020.1	NZ_GL52024.1
		CW2	NZ_KN050646.1	NZ_KN050646.1	NZ_KN050646.1	NZ_KN050646.1	NZ_KN050646.1
		H2Cu2	NZ_JFZH01000014.1	NZ_JFZH01000030.1	NZ_JFZH01000030.1	NZ_JFZH01000004.1	NZ_JFZH01000017.1
<i>solanacearum</i>	<i>ICMP-8657</i>	H2Cu5	NZ_MCGA01000016.1	NZ_MCGA01000020.1	NZ_MCGA01000031.1	NZ_MCGA01000031.1	NZ_MCGA01000031.1
		OR214	NZ_MCGB01000107.1	NZ_MCGB01000106.1	NZ_MCGB01000086.1	NZ_MCGB01000061.1	NZ_MCGB01000069.1
		SSH4	NZ_NREQ02000002.1	NZ_NREQ02000002.1	NZ_NREQ02000002.1	NZ_NREQ02000002.1	NZ_NREQ02000002.1
		GM11000	NZ_BC PW01000044.1	NZ_BC PW01000015.1	NZ_BC PW01000005.1	NZ_BC PW01000009.1	NZ_BC PW01000009.1
		CQPS-1	NZ_APMQ01000039.1	NZ_APMQ01000003.1	NZ_APMQ01000003.1	NZ_APMQ01000015.1	NZ_APMQ01000015.1
	<i>EpI</i>	EpI	NZ_JFZG01000019.1	NZ_JFZG01000008.1	NZ_JFZG01000008.1	NZ_JFZG01000026.1	NZ_JFZG01000020.1
		FIAT-91	NC_003295.1	NC_003295.1	NC_003295.1	NC_003295.1	NC_003295.1
		FOY_4	NZ_CP016914.1	NZ_CP016914.1	NZ_CP016914.1	NZ_CP016914.1	NZ_CP016914.1
		Rs-09-161	NZ_CP015115.1	NZ_CP015115.1	NZ_CP015115.1	NZ_CP015115.1	NZ_CP015115.1
		P781	NZ_CP016612.1	NZ_CP016612.1	NZ_CP016612.1	NZ_CP016612.1	NZ_CP016612.1
<i>solanacearum</i>	<i>CaRs-Mep</i>	SD 54	NZ_CP016554.1	NZ_CP016554.1	NZ_CP016554.1	NZ_CP016554.1	NZ_CP016554.1
		UW757	NC_020799.1	NC_020799.1	NC_020799.1	NC_020799.1	NC_020799.1
		Y45	NZ_CM002757.1	NZ_CM002757.1	NZ_CM002757.1	NZ_CM002757.1	NZ_CM002757.1
		UW25 ^T	NZ_CM002755.1	NZ_CM002755.1	NZ_CM002755.1	NZ_CM002755.1	NZ_CM002755.1
		Grenada 9-1	NZ_JXLK01000128.1	NZ_JXLK01000141.1	NZ_JXLK01000113.1	NZ_JXLK01000119.1	NZ_JXLK01000119.1
	<i>B50</i>	B50	NZ_LEJP01000112.1	NZ_LEJP01000060.1	NZ_LEJP01000001.1	NZ_LEJP01000040.1	NZ_LEJP01000042.1
		IBSBF1900	NZ_MCBM01000159.1	NZ_MCBM01000006.1	NZ_MCBM01000053.1	NZ_MCBM01000005.1	NZ_MCBM01000070.1
		CIP120	NZ_ASQR02000153.1	NZ_ASQR02000040.1	NZ_ASQR02000041.1	NZ_ASQR02000153.1	NZ_ASQR02000153.1
		P597	NZ_AFWL01000007.1	NZ_AFWL01000007.1	NZ_AFWL01000014.1	NZ_AFWL01000153.1	NZ_AFWL01000263.1
		UW551	NZ_NCTK01000001.1	NZ_NCTK01000001.1	NZ_NCTK01000001.1	NZ_NCTK01000001.1	NZ_NCTK01000001.1
<i>solanacearum</i>	<i>UW031</i>	UW031	NZ_CD LW01000001.1	NZ_CD LW01000001.1	NZ_CD LW01000001.1	NZ_CD LW01000001.1	NZ_CD LW01000001.1
		IBSBF1503	NZ_CDMA01000001.1	NZ_CDMA01000001.1	NZ_CDMA01000001.1	NZ_CDMA01000001.1	NZ_CDMA01000001.1
		P082	NZ_CDRW01000001.1	NZ_CDRW01000001.1	NZ_CDRW01000001.1	NZ_CDRW01000001.1	NZ_CDRW01000001.1
		UW163	NZ_JXAY01000009.1	NZ_JXAY01000060.1	NZ_JXAY01000060.1	NZ_JXAY01000054.1	NZ_JXAY01000009.1
		UW551	NZ_JIBY01000037.1	NZ_JIBY01000010.1	NZ_JIBY01000001.1	NZ_JIBY01000054.1	NZ_JIBY01000037.1
	<i>UW031</i>	UW031	NZ_NCTT01000001.1	NZ_NCTT01000001.1	NZ_NCTT01000001.1	NZ_NCTT01000001.1	NZ_NCTT01000001.1
		IBSBF1503	NZ_CP012687.1	NZ_CP012687.1	NZ_CP012687.1	NZ_CP012687.1	NZ_CP012687.1
		P082	NZ_CP012943.1	NZ_CP012943.1	NZ_CP012943.1	NZ_CP012943.1	NZ_CP012943.1
		UW163	NC_017574.1	NC_017574.1	NC_017574.1	NC_017574.1	NC_017574.1
		UW163	NZ_CP012939.1	NZ_CP012939.1	NZ_CP012939.1	NZ_CP012939.1	NZ_CP012939.1

Table 4-3の続き

Genus	Species	Strain	Accession number			
			16S rRNA	atpD	gylB	lsmS
<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>	CFBP3858	NZ_CDOJ01000001.1	NZ_CDOJ01000001.1	NZ_CDOJ01000001.1	NZ_CDOJ01000001.1
		IPO1609	NZ_LN651282.1	NZ_LN651282.1	NZ_LN651282.1	NZ_LN651282.1
		NCPPB 909	NZ_JNGD01000055.1	NZ_JNGD0100034.1	NZ_JNGD0100015.1	NZ_JNGD0100040.1
		POF52	NZ_JOSI01000196.1	NZ_JOSI0100038.1	NZ_JOSI0100049.1	NZ_JOSI0100045.1
		RS2	NZ_CDRX01000001.1	NZ_CDRX0100001.1	NZ_CDRX0100001.1	NZ_CDRX0100001.1
		UW365	NZ_LVKS01000005.1	NZ_LVKS0100003.1	NZ_LVKS0100001.1	NZ_LVKS0100022.1
		UW491	NZ_LVKU01000013.1	NZ_LVKU01000048.1	NZ_LVKU01000027.1	NZ_LVKU0100006.1
		NCPPB 282	NZ_JQSH01000011.1	NZ_JQSH0100008.1	NZ_JQSH0100034.1	NZ_JQSH0100062.1
		CFBP1416	NZ_CDLX01000001.1	NZ_CDLX0100001.1	NZ_CDLX0100001.1	NZ_CDLX0100001.1
		CIP417	NZ_CDMD01000001.1	NZ_CDMD0100001.1	NZ_CDMD0100001.1	NZ_CDMD0100001.1
		MoK2	NZ_CAHW0200006.1	NZ_CAHW0200054.1	NZ_CAHW0200310.1	NZ_CAHW0200332.1
		CFBP6783	NZ_JXAZ01000012.1	NZ_JXAZ0100003.1	NZ_JXAZ0100001.1	NZ_JXAZ0100002.1
		P673	-	NZ_JAL001000005.1	NZ_JAL00100001.1	NZ_JAL00100002.1
		UW179	NZ_CDLZ01000001.1	NZ_CDLZ0100001.1	NZ_CDLZ0100001.1	NZ_CDLZ0100001.1
		23-10BR	NZ_JQOI01000063.1	NZ_JQOI0100001.1	NZ_JQOI0100001.1	NZ_JQOI0100002.1
		CFBP7014	NZ_CDRJ01000001.1	NZ_CDRJ0100001.1	NZ_CDRJ0100001.1	NZ_CDRJ0100001.1
		CFIA906	NZ_JNVJ03000128.1	NZ_JNVJ0300050.1	NZ_JNVJ0300053.1	NZ_JNVJ0300048.1
		CMR15	NC_017559.1	NC_017559.1	NC_017559.1	NC_017559.1
		CFBP3059	NZ_JXBA010000296.1	NZ_JXBA01000005.1	NZ_JXBA01000217.1	NZ_JXBA01000024.1
		PSI07	NC_014311.1	NC_014311.1	NC_014311.1	NC_014311.1
		KACC10709	NZ_CP016904.1	NZ_CP016904.1	NZ_CP016904.1	NZ_CP016904.1
		KACC 10722	NZ_CP014702.1	NZ_CP014702.1	NZ_CP014702.1	NZ_CP014702.1
		OEL1	NZ_CP009764.1	NZ_CP009764.1	NZ_CP009764.1	NZ_CP009764.1
		RS 488	NZ_CP021652.1	NZ_CP021652.1	NZ_CP021652.1	NZ_CP021652.1
		RS 489	NZ_CP021766.1	NZ_CP021766.1	NZ_CP021766.1	NZ_CP021766.1
		RSCM	NZ_CP025985.1	NZ_CP025985.1	NZ_CP025985.1	NZ_CP025985.1
		SEPPX05	NZ_CP021448.1	NZ_CP021448.1	NZ_CP021448.1	NZ_CP021448.1
		YC40-M	NZ_CP015850.1	NZ_CP015850.1	NZ_CP015850.1	NZ_CP015850.1
		58_RSOL	NZ_JVB010000203.1	NZ_JVB01000020.1	NZ_JVB01000155.1	NZ_JVB01000215.1
		GEO 6	NZ_PHHM01000103.1	NZ_PHHM0100066.1	NZ_PHHM0100037.1	NZ_PHHM0100039.1
		GEO 35	NZ_PHHP01000167.1	NZ_PHHP0100066.1	NZ_PHHP0100034.1	NZ_PHHP0100018.1
		GEO 57	NZ_MXAM01000054.1	NZ_MXAM0100051.1	NZ_MXAM0100047.1	NZ_MXAM0100028.1
		GEO 81	NZ_PHHN01000120.1	NZ_PHHN0100036.1	NZ_PHHN0100037.1	NZ_PHHN0100041.1
		GEO 96	NZ_MZNA01000062.1	NZ_MZNA0100027.1	NZ_MZNA0100020.1	NZ_MZNA0100050.1
		GEO 99	NZ_MZNB01000099.1	NZ_MZNB0100011.1	NZ_MZNB0100025.1	NZ_MZNB0100002.1
		GEO 230	NZ_PHHL01000099.1	NZ_PHHL0100002.1	NZ_PHHL0100034.1	NZ_PHHL0100024.1
		GEO 304	NZ_PHHO01000091.1	NZ_PHHO0100011.1	NZ_PHHO0100066.1	NZ_PHHO0100020.1
		PS84	NZ_KV863253.1	NZ_KV863199.1	NZ_KV86326.1	NZ_KV863209.1
		PS8190	NZ_MOLP01000122.1	NZ_MOLP0100020.1	NZ_MOLP0100038.1	NZ_MOLP0100028.1
		PS8216	NZ_KV863064.1	NZ_KV862975.1	NZ_KV86298.1	NZ_KV862986.1
		PS81308	NZ_MOL001000035.1	NZ_MOL00100014.1	NZ_MOL001000046.1	NZ_MOL00100035.1
		RD15	NZ_KV841690.1	NZ_KV841645.1	NZ_KV841633.1	NZ_KV841641.1
		Rs-T02	NZ_LKVH01000111.1	NZ_LKVH0100006.1	NZ_LKVH0100045.1	NZ_LKVH0100053.1
		UTT-25	NZ_PPF010000934.1	NZ_PPF01000039.1	NZ_PPF0100026.1	NZ_PPF0100038.1
		UW24	NZ_LVKT01000062.1	NZ_LVKT0100018.1	NZ_LVKT0100094.1	NZ_LVKT0100105.1
		UW181	NZ_CDSB01000001.1	NZ_CDSB0100001.1	NZ_CDSB0100001.1	NZ_CDSB0100001.1
sp.		25meca4.1	NZ_FNU001000044.1	NZ_FNU001000015.1	NZ_FNU001000009.1	NZ_FNU001000011.1
		5_2_56FAA	NZ_JH815236.1	NZ_JH815236.1	NZ_JH815236.1	NZ_JH815240.1
		A12	NZ_JSZ001000010.1	NZ_JSZ001000009.1	NZ_JSZ00100004.1	NZ_JSZ001000013.1
		AUI2-08	NZ_ASZV01000067.1	NZ_ASZV0100047.1	NZ_ASZV0100035.1	NZ_ASZV0100052.1
		MD27	NZ_LFZM01000043.1	NZ_LFZM0100003.1	NZ_LFZM0100018.1	NZ_LFZM0100027.1
		NEACC01	NZ_FOWV01000025.1	NZ_FOWV0100012.1	NZ_FOWV0100007.1	NZ_FOWV0100010.1
		NT80	NZ_BBQS01000001.1	NZ_BBQS0100008.1	NZ_BBQS0100073.1	NZ_BBQS0100018.1
		PBA	NZ_AKCV01000044.1	NZ_AKCV0100023.1	NZ_AKCV0100002.1	NZ_AKCV0100036.1
		UNC-40C1.2 Col	NZ_JIBE01000001.1	NZ_JIBE0100003.1	NZ_JIBE0100003.1	NZ_JIBE0100007.1
		UNCCL144	NZ_FMTI01000043.1	NZ_FMTI0100004.1	NZ_FMTI0100004.1	NZ_FMTI0100005.1
<i>Paraburkholderia</i>	<i>xenovorans</i>	LB400	NZ_CP008760.1	NZ_CP008760.1	NZ_CP008760.1	NZ_CP008760.1

Cupriavidus sp. UYPR2.512 株、*R. solanacearum* P673 株、*R. solanacearum* Y45 株、*R. solanacearum* Rs-10-244 株は部分的な配列しか利用できない状態であったため、解析に含めなかった。アラインメント後、全ての gap を取り除き、最終的には 1,386 bp の共通配列を解析に使用した。*P. xenovorans* LB400 株の 16S rRNA 遺伝子配列を、outgroup に使用した。また系統樹のトポロジーを評価するために、1,000 反復のブートストラップ解析を行った。

4-2-7 Multilocus Sequence Analysis (MLSA) による系統解析

MLSA による系統解析を行うために、全ての *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌が持っていると考えられる single-copy housekeeping 遺伝子を探した。その結果、*Cupriavidus* sp. SK-3 株以外の全ての株が、*atpD* (ATP 生成酵素 F0F1 遺伝子の β -サブユニット)、*leuS* (ロイシン-tRNA 合成酵素遺伝子)、*rplB* (50S リボソームタンパク質 L2 遺伝子)、*gyrB* (DNA ジャイレース遺伝子の β サブユニット) を有していたため、MLSA に使用した。なお *leuS*、*rplB*、*gyrB* 遺伝子は、*R. solanacearum* の MLSA 解析にも使用されていた (Zhang and Qiu, 2016)。解析に使用した配列情報を、Table 4-3 に示した。遺伝子ごとに ClustalW でアラインメントを行い、全ての gap を取り除いて、*atpD*–*leuS*–*rplB*–*gyrB* の順番につなげた。各遺伝子、及び全遺伝子をつなげた配列の長さは次の通りである：*atpD* (1,278 bp)、*leuS* (2,571 bp)、*rplB* (822 bp)、*gyrB* (1,662 bp)、全遺伝子をつなげた配列 (6,333 bp)。それ以外の方法は、4-2-6 に準じた。

