

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430175

研究課題名(和文)ミヤコグサ親和性エンドファイトによる共生システムの情報基盤形成

研究課題名(英文) Genomic information of an endophyte of *Lotus japonicus* to facilitate investigation on the 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・教授

研究者番号：80370922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコグサエンドファイトの全ゲノム配列を決定した。ゲノムライブラリを作成し、クローンを2974個、ゲノムマッピングした。これらは、接合導入できるので、機能解析に利用可能である。このゲノムは3つの複製単位で構成され、7703のタンパク質遺伝子、3セットのrRNA遺伝子群、54のtRNA遺伝子が推測された。タンパク質の42%は機能推定と機能分類ができた。根粒菌と比較すると、窒素固定と根粒形成関連遺伝子が無く、これらが本エンドファイトの特徴と言える。植物微生物相互作用の遺伝子クラスターとしてはIII型とIV型のタンパク質分泌系のもが見つかったため、これらが共生に重要なものかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The complete nucleotide sequence of the genome of a *Lotus japonicus* endophyte was determined. For sequencing, a cosmid genomic library was constructed, and the library is available as a tool for post genomics. The 2974 clones, all of which have been mapped on the genome, contain inserts of approximately 28 kb. The genome of the endophyte consists of a chromosome (4779007 bp) and two plasmids (2509446 bp and 614482 bp). The genome comprises 7703 protein-encoding genes, three copies of rRNA gene clusters and 54 tRNA genes. Forty-two percent of the protein-encoding sequences shown sequence similarity to genes of known function were classified into SEED subsystems. Compared with other *Rhizobium* species, no gene for either nitrogen fixation nor nodulation was notable characteristics of this endophyte. Three gene clusters related to the protein secretion classified into T3SS or T4SS were identified. These may be involved in the plant-microbe interactions.

研究分野：ゲノム構造学

キーワード：ゲノム エンドファイト 共生 ミヤコグサ 根粒菌 *Rhizobium*

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は微生物と相互作用する。この関係は植物体内や表面で様々あり、「感染する病原微生物と防御応答する植物の攻防」、「植物の生育に有利に働く微生物と宿主植物の相互作用」が主に知られていた。そのような植物と微生物の相互作用研究は、単離微生物の接種により研究が行われ、微生物の共生因子とその作用機構、宿主植物の防御システムを回避して感染するしくみなど、相互作用の機構が分子レベルで明らかにされつつあった。

(2) 植物の細胞間隙に生息する微生物は、エンドファイトと呼ばれ多様な分類群に属する。エンドファイトは感染後、植物体内の細胞間隙に定着し、植物から栄養を得て生活する。しかしながら、エンドファイトは植物体内に特殊な器官を形成しないことから、その共生状態を肉眼で認識することが困難であり、相互作用システムの解明が遅れていた。その一方で、一部のエンドファイトの接種が作物生育に有利に働くことが示されており、実用化されつつあった (Isawa 2009)。

(3) ミヤコグサは日本に自生する野生マメ科植物であり、モデル生物として有用な特性を持つ。多数の共生変異体、遺伝学研究基盤、ゲノム情報が整備されたことから、根粒菌および菌根菌をパートナーとした共生システムに関する研究成果が、これまでに多数報告されてきた。根粒菌感染では、感染中絶、非親和性菌の排除、根粒過剰着生の制限が報告され、ミヤコグサの防御システムは、根粒菌を含めた微生物感染に影響を及ぼすことが示された (Kouch 2010)。

2. 研究の目的

(1) 根粒菌共生研究の知見をもとに、エンドファイト感染による宿主植物への影響を検討することが、植物微生物相互作用の研究進展を促進させることを期待している。そこで、

