

遺伝子水平伝播による共生系の進化と起源の統合的解析 —理論的推定および実験的検証—

●青木 誠志郎 ◆伊藤 元己
東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

<研究の目的と進め方>

本研究は、配列類似性を基礎にした比較ゲノミクスから一歩進み、進化的特徴の類似に注目した機能進化ゲノミクス分野の確立を目標とする研究の第一弾にあたる。ここでは(1)分子進化的に他にない特徴をもつ遺伝子を計算によりゲノム全体を網羅的に検索、抽出し、(2)実験により破壊あるいは改変し形質変化を観察することにより、生物の特徴的形質を進化の中で決定づけた遺伝子である可能性を実証することを試みる。本研究ではそのような分子進化的特徴のうち、特に“バクテリアにおける遺伝子の水平伝播”に注目する。水平伝播は新規な適応的形質を入手するための迅速でコストの少ない進化の手段の一つであり、特にバクテリアでは種レベルを遥かに超えた遠縁の生物間でも多くの例が知られている。これらの例における個々の生物群からは、水平伝播遺伝子も数多く単離され研究がなされている。本研究ではこれらの例を考慮し、ゲノムレベルでの解析を行い遺伝子機能と結びつけた研究を行う。そこで(1)異なる生物群に跨った生物集合に共通する形質情報から機能遺伝子群の水平伝播に関し全ゲノムを網羅して探索する解析(伝播遺伝子探索)および(2)形質・機能進化を促した遺伝子系の水平伝播前の起源の特定(伝播起源特定)といった統合的な遺伝子水平伝播研究を行う。そのために理論計算と実験的検証を融合し共生進化の鍵となった水平伝播遺伝子群のゲノム網羅的探索を行うことを本研究の方法的な目的とする。

このような目的を目指し、我々は理論的アプローチとしての水平伝播遺伝子群解析のため系統樹上での同一機能遺伝子群の単系統性を指標とした「進化過程探索プログラム(Evolutionary Process Search: EPS program)」の開発を行っている。形質の例として根粒形成を掲げ(入力として2006年8月公開済み原核生物全属116種ゲノム全タンパク質配列を情報に)解析したところ、根粒菌-マメ共生関連遺伝子群(nod, nol, nif, fix genes)の検出に成功するとともに、共生機能が未研究な遺伝子を数多く機能予測できる可能性を見いだした。例えばアデニル酸サイクレス、転写因子ホモログ候補として挙がり、多くのhypothetical proteinとしか知られていない遺伝子についても共生関連機能を予測することができた。そこでさらに詳しい解析を行おうと考えている。なお系統プロファイル法やロゼッタストーン法を用いたいくつかのデータベースサーチによる解析では今のところ、基本的に本研究で探索できたと同様な共生関連遺伝子群を検索することはできないことを確認している。

次に実験的アプローチとして本EPSプログラムで探索された遺伝子についてゲノム上の遺伝子破壊による根粒菌ミュータントを作成する。これらの進化予測遺伝子破壊根粒菌のマメへの感染実験を行い、その共生関連機能の実証実験を行う。これら理論と実験を両輪とし遺伝子の進化的特徴と生物の形質の特徴の関係の

解明を進める。

<2007年度の研究の当初計画>

1、プログラムの開発(理論計算的アプローチ)

本研究で開発を始めたEPS(Evolutionary Process Search)プログラムでは系統樹を幾何学的グラフとしてとらえ、注目している遺伝子を内包しうる仮想クレードの全ての数え上げを行う。次にそれぞれの仮想クレードの要素(生物)を“特徴的な形質(マメとの共生)を示す生物群集合(根粒菌)”と比較し、種の系統樹で予想されるよりも高い単系統性が見られる時にこれを水平伝播遺伝子群と推定する。本プログラムの初期段階では系統樹のトポロジーのみを考慮しておりある意味定性的な推定を行った。それにも関わらず、根粒菌における共生アイランド領域の同定に成功した。そこで本年度の改良として距離行列に則った定量的推定法(mirror-tree法、improved phylogenetic profiling法を参考に)アルゴリズムに加えさらに精密な推定を行おうと考えた。また現在のプログラムでは遺伝子重複に関する推定は行っているが遺伝子喪失推定のためのアルゴリズムを含んでおらず、遺伝子喪失を水平伝播と混同する危険を孕んでいる。そこで系統樹を種の系統樹とみなし距離行列のパターンを比較することで、定量的に遺伝子喪失の可能性を推定するプログラムの開発を計画した。さらに現在EPSプログラムに入力しているのはDDBJに報告されたアノテーション(Kaneko et al. 2002)とCOGの情報であるが、ここにトランスクリプトームの解析結果(Uchiumi et al. 2004)を加え、より詳しい判推定を行うことのできるプログラムに改良しようと考えた。

2、遺伝子破壊と感染実験(実験的アプローチ)

本年度はEPSプログラムによる機能推定が正しいことを1例でも良いので実証することを目標とした。そのために少数遺伝子に絞って破壊と感染実験を行おうと考えた。材料としてはマメ科モデル植物であるミヤコグサおよび共生菌Mesorhizobium loti MAFF303099を利用する。EPSプログラムにより共生関連機能の推定された未研究遺伝子を分子生物学的手法にて破壊する。遺伝子破壊はPCRによるクローニングと自殺ベクターへの導入によるコンストラクト、およびmatingとそれに続くhomologous recombinationによる遺伝子の切断により行う。そして作成された根粒菌突然変異体を用いin vitroでの着生実験を行い、根粒形成と窒素固定系への影響を調べる。さらに窒素固定系に関し、直接の窒素固定能の測定と共にレグヘモグロビンmRNAの転写を定量的PCRにて調べることにより解析することを計画した。

