

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21310130

研究課題名(和文) ダイズ共生窒素固定系に関わる遺伝因子解明に向けた根粒菌多様性の比較ゲノム研究

研究課題名(英文) Comparative genomics of Bradyrhizobia toward uncovering relationship between the genetic elements and the biological effects in soybean symbiosis

研究代表者

金子 貴一 (KANEKO TAKAKAZU)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：80370922

研究成果の概要(和文)：

ダイズ根粒菌ゲノムと共生形質・共生効率の関連性に関する情報を得ることを目的とし、ダイズ根粒菌4菌株について遺伝子構成の多様性に関する基盤情報と研究リソースを整備した。基盤情報に基づき、ゲノム構造、特に外来性 DNA 挿入因子に着目した比較をおこない、異系統間での挿入因子の塩基配列レベルでの高度な一致と、因子の多様性の存在を示した。

研究成果の概要(英文)：

The nucleotide sequences of the genomes of four Bradyrhizobial strains were determined. Comparison of their genome structures, especially constitution of the genomic islands, was explored based on the genomic information. A significantly high level of sequence conservation was detected in symbiosis islands on USDA110 and USDA6 genomes. Diversity of the symbiosis islands of *B. japonicum* and *B. elkanii* represented some different symbiotic aspects between them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノム、植物、微生物、窒素固定、共生

1. 研究開始当初の背景

共生窒素固定は、マメ科植物と根粒菌との共生により窒素固定反応がおこる「植物の生育に有利に働く相互作用」として、地球環境における物質循環の一部を構成する重要なシステムである。そのようなシステムにおける植物と微生物の相互認識、感染後のシグナル伝達に関わる因子が、ゲノム情報を利用し

た解析により同定されつつある。実用マメ科植物関連微生物としては、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株のゲノム解読が 2002 年に完了し、全遺伝子情報が利用可能になった。この情報が共生窒素固定システムの研究進展に貢献した。ゲノムに共生アイランド様の構造が挿入されていたことは USDA110 株の重要な特徴である。

さらに、14種類のゲノムアイランド(4-97 kb)の挿入が確認され、そのゲノムアイランドのひとつには窒素固定活性のエネルギーフローに関わる uptake hydrogenase の遺伝子クラスターが内在していた。つまり、これらは共生窒素固定能に関連する多くの要因が外来性 DNA に由来することを示している。一方、これまでに単離されたダイズ根粒菌は遺伝学的にも生理学的にも多様であることが明らかにされている。多様なダイズ根粒菌株には、多様なゲノムアイランドが存在し、宿主品種選択性、根粒形成効率、窒素固定効率に影響していることが予想された。

2. 研究の目的

Bradyrhizobium 属ダイズ根粒菌は、主に *B. elkanii* と *B. japonicum* の2種に分類され、*B. japonicum* は3つのゲノムタイプ(110, 122, 6)に分類される。本研究では、これらダイズ根粒菌の多様性比較を目的として、ゲノム構造と遺伝子構成の多様性に関する基盤情報を整備する。つづいてダイズ根粒菌株間のゲノム構造、特にゲノムアイランドに着目した比較から、ゲノム情報と共生形質・共生効率の関連性の情報を得る。

3. 研究の方法

先にゲノム解読が完了している USDA110 株は、栽培ダイズへの根粒着生率、窒素固定能がともに高く、農業生産において重要な優良根粒菌である。形質転換系も確立されていることから、これまで共生窒素固定の主要な研究材料として使われてきた。USDA110 は *B. japonicum* のゲノムタイプ 110 に属している。そこで、多様性検討を目的とする本研究では、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌 4 菌株 (USDA6、USDA122、T9、USDA61) を研究対象とした。いずれも USDA110 株より低い窒素固定活性を示すダイズ根粒菌であり、共生特性が USDA110 と異なるものを含めた。これらが実験系に有用な菌株であることは、本研究と並行して行われる共同研究により確認されている。USDA6 株は *Bradyrhizobium* 属の基準株であることから分類学的に重要性が高く、*B. japonicum* のゲノムタイプ 6 に属する。USDA110 の 70% 程度の共生窒素固定活性を示す。USDA122 株は *B. japonicum* のゲノムタイプ 122 に属し、USDA110 の 70% 程度の共生窒素固定活性を示す。rRNA 遺伝子の分子系統的に USDA110 と極めて近縁であることから USDA110 と極めて高いゲノム構造の類似が予測されたものの、宿主特異性が USDA110、USDA6 とは異なり、*Rj2* 因子を持つダイズに有効根粒を形成誘導できない。これは USDA122 が宿主特異性制御に関わる因子を持つことを示唆している。T9 株は

