

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510235

研究課題名(和文) 共生遺伝子群最小セットの同定を目指すミヤコグサ根粒菌共生アイランドの最小化

研究課題名(英文) Deduction of minimum symbiosis island gene sets for Lotus rhizobia

研究代表者

佐伯 和彦 (Saeki, Kazuhiko)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：40201511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサの根粒菌の共生アイランドについて、広域宿主性菌株のアイランドの配列を新たに決定して、共生に必須なアイランド上遺伝子の最小セットを抽出した。抽出した遺伝子セットのみを残すような欠失により最小共生アイランドを実体化するために、誘導可能で強度の異なるプロモーター・セット、根粒菌用としては新規な薬剤耐性マーカーと温度感受性広域宿主ベクターを作製し、共生アイランドを60kbpに渡り欠失した変異株を得た。また、実験系統・野生系統の次世代シーケンサー解析により、上記の最小セットの予測を確認するとともに、共生アイランドの保存性が主染色体よりも高いことを確認した。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to deduce the rhizobial minimum symbiosis gene sets for mutualism between Mesorhizobium loti and Lotus species, we compared nucleotide sequences of symbiosis islands of three M. loti strains and found 155 genes are completely conserved among them. We made controllable promoters and new selectable markers to be used with M. loti strains. We also made a temperature sensitive derivative of the broad-host range vector pBBR1MCS2, by mutagenesis of its rep gene. In addition, we performed Next Generation Sequencing analysis of several M. loti strains and mapped the obtained reads on the genome sequence of the strain MAFF303099. The results supported the divergence of main chromosomes among M. loti strains with conserved core structure of symbiosis island.

研究分野：ゲノム微生物学・遺伝生化学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：植物微生物相互作用 共生 窒素固定 根粒形成 遺伝子水平伝搬

## 1. 研究開始当初の背景

根粒菌とマメ科植物が営む窒素固定共生は、相利共生の代表的な例であり、数少ない細胞内共生の実例でもある。異種生物間の相互認識と寛容・排除の機構、さらにその進化は基礎科学上の重要な課題であるとともに、ダイズなどの重要作物生産性改良の基盤となる課題と言える。共生に必要な遺伝子の最小セットを同定することは、改良の道筋を示す上で重要である。

宿主であるマメ科植物と根粒菌の種の組合せは比較的限定されている。共生が成立するためには、根粒の形成に機能する遺伝子群 (*nod*)、窒素固定反応を行うニトロゲナーゼとその成熟などに関与する窒素固定遺伝子群 (*nif*) とニトロゲナーゼ以外で根粒内の窒素固定に関与する遺伝子群 (*fix*) など、根粒菌のほぼすべてに共通する基本的な共生遺伝子群に加えて、さらに数多くの遺伝子群が必要である。既知の根粒菌は、近縁の非根粒菌と共通する主ゲノムのセットに加えて、主ゲノム上の一部に外来性のアイランドとして、あるいはプラスミドとして上記の *nod*、*nif* と *fix* 遺伝子群を保持することが知られている。全ゲノムの決定されたミヤコグサの根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株やダイズの代表的な根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株などでは共生アイランドとして保持され (Kaneko et al. 2000; 2002)、アルファルフアの根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 や広域宿主根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 では共生プラスミドとして保持されている (Galibert et al. 2001; Freiberg et al. 1997)。

共生アイランドやプラスミドが可動性であることは、実験室レベルでクローバー根粒菌の巨大共生プラスミド pSym を *Agrobacterium* に導入することで根粒形成可能となること (Abe et al. 1998; 但し、窒素固定は行えない) 等からも知られていたが、自然界でも水平伝搬することが示されている。すなわち、西洋ミヤコグサの根粒菌 *Mesorhizobium loti* ICMP3153 の共生窒素固定関連遺伝子領域約 500kbp が土壌中で水平伝搬し、非根粒菌を根粒菌に変貌させて得ること (Sullivan & Ronson 1998) が報告されている。この共生アイランドは病原性細菌の病原アイランドと同様に、非根粒菌の tRNA 遺伝子内を標的に伝搬し根粒形成・窒素固定能を与える遺伝子クラスターである。

## 2. 研究の目的

共生アイランドやプラスミドに座乗する遺伝子は、根粒菌全体で保存されているものと、特定の根粒菌種や特定の菌株のみに存在するものとに分類することができる。いずれにせよ、根粒菌が宿主に感染して根粒を形成し窒素固定を行うための最小共生遺伝子セットが存在するはずである。