4-2-8 ANI による種分類解析

全ゲノム配列を使用して、ANI 解析を行った。ANI 解析の方法の概要を、Fig. 4-1 に示した。ANI の計算には *enveomics* collection の *ani.rb* スクリプト (Rodriguez and Konstantinidis, 2016) を使用し、2 株間の ANI の算出を総当たりで行って、ヒートマップとデンドログラムで可視化した。デンドログラムは、群平均法 (Unweighted pair group method using arithmetic averages : UPGMA) 及び (1-ANI) の距離行列を用いて、R により作成した。

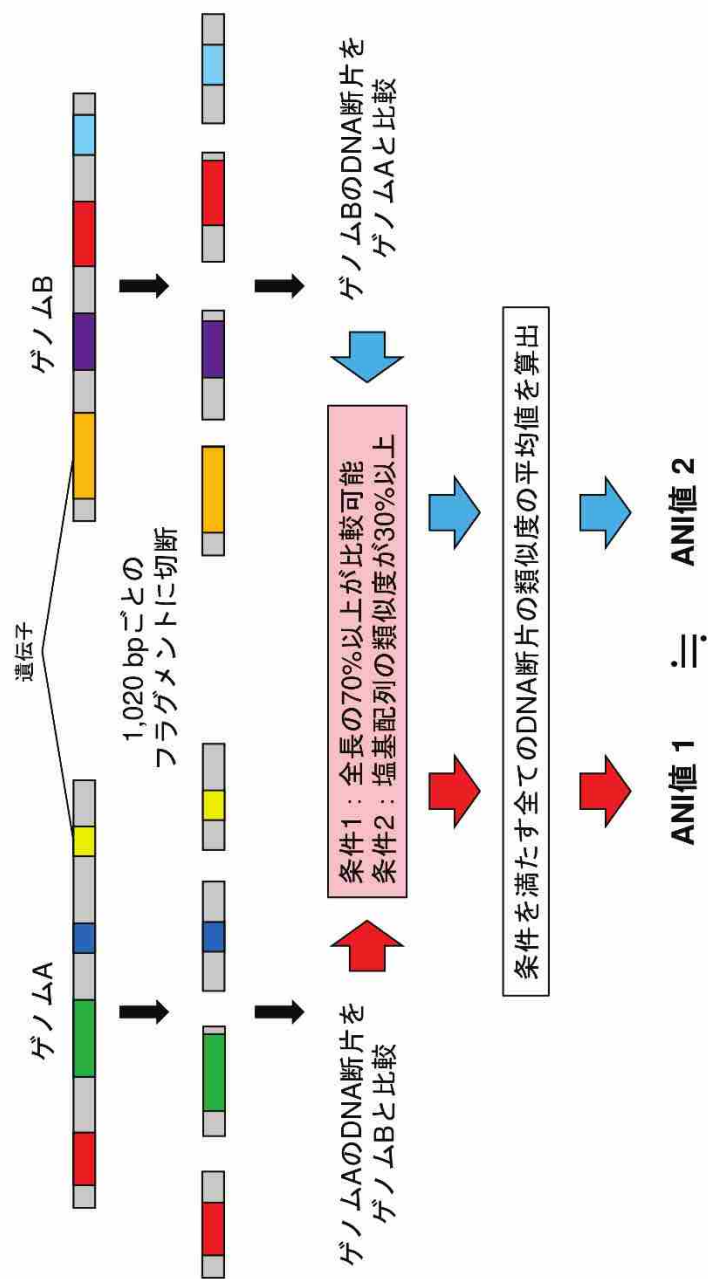


Fig. 4-1 Average nucleotide identity解析の計算方法
通常ANI値95-96%が、DNA-DNAハイブリダイゼーションの70%（同種の境界）に相当する。

4-2-9 Tetra-nucleotide analysis (TNA) による分類解析

全ゲノム配列中における4連塩基の出現頻度を、EMBOSS パッケージの compseq プログラム (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/compseq.html>) を使用して計算した。解析方法を、Fig. 4-2 に示した。256通りの全ての4連塩基の出現頻度を使用してRにより主成分分析を行い、さらにrglパッケージを使用して3次元プロットで可視化した。

4-2-10 Percentage of conserved proteins (POCP) による属分類解析

Harris らのスクリプト (Harris *et al.*, 2017) を使用し、POCP 解析 (Qin *et al.*, 2014) を行った。POCP 値の計算式は、下記の通りとした。 $E\text{-value} < 1e^{-5}$ 、sequence identity $\geq 40\%$ 、クエリー配列のアラインメント領域 $\geq 50\%$ を満たすものを、保存されたタンパク質と定義した。株ごとに、*Cupriavidus* 属細菌と比較した平均 POCP 値、及び *Ralstonia* 属細菌と比較した平均 POCP 値を算出した。

$$\text{POCP 値 (\%)} = \frac{C1 + C2}{T1 + T2} \times 100$$

$C1, C2$. . . 各株で保存されたタンパク質の数
 $T1, T2$. . . 各株の全タンパク質の数

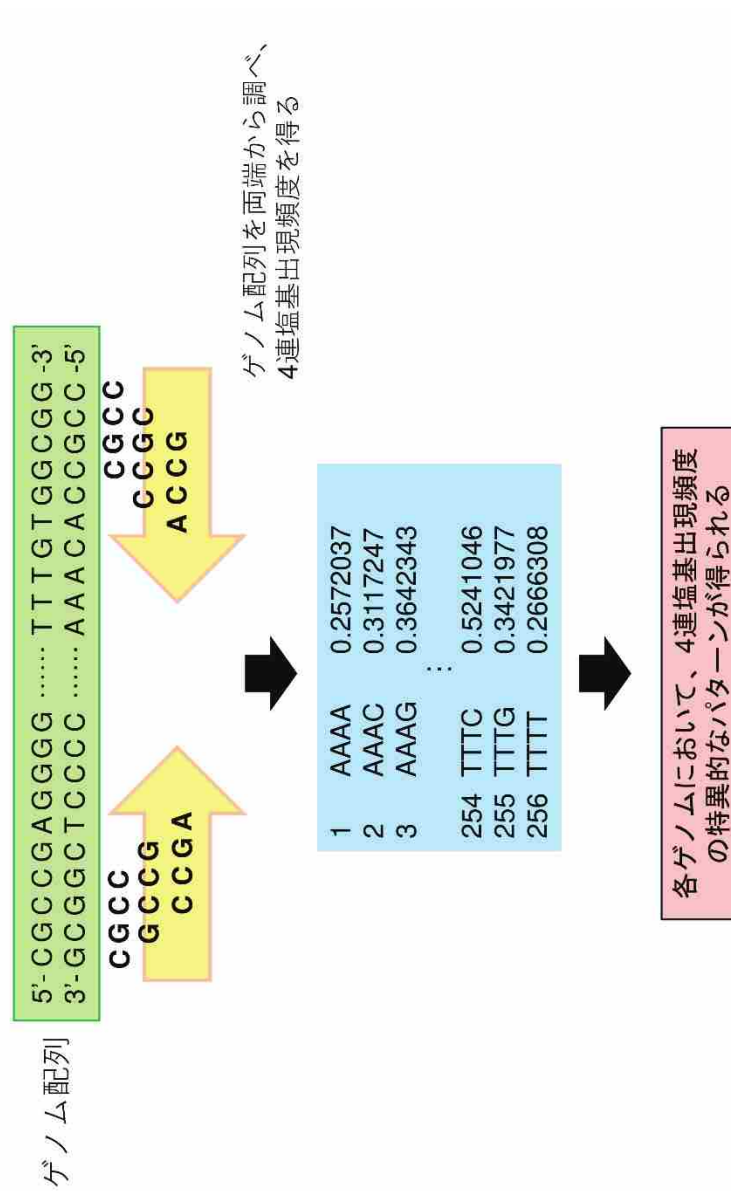


Fig. 4-2 Tetra-nucleotide analysisの解析方法
 得られた256通りの4連塩基の出現頻度を使用して、主成分分析を行った。

4-3 結果

4-3-1 BenA 及び PobA アミノ酸配列による系統解析

BenA 及び PobA アミノ酸配列による系統解析の結果をそれぞれ、Fig. 4-3、4-4 に示した。両系統樹ともに大きく 2 つのクラスターに別れたが、系統関係と一致していなかった。特に BenA に関しては、*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属細菌株が入り混じっていた。また *Klebsiella* 属、*Pseudomonas* 属、*Paraburkholderia* 属細菌が、*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属細菌のクラスターの外群に位置することはなかった。なお NH9 株は、*C. necator* H16 株、N-1 株と同じクラスターに位置していた。

4-3-2 推定芳香族化合物分解能と分類の関連性

オーソログ解析の結果、*Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌の芳香族化合物分解能を推定した (Fig. 4-5)。大きく 2 つのクラスターに別れたが、推定芳香族化合物分解能と菌株の系統関係は一致していなかった。

4-3-3 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析

16S rRNA 遺伝子配列による系統樹を、Fig. 4-6 に示した。*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属は大きく 2 つのクラスターに分かれ、*Ralstonia* sp. PBA 株はどちらのクラスターにも属さなかった (Fig. 4-6A)。*Cupriavidus* 属の系統樹には多くのクラスターがあり、また 2 株の *Ralstonia* 属細菌が含まれていた (Fig. 4-6B)。*R. pickettii* DTP0602 株は *C. necator* (type strain は *C. necator* N-1^T 株) クラスター、*Ralstonia* sp. 25mfc04.1 株は *Cupriavidus* sp. を構成するクラスターに分類された。*C. pinatubonensis* JMP134 株と *C. pinatubonensis* 1245^T 株は 99.6% の 16S rRNA 配列の similarity があり、ホモログなグループを形成していた。これは、以前の報告と矛盾していなかった (Sato *et al.*, 2006)。*C. oxalaticus*、*C. taiwanensis*、*C. nantongensis*、*C. alkaliphilus* の 4 株は 1 つのクラスターに含まれていた。これらの 16S rRNA 遺伝子配列の similarity は > 97.2% であり、特に *C.*

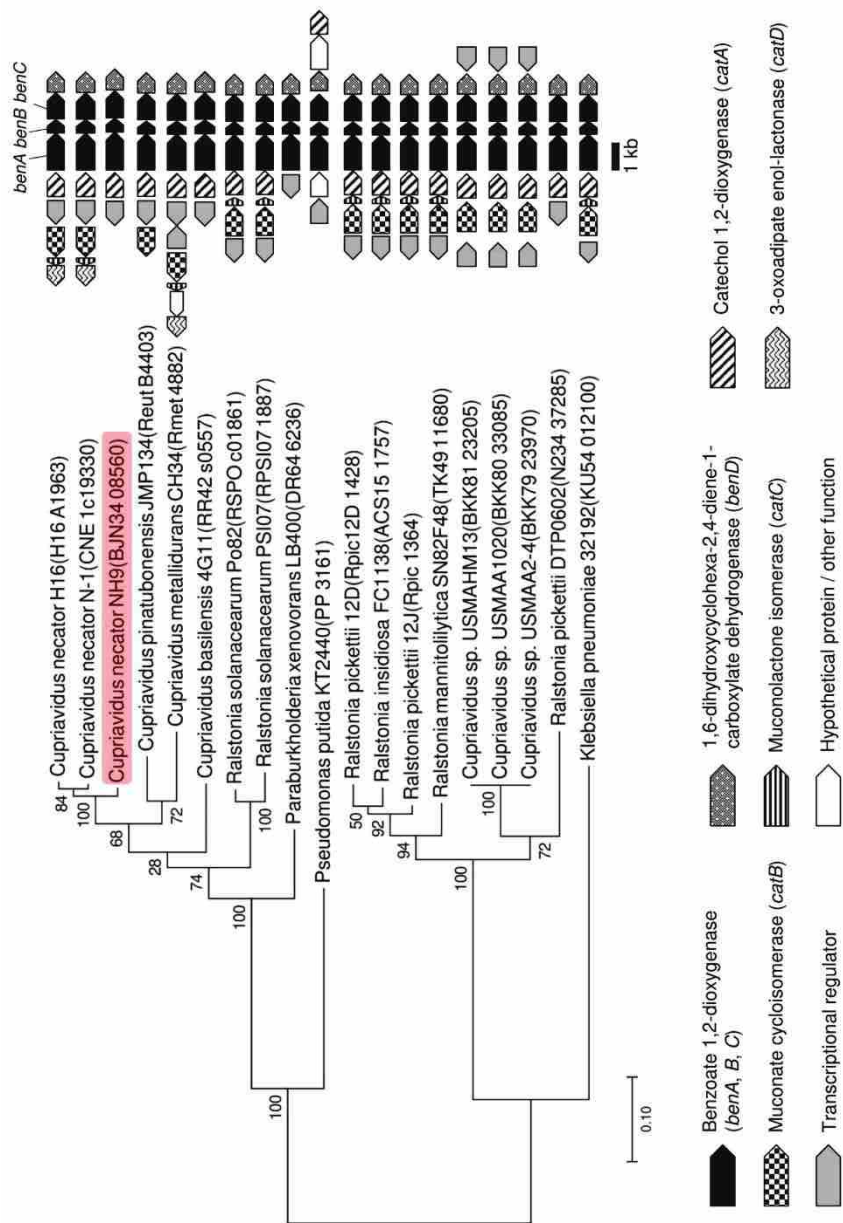


Fig. 4-3 BenA アミノ酸配列による系統樹解析
Maximum likelihood法により、系統樹解析を行った。系統樹の右側に、各菌株が持っている *benA* 及びBA分解に関わる周囲の遺伝子図を示した。NH9株を赤色で示した。

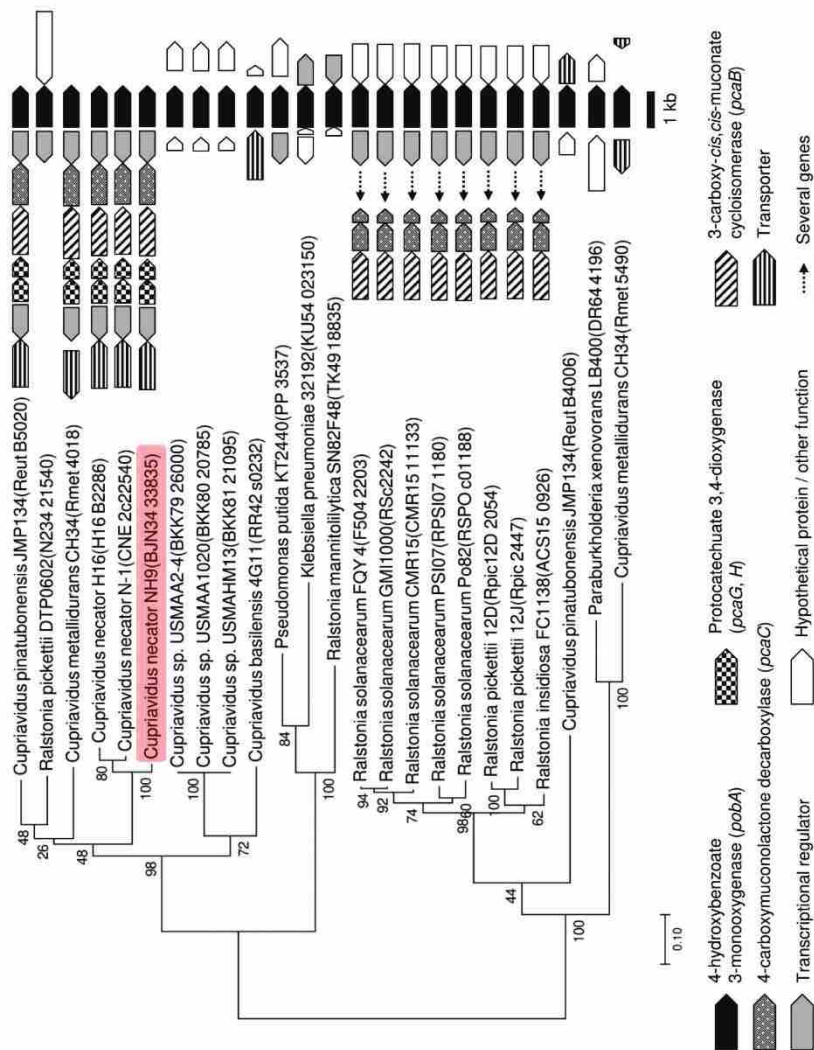


Fig. 4-4 *pobA* アミノ酸配列による系統樹解析
Maximum likelihood法により、系統樹解析を行った。系統樹の右側に、各菌株が持っている *pobA* 及び4-HBA分解に関わる周囲の遺伝子図を示した。NH9株を赤色で示した。