B. japonicum のゲノムタイプ 6 に属し、USDA110 の 30% 程度の共生窒素固定活性を示す。USDA61 は *B. elkanii* に属し、宿主特異性が USDA110、USDA6 とは異なり、*rjlrj1* 保有ダイズに窒素固定能を持つ根粒を形成させる一方で、*Rj4* 保有ダイズに有効根粒を形成できない特徴をもつ。このような宿主特異性に関わる根粒菌側の因子は III 型分泌系が関与する分泌タンパク質であると考えられている。

ダイズ根粒菌 4 菌株 (USDA6、USDA122、T9、USDA61) について、制限酵素切断処理ゲノム DNA の電気泳動パターンによりゲノムサイズと複製単位を調査した上で、全ゲノム DNA からホールゲノムショットガン法により、塩基配列解析をおこなった。USDA6、USDA122、T9 では塩基配列一次データ取得に Roche-454 GS FLX を用いた。USDA61 では Illumina GAII を用いた。配列データは、MIRA3、Newbler、CABOG、Velvet、SOAPdenovo、Phrap を用いてアセンブルを行い、コンティグとスキュフォードを形成させ、ドラフトゲノム配列とした。さらに BAC ライブラリ (約 70 kb の DNA をクローニング)、コスミドライブラリ (約 28 kb の DNA をクローニング) を構築し、サンガー法によりクローン両末端の塩基配列情報を得た上で、ドラフトゲノム配列へマッピングし、スキュフォード形成を行った。シーケンシングギャップには、プライマーウォーキングによりデータを追加することで対応した。BAC とコスミドクローン DNA を鋳型とし、サンガー法で追加反応をおこなうことでデータを出し、consed 上でギャップを補完した。ゲノム比較には RhizoBase、GenomeMatcher、COG データベース、InterProScan を用いた。

4. 研究成果

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* 属バクテリアについて、ゲノムサイズを調査した。断片合計長 (ゲノムサイズ) は以下のとおりであった。USDA6: 9.2 Mb、USDA122: 8.9 Mb、T9: 9.3 Mb、USDA61: 8.3 Mb。*B. japonicum* はいずれも複製単位は 1 であるが、USDA61 にはプラスミドが 1 種類存在することも予測された。

次世代シーケンサーによる塩基配列データ取得では、USDA6 はゲノムの 30 倍、USDA122 は 40 倍、T9 は 30 倍、USDA61 は 310 倍重複度のデータを得てアセンブルを行い、ドラフトゲノム配列を構築した。さらに BAC ライブラリ、コスミドライブラリを構築し、USDA6:4311 クローン、T9:3976 クローン、USDA122: 3640 クローン、USDA61: 3912 クローンの末端配列情報をゲノム塩基配列にマッピングし、クローンがゲノムの全領域をカバーすることを確認した。全クロー

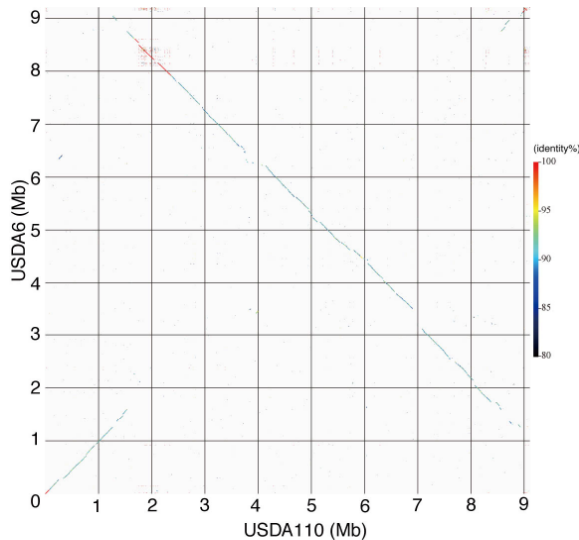


図1 USDA110とUSDA6ゲノムのblastn比較のドットプロット表示

の両末端配列をDDBJに登録し、クローンをNBRP (LegumeBase)へ寄託した。マッピングにより示されたゲノム上のクローン配置情報は、RhizoBase上でGBrowseにより表示される。なお、RhizoBaseとLegumeBaseの情報は相互リンクされるようにWeb上で設計された。USDA6の全クローンは、2012年9月に情報公開され、NBRPから配布開始された。T9、USDA122、USDA61については公開と配布のため、データベースの準備を進めている。