本研究では、マメ科のモデル植物であるミ

ヤコグサの根粒菌 *Mesorhizobium loti* の共生アイランドについて、異なる菌株 (実験系等・野生系統) の配列データに基づいて、共生アイランド機能に必須な最小の遺伝子セットを抽出すること、また、抽出した遺伝子セットのみを残すような欠失により最小共生アイランドを実体化することを目指した。なお、当然のことながら、共生アイランド (または共生プラスミド) の受容により窒素固定共生が可能となる細菌種は限定されていることから、アイランドやプラスミド以外の主染色体にもマメ科との共生能を付与するための遺伝子群が存在することは明白である。そこで、主染色体についても、異なる菌株の配列データを集め、最小共生遺伝子トータルセット解明の糸口を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ根粒菌実験系統 NZP2037 株共生アイランド塩基配列の決定

ライブラリー構築: NZP2037 株 DNA を制限酵素 *MboI* で部分消化後、パルスフィールドゲル電気泳動により 30~50kbp サイズの断片を分離して抽出、pCC1BAC ベクター (Epicentre Bio 社) の *BamHI* サイトに挿入することで、ゲノムの BAC ライブラリーを作製した。

塩基配列決定: 平均 33kbp のインサートを持つ 3740 クローンについて、Dye-Terminator Cycle Sequencing 反応後、キャピラリー・シーケンサーを用いて、インサートの両端配列を決定した。得られた末端配列と、ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株ならびに R7A 株の共生アイランド内の遺伝子との類似性を持つかどうかにより、6 つの初期クローンを選抜し Seed クローンとした。Seed クローンのインサートについて、shotgun 法を用いたサブライブラリーを作製して、やはり Dye-Terminator Cycle Sequencing 後にキャピラリー・シーケンサーで全塩基配列を決定した。Seed クローンの全配列と残るクローン群のインサート両端の配列との同一性を調べ、隣接する領域を含むクローンを選抜する Walking を行った。Seed クローンから出発して、全部で 28 の BAC クローンのインサートとして、694kbp の配列を決定した。

アノテーションと比較: 決定した塩基配列上のタンパク質コード遺伝子の予測については、Glimmer 3.02 (Arthur et al. 2007) と IMC (in silico Molecular Cloning) (In Silico Biology 社)、MGA (MetaGeneAnnotator) (Noguchi et al. 2008)、EMBOSS getorf program (<http://eboss.sourceforge.net/apps/emboss/getorf.html>) を用いた。遺伝子のアノテーションと比較には、COGs (Clusters of Orthologous Groups) データベース ([url: www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/)) に対して、BLASTP 検索を行い、最高スコアを示すものを選抜した上で、より低いスコアのものも比べた。

## (2)ゲノム改変用組換え酵素遺伝子発現用プラスミドセットの作製

通常の組換え DNA 手法を用い、必要に応じて合成オリゴヌクレオチドを PCR プライマーあるいは埋込カセットとして、人工的な遺伝子配列を持つ産物を作製した。

## (3)ミヤコグサ根粒菌実験系統と野生系統ゲノムの次世代シーケンサー解析

ミヤコグサ根粒菌実験系統 6 株と日本国内の野生系統 6 株について、(新学術領域・ゲノム支援事業に応募し) Illumina GAIIx による短鎖インサート・ペアエンドのシーケンス (300~360bp 断片の両端から各 69 塩基を解読)を行った。得られた read については、Velvet ver.1.2.01 (Zerbino & Birney 2008) によるアセンブルも行った。

個別 read については、MAQ (Heng et al. 2008) により既知ゲノム配列へのマッピングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 実験系統 NZP2037 株の共生アイランドの塩基配列決定に基づく、ミヤコグサ根粒菌共生アイランドのコア遺伝子セットの抽出

ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* は *Lotus* 属のマメ科植物と窒素固定共生を行う根粒菌として定義されてきた。しかし、新属・新種としての定義の時点から、菌株によって、*Lotus* 属の限られた種としか共生しない(狭宿主性)株と、*Lotus* 属以外のマメ科植物とも共生可能な(広宿主性)株の存在することが知られていた。例えば、*Lotus divaricatus* 根粒に由来する実験系統 NZP2037 は、木本マメ科植物であるギンネム *Leucaena leucocephala* とも共生を樹立する。

これまでにゲノム (MAFF303099 株) や共生アイランド (R7A 株) の配列が決定されていたのはいずれも狭宿主性株であったため、広宿主性の NZP2037 株の共生アイランド配列を決定して比較した。(図 1)