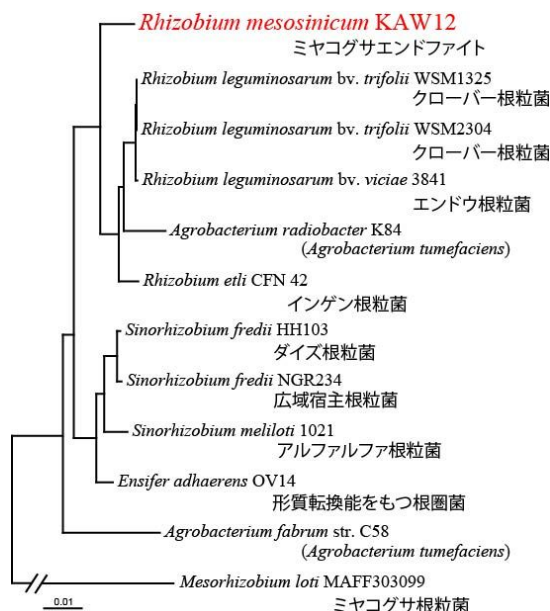


図1 Rhizobium科16SrDNAの分子系統樹

研究が遅れているマメ科植物エンドファイトについて、ゲノム情報基盤形成を進める。

(2) ミヤコグサへ高親和性を示すエンドファイト *Rhizobium mesosinicum* KAW12 株を研究対象とする。16S rDNA による分子系統解析では、KAW12 は *Rhizobium* 属根粒菌と近縁である (図1)。ところが KAW12 のミヤコグサへ接種では、根粒形成が誘導されず、ミヤコグサの明確な成長促進を示さないものの、ミヤコグサへ KAW12 が安定に定着する。また、*Mesorhizobium loti* と根粒内に共感染する (Zgadaj 2015)。これらの特性から、KAW12 ゲノム情報は、エンドファイト分子遺伝学研究に貢献すると考えている。

(3) KAW12 の全遺伝子情報の整備のため、ゲノム構造解析 (高精度全ゲノム配列決定) をおこなう。KAW12 と近縁 *Rhizobium* 属根粒菌のゲノム情報比較により、*Rhizobium* 属根粒菌とのゲノム構成の違い、遺伝子構成の違いに基づきエンドファイトとしての特性、ミヤコグサへの親和性に関わる知見を得る。

(4) KAW12 ゲノムのほぼ全領域をカバーするクローンライブラリを作成する。scaffolding とゲノム最終配列の信頼性確認のためである。また、接合伝達能をもつベクターを用いてライブラリ構築することで、クローンライブラリを既知領域のゲノム断片を含むクローンとして、ゲノム機能解析を進展させるリソースとして整備する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム DNA 調製: KAW12 は phosphomycin を含む TY 培地で培養した。次世代シーケンシング取得用のゲノム DNA 抽出には、培養菌体から QIAGEN Genomic-tip 100/G を用いて調製した。コスミドライブラリ作成と制限酵素切断片解析には、アガロースプラグに埋め込んだ DNA を調製して用いた。

(2) 制限酵素切断片解析: ゲノム DNA は、2種類の制限酵素、*SwaI* もしくは *PmeI* で切断された後に、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) で解析が行われた。

(3) コスミドクローンライブラリ: ゲノム DNA は、制限酵素 *Sau3AI* で部分切断処理された。30~70kb を PFGE でサイズ分画した後、コスミドベクター (pKS800) の *BamHI* 部位にクローニングした。パッケージング後に大腸菌へ導入し、ライブラリとした。展開したライブラリをクローン個別に培養し、凍結保存と DNA 調製を行った。クローン DNA は、挿入 DNA 断片の末端配列解析が行われた。

(4) ドラフトゲノム構築: 平均 3 kb に断片化されたゲノム DNA は、メイトペア法で GS FLX チタニウムにより塩基配列が読み取られた。gsAssembler によりデータの一次アセンブルを行い、contig 塩基配列と scaffolding の情報を得てドラフト配列とした。

