

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660057

研究課題名(和文) 進化的特徴の類似に基づくマメ-根粒菌共生遺伝子のゲノム網羅的計算推定と実験検証

研究課題名(英文) Comparative genomic study of the symbiotic genes of rhizobia with legumes

研究代表者

青木 誠志郎 (Aoki, Seishiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：10334301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物との共生により窒素固定を行うバクテリアには、遺伝学的研究により様々な共生遺伝子群が見つかる。これらの遺伝子群は、ハウスキーピング遺伝子とは異なる進化的特徴を持つことが推定されている。本研究ではそのような進化的特徴を解析し、ゲノムビッグデータを元に新規な共生遺伝子を探索、さらにこの共生系の起源の解析を行った。これらの探索によりいくつかの共生遺伝子が共生バクテリアの遺伝子重複で生まれたことが明らかになった。また遺伝子水平移行、共生の平行進化、共生遺伝子群の集合クラスターの収斂進化、gene conversionのような、新しい進化現象がこれらの共生遺伝子群に見受けられることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The symbiosis of nitrogen-fixing bacteria with plants is a widespread and important phenomenon in ecosystems. The genes for this symbiosis have ever been found with genetic analysis. It has been thought that the symbiotic genes passed through different evolutionary pathways from the other housekeeping genes and have characteristic features in the molecular evolution. We searched for these genes using the analysis of microbial comparative genomics and revealed that several symbiotic genes might have originated from the gene duplication of the housekeeping genes in bacteria. We also found that new evolutionary phenomena such as parallel evolution of symbiosis function, convergent evolution of gene order, and gene conversion in several symbiotic genes.

研究分野：進化学

キーワード：分子進化 共生 窒素固定 根粒 水平移行 平行進化 遺伝子重複 機能進化

1. 研究開始当初の背景

相利共生においては自己資源の利他的な振り分けが必須であり、より速く大量の自己複製を目指すハウスキーピング遺伝子の理想とは対照的に、共生相手からの見返りとリンクした共進化が、共生遺伝子に働くと考えられている。近年、マメ-根粒菌共生系の生態学的解析が進み、植物個体は1つ1つの根粒の窒素固定効率を観測し、高い窒素固定能をもつ根粒菌に、多くのエネルギー資源を供給するという、制裁機構と呼ばれる複雑な制御が行われることがわかってきた。このような制御に関わる共生遺伝子は、従来の遺伝学的解析のような、“根粒形成をするかしないか”という様な、大まかな形質の違いを指標にしたスクリーニング法では、特定できないものがある可能性がある。また、パラログのような機能相補をもつ共生機能遺伝子群は、1遺伝子破壊による分子遺伝学的解析で見つけることは困難である。我々はこれらの共生遺伝子がハウスキーピング遺伝子とは異なる分子進化的特徴をもつことを鍵にして、ゲノムビッグデータから探索できないかと考えた。本研究の研究開発当初時には、すでに数万を超えるゲノム計画が進み莫大な配列情報が蓄積している現状にも拘らず、DNA配列からの機能予測は、従来の「配列類似性による遺伝子機能推定」よりも優れた、ゲノム情報のインフォマティクス解析はまだ多くが開発中で、このような分子進化的特徴の解析は遅れていた。従来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と分類され、結果として全ゲノム解読済みの生物ほぼ全てにおいて、多くの割合の遺伝子が、機能未知遺伝子に分類されてきた。この状況に対し研究開始当初、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、mirror tree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遺伝子である *nod* 遺伝子群やマメ科植物の *HARI*, *NFR* 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、基本的にどのデータベースでも、共生機能は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:根粒菌だけが持ち他の生物が持たない遺伝子を共生遺伝子と推定する。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類似機能と推定する)。そこで我々は新しく『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、機能進化ゲノム解析を展開することを考えた。

2. 研究の目的

従来、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。また、農作物を中心としたマメ科植物の多くが、 α 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 α プロテオバクテリアであると考えられてきた。我々は本研究に先駆けて、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 β 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(Aoki et al. 2013 Molecular Biology and Evolution)。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。これらの未知な遺伝子についての機能解析は、分子遺伝学では見つからなかった新たな共生遺伝子の発見に繋がると共に、分子進化解析は分子の新機能(共生に必須な機能)形成に重要な、DNA 変異の解明、および、ゲノムレベルの植物-根粒形成菌全体の起源の解明に繋がると考えられた。そこで本研究では“注目する形質(ここでは共生)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