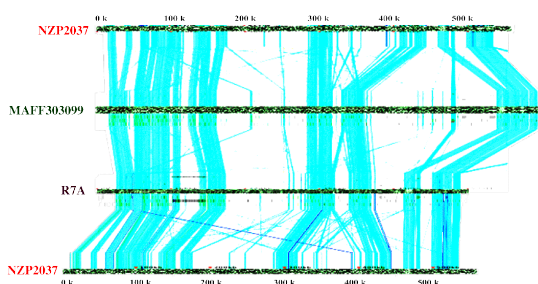


図 1 . ミヤコグサ根粒菌 3 菌株 (MAFF 303099, R7A と NZP2037) 共生アイランド配列比較

比較用ソフトウェア Murasaki (Popendorf et al. 2010)により、共通部分を青線で結んだ

NZP2037 株の共生アイランドは約 533kbp から成り、MAFF303099 株や R7A 株と同様に phe-tRNA を部分重複させた内部に配置して

いたが、同 tRNA 遺伝子の 3' 側重複部分の構造は痕跡化していた。他の 2 株の相当部分と類似する配列 5kbp が、NZP2037 株主染色体上の離れた位置に存在していたこと等から、痕跡化は環状ゲノム内部での組換えにより生じたものと推定された。

3 株の共生アイランドは同一の順序で並んだ、根粒形成に関連する 16 の遺伝子 (*nod*, *noe* と *nol*)、窒素固定反応に関連する 28 の遺伝子 (*nif* と低酸素分圧での呼吸に関連する遺伝子を含む *fix*)、共生アイランドの接合移動に関連する遺伝子 20、さらに、ニコチン酸、ピオチン、チアミンの 3 種のビタミンの合成に関連する遺伝子 14 を含め、155 の遺伝子を共通して保持していた。これらの遺伝子は、図 1 の青線で結ばれる部分として示される 5~6 のクラスターとして存在し、MAFF303099 株では概ね 3 つのクラスター内に収まっていた。また、NZP2037 と R7A には共通して 4 型分泌装置の遺伝子群が認められる点で、MAFF303099 株とは異なっていた。

これらの結果は、MAFF303099 株を土台にして、図 1 で青線にカバーされない非保存領域をゲノム工学により欠失させれば、最小共生アイランドを実体化可能なことを示唆した。

## (2)ゲノム改変用組換え酵素遺伝子発現用プラスミドセットの作製

ミヤコグサ根粒菌のゲノムの異なる領域に大規模な欠失を引き起こすためには、最終的には破壊欠失株作製時に用いた遺伝子マーカーも最終的に欠失させる技術を確認する必要がある。

このために、広域宿主ベクター pBBR1MCS2 や pRK290 派生物に対して用いるために、IPTG により発現誘導可能で、異なる強度を持つプロモーター・セットの開発

根粒菌では従来使えなかったクロラムフェニコール耐性遺伝子 *cat* の改良

根粒菌で使用可能だが、強度に限界のあったゲンタミシン耐性遺伝子 *aacC1* の改良

を行った。また、によって、根粒菌内で配列特異的組換え酵素 Flp やメガヌクレアーゼ I-SceI 等を発現させた上で、不用時にはプラスミドを根粒菌から欠落させるために、

pBBR1MCS2 ベクターの複製関連遺伝子 *rep* に 2 塩基の変異を導入して、温度感受性化した派生物を作製した。

これらに加え、根粒菌内で複製不能なプラスミドにクローン化した MAFF303099 株ゲノム断片による相同組み換えで、Flp の認識部位 FRT を共生アイランド内に複数箇所埋込み、少なくとも 40kbp ならびに 60kbp の欠失を引き起こした。今後は、I-SceI サイトの埋込んだ上で、I-SceI を発現させて二重鎖切断を引き起こして、その修復により遺伝子マーカーと FRT の欠失を行う。

## (3) ミヤコグサ根粒菌実験系統と野生系統ゲノムの次世代シーケンサー解析による、主

## 染色体部分の比較

Illumina GAIIx の配列解析で、シーケンスのリード長は 69 塩基であった。Velvet でアセンブルした場合、試行した 10 種の条件のうち N-50 が最高となる K-mer は 37 または 39 であった。各株のデータは、400 万から 600 万 read で、得られたデータのカバー率は 12 菌株全体で最低 25 倍～最高 40 倍であった。この結果だけでは、contig 数として、最小で 599、最大で 1563 本であり、そのまま全ゲノム配列の決定は困難であった。

得られた read を MAQ により、MAFF303099 株のゲノム配列への mapping を行ったところ、16S rRNA 配列などからの予想されるように、主染色体 (グレイ部分) は、共生アイランド領域 (赤部分) に比べて低い保存性を示した。