USDA6株は、分類学における基準株としての重要性から、全ゲノム塩基配列を解読した。USDA6ゲノムは、複製単位が1、サイズが9207384 bp、GC含量が63.7%であり、USDA110株ゲノムと比べて1.1%大きい。blastnで両者のゲノムを比較し、dotplotすると、アライメント構成は両者間に共直線性があることに加え、複製開始点を含む大きな逆位が存在することがわかった(図1)。

USDA6とUSDA110の共生アイランドを比較すると、InDelは存在するものの、塩基配列レベルでほぼ同一(99%以上の一致率)である。この塩基一致率は、ゲノムの基幹部

分の遺伝子領域が90%程度であることに比べて極めて高い(図2)。つまり、これは近い共通祖先の共生アイランドが系統の異なる*Bradyrhizobium*属細菌へ水平伝播した痕跡であり、その導入が両者の高い共生窒素固定能の背景となったことを示している。ゲノム上には、塩基配列レベルで同一な領域が、共生アイランドに加えて、もう1箇所存在しており、insertion sequenceの局在も類似することから、これらの領域は1つの巨大なゲノムアイランドに由来することが推測された。USDA6ゲノム配列からは、tRNA遺伝子が48種類53個予測された。tRNA遺伝子配列断片、低GC領域、特異的遺伝子領域の検出により、53 tRNA遺伝子のうち15の隣接領域にゲノムアイランドの痕跡が予測された。検出されたゲノムアイランドは、共生アイランド内部のものを除き、USDA110とは塩基配列レベルで全て異なる種類であった。*trnK*-CUUの遺伝子は、USDA6、USDA110いずれにおいてもゲノムアイランド挿入のホットスポットであり、USDA110では3種類、USDA6では4種類の挿入が認められた。また、比較からはUSDA110の特徴として、取り込み型ヒドロゲナーゼ遺伝子群がゲノムアイランドとして挿入されていること、脱窒に関連する*nos*遺伝子群もゲノムアイランド様領域に見つかることが示された。これらの因子は、USDA6ゲノムに挿入されていない。これはUSDA6の生理的特性と一致する。USDA6の15ゲノムアイランド上の遺伝子構成についてUSDA110のものとの比較検討を行なった。USDA6ゲノムアイランドには二成分制御系のセンサータンパク質がより多くコードされており、多様な環境への適応に関連した機能や制御をもたらす可能性が示唆された。

*B. japonicum*T9株、USDA122株のドラフトゲノム構造比較解析をおこなった。T9株ゲノムのサイズは9.5Mbであり、19のゲノムアイランドの挿入に加え、932 kbの共生アイランドが見つかった。T9とUSDA6とのゲノム比較では、2株のゲノム基本骨格が似