(5) ゲノム配列確定と一次配列のゲノムマッピング: gap 領域の塩基配列データ追加は、gap 領域を含むコスミド DNA を鋳型とし、ブ

ライマーウオーキングで行われ、ゲノム塩基配列が決定された。コスミド末端配列は、BLAST によりゲノム配列に対してアライメント作成した。パーサを用いて best-hit データ抽出した後に、コスミドクロンのゲノム上の配置を決定した。GS FLX の一次データを gsMapper によりゲノム配列に対しマッピングすることで編集エラーを検出し、修正した。(6) 遺伝子領域の予測: RAST サーバー (<http://rast.nmpdr.org/>) を用いて遺伝子領域の予測を行った。また、タンパク質遺伝子には MetaGeneAnnotator、構造 RNA 遺伝子には tRNAscan-SE と RNAmmer も用いた。(7) 遺伝子機能分類と遺伝子構成比較: RAST サーバーを用いた。(8) ゲノム塩基配列の解析と比較: 配列の解析と比較には、BLAST、EMBOSS、GenomeMatcher を用いた。

4. 研究成果

(1) ドラフトゲノム配列構築: GS FLX により取得した 698675 reads の一次配列データのアセンブルで構築されたドラフトゲノムは、107 contigs、6 scaffolds、contig 合計長は 7880988 bp であった。コスミドクロン末端配列の contig へのマッピングにより、superscaffold を作成した結果、ゲノムは3つの環状構造であった。Rhizobium 属根粒菌のゲノム構成と比較すると、染色体サイズは似ているが、プラスミド構成が異なり、数が少なく、サイズが大きい。KAW12 ゲノム構成は Sinorhizobium 属根粒菌と似ている。

(2) ゲノム配列の確定: ゲノム全体に繰り返し配列が散在していたことから、ゲノムを18分割し、それぞれの分割単位で配列確定後、分割配列を連結させた。以上の解析で、*Rhizobium mesosinicum* KAW12 の全ゲノム塩基配列を確定した。ゲノムは3つの環状の複製単位からなり、染色体は、4779007 bp: 60.35%GC、2つのプラスミド pRkaw12a と pRkaw12b は、それぞれ 2509446 bp: 59.86%GC、614482bp 57.99%GC であった。

(3) ゲノム構造の検証: 確定したゲノム塩基配列には 15 箇所の *PmeI* 認識部位、19 箇所の *SwaI* 認識部位が検出された。*PmeI*、*SwaI* で処理した DNA を PFGE で解析したところ、*PmeI* では断片サイズが対応する 15 本のバンドが全て検出されたことから、ゲノム塩基配列の構成を検証できた。一方 *SwaI* では、19 本中、16 本のバンドを検出できたが、短い断片を明確なバンドとして検出できなかった。また、パターン検索結果に対応しない約 780 kb の薄いバンドが検出された。これは染色体上の 3580 kb 位置の *SwaI* 部位が切断されにくく、切れ残りがバンドとして現れたものである。

コスミドクロンは、平均サイズ 28 kb のゲノム DNA を持ち、末端配列のマッピングによりゲノム塩基配列と対応づけた。2974 クローンがゲノム塩基配列にマッピングされた(表1)。このセットは、ゲノム重複度が平

表1 コスミドクロンライブラリ

複製単位	クローン数*	
	KAW12CS	KAW12CX
chromosome (4.8 Mb)	1051	602
pRkaw12a (2.5 Mb)	599	411
pRkaw12b (0.6 Mb)	193	118
合計	1843	1131

*複製単位にmappingされたクローン数をライブラリごとに示した。
KAW12CS: ベクター-pKS800と宿主S17-1の組み合わせ
KAW12CX: ベクター-pKS800と宿主XL1-blue MRAP2の組み合わせ
均 10.7 倍であり、ゲノムの 99.9% をカバーする。これらの配置に矛盾ないことから、WGS 法でおこなったゲノム配列の構築が正しいことが示された。ゲノム領域をクローン DNA がカバーする例として pRkaw12b 上の III 型分泌系遺伝子群 (約 10 kb) をカバーするクローンの分布を示した(図2)。このコスミドライブラリ大腸菌凍結保存サンプルは、ナショナルバイオリソースプロジェクト ミヤコグサ・ダイズに寄託済みである。