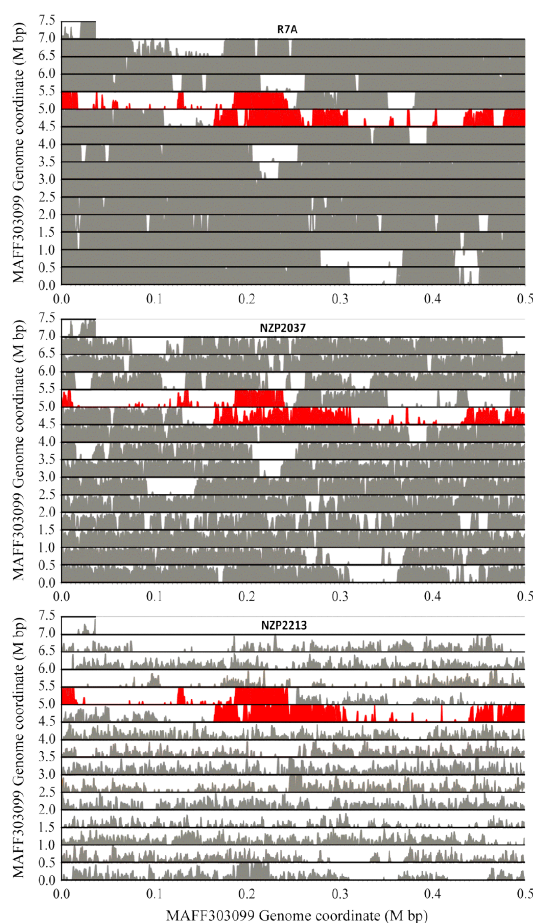


図 2 . ミヤコグサ根粒菌 3 菌株 (R7A、NZP2037 と NZP2213) と MAFF303099 株ゲノムの比較

Illumina GAIIx の read が MAFF303099 株のゲノム情報と一致する程度をタイリングした。共生アイランドを赤、主染色体部分をグレイで示した。

これらの結果は、ミヤコグサ根粒菌は宿主特異性の広狭に関わらず、共生アイランド内に高い共通性を持つ遺伝子セットを持ち、主

染色体としては、広義の *Mesorhizobium* 属細菌のものであれば概ね問題無く利用可能なことを示した。

以上の結果を総合して、ミヤコグサ根粒菌の共生アイランドを実体として最小化する準備は整い、現在は実行の途上にある。主染色体上の遺伝子セットを明らかにする糸口を得たと考えられる。また、各種の菌株は耐塩性や耐乾燥性、耐温性などで異なる形質を示し、これらは異なる主染色体をバックボーンとして持つことに起因すると予想されるので、今後は、菌株毎の有用形質の遺伝的基盤を解析することが可能となった。

## 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 2 件)

Takanashi K, Yokosho K, Saeki K, Sugiyama A, Sato S, Tabata S, Ma JF and \*Yazaki K "LjMATE1: a citrate transporter responsible for iron supply to the nodule infection zone of *Lotus japonicus*" Plant and Cell Physiology 54 (4): 585-594 (2013)(査読有り)

Kasai-Maita H, Hirakawa H, Nakamura Y, Kaneko T, Miki K, Maruya J, Okazaki S, Tabata S, \*Saeki K and \*Sato S. "Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains" Microbes and Environments 28 (2): 275-278 doi:10.1264/j sme2.ME12201 (2013) (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

Saeki K, Kasai-Maita H, Kubota K, Kaneko T, Hirakawa H, Tabata S, Sato S. Core gene sets and evolution of symbiosis islands in rhizobial isolates from *Lotus japonicus* indigenous to Japan 2013 年 10 月 18 日(18th International Congress on Nitrogen Fixation, Phoenix Seagaia Resort; World Convention Center Summit, Miyazaki, Japan, 2013 年 10 月 14 日～10 月 18 日)

窪田和奈, 眞板寛子, 平川英樹, 佐藤修正, 佐伯和彦. ミヤコグサ根粒菌野生系統の耐塩性について. 2013 年 9 月 8 日(植物微生物研究会・第 23 回研究交流会. 2013 年 9 月 7～9 日 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市))

白井理恵, 中村公美, 副島麻衣, 岡崎伸, 佐伯和彦. ミヤコグサ根粒菌を宿主とした人為制御可能な発現ベクターの開発と応用. 2012 年 9 月 26 日(植物微生物研究会・第 22

回研究交流会 .2012 年 9 月 25～27 日 神戸大学百年記念館)

佐伯和彦、谷佳美、池田翠、金子貴一、眞板寛子、平川英樹、田畑哲之、佐藤修正。ミヤコグサ根粒菌共生アイランドの伝搬と進化：宿主モデル系統 MG20 自生地採集株群に焦点をあてて。2012 年 9 月 25 日 (植物微生物研究会・第 22 回研究交流会。2012 年 9 月 25～27 日 神戸大学百年記念館)

眞板寛子、平川英樹、佐伯和彦、田畑哲之、佐藤修正。ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) 12 株における遺伝子構造の比較解析。2012 年 3 月 11 日 (第 6 回日本ゲノム微生物学会年会。2012 年 3 月 10～12 日 立教大学池袋キャンパス)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 和彦 (SAEKI KAZUHIKO)  
奈良女子大学・自然科学系・教授  
研究者番号：40201511

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

佐藤 修正 (SATO SHUSEI)  
東北大学・生命科学研究科・准教授  
研究者番号：70370921