博士論文(要約)
大量の挿入配列を保有するダイズ根粒菌ゲノムにおける共生アイランドの構造に関する研究

平成 26 年度

東北大学大学院生命科学研究科
生態システム生命科学専攻

飯田　隆之

ダイズ根粒菌はαプロテオバクテリアに属するグラム陰性の土壌細菌であり、ダイズなどのマメ科植物に根粒を形成することで共生関係を結び、根粒組織において大気中の窒素ガスをアンモニアに固定している。ダイズ根粒菌ゲノムの重要な特徴の一つとして、共生アイランドの存在がある。共生アイランドは、共生窒素固定に必須な遺伝子と大量の挿入配列(Insertion Sequence: IS)が存在する外来性ゲノム領域であり、ダイズと共生する際に必要となる。例えば、研究に汎用されるダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 株(9.1 Mb)では、染色体中の低 GC 含量領域である 681 kb 以上に及ぶゲノミックアイランド(Genomic island)を保有している。USDA110 ゲノムには 20 種類の異なる IS(RSα, RSβ, FK1, IS*1632*, ISB20, ISB27, ISBj2~ISBj15)が存在する。しかしながら、ダイズ根粒菌に近縁だが共生アイランドを持たない *Bradyrhizobium* 属細菌 S23321 株ゲノムではこれらの IS は全く見いだされない。

生育が極端に遅いダイズ根粒菌(Extra-Slow-Growing: ESG)は、日本、アメリカ、中国の土壌で形成されたダイズ根粒から分離されている。IS コピー数の多い ESG 株は HRS(Highly Reiterated Sequence–possessing：超反復配列保有)株とも呼ばれている。

挿入配列は転移酵素トランスポゼースと末端逆方向反復配列(Terminal inverted repeat: TIR)をもった原核生物の最小の転移因子の単位であり、特定の標的配列に入り込み、元の配列に対し逆位、挿入、欠失といった変化を起こさせる。また、IS の挿入等が起きると、複製・相同組換えタイプの場合はその IS のコピー数は増加する。したがって、HRS 株は non-HRS 株より IS コピー数が顕著に多いので、HRS 株ゲノムでは IS による DNA 再編成や IS 転移によるコピー数は増加が起きた可能性が高いと考えられてきた。

本研究では、ダイズ根粒菌 HRS 株と non-HRS 株のゲノム等の解析を通じ、(1) HRS 株ではどの種類の IS コピー数が増加しているか、(2) HRS 株では IS による DNA 再編成が起きているか、(3) HRS 株ではダイズ根粒菌の特徴である共生アイランド構造が維持されているか、という 3 点の疑問を明らかにすることを目的とした。さらに、これらの解析結果より、HRS 株の共生および単生の表現型の一部についてゲノム構造より説明することができるかという点についても考察を行った。

Bradyrhizobium 属ダイズ根粒菌 HRS 株の系統解析

HRS 株の系統を明らかにするため、HRS 株（NK5, NK6, USDA123, 2281, USDA135, T2）の 16S rRNA 遺伝子、ITS 領域、*nifH* 遺伝子配列を決定し、non-HRS 株とともに系統樹を作製した。16S rRNA 及び ITS の系統樹より、NK5 株と NK6 株は Bd クラスター(Bd; *B. diazoefficiens*)

に入り、他の HRS 株は Bj クラスター(Bj; *B. japonicum*)に入った。*nifH* 系統樹では、HRS 株は共生アイランドを保有しているダイズ根粒菌と同一のクラスターを形成した。以上の結果より、HRS 株は、non-HRS 株と系統的に同一であることが明らかとなった。