網羅して数理計算的に探索し、分子生理実験により形質への関与(機能)を検証すること”を“マメ科植物と根粒菌の相利共生系”を研究材料として行なうことを具体的目的とした。同時に、見つかった共生遺伝子群による分子進化解析により、この共生系の起源の解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究では

1. 計算的アプローチ
2. 分子進化的アプローチ
3. 実験的アプローチ

の3つを具体的な研究方法とした。

1. 計算的アプローチでは最初に、*nod* 遺伝子群と同じ進化的特徴をもつ共生遺伝子のゲノム網羅的推定プログラムの開発を行った。ゲノム解析が済んだ細菌数百種を用いた遺伝子クラスタリングで出力されるであろう、数万の相同遺伝子クラスターの中から、共生遺伝子を含むクラスターの判別プログラムの開発を進めた。系統樹を幾何グラフとしてトポロジーだけを考え、共生遺伝子の系統樹とハウスキーピング遺伝子の系統樹を比較した。共生遺伝子が水平移行していれば、根粒菌集合だけで単系統群を作るので、種の系統樹との相違が生まれる。これらの系統樹で厳密合意する最大単系統群の OTU 数を出力し、共生遺伝子(*nodJ* 遺伝子群など)の系統樹が根粒菌に特徴的な性質を持つことへの数値化を試みた。

また、統計的手法による、共生遺伝子の推定を行った。共生菌ゲノム特異的に高頻度な重複が見受けられる遺伝子も、共生機能に関わる可能性が高いと考えられる。実際、根粒形成初期に機能する *nodD* 遺伝子パラログを3つ以上持つ根粒菌の存在が知られている。そこでまず全細菌より利用するゲノムを選び、遺伝子クラスタリングの後、“共生菌のホモログを数多く、非根粒菌は少なく保持する遺伝子クラスター”(またはその逆)を Brunner-Munzel 検定により抽出

した。

2. 分子進化的アプローチとして、根粒形成系を形づくる共生遺伝子の分子進化と起源の解析を行った。ここでは根粒形成遺伝子研究でそれまで行われてきた様な、研究者がいわば恣意的に選んできた少数の OTU を用いた計算ではなく、公共遺伝子データベースに存在する全遺伝子を用いた解析に、初めに取り組んだ。この理由は、 β プロテオバクテリアが根粒菌と考えた我々の 2013 年の発表に対し、以前より唱えられてきた α プロテオバクテリアが、やはり根粒菌の起源ではないかという総説や学会発表がなされたためであった。この問題を解決するためには、根粒菌の研究でこれまで行われてきたような限られた配列データによる解析ではなく、 α プロテオバクテリアと β プロテオバクテリアを中心に、全細菌を網羅した遺伝子配列データを元にして共生遺伝子の起源を明らかにする必要があった。そこで、バイオインフォマティクス分野の解析を用い、大規模系統解析を行った。本研究ではこの 2. 分子進化的アプローチが主なものとなった。

3. 実験的アプローチについては、競争的な共生実験系の設計までを行い、具体的な新規遺伝子を用いた実験のための基盤を作った。

4. 研究成果

本研究の主な目標は、研究方法で述べた 1. 計算的アプローチを元にした、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、むしろ 2. 分子進化的アプローチによる共生遺伝子の進化解析において新しい発見があった。これまでにゲノムが解析された菌の配列情報として NCBI の RefSeq に登録された全細菌のデータを用いることで、共生遺伝子がどのようなハウスキーピング遺伝子を起源にして新規に生まれたのかについて詳しい解析を行うことができた。我々はすでにマメ科共生菌の起源についての発表を行ったが、その解析に用いた *nodJ* 遺伝子群以外にも、いくつかの共生遺伝子が共生バ

クテリア自身あるいはその近縁菌のゲノム重複で生まれたことを明らかにした。現在それら重複の順番を決定することにより、マメ科だけでなく植物全体を網羅してその共生窒素固定細菌の起源の解析を行っている。また、本研究では特に *nodM* 遺伝子に注目し、遺伝子水平移行、共生機能の平行進化、共生遺伝子群の集合クラスターの収斂進化、gene conversion による進化のような様々な分子進化現象がこの1遺伝子に見受けられることを発見した。現在この成果として論文に執筆中である。この他、その他の共生遺伝子に、遺伝子水平移行とキメラ形成に起源した宿主特異性進化、多数回の遺伝子重複と自然選択のような特徴的な分子進化を見つけることができ、それぞれ詳しく解析中である。