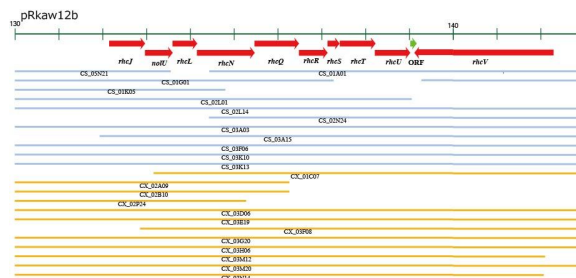


図2 コスミドクロンのマッピング

(4) 遺伝子領域予測、アノテーション、機能分類: tRNA 遺伝子は、染色体と pRkaw12a に 44 種類、54 tRNA 遺伝子が見つかった。rRNA 遺伝子クラスター(*rrn*)は3コピーを染色体上に同定した。タンパク質遺伝子は、染色体、pRkaw12a、pRkaw12b にそれぞれ 4828、2331、544 が予測された。そのうち 3335、1767、337 には、遺伝子産物の機能が推定されるアノテーションが付加された。SEED による機能分類では、それぞれ 2086 (43%)、1026 (44%)、175 (32%) が 26 の subsystem のいずれかに分類された(図3)。

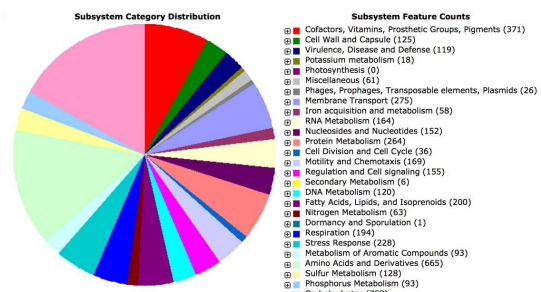


図3 タンパク質遺伝子の機能分類集計

(5) KAW12 と根粒菌ゲノム塩基配列の 2D プロット解析: 図 1 の系統樹で近縁であることを示した根粒菌 *R. leguminosarum* 3841 株は全ゲノム配列が決定されている。近縁菌であることを背景に BLAST 検索を行い、高い閾値 (E 値が $1e-199$ 未満、bit-score が 2000 以上) でのアライメント形成された領域を抽出し、2D プロットをおこなった (図 4)。rrn はいずれも 3 コピーあり、染色体上の位置関係が保存されている。染色体上のアライメント形成は KAW12 の 0~2Mb、3~4.8Mb で認められ、コアゲノム領域の存在が示された。一方で、2~3Mb の領域には *R. leguminosarum* ゲノムと一致度が高く長いアライメントを形成できなかった。この領域には DNA 複製の終了領域が含まれており、DNA 複製と変異蓄積バイアスの関連が予想された。プラスミドには、アライメント形成した短い領域を検出できたものの、長い共直線性を示す傾向は認められなかった。つまり、プラスミドは、染色体の遺伝子構成特性と異なることを示す。