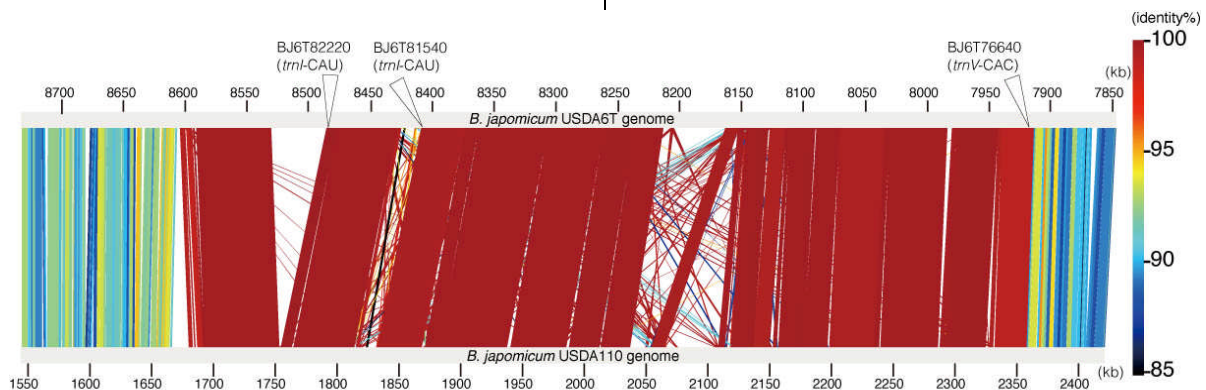


図2 USDA6とUSDA110の共生アイランドの塩基配列比較

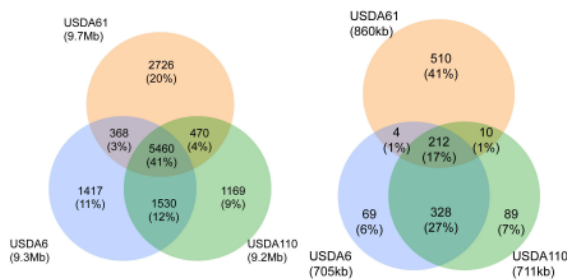


図3 *B.elkanii*と*B.japonicum*のオルソログ数の比較
左図:ゲノム全体の比較、右図:共生アイランド領域の比較

ていた。ゲノムアイランドのうち7はT9に新規タイプである。USDA122株は9.0 Mbのドラフト配列が得られ、10ヶ所にゲノムアイランドと予想される特異領域が見つかった。USDA122とUSDA110のゲノム比較では全体領域で塩基配列レベルでの同一性が、共生アイランド領域を含めて認められるものの、複数の特異領域の存在と大きな逆位が生じていることが示された。タンパク質遺伝子は8674予測された。*Rj2*共生不和合性とUSDA122のIII型分泌系存在が関連性あることは、根粒菌変異体の*Rj2*ダイズへの感染試験から明らかにされている。USDA122の共生アイランドにはUSDA110、USDA6と同様の構造として、III型分泌系遺伝子(*rhc*)が見つかった。分泌タンパク質についてもNopM、NopE1、NopE2、NopF、Bll1840の遺伝子の存在が確認されている。制御に関わるシスエレメント、*nod* box、*tts* box いずれもUSDA110と同様に保存されていた。分泌タンパク質にはアミノ酸置換が存在し、*Rj2*共生不和合性との関与について検討する必要がある。また、共生アイランド以外の外来性領域にコードされる*Rj2*関連分泌タンパクの可能性についても今後検討する必要がある。

B.elkanii USDA61株は、*B.japonicum*とは分子系統的に離れており、参照配列の利用が困難であることから全ゲノム解読を行った。USDA61ゲノムは、101809 bpのプラスミドと9548186 bpの染色体からなる。タンパク質遺伝子は9346予測された。共生窒素固定関連遺伝子は共生アイランド上に存在する。USDA61ではtRNA-Gln遺伝子に隣接する648 kbの低GC%領域が、共生アイランドに対応することを明らかにした。*B.elkanii*の共生アイランドは*B.japonicum*のものと塩基配列の一致度が低く、これは*B.japonicum*と*B.elkanii*の共生アイランドが系統的に別グループに属することを示す(図3)。しかしながら、共生アイランドには共生窒素固定に重要な*nod*、*nif*、*fix*遺伝子群が保存されていることが確認された。*rhc*と主要な分泌タンパク質遺伝子も見つかるが、*rj1rj1*への根粒形成の要因となる分泌

タンパク質因子の同定には至っていないので、全ゲノム情報を用いた因子の解明が今後の課題である。USDA61のプラスミドには109タンパク質遺伝子が予測された。COGによる機能分類では、特に組換えに関する遺伝子群の数が多く、全体の20%を占めていた。これは共生アイランドと共通の特徴と言えるが、共生窒素固定に必須の遺伝子はプラスミド上に見つからない。しかしながら、複数のcytochrome P450、III型分泌系エフェクターのホモログがコードされていることから、宿主範囲と共生窒素固定効率への関与も予想される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ①Tsukui T, Eda S, Kaneko T, Sato S, Okazaki S, Kakizaki-Chiba K, Itakura M, Mitsui H, Yamashita A, Terasawa K, Minamisawa K The type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. Appl Environ Microbiol. 査読有 2013 79: 1048-1051. doi: 10.1128/AEM.03297-12
- ②Kaneko T, Maita H, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. Genes 査読有 2011, 2:763-787. doi:10.3390/genes2040763
- ③Ikeda S, Okubo T, Anda M, Nakashita H, Yasuda M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Eda S, Momiyama A, Terasawa K, Mitsui H, Minamisawa K Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. Plant Cell Physiol. 査読有 2010 51:1398-1410. doi: 10.1093/pcp/pcq119