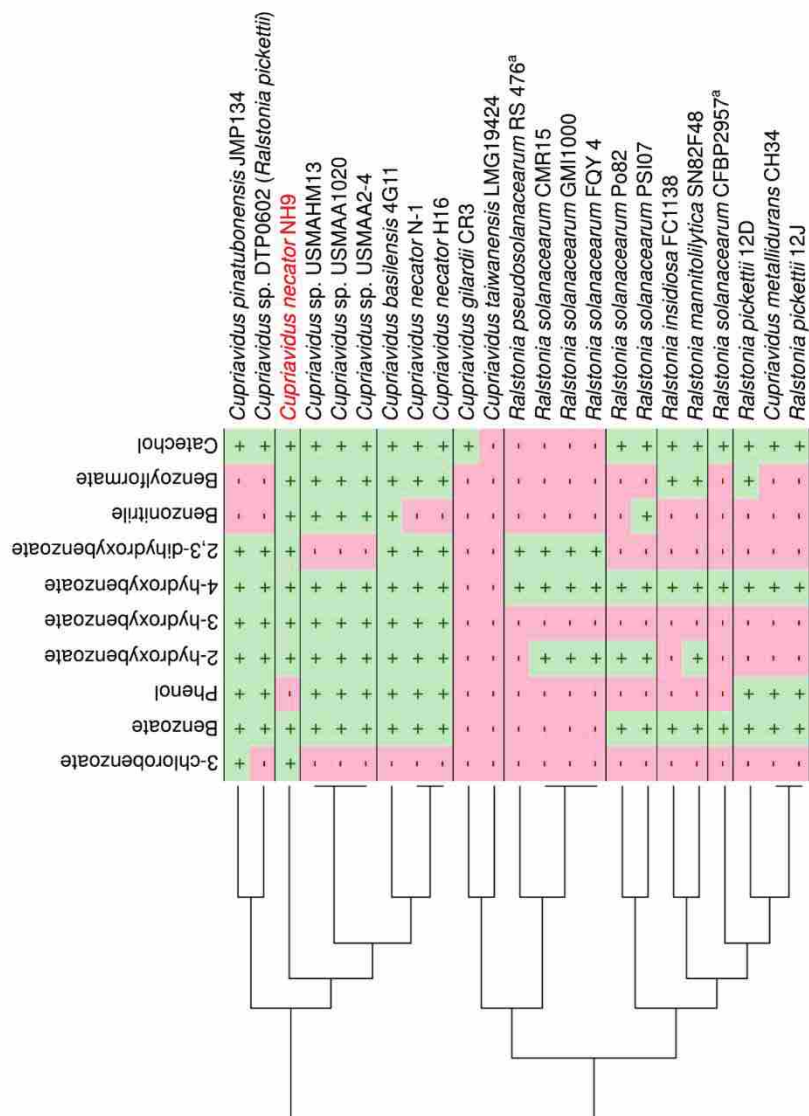


Fig. 4-5 推定芳香族化合物分解能のヒートマップ及びデンドログラム
「+」は分解能をもっている、「-」は分解能を持っていないことを示す。「a」は、全ゲノム情報を用いた解析に使用していない株を示す。NH9株を赤色で示した。

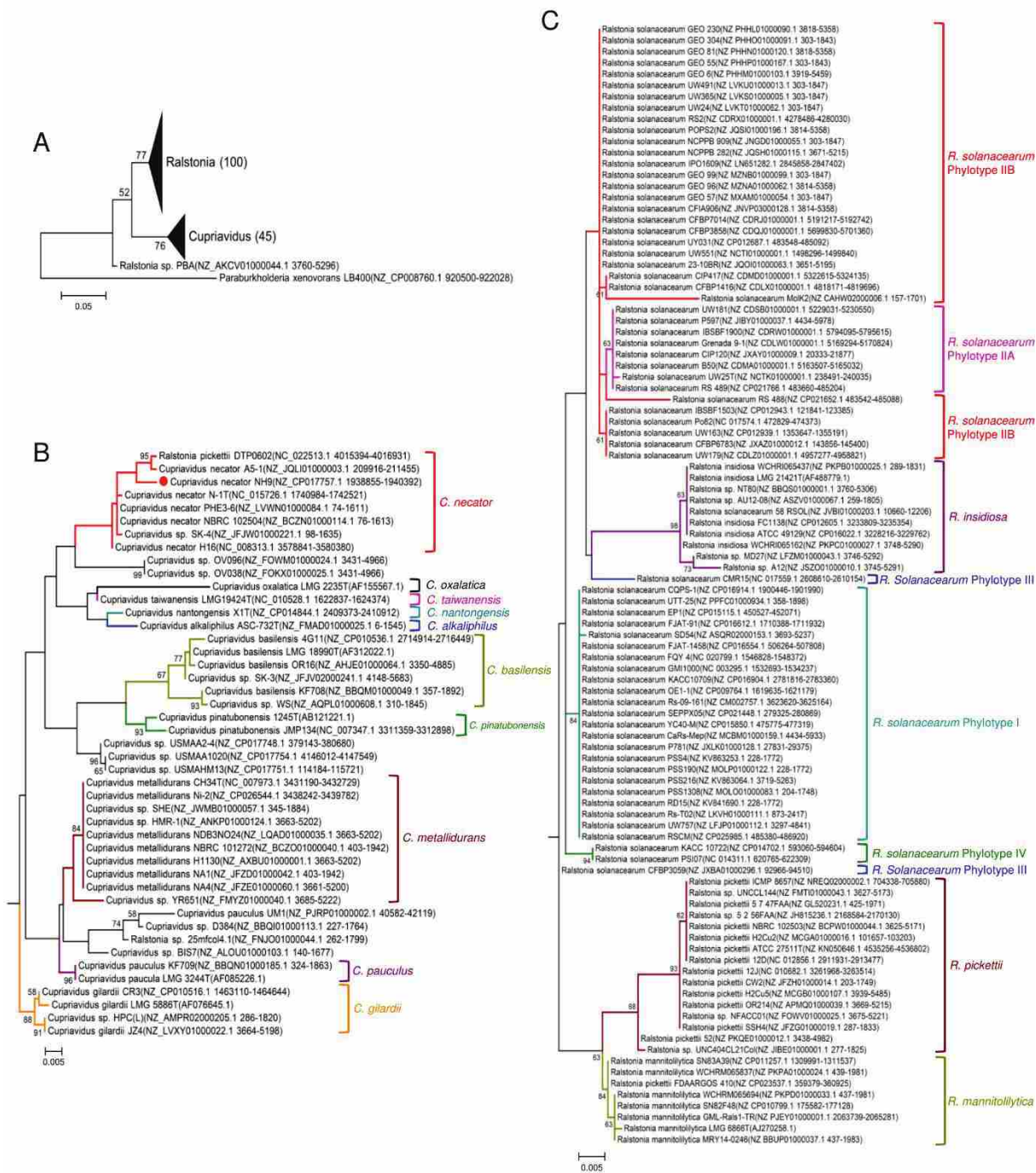


Fig. 4-6 16S rRNA遺伝子配列による系統樹解析
(A) 両属、(B) *Cupriavidus*属、(C) *Ralstonia*属細菌の系統樹。Maximum likelihood法により解析を行った。Type strainを”T”、NH9株を赤い丸で示した。

taiwanensis LMG19424^T 株、*C. nantongensis* X1^T 株、*C. alkaliphilus* ASC-732^T 株はこれまでの報告の通り (Sun *et al.*, 2016)、> 99.1%の高い similarity を示した。NH9 株は、*C. necator* N-1^T 株と 16S rRNA 配列で 99.2%の similarity を示し、期待通り *C. necator* のクラスターに分類された。

Ralstonia 属は、*R. pickettii* (type strain は *R. pickettii* ATCC 27511^T 株) と *R. mannitolilytica*、また *R. insidiosa* と *R. solanacearum* (type strain は *R. solanacearum* UW25^T 株) という 2 つの大きなクラスターを形成した。しかし *R. solanacearum* クラスターにおいて、異常な分岐を示した。例えば phylotype III に分類されている CMR15 株と CFBP3059 株は、クラスターを形成しなかった。さらに *R. insidiosa* クラスターは、*R. solanacearum* クラスターに内包されていた。

4-3-4 MLSA による系統解析

16S rRNA 遺伝子配列を使用した系統解析は、細菌の分類を簡便に調べる有効な手段である。しかし配列の保存度が高く、配列が 99%以上一致しても別種であることが少なくない。MLSA は細菌の種分類に有効な系統解析であるため、本実験でも MLSA を行った (Fig. 4-7)。全体的には 16S rRNA 遺伝子配列の系統樹と大きく類似していたが、解像度が上昇していた。*Ralstonia* sp. PBA 株は、*Cupriavidus* 属と同じクラスターに含まれており、この結果は以前の報告と一致していた (Kim and Gan, 2017) (Fig. 4-7A)。また *Cupriavidus* sp. BIS7 株、*Cupriavidus* sp. YR651 株、*Ralstonia* sp. A12 株、及び *R. insidiosa* クラスターの系統的な位置関係は、16S rRNA 遺伝子配列の系統樹と異なっていた (Fig. 4-7B、C)。また *R. solanacearum* 種は、以前の報告と同じ分岐を示した (Zhang and Qiu, 2016)。MLSA による系統樹のブートストラップ値は、16S rRNA 遺伝子配列の系統樹よりも高く、分岐の信頼性が相対的に高いことを示した。

4-3-5 ANI による種分類解析

ANI 解析によるゲノム比較の結果を、Fig. 4-8 と 4-9 及び Table 4-2 に示した。ANI 解析は MLSA と同様、細菌の種分類に使用されており、その閾値は通常 95-96%となっている (Ciufo *et*

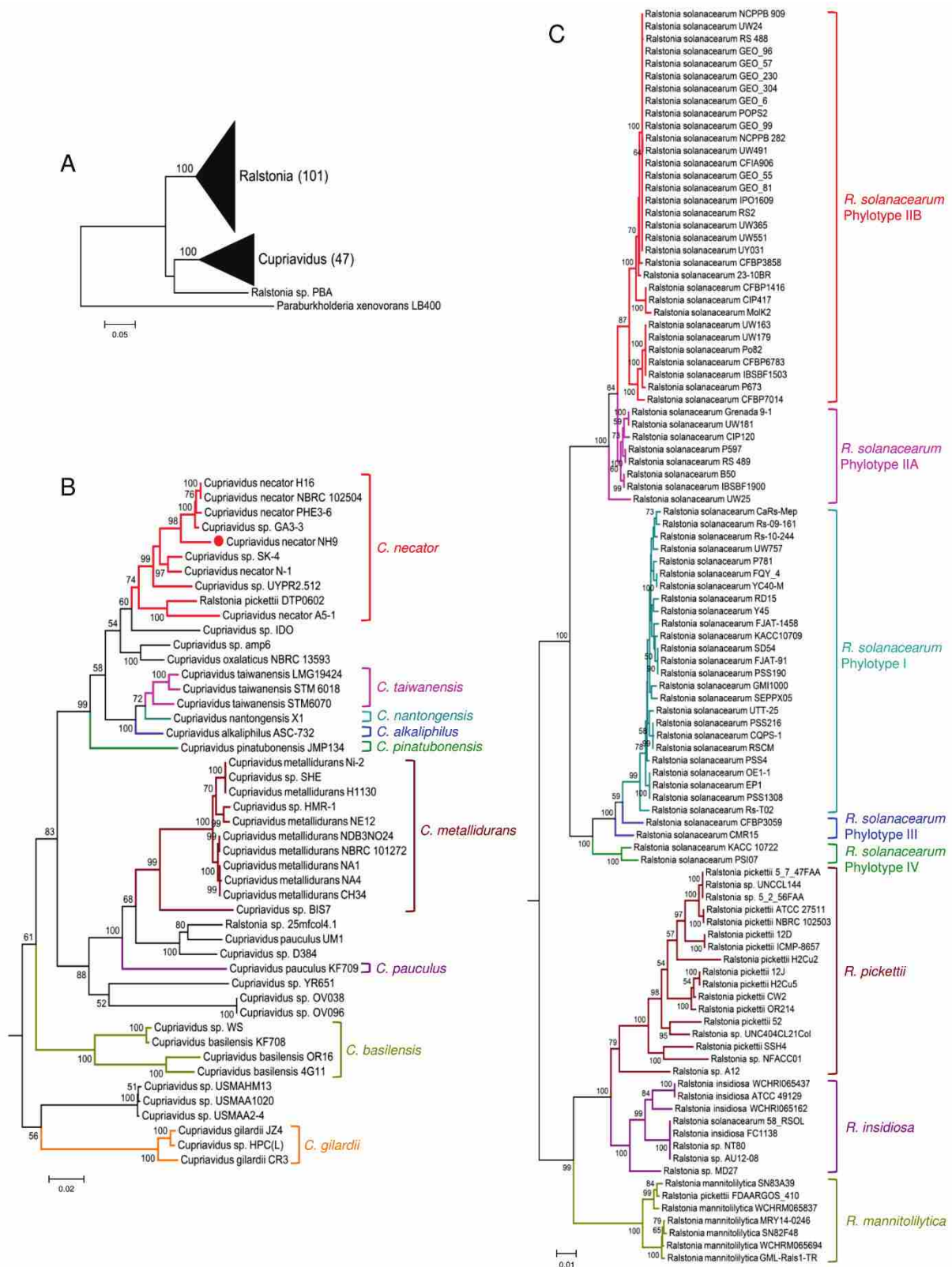


Fig. 4-7 MLSAによる系統樹解析
(A) 両属、(B) *Cupriavidus*属、(C) *Ralstonia*属細菌の系統樹。Maximum likelihood法により解析を行った。NH9株を赤い丸で示した。

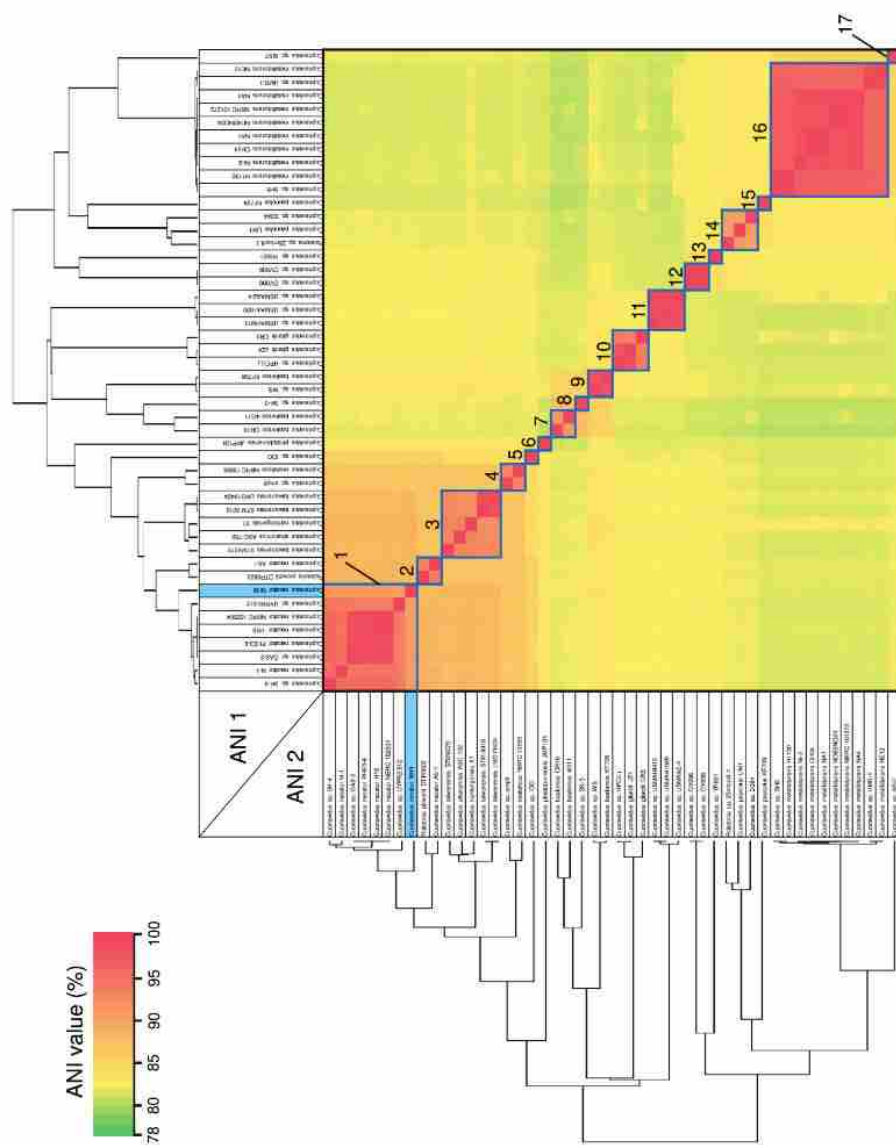


Fig. 4-8 48株の推定 *Cupriavidus* 属細菌ゲノムによる ANI 解析結果のヒートマップとデンドログラム
 ANI 値 > 90% の株を青い四角で囲み、NH9 株を青で示した。クラスターは 1 - 17 まで 17 個存在し、
 各クラスターの株の詳細は、Table 4-2 に示した。

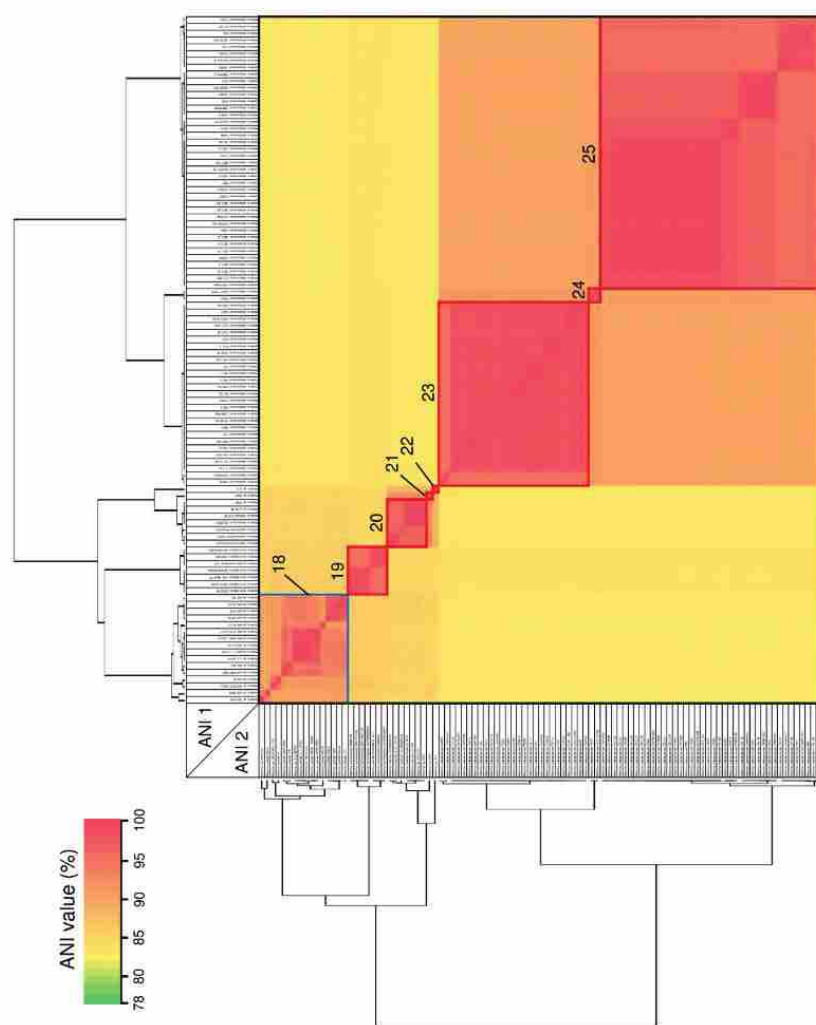


Fig. 4-9 101株の推定 *Ralstonia* 属細菌ゲノムによるANI解析のヒートマップとデンドログラム
ANI値 > 90%の株を青い四角、> 95%の株を赤い四角で囲んだ。クラスターは18 - 25まで8個存在し、
各クラスターの株の詳細は、Table 4-2に示した。

al., 2018; Kim *et al.*, 2014; Richter and Rossello-Mora, 2009)。これは、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) の 70% (同種の指標) に相当する (Goris *et al.*, 2007)。つまり 95–96% よりも大きければ、比較した 2 株は同種ということになる。多くの *Ralstonia* 属細菌においては、この閾値を適応できた (詳細は下記参照) が、*Cupriavidus* 属と *R. pickettii* 種に関しては、90% を閾値とした。例えば NH9 株は、*C. necator* N-1^T 株と 91.16% (ANI1 と 2) の ANI スコアを示し (Fig. 4–10)、通常の閾値では *C. necator* 種ではないことになる。しかしこれまでの系統解析や後の TNA の結果から、NH9 株は *C. necator* 種と同じ挙動を示していた。また、*R. pickettii* 種のいくつかの株も同様であった。これらの結果より、*Cupriavidus* 属と *R. pickettii* 種は、種分類の閾値を 90% とした。

ANI 解析の結果、*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属の 2 つの大きなクラスターに分かれたが、*Ralstonia* sp. PBA 株はどちらにも属さなかった (Table 4–2)。*Cupriavidus* 属は 17 個のクラスター、*Ralstonia* 属は 8 個のクラスターを形成した。これは、*Cupriavidus* 属の方が、多様性が高いことを示している。興味深いことに、クラスター 3 には 3 つの異なる種 (*C. alkaliphilus*、*C. nantongensis*、*C. taiwanensis*) (ANI 値 > 92%) が含まれていた。ANI 解析によって分けられたクラスターは、MLSA の系統関係とおおよそ一致していたが、いくつかの株で異なる分類が見られた。*C. necator* A5–1 株と *R. pickettii* DTP0602 株 (クラスター 2) は *C. necator* 種 (クラスター 1) には含まれておらず、クラスター 9 に分類された。また *C. basilensis* KF708 株と *Cupriavidus* sp. WS 株 (クラスター 9) は、*C. basilensis* (クラスター 7) と別のクラスターに区別された。MLSA 解析で *C. metallidurans* のクラスターに分類された *Cupriavidus* sp. BIS7 株 (クラスター 7)、*R. insidiosa* のクラスターに分類された *Ralstonia* sp. MD27 株 (クラスター 21)、*R. pickettii* のクラスターに分類された *Ralstonia* sp. A12 株 (クラスター 22) はそれぞれ、各クラスターから外れた。さらに *Ralstonia* sp. A12 株は、*R. pickettii* (クラスター 18) よりも *R. insidiosa* (クラスター 20) に高い similarity を示した。*R. solanacearum* 種は、95% の ANI 値によって、phylo type I と III (クラスター 23)、phylo type IV (クラスター 24)、phylo type II (クラスター 25) の 3 つのサブクラス

	<i>Cupriavidus</i> sp. SK-4	<i>C. necator</i> N-1 ^T	<i>Cupriavidus</i> sp. GA3-3	<i>C. necator</i> PHE3-6	<i>C. necator</i> H16	<i>C. necator</i> NBRC 102504	<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	<i>C. necator</i> NH9
<i>Cupriavidus</i> sp. SK-4	100	96	96	96	96	96	95	91
<i>C. necator</i> N-1 ^T	96	100	95	95	95	95	95	91
<i>Cupriavidus</i> sp. GA3-3	96	95	100	99	99	99	94	91
<i>C. necator</i> PHE3-6	96	95	100	100	99	99	94	91
<i>C. necator</i> H16	96	95	99	99	100	100	94	91
<i>C. necator</i> NBRC 102504	96	95	99	99	100	100	94	91
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	95	95	94	94	94	94	100	91
<i>C. necator</i> NH9	91	91	91	91	91	91	91	100

Fig. 4-10 Fig. 4-8のクラスター1の拡大図

ーを形成した。*R. solanacearum* 種は、*R. pseudosolanacearum* 種 (phylotype I と III)、*R. solanacearum* 種 (phylotype II)、*R. syzygii* 種 (phylotype IV) の 3 種に分類されると報告されており (Safni *et al.*, 2014)、それはゲノム・系統樹・タンパク質を使用した解析でも証明されている (Prior *et al.*, 2016; Zhang and Qiu, 2016)。本 ANI 解析の結果も、これまでの報告を支持するものであった。

4-3-6 TNA による分類解析

4 連塩基の出現頻度は、ゲノム配列の類似性によって細菌をクラスタリングする際のマーカーの 1 つになる。ANI 解析とは別の手法を用いて分類を評価することを目的として、TNA を実施した (Fig. 4-11、Tale 4-2)。*Cupriavidus* 属では 12 のクラスター (クラスター A-L)、*Ralstonia* 属では 4 つの明瞭なクラスター (クラスター M-P) が形成された。これは、*Cupriavidus* 属の多様性を示している。NH9 株は、主に *C. necator* 株から構成されるクラスター D に分類された。ANI 解析でも見られたように、*C. necator* A5-1 株と *R. pickettii* DTP0602 株は同じクラスター (クラスター G) に分類され、さらに *Cupriavidus* sp. amp6 株と *Cupriavidus* sp. IDO 株もクラスター G に分類された。しかし、*Cupriavidus* sp. amp6 株と > 90% の ANI スコアを示す *C. oxalaticus* NBRC 13593 株はクラスター G から外れ、*C. taiwanensis*、*C. nantongensis*、*C. alkaliphilus* 種から構成されるクラスター B に分類された。クラスター K には、*C. pauculus* KF709 株、*C. pinatubonensis* JMP134 株、*Cupriavidus* sp. BIS7 株、*Cupriavidus* sp. YR651 株、*Ralstonia* sp. PBA 株が含まれていた。また期待通り、*R. pickettii* DTP0602 株と *Ralstonia* sp. 25fmc04.1 株は、*Cupriavidus* 属由来のクラスターに分類された。*Ralstonia* sp. A12 株は、主に *R. insidiosa* 種から構成されるクラスター N に分類された。この結果は MLSA の結果とは一致していなかったが、ANI 解析の結果とは一致していた。*R. solanacearum* 種 (クラスター P) は、ANI 解析結果のような 3 つのグループは形成せず、1 つのクラスターを形成した。その他の *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌株の分類は、ANI 解析結果と同一であった。

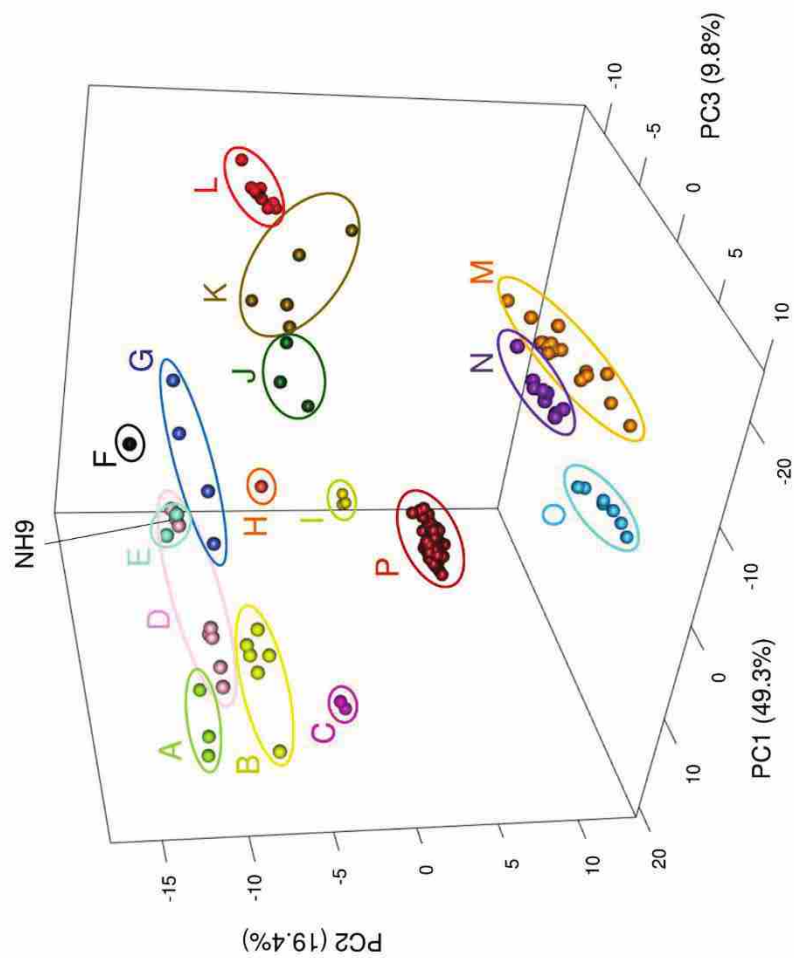


Fig. 4-11 Tetra-nucleotide analysisの結果を使用した主成分分析の3次元プロット
それぞれのクラスターを色ごとに示し、計16個のクラスター (AからP) が形成された。
各クラスターの株の詳細は、Table 4-2に示した。

4-3-7 POCP による属分類解析

これまでの解析は、細菌の種分類には適しているが、属分類には適していない。そこで、細菌の属分類に適している POCP 解析を行った (Fig. 4-12)。POCP 解析における属分類の閾値は、通常 50%となっている (Qin *et al.*, 2014)。つまりこの数値よりも大きければ、比較した 2 株は同属ということになる。しかし *Cupriavidus* 属細菌と *Ralstonia* 属細菌の場合、60%で明瞭な違いを確認でき、これを閾値とした。ほとんどの *Cupriavidus* 属細菌と *Ralstonia* 属細菌は属名と解析結果が一致していたが、*Ralstonia* sp. 25mfcol4.1 株と *R. pickettii* DTP0602 株は、*Cupriavidus* 属細菌と同じ挙動を示した。また *Ralstonia* sp. PBA 株は、*Cupriavidus* 属細菌とは 51.4%、*Ralstonia* 属細菌とは 52.6%の POCP 値を示した。

4-3-8 *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌株の再分類

16S rRNA 遺伝子配列の系統解析、MLSA、ANI 解析、TNA、POCP 解析の結果を総合し、*Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌の再分類を Table 4-4 に提案した。これらの結果より、NH9 株は *C. necator* 種に分類すること、また調べた 150 株のうち 41 株の分類を見直すべきであると結論づけた。

