

ミヤコグサ根粒菌ゲノムの多様性・可塑性の解析に基づく共生システム分子基盤の解明

●佐伯 和彦

奈良女子大学理学部

〈研究の目的と進め方〉

根粒菌とマメ科植物とが営む共生窒素固定は、数少ない細胞内共生の実例である。いずれも自由生活可能な異種生物間の相互認識と寛容・排除の機構は古典的かつ現代的な課題である。一般に、宿主であるマメ科植物と根粒菌の種の組合せが比較的限定されている。しかし、百種類以上のマメ科植物と共生可能な広域宿主菌が知られている。また、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が土壤中で水平伝搬し、非根粒菌を根粒菌に変貌させて得ることも示され、病原性細菌の pathogenesis island の伝搬と類似性を持つことから symbiosis island (共生アイランド) と名付けられている。共生アイランドは、移動する DNA 断片のサイズは非常に大きく、Mycoplasma ゲノムにも匹敵する程度の遺伝子超クラスターとなっている点の特徴である。ミヤコグサ根粒菌だけでなく、ダイズ根粒菌にも類似のアイランドの存在することが全ゲノム配列の決定により明らかにされた。当然ながら、共生アイランドの受容により共生窒素固定が可能となる細菌種は限定されている。従って、アイランド以外のゲノム領域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。

本研究では、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 株ゲノムの情報を基盤に、ミヤコグサ *Lotus japonicus* 根粒由来の菌株 (国内単離 6 株) と西洋ミヤコグサ *L. corniculatus* などミヤコグサ近縁種の根粒由来の菌株 (*M. loti* 標準株 NZP2213 株や R7A 株などニュージーランドと北米単離の 9 株) 広宿主域菌 *Rhizobium* spp. NGR234 株やミヤコグサと不完全な共生を行う *Rhizobium etli* CE3 株について、ゲノムの多様性・可塑性と宿主特異性を解析した。また、ミヤコグサ根粒菌と同じ構造の Nod 因子を合成し、本来の宿主とされていないミヤコグサにも感染して根粒を形成させるインゲン根粒菌 *Rhizobium etli* CE3 株を不全ミヤコグサ根粒菌株とみなして、共生能力を向上させるゲノム領域を探した。これらにより、非根粒菌から根粒菌への変換に必要な因子及び宿主域を決定する因子の解明の基盤形成を目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) ゲノム構造の粗比較：国内でミヤコグサの根粒から単離された菌株 7 種と国外で西洋ミヤコグサの根粒から単離された菌株など 10 種を対象にして比較を行う。16S rRNA の配列および共生アイランド内で、MAFF303099 と R7A 株の間で共通して保存される遺伝子領域、保存されるが挿入の認められる領域及び一方のみにしか存在しない遺伝子領域について、PCR と Southern 解析による粗比較を行う。可能なら、マイクロアレイによる比較も行う。
- 2) 菌株生育条件・共生能の比較検討：菌株毎に薬剤耐性等を含む生育条件・生育能を調べる。また、ミヤコグサ・西洋ミヤコグサ以外の近縁種として、ネビキミヤコグサ *Lotus pedunculatus*、木本のマメ科植物である

ギンネム *Leucaena leucocephala* を宿主とした場合の共生能を比較する。

- 3) インゲン根粒菌の異種相補実験：ミヤコグサに早期老化根粒を着生するインゲン根粒菌 *Rhizobium etli* CE3 株を不完全なミヤコグサ根粒菌として、ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* MAFF303099 株のゲノム整列化ライブラリーを導入することにより、ミヤコグサとの共生に必要なゲノム領域を同定する。
- 4) 根粒菌ゲノムツールの開発：共生アイランドの欠失や近縁細菌への水平移動のモデル実験を可能とするために、配列特異的リコンビナーゼの根粒菌内発現系、温度感受性広域宿主ベクターの開発を行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) ゲノム構造の粗比較：まず、国内各地に自生するミヤコグサの根粒から根粒菌株の 16S rRNA 配列を解析した結果は、これらの菌株が単系統に属さない可能性を示唆した。いずれも、ミヤコグサ根粒菌標準株である NZP2213 株よりは、レンゲソウ根粒菌 *Mesorhizobium huakukii* などと類縁性を示した。Southern 解析の結果は根粒形成関連遺伝子である nodC-nodI を含む領域でも多型を示した。