[学会発表] (計15件)

- ①津久井隆裕、江田志磨、金子貴一、佐藤修正、岡崎伸、柿崎(千葉)芳里、板倉学、三井久幸、南澤究:ダイズ根粒菌 Type III 分泌系による *Rj2* ダイズ共生不和合性の誘導 第22回植物微生物研究交流会、神戸市、2012.9.25-27
- ②宮澤幸樹、飛弾英伸、太田公平、佐藤修正、平川英樹、田畑哲之、岡崎伸、佐伯和彦、金子貴一:ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 のゲノム

構造解析 第22回植物微生物研究交流会、神戸市、2012.9.25-27

- ③ Kaneko T, Uchiike N, Maita H, Hirakawa H, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S: *Bradyrhizobium japonicum* Character Predicted from Genomic Comparison of Two Strains. The XV Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 2012.7.30-8.2
- ④ Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K: Activation of the host symbiosis signaling by rhizobial type III secretion system. The XV Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 2012.7.30-8.2
- ⑤ Maita H, Hirakawa H, Nakamura Y, Kaneko T, Tabata S., Saeki K, Sato S: Comparative genome analysis of *Mesorhizobium loti* strains. The XV Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 2012.7.30-8.2
- ⑥ 金子貴一, 宮澤幸樹, 飛弾英伸, 平川英樹, 渡辺安希子, 田畑哲之, 佐藤修正: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* のゲノム構造解析第6回日本ゲノム微生物学会年会、豊島区、2012.3.10-12
- ⑦ 津久井隆裕, 金子貴一, 佐藤修正, 山田学, 板倉学, 山下明史, 三井久幸, 江田志磨, 南澤究: 宿主遺伝子特異的な共生不和合性をもつダイズ根粒菌のゲノム解析、第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16
- ⑧ 金子貴一, 内池伸和, 南澤究, 渡辺安希子, 山田学, 佐藤修正: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 のゲノム構造解析 第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16
- ⑨ 眞板寛子, 平川英樹, 中村保一, 金子貴一, 佐伯和彦, 田畑哲之, 佐藤修正: ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* における共生アイランドの比較解析、第5回日本ゲノム微生物学会年会、仙台市、2011.3.14-16
- ⑩ 眞板寛子, 平川英樹, 中村保一, 金子貴一, 佐伯和彦, 田畑哲之, 佐藤修正: 根粒菌 *Mesorhizobium loti* の共生アイランドにおける比較解析、第33回日本分子生物学会年会、神戸市、2010.12.7-10
- ⑪ 金子貴一, 眞板寛子, 内池伸和, 南澤究, 渡辺安希子, 山田学, 佐藤修正: ダイズ根

粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 のゲノム構造解析 植物微生物研究会、岡山市、2011.9.20-22

- ⑫ Ikeda S, Okubo T, Kaneko T, Inaba S, Sasaki K, Anda M, Eda S, Sato S, Tabata S, Sato T, Mitsui H, Minamisawa K: Community shifts of soybean-associated microbes by host nodulation phenotypes and nitrogen applications. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24
- ⑬ Kaneko T, Minamisawa K, Watanabe A, Kawashima K, Minami C, Katoh M, Nakazaki N, Yamada M, and Sato S: Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6. 1st Asian Conference on Plant Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Miyazaki, 2010.9.20-24
- ⑭ 津久井隆裕, 金子貴一, 佐藤修正, 山田学, 板倉学, 山下明史, 三井久幸, 江田志磨, 南澤究: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 株と USDA110 株のゲノム比較 環境バイオテクノロジー学会 2010年度大会、仙台市、2010.6.21-22
- ⑮ 津久井隆裕, 金子貴一, 佐藤修正, 山田学, 板倉学, 三井久幸, 江田志磨, 南澤究: ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 株と USDA110 株のゲノム比較: USDA122 株特異的遺伝子の探索 日本土壤微生物学会 2010年度大会、文京区、2010.5.21-22

[その他]

ゲノム解析成果の公開: RhizoBase
<http://genome.microbedb.jp/rhizobase>
ゲノムクローン配布: LegumeBase
<http://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 貴一 (KANEKO TAKAKAZU)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号: 80370922

(2) 研究分担者

佐藤 修正 (SATO SHUSEI)
公益財団法人かずさDNA研究所・植物ゲ

ノム研究部・室長

研究者番号：70370921

(3)連携研究者

南澤 究 (MINAMISAWA KIWAMU)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667