<2007年度の成果>

本研究で開発したプログラムが今まで知られていなかった遺伝子の機能推定を行えることを確かめるために、既存のデータベースと本研究の比較を行った。全nod遺伝子(23遺伝子)のうちどれだけを共生に関与するものとして機能予測が可能であるかと

いうことを例に調べた。その結果、系統プロファイル法や Rosetta stone 法、Gene neighbor 法では機能推定できなかった nod 遺伝子の多くが本研究で初めて計算的に機能予測できることを確認した。また nod 遺伝子以外の根粒形成遺伝子群遺 (nod 遺伝子群)、窒素固定関連遺伝子群 (nif, fix 遺伝子群) の共生機能の進化的予測に成功した。さらに共生アイランド全体がゲノムの他の領域と異なる特徴を持つことを推定できた。この他、計画当初考えていたような遺伝子の水平伝播が分子系統学的に推定できただけでなく、根粒形成の促進に関わる遺伝子機能の平行進化や、遺伝子置換によるマメ-根粒菌宿主特異性の新規な組み合わせの進化といった、従来知られていなかった進化的現象を発見した。

また難しかった遺伝子破壊系をようやく確立した。そしていままで Mesorhizobium 根粒形成に必須と考えられてきた共通 nod 遺伝子群の中に、進化的な特徴が他とは違った遺伝子があることを計算により見だし、遺伝子破壊により機能を調べ、この nod 遺伝子が破壊されていても植物はある程度の根粒形成を行うことを確認した。さらにかずさ DNA 研究所との共同研究により遺伝子破壊株の提供を受け、共生機能が未知であったいくつかの遺伝子の中に (進化的な予測どおり) 根粒形成に関与するものがあることを発見した。

<国内外での成果の位置づけ>

比較ゲノム研究における進化的手法として系統プロファイルングやオーソログクラスタリングが一般に行われ、国内外でこれらの手法を用いた機能検索プログラムが付属したデータベース、例えば Phylbac, MBGD, Prolinks などが公開されている。本研究によるプログラムはこれらの既存のデータベース検索では抽出できなかった共生関連遺伝子の検索に成功した。本研究のような水平伝播やその他の進化的特徴に着目し、新規な遺伝子機能の計算的探索と実験的検証という両軸の解析より、ゲノム遺伝子機能と遺伝子進化について新発見が得られると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

根粒菌における遺伝子破壊が当初の計画で考えていた以上に難しかったが、ようやく本年度で系の確立に至った。いくつかの遺伝子については本質的に破壊株の取得が難しいらしく、あるいは致死遺伝子であるかもしれない可能性が予想されつつある。また共生機能について新規に発見された遺伝子を世界に発表する前に、共生関連遺伝子の (水平伝播を含めた) 様々な特別な進化様式に関して解析と発表が必要である。

<今後の課題>

本研究でこれまでに開発したプログラムは定性的なものであったが、これに定量性を加えたプログラムが必要でありこの開発を急いでいる。またいままでのゲノム解析の報告からバクテリア側だけではなく植物側でも、いくつかの共生関連機能遺伝子を進化的に予測できることが示唆された。特に共生に関与する生物間認識遺伝子のいくつかに大きな遺伝的多様性の存在が見受けられることがわかった。そこで、そのような植物側における多様性の原因となる変異を計算によりとらえ、実験により共生関連機能を確かめたいと考えている。ミヤコグサの種子バンクよりいくつかの野生植物を取り寄せ、機能との関係に注目しつつ共生機能を遺伝子ごとに調べ始めている。

本研究で注目しているのはマメと根粒菌の相互作用に関わる遺伝子系であるが、このような生物間相互作用を調べるには既存のバイオリソースでは不十分であることがわかってきた。マメと根粒菌はそれぞれ別々のバンクに保存されている。これらは別の機会に採集されたものであるため、果たして野外で共生関係を結んできた組み合わせかどうかはわからない。実験環境で過剰な共生菌の感染をおこなうことにより、両者の相互作用は確認できる。しかしながら、本研究のような進化的手法を用いた研究のためには、はじめから野外で共生関係にあった植物と菌の組み合わせに関する情報を解析に用いることが望ましい。そこで新しく“生物間相互作用バンク”の立ち上げを進めている。植物1個体ごとの野外におけるマーキングを行い、個体ごとの「遺伝子、種子、共生菌」の確保および保存を行って情報を集めつつある。このような“生物間相互作用バンク”は進化学のみならず、保全生物学、環境生物学、生態学的に重要な役割を果たすことが期待される。果たして野外における相互作用の組み合わせに、例えば共生に関する新規な特異性の進化や、あるいはハンディキャップの原理に従った進化といったような機構があるのかどうかについて検証したい。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0702131007

Hoya A, Shibaike H, Morita T, Ito M. Germination characteristics of native Japanese dandelion autopolyploids and their putative diploid parent species. J Plant Res. 2006 Oct 24; [Epub ahead of print]

2. 0702131012

Hamada S, Sekimoto H, Tanabe Y, Tsuchikane Y, Ito M. Isolation of myosin XI genes from the Closterium peracerosum-strigosum-littorale complex and analysis of their expression during sexual reproduction. J Plant Res. 2006 Mar;119(2):105-13. Epub 2006 Feb 3.

3. 0701182043

Shigyo M, Hasebe M, Ito M. Molecular evolution of the AP2 subfamily. Gene. 2006 Feb 1;366(2):256-65. Epub 2006 Jan 4.

4. 0702131016

Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences. J Plant Res. 2005 Aug;118(4):271-84. Epub 2005 Jul 16.

2) データベース/ソフトウェア

特になし。