

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2013

課題番号：20570220

研究課題名(和文)機能進化ゲノミクス：進化解析を用いた共生遺伝子のゲノム網羅的探索とその実験的検証

研究課題名(英文)Functional Evolutionary genomics: Inferring the origin and function of the genes involved in nodulation symbiosis with nitrogen fixation

研究代表者

青木 誠志郎(Aoki, Seishiro)

東京大学・総合文化研究科・学術研究員

研究者番号：10334301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：根粒形成や窒素固定を伴うマメと根粒菌の相互作用にとって、重要な役割をもつ共生遺伝子群は、他の一般的遺伝子とは異なる、特別な進化を経てきた可能性がある。様々なバクテリアのゲノム情報を比較して、この特別な進化をたどることで、根粒菌に特異的と考えられる共生遺伝子を新しく推定し、その進化を解析した。その結果、従来プロテオバクテリア起源と考えられてきたマメ科根粒菌の起源が、プロテオバクテリアにあるであろうことを発見した。さらに、今まで共生機能が知られていなかった遺伝子の中に、根粒菌に特徴的な分子進化を経た可能性があるものがあることがわかった。これらへの遺伝子破壊により共生機能の確認を行っている。

研究成果の概要(英文)：There is a possibility that the symbiosis genes with an important role for the nodulation and nitrogen fixation passed through the special evolution that may be different from the other housekeeping genes. We compared the genomic information of various bacteria using the background information of symbiosis with legumes and inferred the new symbiotic nodulation genes and the evolution of this symbiosis. We examined large scale phylogenetic profiling and revealed the evolutionary origin of nodulation genes. Contrary to the widely accepted scenario of the alpha-proteobacterial origin of rhizobia, our exhaustive analysis showed that the nodulation symbiosis of rhizobia with legumes may have originated from beta-proteobacterial family. Furthermore, we found that there was a possibility that several genes which symbiosis function was not known so far are characteristic of root nodule bacteria. We confirm the symbiosis function of these genes by the gene destruction.

研究分野：植物進化学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：進化 ゲノム 共生 根粒菌 マメ科植物

1. 研究開始当初の背景

基本的に多くの比較ゲノム解析では BLAST 等で配列類似性が推定できない場合、遺伝子機能は unknown となり、結果として全ゲノム解読済みの生物ほぼ全てにおいて多くの遺伝子が「機能未知遺伝子」に分類されてきた。これに対し、いくつかの進化的仮定に基づく機能推定法（系統プロファイル法、ロゼッタストーン法、近傍遺伝子法、ミラーツリー法等）が開発され各種データベースとともに公開されてきた。ところが根粒菌の共生関連遺伝子である nod 遺伝子群を用い、これらの方法で機能推定を行ったところ、ほとんどの nod 遺伝子の共生機能がどのデータベースでも推定できないことがわかった。この理由は、従来の進化的機能推定法が単純すぎる仮定に基づいていたためと考えられた（例、系統プロファイル法：根粒菌は持つが他の生物が持たない遺伝子を共生遺伝子と推定、近傍遺伝子法：ゲノム上で共生遺伝子の近傍にいつも存在するものを関連機能遺伝子と推定）。近年、数多くの遺伝子に対し分子進化解析がなされ、これらの推定法でわかる以外にも様々な進化的特徴が発見されている。私も nod 遺伝子群について解析を行ったところ、遺伝子重複と正の自然選択（nodD）、遺伝子機能の平行進化（nodM）、遺伝子水平移行に伴う宿主特異性進化（nodFE）などが示唆されることがわかった。さらに今まで共生機能の知られていなかった遺伝子のいくつかに nod 遺伝子と同じ進化的特徴がある可能性が見つかった。そこで「nod 遺伝子群と同じ進化的特徴をもつ遺伝子をゲノム網羅して探索すれば未発見の共生遺伝子が見つかるのではないか？」と考えこれに実験による検証を加えることで本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

数万を超える多様な生物のゲノムの配列

解析が進み情報が莫大に蓄積する現在、従来の比較ゲノミクスでなされてきた「配列類似性による遺伝子機能推定」を拡充した解析法が望まれている。そこで私は新しく“進化的特徴の類似性に基づく遺伝子機能推定法”を開発することにより、機能進化ゲノミクス（Functional Evolutionary Genomics）分野を展開したいと考えた。本研究では、「注目する形質にとって重要な遺伝子と同じ進化的特徴をもつ（機能未知）遺伝子を、ゲノムを網羅して数理的に探索し、実験的に形質への関与（機能）を検証すること」を具体的目標と考えた。そこで本研究の目的は分子生物学的には「機能未知遺伝子の進化的機能推定法の開発」、進化学的には「推定遺伝子の祖先機能復元実験による進化理論の実証」を考えた。

本研究の進行ではまず（1）既知の共生関連遺伝子がもつ分子進化的特徴を調べ上げ、次に（2）見つかった進化的特徴への類似性を指標とし、根粒菌を含む多種バクテリアゲノム情報を用いた計算で共生関連機能の未発見な遺伝子を網羅的に探索し、（3）新しく推定された遺伝子が果たして共生関連機能を有するかを確かめるため、分子生理実験による機能の検証を行うことを計画目標とした。

3. 研究の方法

研究方法は以下のように2つのアプローチからなる研究にわけることができる。

（1、数理的アプローチ）進化的解析による遺伝子機能推定アルゴリズム・プログラムの開発

比較ゲノムとしての、遺伝子クラスタリング、系統プロファイル法を拡張し、根粒共生に関わる遺伝子の推定を試みた。系統樹を幾何グラフとしてトポロジーを考え、まず注目している生物の遺伝子を内包する仮想単系

統群全ての数え上げを行った。次にそれぞれの単系統群の要素（生物、遺伝子）を、前もって入力済みの「特別な形質を示す集合（根粒菌集合）」と比較解析した。別に分類学的な生物集合（プロテオバクテリア）についても同様に比較することで、大もとの系統樹がどれだけ種の系統樹に類似しているか、あるいは根粒形成に得意的なのかを解析した。（2、実験的アプローチ）遺伝子破壊系と祖先 DNA 配列復元系の開発および感染実験

材料としてマメ科モデル植物ミヤコグサの MG-20 系統および共生菌 *Mesorhizobium loti* MAFF30309 を利用した。共生関連機能の推定された機能未知遺伝子を分子生物学的手法（recombinant PCR と Gateway システム）による遺伝子破壊用ベクターへの導入、および相同組み替えによる遺伝子の破壊）により行った。作成された根粒菌突然変異体を用い *in vitro* での着生実験を行い、根粒形成と窒素固定系への影響を調べた。

この他さらに以下の基礎研究と拡張研究を方法として用いた。

（3、基礎研究1）根粒菌 *nod* 遺伝子の分子進化解析

nod 遺伝子群は根粒形成に必須な遺伝子として分子遺伝学的手法で単離され、その多くは *Nod* ファクター（マメとの認識物質である多糖類）合成に関する機能を果たすことが知られている。そこで、基礎研究として、*nod* 遺伝子群の分子進化・系統解析を進めた。共生の起源（*nodIJ*）、正の自然選択（*nodD*）、平行進化（*nodM*）、遺伝子水平移行による共生特異性の変化（*nodEF*）」について解析を行った。

（4、基礎研究2）野生根粒菌調査

現在研究が進み遺伝子の配列情報が蓄積されているのは農学的に重要な植物から採集された根粒菌がほとんどであり、野生植物に着生する根粒菌の情報はきわめて少ない。そこで日本各地の野生植物から（特にレンリ

ソウ属、ソラマメ属、オジギソウ属を中心に）根粒菌を採集した。本研究で推測された遺伝子群を配列のターゲットとして、これら野生根粒菌の遺伝子配列決定を行い、分子進化解析を行った。

（5、拡張研究1）真核生物ゲノム遺伝子の機能推定法の開発

真核生物の場合、遺伝子水平移行よりもむしろ遺伝子重複が進化的に重要である場合が近年数多く報告されている。これらの報告における進化理論をもとにミヤコグサの根粒形成関連遺伝子の解析を行った。

4. 研究成果

本研究の目的は、根粒菌ゲノムから新たな共生遺伝子を探索することであったが、最も大きな成果は、マメ-根粒菌共生系の起源が明らかになったという発見であった。従来、農作物を中心としたマメ科植物の多くが、プロテオバクテリアと共生することから、マメ-根粒菌の起源はプロテオバクテリアであると考えられてきた。また、共生遺伝子は分子遺伝学的に見つかったものの、「*nod* 遺伝子群が、どのような DNA 変異により共生に必須な機能を得たのか？」については全く解析がなされてこなかった。我々は根粒形成に必須な *nod* 遺伝子群の詳細な分子進化解析を行い、*nod* 遺伝子群の起源はプロテオバクテリアと考えられること、起源した後 *nod* 遺伝子群には、置換速度の加速による適応的な分子進化が起きていることを発見した。この結果は *nod* 遺伝子群の 10 遺伝子により検証されたが、同論文内の系統プロファイル解析によると、ゲノム内には *nod* 遺伝子群と同じ進化的特徴のある未知共生遺伝子が隠れていることがわかった。

そこでこの、「根粒菌集合における水平移行」を指標にゲノム網羅的な解析を行なった結果、共生アイランドの位置を正確に推定し、

共生アイランド以外の部位に、新しく転写因子やアデニル酸サイクレスを含め数多くの機能未知の遺伝子が、共生遺伝子として推定されることがわかった。遺伝子破壊と感染実験系の導入に成功し、いくつかの試行的な実験結果を得た。過去の多くの研究で見つかった共生遺伝子は、その破壊により根粒形成数が低下することがわかっている。本研究でもそのような着生数低下型の遺伝子がいくつか見つかったが、その逆に遺伝子破壊により着生数が増える遺伝子が見つかった。そして根粒の体積についても比較したところ、このような場合、野生株よりも遺伝子破壊株の方が、小さくなるという結果を得た。これは、宿主側の表現型可塑性により、1つあたりの共生体積の減少を感染数で補償している可能性を示していると考え、さらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

. Seishiro Aoki, Motomi Ito, Wataru Iwasaki

“From α - to β -Proteobacteria: The origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*”

Molecular Biology and Evolution

2013 30:2494-2408、査読有り

. Seishiro Aoki, Tetsuya Kondo, Danielle Prévost, Sayuri Nakata, Tadashi Kajita, Motomi Ito

“Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus* indigenous to Japan.”

Systematic and Applied Microbiology

2010 33:383-397、査読有り

・Makoto Fujiwara, Haruki Hashimoto, Yusuke Kazama, Tomonari Hirano, Yasushi, Yoshioka, Seishiro Aoki, Naoki Sato, Ryuuichi Itoh, and Tomoko Abe

“Dynamic morphologies of pollen plastids visualised by vegetative-specific *FtsZ1*-GFP in *Arabidopsis thaliana*”
Protoplasma

2010 242: 19-33、査読有り

・Satoko Iida, Atsuko Miyagi, Seishiro Aoki, Motomi Ito, Yasuro Kadono, Keiko Kosuge.

“Molecular Adaptation of *rbcL* in the *Heterophyllous* Aquatic Plant *Potamogeton*.”

PLoS ONE

2009, 4: e4633、査読有り

[学会発表](計9件)

・18th International Congress on Nitrogen Fixation

Oct 14-18, 2013

Phoenix Seagaia Resort, Miyazaki

Model for the evolutionary dynamics of nitrogen fixation in the legume-rhizobia symbiosis

Hironori Fujita, Seishiro Aoki, Masayoshi Kawaguchi

・共同利用重点型研究による研究集会「ゲノム多様性と進化の統計数理」

2011年10月25,26日

統計数理研究所、立川

マメ科植物 - 根粒菌相互作用に関わる共生遺伝子の起源とゲノム網羅的な探索

青木誠志郎

・日本植物学会第75回大会

2011年9月17-19日

東京大学、東京都目黒区

分子進化解析による共生遺伝子の機能進化

推定：茎頂分裂組織または根粒形成に関わる

CLV1/HAR1 遺伝子ファミリーについて

青木 誠志郎、川口 正代司、佐藤 修正、
伊藤 元己

・ Memorial Symposium for the 26th
International Prize for Biology, Biology
of Symbiosis

December 7-8, 2010

Tsukuba International Congress Center,
Tsukuba

Genetic and phenotypic diversity of
rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus*
in Japan and Canada

Seishiro Aoki, Motomi Ito

・ 1st Asian Conference on Plant-Microbe
Symbiosis and Nitrogen Fixation

September 20-24, 2010

Aoshima Palm Beach Hotel, Miyazaki

Genetic and phenotypic diversity of
rhizobia based on PCR-based identification,
RAPD, RFLP, phylogenetic, and
physiological analyses isolated from
Lathyrus japonicus in Japan and Canada
Seishiro Aoki, Motomi Ito

・ 第 11 回日本進化学会大会 (札幌大会)

2009年9月 2-4日

北海道大学、札幌

機能進化ゲノミクス:進化解析を用いた共生
関連遺伝子のゲノム網羅的探索と 実験的
検証

青木誠志郎、下田宣司、伊藤元己

・ 第 11 回日本進化学会大会 (札幌大会)

2009年9月 2-4日

北海道大学、札幌

マメ科の汎熱帯海流散布植物と根粒菌の共生
特異性

中田さゆり、青木誠志郎、梶田忠

・ 植物微生物研究会第 19 回研究交流会

2009年9月 8-10日

あがたの森文化会館、松本市

機能進化ゲノミクス:進化的特徴の類似性に
基づくゲノム網羅的な共生遺伝子の計算推定
と実験的検証

青木誠志郎、下田 宣司、伊藤元己

・ 日本植物学会73回(山形)大会

2009年9月18-20日

山形大学、山形

機能進化ゲノミクス:進化解析を用いた共生
関連遺伝子のゲノム網羅的探索と実験的
検証

青木誠志郎、下田宣司、伊藤元己

〔図書〕(計3件)

・ 「進化学事典」

“ 51.5 植物と真菌類ノバクテリアの共進
化 ”

日本進化学会創立 10 周年記念出版編集委員
会

共立出版

2012, pp799-803

・ 「図説生物学」

“ 11.7 花成 2 花器官の形態形成 ”

東京大学教養学部図説生物学編集委員会編

東京大学出版会

2010, pp156-157

・ 「共進化の生態学」

“ 第 7 章 マメー根粒菌共生系の進化 ”

種生物学会 編

文一総合出版

2008, pp185-236

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青木 誠志郎 (AOKI, Seirhiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・学術研
究員

研究者番号：10334301

(2)研究分担者

伊藤 元己 (ITO, Motomi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524