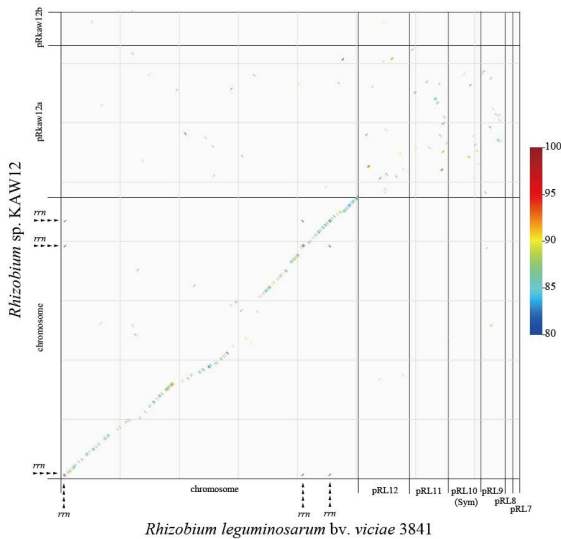


図 4 KAW12 と *R. leguminosarum* ゲノムの 2D プロット

(6) rrn-ITS 領域の比較: rrn の 16S-23S の ITS 領域を用い、根粒菌以外の *Rhizobium* 属細菌を含めて分子系統樹を構築した (図 5)。KAW12 は *R. leguminosarum*、*R. etli* のクレードとは分かれ、シロイヌナズナマイクロビオームの *Rhizobium* sp. JGI 001013-F22 株、ポプラエンドファイト *Rhizobium* sp. CF142 株、ネムノキ根粒菌 *Rhizobium mesosinicum* CCBAU 4104 株と同じクレードに属していた。このクレードにはゲノム解読が完了している菌株はなく、KAW12 ゲノム解読には新規性がある。近縁のエンドファイト CF142 はドラフトゲノム配列が利用可能なことから、ゲノム比較に用いた。

(7) KAW12 と近縁系統菌ゲノムの比較: *Rhizobium* sp. CF142 ゲノム配列データは、 N_{50} が 85172 bases の 150contigs から構成される (AJWE00000000)。このドラフト配列合計長は 7457089 bp であり、KAW12 (7902935 bp) とゲノムサイズが近似しているため、ゲノム

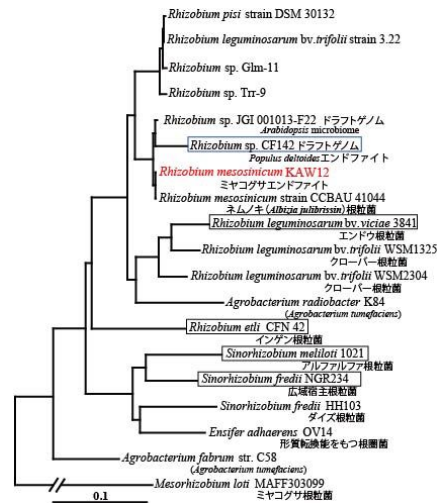


図 5 *Rhizobium* 科の rrn-ITS の分子系統樹

間の塩基配列レベルでの高い一致が予想された。そこで、塩基配列レベルでの比較をおこない、KAW12 のコアゲノムと特異的領域を予測した。閾値を E 値が $1e-199$ 未満、bit-score が 2000 以上と設定し、アライメント形成された KAW12 ゲノム領域をコアゲノム領域として集計した。図 6 には KAW12 ゲノム環状地図に青線で *Rhizobium* sp. CF142 との比較でアライメント形成された領域を示した。比較の補助データとして、根粒菌 4 菌株の全遺伝子産物について、アミノ酸配列レベルでのマッピングをおこない、黒とグレーで示している。最内環には KAW12 ゲノムの GC 含量分布 (紫/橙) を示した。KAW12 複製単位に対するコアゲノム領域の比率は染色体、pRkaw12a、pRkaw12b でそれぞれ 89.5%、80.1%、0.5% であった。つまり、pRkaw12b の大部分が KAW12 に特異的である。また、染色体上の 0.6 Mb 付近と 3.6 Mb 付近、pRkaw12a の 9 箇所に、20kb 以上の KAW12 特異的な領域が見つかった。その多くの領域でゲノム全体平均より低い GC 含量を示すことから、外来性因子の保持が KAW12 株としてのゲノムを特徴づけている。

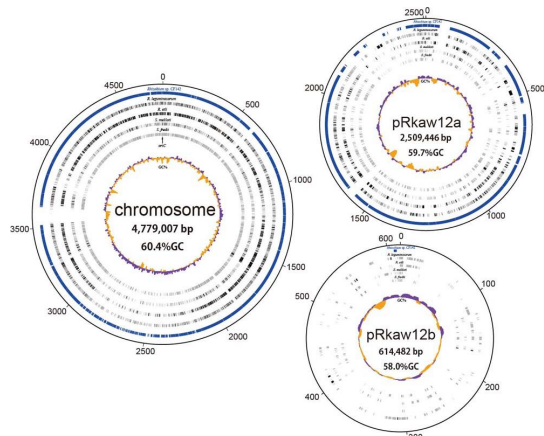


図 6 KAW12 とエンドファイト/根粒菌のゲノム比較

(8) KAW12 遺伝子構成の特徴: KAW12 と *R. leguminosarum* ゲノムの機能分類構成の比較を比較すると、窒素代謝系の構成が異なっていた。KAW12 は窒素固定関連遺伝子群 (*nif*) を持たず、脱窒素関連遺伝子群の大部分を持

つ。しかし、亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) は持たない。KAW12 は土壌中での窒素循環に関与するが、共生において窒素源供給に関与しないといえる。また、根粒共生初期応答に重要な *Nod* 因子生合成遺伝子群 (*nod*) も見つからない。*nif* と *nod* がいないことは、KAW12 ゲノムに根粒菌共生プラスミドに対応する領域が存在しないことを反映している。植物ホルモンに関する遺伝子としては、エチレン前駆体分解 ACC deaminase、IAA 合成関連遺伝子 *ipdC*、*iaaM*、*iaaH* は KAW12 ゲノム上に見つからなかった。植物ホルモン代謝については、KAW12 に未知の反応系が存在するのかもしれない。宿主との相互作用に関する遺伝子として見つかったものは、III 型分泌系 (pRkaw12b に 9 遺伝子) と IV 型分泌系 (pRkaw12a に 12 遺伝子、pRkaw12b に 10 遺伝子) である (図 7)。これらの遺伝子クラスターは植物病原菌、根粒菌 (*Agrobacterium radiobacter* K84、*Rhizobium etli* CFN 42、*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39) の遺伝子群に高い類似を示した。一方で、V 型、VI 型の分泌系遺伝子は見つからなかった。pRkaw12b の III 型は、根粒菌の多くに見られる *rhc* 遺伝子群と類似が低く、エフェクタータンパク質の推定もできていない。そのため、根粒菌と異なる分泌系の宿主応答に関する特性、共感染との関連について、今後の研究が必要である。

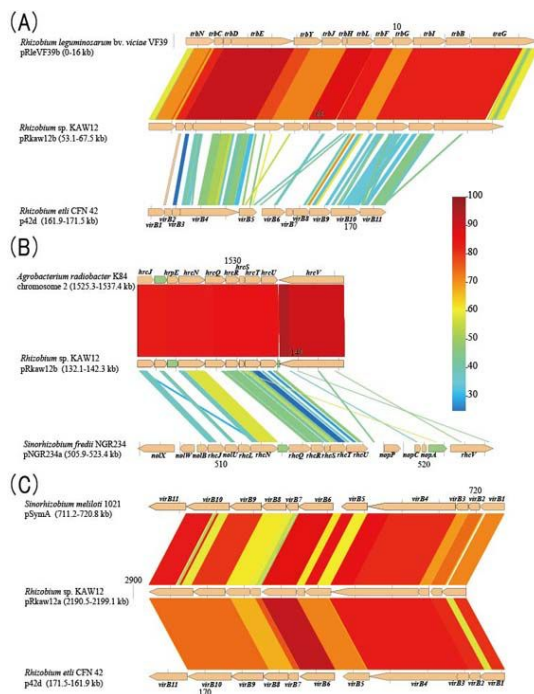


図 7 KAW12のタンパク質分泌系遺伝子構成比較

A: pRkaw12b-T4SS, B: pRkaw12b-T3SS, C: pRkaw12a-T4SS

< 引用文献 >

Isawa, T., Yasuda, M., Awazaki, H., Minamisawa, K., Shinozaki, S., Nakashita, H. *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. (2010) *Microbes and*

Environments, 25 (1), pp. 58-61.

Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. (2010) *Plant and Cell Physiology*, 51 (9), pp. 1381-1397.

Zgad Zaj, R., James, E.K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. (2015) *PLoS Genet.*, 11(6), e1005280.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1件)

金子 貴一、ミヤコグサエンドファイト *Rhizobium* sp. KAW12 のゲノム解析. 第 24 回植物微生物研究交流会、2014.9.19-21、佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)

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・教授
研究者番号: 80370922

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

平川 英樹 (HIRAKAWA, Hideki)
公益財団法人かずさ DNA 研究所・植物ゲノム研究部・主任研究員
研究者番号: 80372746