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)

① Koji Yano, Seishiro Aoki, Meng Liu, Yosuke Umehara, Norio Sukanuma, Wataru Iwasaki, Shusei Sato, Takashi Soyano, Hiroshi Kouchi, Masayoshi Kawaguchi

“Function and evolution of a *Lotus japonicus* AP2/ERF family transcription factor that is required for development of infection threads”

DNA Research, 査読有,

Vol. 24: 193-203 (2017)

DOI: 10.1093/dnares/dsw052

② Masaru Bamba, Sayuri Nakata, Seishiro Aoki, Koji Takayama, Juan Nunez-Farfan, Motomi Ito, Masaki Miya, Tadashi Kajita

“Wide distribution range of rhizobial symbionts associated with pantropical sea-dispersed legumes”

Antonie van Leeuwenhoek, 査読有,

Vol. 109: 1605-1614 (2016)

DOI: 10.1007/s10482-016-0761-y

③ Takako Kato-Minoura, Kumiko Karino, Nobuyuki Akimoto, Norito Yoshiga, Mika Ehara, and Seishiro Aoki

“Phylogenetic analysis of NAP, an unconventional actin of the Volvocales”

Plant Systematics and Evolution, 査読有,

Vol. 301: 1725-1733 (2015)

DOI: 10.1007/s00606-014-1187-5

④ Hironori Fujita, Seishiro Aoki, Masayoshi Kawaguchi

“Evolutionary Dynamics of Nitrogen Fixation in the Legume-Rhizobia Symbiosis”

PLoS One, 査読有,

Vol. 9: e93670 (2014)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093670>

[学会発表] (計7件)

① 番場大、青木誠志郎、梶田忠、瀬戸口浩彰、綿野泰行、佐藤修正、土松隆志

日本各地の野生ミヤコグサに共生する根粒菌の単離と系統解析

日本進化学会

2017年8月24-26日

京都大学 吉田キャンパス

② 番場大、青木誠志郎、梶田忠、瀬戸口浩彰、綿野泰行、佐藤修正、土松隆志

日本各地の野生ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)に共生している根粒菌の系統解析

日本植物学会

2017年9月8-10日

東京理科大学野田キャンパス

③ 徳本雄史、征矢野敬、青木誠志郎、福原舞、中川知己、横山潤、藤田浩徳、川口正代司

ヒメハギ科カスミヒメハギ(*Polygala paniculata* L.)

の根粒共生進化研究に向けた種特性の解析。

日本植物学会

2017年9月8-10日

東京理科大学野田キャンパス

④ 番場大、青木誠志郎、梶田忠、瀬戸口浩彰、綿野泰行、佐藤修正、土松隆志

日本各地より採集された野生ミヤコグサに共生する根粒菌の系統解析

植物微生物研究会

2017年9月20-22日

京都大学宇治キャンパス宇治おうばくプラザ きはだホール

⑤ 番場大、青木誠志郎、高山浩司、伊藤元己、宮正樹、梶田忠

西表島海浜土壌に含まれる根粒菌群集

日本植物分類学会

2017年3月9-12日

京都大学 吉田キャンパス

⑥ 青木誠志郎、伊藤元己、岩崎渉

遺伝子重複・GC含量変化・分子進化加速・水平伝播による根粒菌共生遺伝子 *nodJ* の誕生と進化

日本進化学会

2015/8/20-23

中央大学後楽園キャンパス

⑦ 番場大、青木誠志郎、高山浩司、伊藤元己、宮正樹、梶田忠

海浜土壌におけるマメ科植物の根粒菌相の解析

日本植物分類学会

2015/3/6-8

福島大学金谷川キャンパス

[図書](計1件)

① 藤田浩徳, 青木誠志郎, 川口正代司

学研メディカル秀潤社

進化の謎をゲノムで解く

2015

総ページ数:199 (146-155)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 誠志郎(AOKI, Seishiro)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員

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

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()

研究者番号: