

進化的特徴の類似性に基づくゲノム網羅的な共生遺伝子の探索— 数理と実験の統合解析—

●青木 誠志郎 ◆伊藤 元己

東京大学大学院総合文化研究科

<研究の目的と進め方>

生物の多様性をかたちづくるそれぞれの特徴は、その特徴ごとに独自の遺伝要素ネットワークによって支えられていると考えられる。そのようなネットワークを構成する遺伝子群は、他にないそれらにのみ共通の、分子進化的特徴を有する可能性がある。そこで私は、従来なされてきた配列類似性による推定を拡張し、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ミクス (Functional Evolutionary Genomics) 分野の一端を担いたいと考えた。このため本研究では、まず注目する形質 (本研究ではマメ根粒菌相互作用) にとって重要な機能を持つことがわかっている遺伝子と同じ進化的特徴をもつ (機能未知) 遺伝子群を、ゲノムを網羅して数理的に探索し、次に分子的解析を利用した生理実験により機能を解析して、注目形質への関与を実証することを目的とする。新しく見つかった遺伝子により、新しい現象が見つかり、この現象への説明が新しい機能的/進化的仮説をもたらすことを目標とする。

本研究では生物のもつ多様な特徴の中で相利共生 (協力) 現象に注目し、マメ根粒菌相互作用をモデルに解析する。協力あるいは相利共生は、個体が利己的な複製を差し控え自己資源を相手の援助に消費することを意味し、競争を包含する自然選択を基礎として考える場合、その進化には何らかの特別な機構が必要ということになる (Nowak 2006)。また協力している集団中における特異的関係性の分化は、協力相手の減少という危険を伴うことになり、やはり特別な機構がその進化には必要と考えられる (Parker 1999)。

マメ根粒菌共生系では今までの分子遺伝学的研究の蓄積により、このような協力現象および特異的協力相手の選択に重要な働きをもつ遺伝子が多数知られている。そこで本研究の進行ではまず、このような共生関連遺伝子に特有な分子進化的特徴の解析を行う。これまでに私が根粒形成遺伝子群 (*nod* genes; *nodulation* genes) を用いて解析した結果では、もっとも頻繁に見受けられたのがバクテリアの間における遺伝子水平移行現象で、これは従来の主張を確認するものであった。ところがこの他、ある根粒形成遺伝子では、特異的関係性分化と連動した遺伝子重複の頻出および正の自然選択が見つかり、他の遺伝子では遺伝子機能の平行進化、また他の遺伝子では遺伝子置換による特異性の変化というような進化的特徴が新しく見つかった。この他、遺伝子融合、根粒菌にしか類似遺伝子が見つからない遺伝子の存在など、様々な現象が *nod* 遺伝子群に見ついている。現在、窒素固定関連遺伝子群でも分子進化解析を進めつつある。

本研究では次に、見つかった進化的特徴への類似性を指標とし、根粒菌を含む多種バクテリアゲノム情報を用いた計算により、マメ根粒菌共生関連機能の未発見な遺伝子を網羅的に探索している。はじめに、多くの遺伝子に見つかった特徴である遺伝

子水平移行と遺伝子重複を指標として用い、解析を始めた。共通 *nod* 遺伝子群の水平移行を、系統樹上の単系統性として扱い、表現型/遺伝型プロファイルを行うプログラムを開発し探索を行い、多数の新しい共生遺伝子候補が見ついている。さらに遺伝子重複頻度検索プログラムの開発により、これとは別の新しい候補遺伝子の探索および共生アイランド全体の検出に成功している。現在、正の自然選択を指標とした新しい探索プログラムを作りつつあり、その他の現象に関しても順次計算法を開発する。また蛋白質相互作用や代謝系のネットワークにおける、これまでに本研究により発見された共生関連候補遺伝子の配置と情報に注目した機能推定について、研究を進める。

さらに本研究では、これら新しく推定された遺伝子が、果たして共生機能を有するかどうかを確かめるため、分子生理実験による機能の検証を行っている。検証実験の材料としてモデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) とその着生根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 を用い、根粒菌において計算で見つかった推定遺伝子の遺伝子破壊実験および植物への感染実験を行った。昨年度、20 強の遺伝子について根粒形成機能の検証を行い、そのうちのいくつかについて根粒形成能の変化の観察に成功した。現在さらにこの他の候補遺伝子の破壊と生理実験を進めている。ところで今までは、本手法の妥当性の立証ため、1 遺伝子破壊により現象が見受けられそうな候補遺伝子のみ注目してきた。しかしながらこれらによる実験では、新しい現象や大きな形質の変化は見つからない可能性が大きい。なぜなら根粒菌は分子遺伝学的解析の歴史が長く、遺伝子破壊実験により、多くの共生関連現象と遺伝子が既に見ついているからである。そこで本研究では、分子遺伝学的解析では発見が困難な、重複した遺伝子に機能相補がある場合に注目し、複数遺伝子の破壊による共生現象の発見を目指す。また、変異体が大きな形質の違いを示さず分子遺伝学的解析のスクリーニングにかからない可能性に注目する。本研究ではそのような遺伝子が細胞内分子ネットワークでどのような連携を示すのかに注目し、破壊実験により共生機能について検証したい。

さらに植物側のゲノムについても解析を始めつつある。分子進化解析として、根粒菌からの認識物質の受容体遺伝子を中心に進めている。全ゲノムによる計算として、植物ゲノム計画が進んだシロイヌナズナ、イネ、ポプラ、ブドウ、ヒメツリガネゴケを用いた解析法の開発を進めつつある。

<2008 年度の研究の当初計画>

共生関連遺伝子にみつかった分子進化的特徴のうち、単系統性および遺伝子重複頻度の変化について、系統樹トポロジーに注目しバクテリアゲノムの全蛋白質の検索を進める。またこれらの計算の改良として、遺伝距離行列の数値情報を利用し、非階層クラスタリング法、そして Taxon Jackknife によるアミノ酸置換モデ

ルへの適合性の比較法を開発する。また共生遺伝子への正の自然選択の可能性について根粒菌と近縁なバクテリアの全遺伝子を網羅した解析を試みる。このためにPAMLプログラムのbranch-site model (Yang 2004) にて共生機能獲得時および獲得後、そして特異性分化時における自然選択に注目した計算を行う。次に遺伝子破壊系のシステム化を行い、計算によって見つかった共生関連遺伝子候補の大量破壊に取り組む。またかずさDNA研究所の好意により遺伝子破壊根粒菌株の入手が可能になったのでこれらの株も利用する。遺伝子破壊根粒菌株を用い、共生関連機能を根粒形成能に注目して感染実験で解析する。

<2008年度の成果>

これまでの我々による共生関連遺伝子の進化的特徴の解析により、遺伝子重複と正の自然選択、遺伝子機能の平行進化、遺伝子水平移行に伴う宿主特異性進化のような進化現象が新たに見つかった。このような共生遺伝子の特徴のうち、遺伝子水平移行と遺伝子重複に焦点を当て、既知の根粒菌感染遺伝子 *nodA-nodZ* について解析したところ、23 遺伝子のうち 18 遺伝子が予測可能であることがわかった。そこで *Mesorhizobium* ゲノムの全蛋白質を用い解析した結果、共生アイランド全体の検出に成功、一方でこの領域内に数多くの共生とは関係のないハウスキーピング遺伝子の存在が推測され、ここから複数回の共生アイランド水平移行とゲノム内遺伝子転移の可能性が示された。さらに本解析による機能推定は 1 つ 1 つの共生関連遺伝子 (*nod*, *nol*, *nif*, *fix genes*) の検出に成功し、他にも共生アイランドの外に今まで共生への関与が知られていなかった数多くの遺伝子 (アデニル酸サイクレス、転写因子、機能未知遺伝子群 (未発見の共生アイランドの可能性)) が見つかった。

これらの推定で、本当に新しい共生関連遺伝子を発見し得たのかどうかを調べるため、それら推定遺伝子の遺伝子破壊菌株を作成した。植物に感染させ、共生機能の実験的検証を行い、いくつかの試行的な実験結果を得た。過去の多くの研究で見つかった共生関連遺伝子では、その破壊により根粒形成能力が低下することがわかっている。本研究の推定遺伝子の破壊でも、確かにそのような感染数低下型の遺伝子がいくつか見つかったが、逆に遺伝子破壊により感染数が増える遺伝子を発見した。さらに本課題では、数多くのその他の遺伝子の機能について、大量遺伝子破壊により解析する予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

今までにも、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関連遺伝子である *nod* 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、ほとんどの *nod* 遺伝子がどのデータベースでも推定できないことがわかった。そこで、今までの方法が全生物に適用できる統一的な手法を目指すのに対し、本研究では多様性に関わる各現象 (ここでは共生現象) に特化した手法の開発を目指す。機能進化ゲノミクスは「機能」に関わる分子生物学および生理学分野と「進化」に関わる進化生物学分野を両輪とし、一方だけでは予見できない発見を目指している。機能関連分野において本研究は、進化的解釈なしに知り得ない分子機能を推定し生物形質への関与を示すであろう。さらに分子遺伝学的には解析できない、パラログによる機能相補についても

予測可能である。また進化分野にとって重要な形質に関わる遺伝子を予測し、この遺伝子への分子工学的改変 (祖先機能復元) により、その形質進化への新たな解析を可能にすると考えられる。これからさらにゲノム全体を俯瞰した進化解析を進め、伸展の著しいパスウェイ解析やシステム生物学を機能進化ゲノミクスに結びつけることで、本研究を生物現象の複雑性に迫るものとした。

<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は *Mesorhizobium* では成功し、いくつかの破壊株による実験ができたが、*Bradyrhizobium* では未だ上手く行っていない。また、正の自然選択の解析には、遺伝子の 1 対 1 の比較による方法から一歩進んで、多数の遺伝子を用いたプログラムを利用しようとした。多数の遺伝子系統樹の枝を平等に比較するのは時間がかかりすぎ、ゲノム内全遺伝子の計算は難しい事が解った。そこで現在、遺伝子破壊に成功した *Mesorhizobium* の遺伝子での自然選択に特化したプログラムに改善したいと考えている。

<今後の課題>

今まで行ってきた遺伝子破壊株の実験結果の解釈は、根粒の直径からの推測であり、これからさらに植物の生長量や根粒菌の増殖を測って、両者の適応度の解析を行う必要がある。このための課題として根粒形成能以外の共生関連機能の実験が挙げられる。窒素固定能やバクテロイドの単生状態への復帰率といった、共生進化に重要な現象の解析法を本研究に導入することが必要と考えられる。

<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、Nomura N., Fujiwara K, Takaso T, Ito M, Uehara K, Setoguchi H
Development and characterization of microsatellite loci in *Farfugium japonicum* (Asteraceae). *Conservation Genetics* (in press)
- 2、Abe J, Hiwatashi Y, Ito M, Hasebe M, Sekimoto H.
Expression of exogenous genes under the control of endogenous HSP70 and CAB promoters in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. *Plant Cell Physiol.* (2008) 49 (4) :625-32
- 3、Fujita T, Sakaguchi H, Hiwatashi Y, Wagstaff SJ, Ito M, Deguchi H, Sato T, Hasebe M.
Convergent evolution of shoots in land plants: lack of auxin polar transport in moss shoots. *Evol Dev.* (2008) 10 (2) :176-86.