R. pickettii DTP0602 株と *Ralstonia* sp. 25mfcol4.1 株は、*Cupriavidus* 属に分類すべきである。全ての解析結果が、この提案を支持していた。DTP0602 株は過去の報告でも *Cupriavidus* 属に分類すべきであると提案されていたが (Zhang and Qiu, 2016)、詳細な分類解析は行われていなかった。また 25mfcol4.1 株は、本解析により初めて提案された。*C. basilensis* KF708 株と *C. necator* A5-1 株、及び DTP0602 株は、系統解析とゲノム配列を使用した解析 (ANI 解析と TNA) の結果間で、矛盾が見られた。ANI 解析と TNA の分類結果は一致していることから、これを考慮して 3 株とも *Cupriavidus* sp.とした。*Ralstonia* sp. A12 株と MD27 株は、系統解析と ANI 解析において、相反する結果が得られた。これらの株においては、ANI 解析と TNA の結果間も一致していないことから、16S rRNA 遺伝子配列による系統解析の結果を考慮し、現状は両株とも *R.*

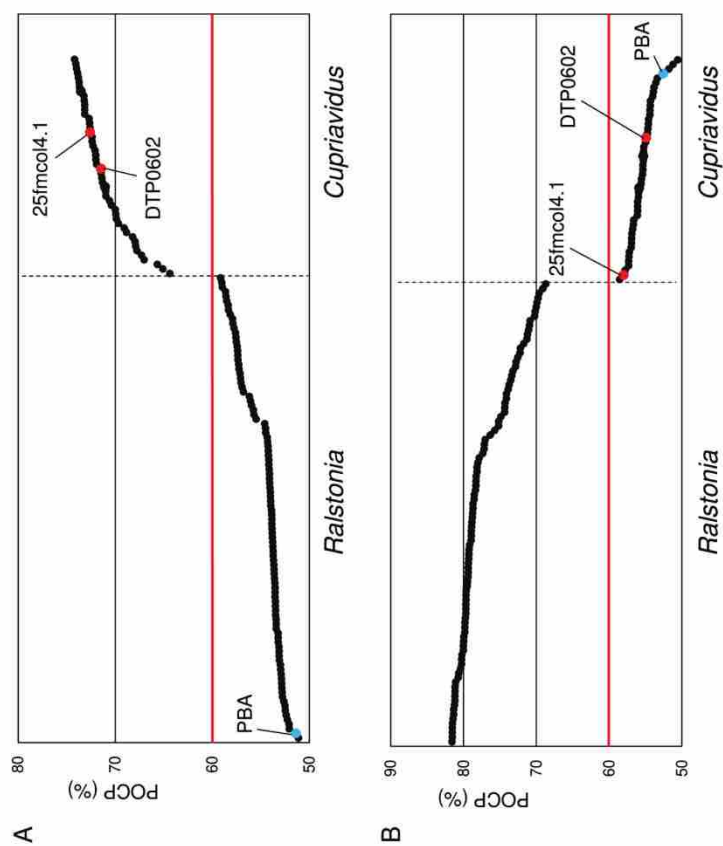


Fig. 4-12 平均POCP値の比較
 (A) Cupriavidus属細菌とPOCP解析を行った平均値。(B) Ralstonia属細菌とPOCP解析を行った平均値。クエリーに用いたRalstonia属細菌をドット線より左に、Cupriavidus属細菌を右に示した。2つの赤い点は、Ralstonia属に分類されているが、本解析でCupriavidus属細菌と同じ挙動を示した株。青い点は、両属との比較でもほぼ同一の平均値を示した株。赤い線は、属分類の閾値を示す。25fmc04.1はRalstonia sp. 25fmc04.1株、DTP0602はR. pickettii DTP0602株、PBAはRalstonia sp. PBA株を示す。

Table 4-4 再分類を提案する *Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属細菌

GenBank strain name	Classification		Phylogenetic analyses		Whole-genome sequence analyses		
	Current	Proposed	16S	MLSA	ANI	TNA	POCP
KF708	<i>C. basilensis</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. basilensis</i>	<i>C. basilensis</i>	+	+	<i>Cupriavidus</i>
A5-1	<i>C. necator</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. necator</i>	<i>C. necator</i>	+	+	<i>Cupriavidus</i>
NH9	<i>C. necator</i>	<i>C. necator</i>	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
UM1	<i>C. pauculus</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
GA3-3	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. necator</i>	N. T.	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
HMR-1	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. metallidurans</i>	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
HPC(L)	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. gilardii</i>	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
SHE	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. metallidurans</i>	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
SK-4	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. necator</i>	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
UYPR2.512	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. necator</i>	N. T.	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
DTP0602	<i>R. pickettii</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	<i>C. necator</i>	<i>C. necator</i>	+	+	<i>Cupriavidus</i>
FDAARGOS_410	<i>R. pickettii</i>	<i>R. mannitolilytica</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
CQPS-1	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
EP1	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
P781	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
UW757	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
CaRs-Mep	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
CFBP3059	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
KACC10709	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
KACC 10722	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. syzygii</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
OE1-1	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
RSCM	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
SEPPX05	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
YC40-M	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
58_RSOL	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. insidiosa</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
PSS4	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
PSS190	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
PSS216	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
PSS1308	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
RD15	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
Rs-T02	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
UTT-25	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. pseudosolanacearum</i>	+	+	+	<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
25mfcoH4.1	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>Cupriavidus</i> sp.	+	+	+	+	<i>Cupriavidus</i>
5_2_56FAA	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. pickettii</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
A12	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. insidiosa</i>	+	<i>R. pickettii</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	+	<i>Ralstonia</i>
AU12-08	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. insidiosa</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
MD27	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. insidiosa</i>	+	+	<i>Ralstonia</i> sp.	+	<i>Ralstonia</i>
NFACC01	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. pickettii</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
NT80	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. insidiosa</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
UNC404CL21Col	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. pickettii</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
UNCCL144	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>R. pickettii</i>	+	+	+	+	<i>Ralstonia</i>
PBA	<i>Ralstonia</i> sp.	Other	+	<i>Cupriavidus</i> sp.	+	<i>Cupriavidus</i> sp.	+

insidiosa に分類した。*Ralstonia* sp. PBA 株は、16S rRNA 遺伝子配列による系統解析と TNA において、*Cupriavidus* 属と系統的に近い関係を示したが、POCP 解析より、*Cupriavidus* 属及び *Ralstonia* 属両方に分類されないと考えた。

4-4 考察

これまでの研究で、芳香族化合物分解能と系統関係に関連性が示唆されていた (Harwood and Parales, 1996; Perez-Pantoja *et al.*, 2012)。そこでまずは、*Cupriavidus* 属と *Ralstonia* 属細菌の BenA と PobA による系統解析、及び推定芳香族化合物分解能による分類が可能かどうか検討した。属レベルでは、どの解析においても大きく 2 つの属に分類される傾向が見られたが完全ではなく、また種レベルにおいては、芳香族化合物分解能から系統関係を考えることは困難であった (Fig. 4-3, 4-4)。系統解析において、いくつかの *benA* 及び *pobA* 遺伝子の水平伝播等による獲得が示唆され、また推定分解能において、*Cupriavidus* 属には存在する芳香族化合物分解能が、*Ralstonia* 属では欠落している傾向が見られるなど、芳香族化合物分解の進化を考える上で興味深い結果は得られた。このように、芳香族化合物分解能は外来より獲得したために、分解能と分類が一致しないと推測する。

ANI 解析において、種分類の閾値を 95–96% から 90% に緩めた。Richter と Rossello-Mora の報告によると、90% よりも低い ANI 値では分類の正確性が低くなったため、90% 以上の ANI 値がより適切な結果を生じると述べている (Richter and Rossello-Mora, 2009)。また 95–96% を閾値としない種の細菌は他にも報告されており (Ciufo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2014)、これらは種の多様性を反映していると考えられている。*Cupriavidus* 属や *R. pickettii* 種も、本解析の結果やこれまでの報告 (Ryan *et al.*, 2007) より、種の多様性は高いと考えられ、過去の報告と一致している。また ANI の分類結果と、系統解析や TNA の分類結果を見ても、大きな矛盾は見られない。これらより、*Cupriavidus* 属や *R. pickettii* 種において ANI の閾値を 90% に緩めることは、妥当であると考えられる。なお ANI 解析は各株の全てのレプリコンを含めた状態で行った。そこで全ゲノム配列が解明されている株を使用し、染色体 1 同士、及び 2 同士で ANI 解析を行った。これにより、ANI の閾値を緩める必要がなくなると期待したが、結果はほとんど変わらなかった (データは示さない)。以上より、ANI 解析には全てのレプリコンを含める形で問題ないということが確認できた。

ANI 解析と TNA はどちらも塩基配列を使用したゲノムベースの解析であるが、*C. oxalaticus* NBRC 13593、*C. pauculus* KF709、*C. pinatubonensis* JMP134、*Cupriavidus* sp. BIS7、*Cupriavidus* sp. YR651、*Ralstonia* sp. PBA の分類において、結果が一致していなかった (Table 4-2)。Richter と Rossello-Mora はこの矛盾する結果について、(i) 進化または環境により、ゲノム塩基組成が影響を受けた可能性、(ii) ANI 解析時に、比較に使用される塩基配列の割合が低い可能性の 2 つを指摘している (Richter and Rossello-Mora, 2009)。ANI 解析において、使用されるフラグメントの割合が極端に低いということは無かったため、後者の理由は当てはまらない。また ANI 解析では明確な種分類の閾値を示したが、TNA に明確な閾値はない。これらより、TNA よりも ANI の方が実際の系統関係を反映しやすく、またゲノム配列を使用した分類解析に、より適していると考えた。

C. basilensis KF708 株と *C. necator* A5-1 株において、系統解析からでは分類の変更を検討する必要の無い結果を得たが、全ゲノム配列による解析により、誤分類の可能性を支持する結果を得た。*R. pickettii* DTP0602 株に関しても、系統解析と全ゲノム配列による分類結果は異なっていた。つまり、系統樹による解析と全ゲノム配列を使用した解析両方を組み合わせることで、異なる視点から分類を検討でき、誤分類の修正に有益な情報を提供できる。特に ANI 解析は、全ゲノムを使用するため結果が偏りにくく、MLSA のように利用する遺伝子配列を選別する必要がない。ゲノム情報さえあれば、計算機上で簡単に実施でき、また現在は公共データベースに多くのゲノム情報が蓄積、追加されているため、利便性が高い。また TNA とは異なり明確な種分類の閾値を示すため、簡易的に細菌の種同定を行う際の有効な手段であると考えられる。

興味深いことに、*C. alkaliphilus*、*C. nantongensis*、*C. taiwanensis* という 3 種は、全ての解析において高い similarity を示した。ANI 解析において、これらの ANI 値は 92%を超えており、3 種が同種であることを示唆している。しかし表現型や DDH より、これらは別種であると報告されている (Sun *et al.*, 2016)。この結果から、ANI 解析は強力な手法ではあるが分類手段の 1 つであり、生化学や分析化学的解析が必要な場面も多々存在することを示していると考えられる。ゲノム配

列による種同定が当然のようになれば、生化学的な解析が省略できる日が来るかもしれないが、現在の新種提案や分類の変更方法を考えると、正確な分類のためには生化学的な解析が必要であると考ええる。

DDH より、H16 株と JMP134 株（以前は *R. eutropha*）はそれぞれ、*C. necator* と *C. pinatubonensis* の type-strain と高い similarity を示すと報告されていた（Sato *et al.*, 2006; Vandamme and Coenye, 2004）。しかし、これらは長いこと多くの論文で、*R. eutropha* H16 株や *C. necator* JMP134 株などと記載されていた。また H16 株においては、これまでに詳細な分類実験が行われていなかった。本研究で行った解析結果より、これらはそれぞれ以前の報告通り、*C. necator* と *C. pinatubonensis* で矛盾はない（Table 4-2）。本研究により、H16 株と JMP134 株の分類を明確にすることができたと考ええる。

本結果を原著論文として発表した後、Gan によって *Ralstonia* sp. PBA 株の分類解析が行われた。PBA 株を含む 428 の *Burkholderiaceae* 科のゲノム情報をダウンロードし、single copy の遺伝子をつなげて系統解析を行った。その結果、PBA 株はどの属にも含まれなかったため、*Burkholderiaceae* sp. PBA 株に変わった（Gan, 2019）。この結果より、PBA 株に関する本解析の結果及び結論は、妥当であったと考える。

総括

C. necator NH9 株は、芳香族塩素化合物である 3-CB を分解するグラム陰性細菌である。本研究は、主にゲノム情報を使用した解析を行い、NH9 株の 3-CB 分解に関わる遺伝子や分解能の特徴を明らかにすることを目的として研究を行った。

第二章では、次世代シーケンサーを使用して、NH9 株の全ゲノム配列を明らかにした。また得られた全遺伝情報から芳香族化合物分解能を推定し、一部の化合物については HPLC により分解を確認した。その結果、NH9 株は 3-CB、BA、3-HBA に対して分解能を示した。また 2-、4-HBA、アントラニル酸を唯一の炭素源、エネルギー源として明らかな増殖能を示したため、これら化合物の分解能が示唆された。

第三章では、3-CB 及び BA 分解時の発現変動遺伝子及びエンリッチされる機能を明らかにすることを目的として、RNA-seq を行った。その結果、第二章で推定した 3-CB 及び BA 分解遺伝子群の発現を確認でき、また 3-CB 及び BA の取り込みに関わると推定されるトランスポーター遺伝子の候補を挙げた。また GO エンリッチメント解析より、3-CB 及び BA で変動している機能の傾向は類似していたが、走化性については逆の結果を示していた。そこで、スイミングプレートアッセイにより走化性を調べた結果、NH9 株は BA に対して強い走化性を示し、3-CB に対しては弱い走化性を示した。

第四章では、NH9 株を含む *Cupriavidus* 属内の種分類を整理し、将来的な比較実験への足掛かりとすること、また近縁の *Ralstonia* 属細菌も含め、属間の誤分類も整理することを目的として、ゲノム情報を使用した再分類を試みた。まず芳香族化合物分解遺伝子のアミノ酸配列、及び推定芳香族化合物分解能により分類が可能かどうか調べたが、妥当な結果は得られなかった。そこで、16S rRNA 遺伝子配列や複数のハウスキーピング遺伝子を使用した系統解析、及び全ゲノム配列を使用した解析を行い、複数の結果を総合して再分類を検討した。その結果、NH9 株は *C. necator* 種への分類が妥当であることがわかり、また 150 株中 41 株の再分類の提案に成功した。

第二章及び第三章の結果より、NH9 株の 3-CB 分解能獲得に関する進化を考えた。3-CB 分解能を獲得するためには、(i) 外部からの分解遺伝子の獲得、(ii) 既存のトランスポーター遺伝子の利用や変異による適応、あるいは外部からの獲得、(iii) 走化性などの他の機能遺伝子の利用や適応による進化、または外部からの獲得、という 3 ステップがあると考ええる。

まず (i) 外部からの分解遺伝子の獲得について、3-クロロカテコール分解能は、基本的に外来から獲得すると考えられている (Reineke, 1998)。NH9 株は、3-クロロカテコール分解遺伝子群 (*cbn* 遺伝子群) を持つプラスミド pENH91 により、3-CB の完全分解能を得た。*cbn* 遺伝子群の両端には IS が存在していたため、この遺伝子群は水平伝播によって pENH91 に導入されたと思われる。NH9 株が元々 pENH91 プラスミドを持っていて、そこに *cbn* 遺伝子群が水平伝播したのか、あるいは *cbn* 遺伝子群を有する pENH91 を獲得したのか、どちらの経路により 3-クロロカテコール分解能を取得したのか不明である。しかし現在のところ、*cbn* 遺伝子群を除く pENH91 の配列と全く同じ配列のプラスミドは見つかっていない (pA81 は同じ配列を含むが、全長が異なる)。そのため、NH9 株が元々 pENH91 を持っており、水平伝播により *cbn* 遺伝子群を獲得したと推測する。

続いて (ii) トランスポーターについて、これまでの研究において、芳香族化合物の取り込みに関する遺伝子が分解遺伝子群とクラスターを形成しているものが、いくつか報告されている。例えば *benK* (BA) (Collier *et al.*, 1997)、*mhbT* (3-HBA) (Xu *et al.*, 2012a)、*pcaK* (4-HBA) (Harwood *et al.*, 1994; Nichols and Harwood, 1997)、*tfdK* (2,4-D) (Leveau *et al.*, 1998)などが挙げられる (カッコ内は取り込む芳香族化合物を示す)。このように、自然界に存在する化合物の取り込みに関しては進化が進んでいるため、クラスターになっていると考えられる (Reams and Neidle, 2004)。一方クロロ安息香酸に関しては、これらの化合物と比較して自然界に多いとは言えず、ゲノムの再編成が起こるほどの進化が進んでいないと考える。例えば、*C. pinatubonensis* JMP134 株は 2,4-D の他に 3-CB も分解するが、3-CB の取り込みに関与する *benP* は、3-CB 分解遺伝子が存在するプラスミドではなく、染色体上に位置している (Ledger *et al.*, 2009)。また *Pseudomonas putida* B13 株において、ICE_{clc} が存在する場合と存在しない場合で比較した時、ICE_{clc} が存在する場合は 3-CB

に対して高い走化性を示した。これは、ICEclc 上に存在する *orf2848* という遺伝子 (PcaK トランスポーターと同じ機能を有すると推測される) が影響していると考えられている (Miyazaki *et al.*, 2018)。本研究の RNA-seq より、3-CB で上方制御されたトランスポーターの多くは、染色体上に位置していた。また 3-HBA やアントラニル酸分解遺伝子クラスターの一部と考えられるトランスポーター遺伝子は 3-CB で発現していたが、3-CB 分解に関わるような遺伝子 (benzoate 1,2-dioxygenase、*cis*-diol dehydrogenase 及び chlorocatechol *ortho*-cleavage pathway 関連遺伝子) の周囲には、発現したトランスポーター遺伝子は存在しなかった。これらのことから、①3-CB の取り込みには特異的なトランスポーター遺伝子の発現は必要ではなく、偶然 3-CB で発現したものが取り込みに関わるという可能性、あるいは②benzoate 1,2-dioxygenase のような BA の分解に関わり、また 3-CB の分解にも関わる遺伝子は 3-CB で発現したが、それら遺伝子に近接する、BA の取り込みに関わるトランスポーター (遺伝子) では 3-CB の取り込みに不十分であるため、これを補うために他のトランスポーター遺伝子が発現した可能性を考えた。細菌における芳香族化合物のトランスポーター (主に MFS) の基質特異性は不明であり、また 1 つのトランスポーターが複数の芳香族化合物を取り込む例はいくつか報告されている (Table 3-15)。そのため、上記①②の可能性はどちらも考えられ、また NH9 株の染色体上のトランスポーター遺伝子が、3-CB の取り込みに関わっていることは十分に考えられる。

最後に (iii) 他の機能遺伝子の利用について、本研究では走化性について実験を行ったため、ここでは走化性について述べる。MCP は芳香族化合物等のリガンドを認識することで、走化性に関連する *che* 遺伝子のリン酸化リレーを開始する (Parales *et al.*, 2015)ため、走化性における重要な因子である。これまでの研究より、MCP が認識する芳香族化合物の特異性に関しては明らかになっていないが、多くは構造的に類似している化合物 (例えばハロゲン置換芳香族化合物) を認識する (Harwood *et al.*, 1990; Lacal *et al.*, 2011; Liu and Parales, 2009)。ただし一部は、全く異なる化合物を認識する例も報告されている (Vangnai *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2000)。これらより、MCP (特に受容体の部分) の配列が変わることで、本来とは異なる化合物にも適応することが期待される。

本研究のスィミングプレートアッセイの結果、NH9 株の 3-CB に対する走化性は、BA や 3-HBA ほどの適応を示さなかった。また RNA-seq の結果より、3-CB で遺伝子発現が上昇したのは、12 の *mcp* 遺伝子のうち 1 つであり、また *che* 遺伝子の発現は減少していた。これらの結果から、NH9 株の MCP は 3-CB に適応できていないと考える。ただし、上述の通り 1 つの *mcp* 遺伝子の発現が上昇しており、またこれは BA に対しても発現上昇を示した。また走化性の実験より、3-CB に対して全く走化性を示さなかったわけではないため、適応の途中であるとも考えられる。

以上より、NH9 株は 3-CB を細胞質内に取り込み、完全分解する部分までは適応できているが、走化性においては十分に適応できていないと考える。適応の順序は、NH9 株の場合、上記の (i)、(ii)、(iii) である仮説を考えた。一方で、分解遺伝子やトランスポーター遺伝子が適応（獲得）する前に、*mcp* 遺伝子が芳香族塩素化合物に適応している例も報告されている (Harwood, 1989; Harwood *et al.*, 1990) ため、適応の順序は株によって異なると考える。

自然界において、分解細菌が芳香族化合物と物理的に接触することを考えた場合、芳香族化合物に対する走化性は、バイオレメディエーションを考える上で重要である。これまでの結果から、NH9 株は環境中において、BA や 3-HBA よりも 3-CB の浄化に適していないと考える。しかし、走化性については大腸菌でよく研究されており、これまでに走化性を意図的に変化させる研究も行われている。例えば、大腸菌の化学物質受容体の特異的な領域にいくつかの変異を導入することで、芳香族化合物を含む環境因子に対する反応が変わったという報告がある (Bi *et al.*, 2018; Pham and Parkinson, 2011)。また MCP の異種発現が、大腸菌の芳香族化合物に対する反応を拡大したという報告もある (Roggo *et al.*, 2018)。このように、生物工学的手法を用いることで NH9 株の走化性を変化させることが可能であり、例えば 3-CB だけでなく、他の様々な単環芳香族化合物に対する走化性を有する株も作製できるかもしれない。

謝辞

本研究の遂行にあたり、素晴らしい研究環境と機会を与えてくださった、静岡大学大学院農学領域（岐阜大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻生物機能制御学連合講座）の小川直人教授に深く感謝申し上げます。

中間発表において、様々な視点からご助言を頂くとともに、厳しくも温かいご指導を頂きました、静岡大学大学院農学領域の森田明雄教授、及び岐阜大学応用生物科学部の鈴木徹教授に深く感謝申し上げます。

原著論文の作成にあたり多大なご助言を頂くとともに、普段の業務でも多大なご指導、ご配慮を頂きました、静岡大学大学院理学領域の道羅英夫准教授に深く感謝申し上げます。

CbnR に関する原著論文を作成する際に大変お世話になりました、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の千田俊哉教授に深く感謝申し上げます。

修士課程修了後も、ことあるごとに気にかけてくださった、東北大学大学院生命科学研究科の津田雅孝教授、永田裕二教授及び大坪嘉行准教授に深く感謝申し上げます。

研究内容についての的確なアドバイスやコメントをくださった、静岡大学大学院農学領域の鮫島玲子准教授に深く感謝申し上げます。

研究内容についての的確なアドバイスやコメントをくださり、また普段の業務でも大変お世話になりました、グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム機能解析部の兼崎友特任助教に深く感謝申し上げます。

走化性を調べる実験方法について、丁寧にご教授くださった国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の山元季実子博士に深く感謝申し上げます。

研究の方向性について悩んでいる時や、業務でわからない部分がある際に、いつも親身になって相談に乗ってくださった、吉松勝彦博士に深く感謝申し上げます。

技術職員の社会人ドクターという（静岡大学では）前例の無い出来事についてご理解頂くととも

に、研究や業務、私生活について常に気にかけてくださった、静岡大学技術部の宮澤俊儀氏に深く感謝申し上げます。

研究を遂行する上で大変お世話になりました、岐阜大学大学院連合農学研究科、静岡大学大学院農学領域、及び遺伝子実験棟の職員の皆様に深く感謝申し上げます。

テーマは異なりましたが一緒に研究を行い、またレクリエーションや飲み会など、研究生生活を楽しいものにしてくれた、静岡大学農学部環境微生物学研究室の学生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、ここまで研究を遂行できたのも、家族の理解や十分な支えがあったからです。いつも精神的に支えて頂いたことに深く感謝申し上げるとともに、謝辞といたします。

引用文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25(17), 3389-3402.
- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Carrere, S., Cruveiller, S., Dossat, C., Lajus, A., Marchetti, M., Poinot, V., Rouy, Z., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Barbe, V., Batut, J., Medigue, C. and Masson-Boivin, C. (2008). Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome. Res.* 18(9), 1472-1483.
- Arias-Barrau, E., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E. R. and Luengo, J. M. (2005). A two-component hydroxylase involved in the assimilation of 3-hydroxyphenyl acetate in *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 280(28), 26435-26447.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. and Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25(1), 25-29.
- Aukema, K. G., Escalante, D. E., Maltby, M. M., Bera, A. K., Aksan, A. and Wackett, L. P. (2017). *In silico* identification of bioremediation potential: carbamazepine and other recalcitrant personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 51(2), 880-888.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. and Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19(5), 455-477.
- Basu, S., Pal Chowdhury, P., Deb, S. and Dutta, T. K. (2016). Degradation pathways of 2- and 4-nitrobenzoates

- in *Cupriavidus* sp. strain ST-14 and construction of a recombinant strain, ST-14::3NBA, capable of degrading 3-nitrobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(14), 4253-4263.
- Bi, S., Jin, F. and Sourjik, V. (2018). Inverted signaling by bacterial chemotaxis receptors. *Nat. Commun.* 9(1), 2927.
- Bi, S. and Sourjik, V. (2018). Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 22-29.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15), 2114-2120.
- Bopp, L. H. (1986). Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1(1), 23-29.
- Bott, T. L. and Kaplan, L. A. (2002). Autecological properties of 3-chlorobenzoate-degrading bacteria and their population dynamics when introduced into sediments. *Microb. Ecol.* 43(2), 199-216.
- Cao, L., Liu, H., Zhang, H., Huang, K., Gu, T., Ni, H., Hong, Q. and Li, S. (2012). Characterization of a newly isolated highly effective 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading strain *Cupriavidus pauculus* P2. *Curr. Microbiol.* 65(3), 231-236.
- Chae, J. C. and Zylstra, G. J. (2006). 4-chlorobenzoate uptake in *Comamonas* sp. strain DJ-12 is mediated by a tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *J. Bacteriol.* 188(24), 8407-8412.
- Chain, P. S., Denef, V. J., Konstantinidis, K. T., Vergez, L. M., Agullo, L., Reyes, V. L., Hauser, L., Cordova, M., Gomez, L., Gonzalez, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S. A., Marx, C. J., Parnell, J. J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W. J., Tsoi, T. V., Ulrich, L. E., Zhulin, I. B. and Tiedje, J. M. (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(42), 15280-15287.
- Chang, H. K., Dennis, J. J. and Zylstra, G. J. (2009). Involvement of two transport systems and a specific porin in the uptake of phthalate by *Burkholderia* spp. *J. Bacteriol.* 191(14), 4671-4673.

- Chang, H. K., Mohseni, P. and Zylstra, G. J. (2003). Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 185(19), 5871-5881.
- Chang, H. K. and Zylstra, G. J. (1999). Characterization of the phthalate permease OphD from *Burkholderia cepacia* ATCC 17616. *J. Bacteriol.* 181(19), 6197-6199.
- Chang, Y. C., Reddy, M. V., Umemoto, H., Sato, Y., Kang, M. H., Yajima, Y. and Kikuchi, S. (2015). Bio-augmentation of *Cupriavidus* sp. CY-1 into 2,4-D contaminated soil: microbial community analysis by culture dependent and independent techniques. *PLoS. One.* 10(12), e0145057.
- Chávez, F. P., Lünsdorf, H. and Jerez, C. A. (2004). Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5), 3064-3072.
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38(8), 2434-2446.
- Chin, C. S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., Turner, S. W. and Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods.* 10(6), 563-569.
- Choudhary, A., Purohit, H. and Phale, P. S. (2017). Benzoate transport in *Pseudomonas putida* CSV86. *FEMS. Microbiol. Lett.* 364(12).
- Ciufo, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretdin, A., Clark, K., Turner, S., Brover, S., Schoch, C. L., Kimchi, A. and DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(7), 2386-2392.
- Collier, L. S., Nichols, N. N. and Neidle, E. L. (1997). *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 179(18), 5943-5946.
- Cuadrado, V., Gomila, M., Merini, L., Giulietti, A. M. and Moore, E. R. B. (2010). *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(Pt 11),

2606-2612.

- D'Argenio, D. A., Segura, A., Coco, W. M., Bünz, P. V. and Ornston, L. N. (1999). The physiological contribution of *Acinetobacter* PcaK, a transport system that acts upon protocatechuate, can be masked by the overlapping specificity of VanK. *J. Bacteriol.* 181(11), 3505-3515.
- Darling, A. E., Mau, B. and Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS. One.* 5(6), e11147.
- De Baere, T., Steyaert, S., Wauters, G., Des Vos, P., Goris, J., Coenye, T., Suyama, T., Verschraegen, G. and Vaneechoutte, M. (2001). Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/'*thomasi*' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(Pt 2), 547-558.
- Denef, V. J., Klappenbach, J. A., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Rodrigues, J. L., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Eltis, L. D. and Tiedje, J. M. (2006). Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1), 585-595.
- Denef, V. J., Park, J., Tsoi, T. V., Rouillard, J. M., Zhang, H., Wibbenmeyer, J. A., Verstraete, W., Gulari, E., Hashsham, S. A. and Tiedje, J. M. (2004). Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8), 4961-4970.
- Denef, V. J., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Park, J., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Tiedje, J. M. and Eltis, L. D. (2005). Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J. Bacteriol.* 187(23), 7996-8005.
- Dennis, P., Edwards, E. A., Liss, S. N. and Fulthorpe, R. (2003). Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2), 769-778.
- Don, R. H. and Pemberton, J. M. (1981). Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145(2), 681-686.

- Espinoza Tofalos, A., Daghighi, M., González, M., Papacchini, M., Franzetti, A. and Seeger, M. (2018). Toluene degradation by *Cupriavidus metallidurans* CH34 in nitrate-reducing conditions and in bioelectrochemical systems. *FEMS. Microbiol. Lett.* 365(12).
- Ezeizika, O. C., Collier-Hyams, L. S., Dale, H. A., Burk, A. C. and Neidle, E. L. (2006). CatM regulation of the *benABCDE* operon: functional divergence of two LysR-type paralogs in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3), 1749-1758.
- Fang, L., Shi, T., Chen, Y., Wu, X., Zhang, C., Tang, X., Li, Q. X. and Hua, R. (2019). Kinetics and catabolic pathways of the insecticide chlorpyrifos, annotation of the degradation genes, and characterization of enzymes TcpA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1^T. *J. Agric. Food. Chem.* 67(8), 2245-2254.
- Fetzner, S. and Lingens, F. (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* 58(4), 641-685.
- Fida, T. T., Moreno-Forero, S. K., Breugelmans, P., Heipieper, H. J., Röling, W. F. and Springael, D. (2017). Physiological and transcriptome response of the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Novosphingobium* sp. LH128 after inoculation in soil. *Environ. Sci. Technol.* 51(3), 1570-1579.
- Flood, J. J. and Copley, S. D. (2018). Genome-wide analysis of transcriptional changes and genes that contribute to fitness during degradation of the anthropogenic pollutant pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum*. *mSystems.* 3(6).
- Fukuoka, K., Ozeki, Y. and Kanaly, R. A. (2015). Aerobic biotransformation of 3-methylindole to ring cleavage products by *Cupriavidus* sp. strain KK10. *Biodegradation.* 26(5), 359-373.
- Furukawa, K. (2000). Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46(6), 283-296.
- Futamata, H., Harayama, S. and Watanabe, K. (2001). Diversity in kinetics of trichloroethylene-degrading activities exhibited by phenol-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(2), 248-253.
- Gürtler, V., Mayall, B. C. and Seviour, R. (2004). Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus

- Rhodococcus*? FEMS Microbiol. Rev. 28(3), 377-403.
- Gan, H. M. (2019). Commentary: complete genome sequence of 3-chlorobenzoate-degrading bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and reclassification of the strains of the genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* based on phylogenetic and whole-genome sequence analyses. Front. Microbiol. 10, 2011.
- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R. and Jan, G. (2019). Review: adaptation of beneficial propionibacteria, *Lactobacilli*, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. Front. Microbiol. 10, 841.
- Gibson, J. and Harwood, C. S. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. Annu. Rev. Microbiol. 56, 345-369.
- Gonçalves, E. R., Hara, H., Miyazawa, D., Davies, J. E., Eltis, L. D. and Mohn, W. W. (2006). Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 72(9), 6183-6193.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. and Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(Pt 1), 81-91.
- Han, L., Zhao, D. and Li, C. (2015). Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. Braz. J. Microbiol. 46(2), 433-441.
- Hara, H., Eltis, L. D., Davies, J. E. and Mohn, W. W. (2007). Transcriptomic analysis reveals a bifurcated terephthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J. Bacteriol. 189(5), 1641-1647.
- Hara, H., Stewart, G. R. and Mohn, W. W. (2010). Involvement of a novel ABC transporter and monoalkyl phthalate ester hydrolase in phthalate ester catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 76(5), 1516-1523.
- Harris, H. M. B., Bourin, M. J. B., Claesson, M. J. and O'Toole, P. W. (2017). Phylogenomics and comparative genomics of *Lactobacillus salivarius*, a mammalian gut commensal. Microb. Genom. 3(8), e000115.

- Harwood, C. S. (1989). A methyl-accepting protein is involved in benzoate taxis in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 171(9), 4603-4608.
- Harwood, C. S., Nichols, N. N., Kim, M. K., Ditty, J. L. and Parales, R. E. (1994). Identification of the *pcaRKLF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. J. Bacteriol. 176(21), 6479-6488.
- Harwood, C. S. and Parales, R. E. (1996). The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. Annu. Rev. Microbiol. 50, 553-590.
- Harwood, C. S., Parales, R. E. and Dispensa, M. (1990). Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. Appl. Environ. Microbiol. 56(5), 1501-1503.
- Hoffmann, D., Kleinstuber, S., Müller, R. H. and Babel, W. (2003). A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. Microbiology. 149(Pt 9), 2545-2556.
- Hosaka, M., Kamimura, N., Toribami, S., Mori, K., Kasai, D., Fukuda, M. and Masai, E. (2013). Novel tripartite aromatic acid transporter essential for terephthalate uptake in *Comamonas* sp. strain E6. Appl. Environ. Microbiol. 79(19), 6148-6155.
- Hunt, M., Silva, N. D., Otto, T. D., Parkhill, J., Keane, J. A. and Harris, S. R. (2015). Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. Genome. Biol. 16, 294.
- Iino, T., Wang, Y., Miyauchi, K., Kasai, D., Masai, E., Fujii, T., Ogawa, N. and Fukuda, M. (2012). Specific gene responses of *Rhodococcus jostii* RHA1 during growth in soil. Appl. Environ. Microbiol. 78(19), 6954-6962.
- Imperlini, E., Bianco, C., Lonardo, E., Camerini, S., Cermola, M., Moschetti, G. and Defez, R. (2009). Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83(4), 727-738.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. and Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield

- growth under oligotrophic conditions. *Microbiology*. 166(6), 531-545.
- Ismail, W. and Gescher, J. (2012). Epoxy coenzyme A thioester pathways for degradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15), 5043-5051.
- Ito, N., Itakura, M., Eda, S., Saeki, K., Oomori, H., Yokoyama, T., Kaneko, T., Tabata, S., Ohwada, T., Tajima, S., Uchiumi, T., Masai, E., Tsuda, M., Mitsui, H. and Minamisawa, K. (2006). Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. *Microbes. Environ.* 21(4), 240-250.
- Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Medigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D. and Mergeay, M. (2010). The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS. One*. 5(5), e10433.
- Jencova, V., Strnad, H., Chodora, Z., Ulbrich, P., Vlcek, C., Hickey, W. J. and Paces, V. (2008). Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Res. Microbiol.* 159(2), 118-127.
- Jeon, C. O., Park, M., Ro, H. S., Park, W. and Madsen, E. L. (2006). The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2), 1086-1095.
- Jin, Y., Zhou, J., Zhou, J., Hu, M., Zhang, Q., Kong, N., Ren, H., Liang, L. and Yue, J. (2020). Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biol. Direct.* 15(1), 6.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R. and Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 30(9), 1236-1240.

- Kallscheuer, N., Vogt, M., Kappelmann, J., Krumbach, K., Noack, S., Bott, M. and Marienhagen, J. (2016). Identification of the *phd* gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(4), 1871-1881.
- Kanehisa, M., Sato, Y. and Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428(4), 726-731.
- Kim, K. and Gan, H. M. (2017). A glimpse into the genetic basis of symbiosis between *Hydrogenophaga* and their helper strains in the biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate. *J. Genomics.* 5, 77-82.
- Kim, D., Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods.* 12(4), 357-360.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. and Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 2), 346-351.
- Kim, S. and Picardal, F. (2001). Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4), 1953-1955.
- Kim, S. and Picardal, F. W. (2000). A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates. *FEMS. Microbiol. Lett.* 185(2), 225-229.
- Kim, S. Y. and Volsky, D. J. (2005). PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC. Bioinformatics.* 6, 144.
- Kitazawa, A., Amagai, T. and Ohura, T. (2006). Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ. Sci. Technol.* 40(15), 4592-4598.
- Koentjoro, M. P., Adachi, N., Senda, M., Ogawa, N. and Senda, T. (2018). Crystal structure of the DNA-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator CbnR in complex with a DNA fragment of the recognition-binding site in the promoter region. *FEBS. J.* 285(5), 977-989.

- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7), 1870-1874.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y. B. and Naidu, R. (2016). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) degradation potential of a new acid tolerant, diazotrophic P-solubilizing and heavy metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. MTS-7 isolated from long-term mixed contaminated soil. *Chemosphere*. 162, 31-39.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. and Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome. Biol.* 5(2), R12.
- Kutralam-Muniasamy, G. and Pérez-Guevara, F. (2018). Genome characteristics dictate poly-R-(3)-hydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* H16. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 34(6), 79.
- Lacal, J., Muñoz-Martínez, F., Reyes-Darías, J. A., Duque, E., Matilla, M., Segura, A., Calvo, J. J., Jiménez-Sánchez, C., Krell, T. and Ramos, J. L. (2011). Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 13(7), 1733-1744.
- Ledger, T., Aceituno, F. and Gonzalez, B. (2009). 3-chlorobenzoate is taken up by a chromosomally encoded transport system in *Cupriavidus necator* JMP134. *Microbiology*. 155(Pt 8), 2757-2765.
- Leveau, J. H., Zehnder, A. J. and van der Meer, J. R. (1998). The *tfdK* gene product facilitates uptake of 2,4-dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 180(8), 2237-2243.
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. [arXiv:1303.3997v2](https://arxiv.org/abs/1303.3997v2).
- Lin, L. X., Liu, H. and Zhou, N. Y. (2010). MhbR, a LysR-type regulator involved in 3-hydroxybenzoate catabolism *via* gentisate in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Microbiol. Res.* 165(1), 66-74.
- Liu, S., Ogawa, N., Senda, T., Hasebe, A. and Miyashita, K. (2005). Amino acids in positions 48, 52, and 73 differentiate the substrate specificities of the highly homologous chlorocatechol 1,2-dioxygenases CbnA and TcbC. *J. Bacteriol.* 187(15), 5427-5436.

- Liu, X. and Parales, R. E. (2009). Bacterial chemotaxis to atrazine and related s-triazines. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(17), 5481-5488.
- Lu, P., Li, Q., Liu, H., Feng, Z., Yan, X., Hong, Q. and Li, S. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresour. Technol.* 127, 337-342.
- Lundgren, C. A. K., Sjöstrand, D., Biner, O., Bennett, M., Rudling, A., Johansson, A. L., Brzezinski, P., Carlsson, J., von Ballmoos, C. and Högbom, M. (2018). Scavenging of superoxide by a membrane-bound superoxide oxidase. *Nat. Chem. Biol.* 14(8), 788-793.
- Lykidis, A., Perez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I. J., Ivanova, N. N., Hooper, S. D., Lapidus, A., Lucas, S., Gonzalez, B. and Kyrpides, N. C. (2010). The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS. One.* 5(3), e9729.
- MacLean, A. M., Haerty, W., Golding, G. B. and Finan, T. M. (2011). The LysR-type PcaQ protein regulates expression of a protocatechuate-inducible ABC-type transport system in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology.* 157(Pt 9), 2522-2533.
- Maddocks, S. E. and Oyston, P. C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* 154(Pt 12), 3609-3623.
- Makkar, N. S. and Casida, L. E. JR. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bac.* 37(4), 323-326.
- Martínez, P., Agulló, L., Hernández, M. and Seeger, M. (2007). Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading bacterium *Burkholderia xenovorans* LB400. *Arch. Microbiol.* 188(3), 289-297.
- Mason, J. R. and Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 277-305.
- McLeod, M. P. and Eltis, L. D. (2008). Genomic insights into the aerobic pathways for degradation of organic pollutants. p. 1–23. In E. Díaz (ed.), *Microbial biodegradation: genomics and molecular biology*. Caister

Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W. and Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(42), 15582-15587.
- Min, J., Chen, W. and Hu, X. (2019). Biodegradation of 2,6-dibromo-4-nitrophenol by *Cupriavidus* sp. strain CNP-8: kinetics, pathway, genetic and biochemical characterization. *J. Hazard. Mater.* 361, 10-18.
- Min, J., Chen, W., Wang, J. and Hu, X. (2017). Genetic and biochemical characterization of 2-chloro-5-nitrophenol degradation in a newly isolated bacterium, *Cupriavidus* sp. strain CNP-8. *Front. Microbiol.* 8, 1778.
- Min, J., Wang, J., Chen, W. and Hu, X. (2018). Biodegradation of 2-chloro-4-nitrophenol *via* a hydroxyquinol pathway by a Gram-negative bacterium, *Cupriavidus* sp. strain CNP-8. *AMB. Express.* 8(1), 43.
- Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S. Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D. and Finn, R. D. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic. Acids. Res.* 43, D213-221.
- Miyakoshi, M., Shintani, M., Terabayashi, T., Kai, S., Yamane, H. and Nojiri, H. (2007). Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 harboring the completely sequenced IncP-7 plasmid pCAR1. *J. Bacteriol.* 189(19), 6849-6860.
- Miyazaki, R., Yano, H., Sentchilo, V. and van der Meer, J. R. (2018). Physiological and transcriptome changes induced by *Pseudomonas putida* acquisition of an integrative and conjugative element. *Sci. Rep.* 8(1), 5550.

- Monsieurs, P., Mijndendonckx, K., Provoost, A., Venkateswaran, K., Ott, C. M., Leys, N. and Van Houdt, R. (2014). Genome sequences of *Cupriavidus metallidurans* strains NA1, NA4, and NE12, isolated from space equipment. *Genome. Announc.* 2(4).
- Monsieurs, P., Provoost, A., Mijndendonckx, K., Leys, N., Gaudreau, C. and Van Houdt, R. (2013). Genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain H1130, isolated from an invasive human infection. *Genome. Announc.* 1(6).
- Moriuchi, R., Takada, K., Takabayashi, M., Yamamoto, Y., Shimodaira, J., Kuroda, N., Akiyama, E., Udagawa, M., Minai, R., Fukuda, M., Senda, T. and Ogawa, N. (2017). Amino acid residues critical for DNA binding and inducer recognition in CbnR, a LysR-type transcriptional regulator from *Cupriavidus necator* NH9. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(11), 2119-2129.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. and Senda, T. (2003). Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* 328(3), 555-566.
- Nichols, N. N. and Harwood, C. S. (1997). PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 179(16), 5056-5061.
- Nishikawa, Y., Yasumi, Y., Noguchi, S., Sakamoto, H. and Nikawa, J. (2008). Functional analyses of *Pseudomonas putida* benzoate transporters expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(8), 2034-2038.
- Nishikino, T., Hijikata, A., Miyanoiri, Y., Onoue, Y., Kojima, S., Shirai, T. and Homma, M. (2018). Rotational direction of flagellar motor from the conformation of FliG middle domain in marine *Vibrio*. *Sci. Rep.* 8(1), 17793.
- Nogales, J., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Serra, B., Pingarrón, J. M., García, J. L. and Díaz, E. (2011). Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the *gal* cluster from *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 79(2), 359-374.

- Norberg, P., Bergstrom, M. and Hermansson, M. (2014). Complete nucleotide sequence and analysis of two conjugative broad host range plasmids from a marine microbial biofilm. *PLoS. One.* 9(3), e92321.
- Ogawa, N., McFall, S. M., Klem, T. J., Miyashita, K. and Chakrabarty, A. M. (1999). Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *J. Bacteriol.* 181(21), 6697-6705.
- Ogawa, N. and Miyashita, K. (1995). Recombination of a 3-chlorobenzoate catabolic plasmid from *Alcaligenes eutrophus* NH9 mediated by direct repeat elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11), 3788-3795.
- Ogawa, N. and Miyashita, K. (1999). The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of *Alcaligenes eutrophus* NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2), 724-731.
- Ogawa, N., Miyashita, K. and Chakrabarty, A. M. (2003). Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. *Chem. Rec.* 3(3), 158-171.
- Ohmiya, Y., Ono, T., Taniguchi, T., Itahana, N., Ogawa, N., Miyashita, K., Ohmiya, K., Sakka, K. and Kimura, T. (2009). Stable expression of the chlorocatechol dioxygenase gene from *Ralstonia eutropha* NH9 in hybrid poplar cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(6), 1425-1428.
- Ohtsubo, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Nagata, Y. and Tsuda, M. (2008). GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC. Bioinformatics.* 9, 376.
- Ohura, T. (2007). Environmental behavior, sources, and effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. World. J.* 7, 372-380.
- Olivera, E. R., Miñambres, B., García, B., Muñoz, C., Moreno, M. A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J. L. and Luengo, J. M. (1998). Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(11), 6419-6424.
- Otani, H., Lee, Y. E., Casabon, I. and Eltis, L. D. (2014). Characterization of *p*-hydroxycinnamate catabolism in a soil Actinobacterium. *J. Bacteriol.* 196(24), 4293-4303.

- Parales, R. E., Luu, R. A., Hughes, J. G. and Ditty, J. L. (2015). Bacterial chemotaxis to xenobiotic chemicals and naturally-occurring analogs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 318-326.
- Parnell, J. J., Park, J., Denef, V., Tsoi, T., Hashsham, S., Quensen, J., 3rd and Tiedje, J. M. (2006). Coping with polychlorinated biphenyl (PCB) toxicity: physiological and genome-wide responses of *Burkholderia xenovorans* LB400 to PCB-mediated stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(10), 6607-6614.
- Patrauchan, M. A., Florizone, C., Dosanjh, M., Mohn, W. W., Davies, J. and Eltis, L. D. (2005). Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *J. Bacteriol.* 187(12), 4050-4063.
- Patrauchan, M. A., Parnell, J. J., McLeod, M. P., Florizone, C., Tiedje, J. M. and Eltis, L. D. (2011). Genomic analysis of the phenylacetyl-CoA pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Arch. Microbiol.* 193(9), 641-650.
- Peoples, O. P. and Sinskey, A. J. (1989). Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 264(26), 15293-15297.
- Perez-Pantoja, D., Donoso, R., Agullo, L., Cordova, M., Seeger, M., Pieper, D. H. and Gonzalez, B. (2012). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environ. Microbiol.* 14(5), 1091-1117.
- Perez-Pantoja, D., Iglesia, R. D. I., Pieper, D. H. and Gonzalez, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS. Microbiol. Rev.* 32(5), 736-794.
- Perez-Pantoja, D., Leiva-Novoa, P., Donoso, R. A., Little, C., Godoy, M., Pieper, D. H. and Gonzalez, B. (2015). Hierarchy of carbon source utilization in soil bacteria: hegemonic preference for benzoate in complex aromatic compound mixtures degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* strain JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(12), 3914-3924.