次に、共生アイランド内のより詳細な比較を行うために、配列が既知の *M. loti* MAFF303099 と R7A 株のアイランド内で i) 共通して保存される nodS-nodACIJ 領域、ii) 保存されるが一方の遺伝子間により長い挿入が認められる共生特異的 GroESL シャペロン遺伝子近傍領域、iii) 一方のみに存在する領域 (MAFF303099 のアイランド上では Type III 分泌系遺伝子群が存在する領域に、R7A では Type IV 分泌系遺伝子群が存在する)、について比較した。GroESL シャペロン遺伝子近傍領域では、国内株は単一のグループを形成し、ニュージーランドや北米由来の国外株は 3 つのグループを形成した。nodS-nodACIJ については、国内株においても nodS と nodA の遺伝子間領域に顕著な多型が認められた。興味深いことに、国内株 6 株はいずれも Type III 分泌系遺伝子群、国外株は Type IV 分泌系遺伝子群を持ち、地理的分布域によって異なる型の分泌装置を持つと見積もられた。根粒形成遺伝子 nodS-nodA 領域の塩基配列を調べることで得られた系統樹は、16S rRNA 塩基配列から得られたものと異なるトポロジーを示した。

- 2) 菌株生育条件・共生能の比較検討：国内外由来の菌株は生育速度に若干の差はあるものの、栄養要求性や薬剤耐性 (ホスホマイシン耐性) において共通の性質を示した。4 種の宿主に感染させたところ、調べた 17 株すべてはミヤコグサとも西洋ミヤコグサとも共生窒素固定能が確認された。また、すべての株はネビキミヤコグサに根粒を形成したが、窒素固定を行ったものはニュージーランドや北米由来の国外株の一部に過ぎなかった。さらに、国内株は木本宿主のギンネムに根粒を着生しなかったが、国外株は少なくとも根粒着性能を示し、一部 (NZP2037 株など) は窒素固定能力

を示した。すなわち、国内株はいずれも狭い宿主域しか示さないのに対し、国外の株は中程度ないしは広い宿主域を示した。宿主域の広狭と塩基配列レベルの系統解析を照合すると、16S rRNA配列によるよりは nodS-nodA領域の配列によるグループ分けの方が宿主域との相関度が高いと判定された。これは共生アイランドの構造の方が、アイランド以外の主ゲノムの構造よりも、宿主範囲をより強く規定することを示唆した。国内株はいずれもTypeIII分泌系遺伝子群を持ち、国外株はTypeIV分泌系遺伝子群を持つことが、前者の狭宿主域性と後者の中ないし広宿主域性と関連するか興味深い。

- 3) インゲン根粒菌の異種相補実験：インゲン根粒菌株を不全ミヤコグサ根粒菌株とみなして、M. loti MAFF303099ゲノムのコスミド整列化クローン480を個別にRetli CE3に導入し、得られた株の共生形質を個別に評価した。コスミド導入の段階で14クローンはRetli CE3に安定に保持されなかったため、残る466クローンの導入株について調べた。この結果、コスミド非導入株に比べ、共生能が10%~20%上昇させるものと、逆に共生能が低下するものが得られた。共生能の向上した株では窒素固定活性がより長期にわたり保持されていた。導入したコスミドクローンがカバーするゲノム領域は分散しており、M. lotiのみが保有し、ミヤコグサとの共生に対して部分的に正の効果を持つ因子が複数加算的に作用している可能性を示唆した。共生能を低下させ、ミヤコグサに未分化な根粒様の黒色顆粒を着生するクローンの存在することから、Retli CE3が持つ負の因子にミヤコグサが反応して排除される傾向があること、この負の傾向はM. lotiの持つ2つ機能未知ORF、mll1820とmlr1821、によって増大することを確認した。
- 4) 根粒菌ゲノムツールの開発：任意のゲノム領域に配列特異的リコンビナーゼの標的配列を埋め込むこと、また任意の遺伝子を破壊することを可能とするため、大腸菌内でWanner法により破壊アリルを作製した後、相同組換えによりゲノム上の野生型アリルと交換する系を確立した。また、リコンビナーゼ発現後にベクターを容易に除去するため、広域宿主ベクターpBBR1MCS2のrep遺伝子にError-Prone PCRを行い、約1200の産物から温度感受性を示す派生物1クローンを得た。1塩基の変異を確認した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

かずさDNA研により、ミヤコグサ菌MAFF303099株に続きダイズ根粒菌Bradyrhizobium japonicum USDA110株ゲノム塩基配列が決定され、ダイズ菌に置いても共生islandが水平伝搬した可能性が強く示唆された。国外でも、アルファルファ菌や近縁の植物腫瘍菌の全ゲノム、また共生プラスミドや共生islandの塩基配列が、続々と行われている。一方で、16S rRNAと23S rRNAやrecA、atpD遺伝子に基づく系統分類が一致しないことがBerkumらにより報告され、BroughtonらとYoungらは、水平伝搬を踏まえ、根粒菌のidentityと分類に対する再評価が必要なことをJournal of Bacteriology誌やMicrobiology誌上で提言している。本研究は、共生island伝搬とisland自体の進化を探ることにより、提言に応えるものである。

ゲノム粗比較と宿主域検討の結果は、極東の日本と(おそらく欧州に由来する)北米やニュージーランドのいずれのミヤコグサ根粒菌においても、共生アイランドの

基本構成が保たれ、しかし独自に進化を遂げたことを示唆した。一方がTypeIII分泌系の遺伝子群を獲得しながらも狭宿主域であるのに対し、他方はより広宿主域でTypeIV分泌系遺伝子を獲得している。2004年夏に開催された北米窒素固定会議での発表に対して活発な議論がなされた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

国内のミヤコグサ菌としてMAFF303099株以外には鹿児島県以外で取得した株について解析に至らなかった。現在、宿主として岐阜県産のB-129と並んで広く利用され始めている宮古島産のミヤコグサMG-20株と本来共生していた菌株の取得に失敗した。ゲノム全体をほぼ3kbp毎にカバーするマクロアレイの作製を行った(国内7グループと共同)が、数的制限からゲノム比較への適用までに至らなかった。

〈今後の課題〉

本研究により、国内のミヤコグサ根粒由来の根粒菌株とニュージーランド・北米の西洋ミヤコグサ根粒由来の根粒菌株の宿主域の広狭が共生アイランド上に存在するTypeIIIおよびTypeIV分泌系遺伝子群の有無に起因する可能性が示唆された。この可能性を検討する必要がある。ミヤコグサ根粒菌として国内由来の狭宿主域菌MAFF303099株とニュージーランド由来の広宿主域菌NZP2037株とを、異なる型の分泌系遺伝子群を持ち、且つ宿主範囲において明白な相違を示す菌株セットとして用い、変異株の作製と相補実験により解析する。より具体的な計画は、以下の通りである。MAFF303099株の共生領域内のTypeIII分泌系相同遺伝子群の配置では、7つのORFが分泌装置を形成し、上流に逆向きに位置するORF、mll6337 (nopXホモログ)は分泌タンパク質であると見積られる。この分泌装置全体を制御すると考えられるORF、mlr6334 (ttsIホモログ)が根粒形成時の転写を誘導する領域nod-boxの下流に存在することから、MAFF303099株のTypeIII分泌系は根粒形成時に発現している可能性が極めて高い。上述の宿主特異性がもしTypeIII分泌系に関わるものだとすれば、2つの可能性が考えられる。1つは、NopXホモログや他の分泌タンパク質が、ミヤコグサの防御応答を抑制するが、ネビキミヤコグサやギンネムタンパク質はミヤコグサや西洋ミヤコグサの防御応答を誘導しない防御応答を誘導してしまう可能性、すなわち異物として認識されることを惹起する場合である。NZP2037株のTypeIV分泌系と分泌タンパク質についても類似の予測が成り立つ。そこで、遺伝子破壊と相補実験により、(1)TypeIIIおよびTypeIV分泌系の有無が宿主域の決定と共生成立に及ぼす効果を検証し、(2)TypeIII分泌系相同遺伝子群の発現時期と発現場所を特定、(3)TypeIIIおよびTypeIV分泌系により宿主細胞内へ輸送される被分泌タンパク質検出を行う必要がある。これら分泌系に着目した解析以外に、ゲノムツールを拡充して、共生アイランド全体を移動交換させることにより、その機能と窒素固定共生の起源に迫る。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

1-1. 0404091846

Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K.,

Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M., and Minamisawa, K. Expression Islands Clustered on the Symbiosis Island of the *Mesorhizobium loti* Genome J. Bacteriol. 186(8):2439-2448 (2004)

1-2.

Y. Tsukushi, N. Kido, K. Saeki, T. Sugiyama, N. Koide, I. Mori, T. Yoshida and T. Yokochi (2004) "Characteristic Biological Activities of Lipopoly-saccharides from *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*" J. Endotoxin Res. 10:25-31

4) その他の刊行物・著書

Saeki (2004) "Electron Transport to Nitrogenase : diverse routes for a common destination" in Genetics and Regulation of Nitrogen Fixing Bacteria W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon and W. E. Newton (eds.), pp 257-290 Kluwer Academic Publishers