- Pernstich, C., Senior, L., MacInnes, K. A., Forsaith, M. and Curnow, P. (2014). Expression, purification and reconstitution of the 4-hydroxybenzoate transporter PcaK from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Protein. Expr. Purif.* 101(100), 68-75.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T. and Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33(3), 290-295.
- Pham, H. T. and Parkinson, J. S. (2011). Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *J. Bacteriol.* 193(23), 6597-6604.
- Pieper, D. H., Knackmuss, H. J. and Timmis, K. N. (1993). Accumulation of 2-chloromuconate during metabolism of 3-chlorobenzoate by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39(4), 563-567.
- Poehlein, A., Kusian, B., Friedrich, B., Daniel, R. and Bowien, B. (2011). Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. *J. Bacteriol.* 193(18), 5017.
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Potter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voss, I., Gottschalk, G., Steinbuchel, A., Friedrich, B. and Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* 24(10), 1257-1262.
- Prieto, M. A. and García, J. L. (1997). Identification of the 4-hydroxyphenylacetate transport gene of *Escherichia coli* W: construction of a highly sensitive cellular biosensor. *FEBS. Lett.* 414(2), 293-297.
- Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B. and Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC. Genomics.* 17, 90.
- Puglisi, E., Cahill, M. J., Lessard, P. A., Capri, E., Sinskey, A. J., Archer, J. A. and Boccazzi, P. (2010). Transcriptional response of *Rhodococcus aetherivorans* I24 to polychlorinated biphenyl-contaminated sediments. *Microb. Ecol.* 60(3), 505-515.

- Qin, Q. L., Xie, B. B., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhou, J., Oren, A. and Zhang, Y. Z. (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *J. Bacteriol.* 196(12), 2210-2215.
- Qu, Y., Shen, E., Ma, Q., Zhang, Z., Liu, Z., Shen, W., Wang, J., Li, D., Li, H. and Zhou, J. (2015). Biodegradation of indole by a newly isolated *Cupriavidus* sp. SHE. *J. Environ. Sci.* 34, 126-132.
- Ray, J., Waters, R. J., Skerker, J. M., Kuehl, J. V., Price, M. N., Huang, J., Chakraborty, R., Arkin, A. P. and Deutschbauer, A. (2015). Complete genome sequence of *Cupriavidus basilensis* 4G11, isolated from the Oak Ridge field research center site. *Genome. Announc.* 3(3).
- Reams, A. B. and Neidle, E. L. (2004). Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 119-142.
- Reineke, W. (1998). Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 287-331.
- Reva, O. N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J. D. and Tümmeler, B. (2006). Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* 188(11), 4079-4092.
- Reverón, I., Jiménez, N., Curiel, J. A., Peñas, E., López de Felipe, F., de Las Rivas, B. and Muñoz, R. (2017). Differential gene expression by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in response to phenolic compounds reveals new genes involved in tannin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(7).
- Richter, M. and Rossello-Mora, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106(45), 19126-19131.
- Rieger, P. G., Meier, H. M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T. and Knackmuss, H. J. (2002). Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J. Biotechnol.* 94(1), 101-123.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26(1), 139-140.
- Rodrigues, J. L., Kachel, C. A., Aiello, M. R., Quensen, J. F., Maltseva, O. V., Tsoi, T. V. and Tiedje, J. M.

- (2006). Degradation of aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(*ohb*) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1(*fc*b). Appl. Environ. Microbiol. 72(4), 2476-2482.
- Rodriguez, R. L. M., and Konstantinidis, K. T. (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. PeerJ Preprints. 4:e1900v1.
- Roggo, C., Clerc, E. E., Hadadi, N., Carraro, N., Stocker, R. and van der Meer, J. R. (2018). Heterologous expression of *Pseudomonas putida* methyl-accepting chemotaxis proteins yields *Escherichia coli* cells chemotactic to aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 84(18).
- Ryan, M. P., Pembroke, J. T. and Adley, C. C. (2007). *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. J. Appl. Microbiol. 103(4), 754-764.
- Saavedra, J. M., Acevedo, F., González, M. and Seeger, M. (2010). Mineralization of PCBs by the genetically modified strain *Cupriavidus necator* JMS34 and its application for bioremediation of PCBs in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87(4), 1543-1554.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L. and Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64(Pt 9), 3087-3103.
- Sahl, J. W., Caporaso, J. G., Rasko, D. A. and Keim, P. (2014). The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. PeerJ. 2: e332.
- Saint, C. P. and Romas, P. (1996). 4-Methylphthalate catabolism in *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* Pc701: a gene encoding a phthalate-specific permease forms part of a novel gene cluster. Microbiology. 142 (Pt 9), 2407-2418.
- Salmon, R. C., Cliff, M. J., Rafferty, J. B. and Kelly, D. J. (2013). The CouPSTU and TarPQM transporters in

- Rhodopseudomonas palustris*: redundant, promiscuous uptake systems for lignin-derived aromatic substrates. PLoS One 8(3), e59844.
- Sarkar, M. K., Paul, K. and Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 107(20), 9370-9375.
- Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J. D., Concepcion, R. N. and Ohta, H. (2006). *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(Pt 5), 973-978.
- Schaper, S. and Messer, W. (1995). Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. J. Biol. Chem. 270(29), 17622-17626.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 30(14), 2068-2069.
- Seto, M., Kimbara, K., Shimura, M., Hatta, T., Fukuda, M. and Yano, K. (1995). A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 61(9), 3353-3358.
- Shafie, N. A., Lau, N. S., Ramachandran, H. and Amirul, A. A. (2017). Complete genome sequences of three *Cupriavidus* strains isolated from various Malaysian environments. Genome. Announc. 5(3).
- Shimizu, M., Kimura, T., Koyama, T., Suzuki, K., Ogawa, N., Miyashita, K., Sakka, K. and Ohmiya, K. (2002). Molecular breeding of transgenic rice plants expressing a bacterial chlorocatechol dioxygenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 68(8), 4061-4066.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K. and Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front. Microbiol. 6, 242.
- Suenaga, H., Yamazoe, A., Hosoyama, A., Kimura, N., Hirose, J., Watanabe, T., Fujihara, H., Futagami, T., Goto, M. and Furukawa, K. (2015). Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Cupriavidus basilensis* KF708 (NBRC 110671) isolated from biphenyl-contaminated soil. Genome.

Announc. 3(2).

Sun, J., Pan, L. and Zhu, L. (2018). Formation of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls by

Bacillus subtilis: new insights into microbial metabolism. Sci. Total. Environ. 613-614, 54-61.

Sun, L. N., Wang, D. S., Yang, E. D., Fang, L. C., Chen, Y. F., Tang, X. Y. and Hua, R. M. (2016). *Cupriavidus*

nantongensis sp. nov., a novel chlorpyrifos-degrading bacterium isolated from sludge. Int. J. Syst. Evol.

Microbiol. 66(6), 2335-2341.

Tada, I., Tanizawa, Y., Endo, A., Tohno, M. and Arita, M. (2017). Revealing the genomic differences between

two subgroups in *Lactobacillus gasseri*. Biosci. Microbiota. Food. Health. 36(4), 155-159.

Tamburro, A., Robuffo, I., Heipieper, H. J., Allocati, N., Rotilio, D., Di Ilio, C. and Favaloro, B. (2004).

Expression of glutathione S-transferase and peptide methionine sulfoxide reductase in *Ochrobactrum*

anthropi is correlated to the production of reactive oxygen species caused by aromatic substrates. FEMS.

Microbiol. Lett. 241(2), 151-156.

Tanizawa, Y., Tada, I., Kobayashi, H., Endo, A., Maeno, S., Toyoda, A., Arita, M., Nakamura, Y., Sakamoto, M.,

Ohkuma, M. and Tohno, M. (2018). *Lactobacillus paragasseri* sp. nov., a sister taxon of *Lactobacillus*

gasseri, based on whole-genome sequence analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68(11), 3512-3517.

Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt,

K. D., Borodovsky, M. and Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic. Acids.

Res. 44(14), 6614-6624.

Teng, Y., Wang, X., Zhu, Y., Chen, W., Christie, P., Li, Z. and Luo, Y. (2017). Biodegradation of

pentachloronitrobenzene by *Cupriavidus* sp. YNS-85 and its potential for remediation of contaminated soils.

Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24(10), 9538-9547.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. and Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-

performance genomics data visualization and exploration. Brief. Bioinform. 14(2), 178-192.

Tiwari, J., Naoghare, P., Sivanesan, S. and Bafana, A. (2017). Biodegradation and detoxification of

- chloronitroaromatic pollutant by *Cupriavidus*. *Bioresour. Technol.* 223, 184-191.
- van der Meer, J. R., Eggen, R. I., Zehnder, A. J. and de Vos, W. M. (1991). Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. *J. Bacteriol.* 173(8), 2425-2434.
- Vandamme, P. and Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(Pt 6), 2285-2289.
- Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E. and Verschraegen, G. (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(Pt 2), 317-327.
- Vangnai, A. S., Takeuchi, K., Oku, S., Kataoka, N., Nitisakulkan, T., Tajima, T. and Kato, J. (2013). Identification of CtpL as a chromosomally encoded chemoreceptor for 4-chloroaniline and catechol in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23), 7241-7248.
- Wang, S., Bai, N., Wang, B., Feng, Z., Hutchins, W. C., Yang, C. H. and Zhao, Y. (2015a). Characterization of the molecular degradation mechanism of diphenyl ethers by *Cupriavidus* sp. WS. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22(21), 16914-16926.
- Wang, S. H., Xu, Y., Liu, S. J. and Zhou, N. Y. (2011a). Conserved residues in the aromatic acid/H⁺ symporter family are important for benzoate uptake by NCgl2325 in *Corynebacterium glutamicum*. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 65(3), 527-532.
- Wang, X., Chen, M., Xiao, J., Hao, L., Crowley, D. E., Zhang, Z., Yu, J., Huang, N., Huo, M. and Wu, J. (2015b). Genome sequence analysis of the naphthenic acid degrading and metal resistant bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3. *PLoS. One.* 10(8), e0132881.
- Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N. and Fujii, T. (2011b). A survey of the cellular responses in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized soil by microarray analysis. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 78(2), 220-232.

- Watahiki, S., Kimura, N., Yamazoe, A., Miura, T., Sekiguchi, Y., Noda, N., Matsukura, S., Kasai, D., Takahata, Y., Nojiri, H. and Fukuda, M. (2019). Ecological impact assessment of a bioaugmentation site on remediation of chlorinated ethylenes by multi-omics analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 65(5), 225-233.
- Watanabe, T., Yamazoe, A., Hosoyama, A., Fujihara, H., Suenaga, H., Hirose, J., Futagami, T., Goto, M., Kimura, N. and Furukawa, K. (2015). Draft genome sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a biphenyl-utilizing bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil. *Genome. Announc.* 3(2).
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. and Eisenbach, M. (1993). Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(19), 8787-8791.
- Wesche, J., Hammer, E., Becher, D., Burchhardt, G. and Schauer, F. (2005). The *bphC* gene-encoded 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase is involved in complete degradation of dibenzofuran by the biphenyl-degrading bacterium *Ralstonia* sp. SBUG 290. *J. Appl. Microbiol.* 98(3), 635-645.
- Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J. and Holt, K. E. (2015). Bandage: interactive visualization of *de novo* genome assemblies. *Bioinformatics.* 31(20), 3350-3352.
- Wu, H., Kato, J., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N. and Ohtake, H. (2000). Identification and characterization of two chemotactic transducers for inorganic phosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182(12), 3400-3404.
- Wu, Y., Mohanty, A., Chia, W. S. and Cao, B. (2016). Influence of 3-chloroaniline on the biofilm lifestyle of *Comamonas testosteroni* and its implications on bioaugmentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(14), 4401-4409.
- Wu, X., Wang, W., Liu, J., Pan, D., Tu, X., Lv, P., Wang, Y., Cao, H., Wang, Y. and Hua, R. (2017). Rapid biodegradation of the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. *J. Agric. Food. Chem.* 65(18), 3711-3720.
- Xiang, S., Lin, R., Shang, H., Xu, Y., Zhang, Z., Wu, X. and Zong, F. (2020). Efficient degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides by the alkali-tolerant *Cupriavidus oxalaticus* strain X32. *J. Agric. Food.*

Chem. 68(12), 3786-3795.

- Xu, Y., Chen, B., Chao, H. and Zhou, N. Y. (2013). *mhpT* encodes an active transporter involved in 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolism by *Escherichia coli* K-12. Appl. Environ. Microbiol. 79(20), 6362-6368.
- Xu, Y., Gao, X., Wang, S. H., Liu, H., Williams, P. A. and Zhou, N. Y. (2012a). MhbT is a specific transporter for 3-hydroxybenzoate uptake by gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 78(17), 6113-6120.
- Xu, Y., Wang, S. H., Chao, H. J., Liu, S. J. and Zhou, N. Y. (2012b). Biochemical and molecular characterization of the gentisate transporter GenK in *Corynebacterium glutamicum*. PLoS. One. 7(7), e38701.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. 39(11), 897-904.
- Yamamoto-Tamura, K., Kawagishi, I., Ogawa, N. and Fujii, T. (2015). A putative porin gene of *Burkholderia* sp. NK8 involved in chemotaxis toward β -ketoadipate. Biosci. Biotechnol. Biochem. 79(6), 926-936.
- Yoshida, N., Ohhata, N., Yoshino, Y., Katsuragi, T., Tani, Y. and Takagi, H. (2007). Screening of carbon dioxide-requiring extreme oligotrophs from soil. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71(11), 2830-2832.
- Yuan, K., Xie, X., Wang, X., Lin, L., Yang, L., Luan, T. and Chen, B. (2018). Transcriptional response of *Mycobacterium* sp. strain A1-PYR to multiple polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations. Environ. Pollut. 243(Pt B), 824-832.
- Zhang, Y. and Qiu, S. (2016). Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. Antonie. Van. Leeuwenhoek. 109(1), 71-82.
- Zühlke, M. K., Schlüter, R., Mikolasch, A., Zühlke, D., Giersberg, M., Schindler, H., Henning, A. K., Frenzel, H., Hammer, E., Lalk, M., Bornscheuer, U. T., Riedel, K., Kunze, G. and Schauer, F. (2017). Biotransformation and reduction of estrogenicity of bisphenol A by the biphenyl-degrading *Cupriavidus*

basilensis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(9), 3743-3758.

Zúñiga, A., Fuente, F., Federici, F., Lionne, C., Bônnet, J., Lorenzo, V. D. and González, B. (2018). An engineered device for indoleacetic acid production under quorum sensing signals enables *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 to stimulate plant growth. ACS. Synth. Biol. 7(6), 1519-1527.

伊藤操子 (2016). 「除草剤とは」世界における除草剤の歴史：その誕生・発達・変遷. 草と緑 8, 3-11.

中地重晴 (2005). PCB による環境汚染の現状と環境監視等の課題. 環境技術 34, 2, 82-87.