HRS 株ゲノムのマッピングによる挿入配列コピー数の推定

HRS 株の RSα, RSβ, IS*1631* の IS コピー数増加が報告されているが、共生アイランドに存在するその他の 18 種類の IS については調べられていない。HRS 株ゲノム中の IS による再編成を明らかにするため、6 株の HRS 株（NK5, NK6, USDA123, T2, USDA135, 2281）と USDA110 株を含む 17 株の non-HRS 株の MiSeq より出力されたリードデータを USDA110 株ゲノムにマッピングすることにより、HRS 株と non-HRS 株ゲノム中の IS コピー数を推定した。また、HRS 株に関しては算出された各挿入配列の推定コピー数について、Canoco for Windows 4.5 を使用して主成分分析を実施した。その結果、HRS 株は 20 種類の IS の内、RSα, RSβ, IS*1631* 以外に ISB27, ISBj8 の 5 種類の IS で non-HRS 株より一貫して高いコピー数を示した。また、non-HRS 株には IS*1631* が存在せず、HRS 株のみに存在した。主成分分析の結果から、Sameshima ら実施した ^{32}P ハイブリダイゼーションによる RSα, RSβのコピー数に基づいた結果と同じ、3 グループ(Group A, B, C)に分かれた。グループ A である NK5 と NK6、グループ B1 である USDA135 と 2281、グループ B2 である USDA123 と T2 が近い位置にプロットされたので、これら株のペアは IS のコピー数において類似していることが分かった。以上の結果より、HRS 株はそのゲノム中に多数の IS を保有していること、共生アイランド上に存在している 20 種類の IS の一部（RSα, RSβ, ISB27, ISBj8）及び IS*1631* のコピー数が高いことが分かった。この結果から、HRS 株ゲノムはこれらの IS による再編成を受けている可能性が示唆された。

HRS 株 NK6 のゲノム解析

HRS 株ゲノムにおいて、IS が介在する DNA 再編成がどのような形式で起きているかを明らかにするため、PacBio 社の Single Molecule Real-Time (SMRT) DNA sequencing により NK6 ゲノムを決定し、NK6 株の複製開始点と複製終結点の推定、ゲノミックアイランド(GIs)の同定及び MiGAP と *x*BASE によるアノテーションを行うことでゲノムの基本的特徴の解析を行い、さらに IS 分布の特徴を調べた。

その結果、NK6 株ゲノムは 9.78 Mb の主染色体と 4 つのプラスミド(136-212 kb)から構成されていた。以前解析されたパルスフィールド電気泳動解析の結果もこの NK6 株ゲノムの正当

性を支持した。

NK6 株の *ori* は、NK6 Chromosome (9,780,023bp)に存在し、3765634−3766154 塩基の間に存在すると考えられ、複製終結点は 8.94 Mb 付近に存在すると考えられた。以上の NK6 Chromosome (9,780,023bp)の染色体の複製起点および終結点の位置は、GC skew 解析結果とも良く一致した。また、プラスミド pNK6a-pNK6d に *repABC* オペロンが 1 つあるいは 2 つ存在したため、Alpha-proteobacteria が保有する *repABC* 型プラスミドであり、*ori* は *repC* 上に位置すると推定された。

NK6 Chromosome (9,780,023bp)のみに NK6GI1-NK6GI12 の 12 個の GIs が見いだされた。12 個の GIs はいずれも GC 含量が染色体の平均 GC 含量 63.7%より低い 55.1-61.7%であった。NK6 株の GIs の内、NK6GI9 と NK6GI12 以外の 10 個の GIs は NK6 にユニークであった。一方、NK6GI9, NK6GI12 は USDA110 と同じ tRNA(*trnK1*、*trnI2*)に GI が挿入されており、さらに GIs 配列中に部分的相同性が見られた。したがって、USDA110 株と NK6 株は ITS 系統樹で USDA110 株と近縁であるだけでなく、共通の祖先を持つことが強く示唆された。

NK6 Chromosome (9,780,023bp)には 9814 個の CDS が予測され、pNK6a(212,255 bp)、pNK6b (210,438 bp)、pNK6c (136,288 bp)、pNK6d (136,153 bp)はそれぞれ 218 個、215 個、152 個、149 個の CDS が予測された。

NK6 株ゲノム中における IS 分布を BLASTN により探索を行ったところ、NK6 株ゲノムの持つ IS 総数は 404 個と推定された。各 IS 密度(copy/ Mb)を算出すると、NK6 染色体が 31、NK6 プラスミド pNK6a が 193、pNK6b が 128、pNK6c が 59、pNK6d が 162 となった。non-HRS 株である USDA110 の IS 密度は 7 であり、USDA6 の IS 密度は 11 であったことから、IS 密度は non-HRS 株よりも NK6 ゲノムの方が高く、プラスミドは染色体よりもさらに IS 密度が高かった。また、IS*1631* は染色体ばかりでなく、プラスミドである pNK6a、pNK6d にも存在した。 *B. diazoefficiens* USDA110 と *B. japonicum* USDA6^{T} では IS が共生アイランドに集中的に分布しているのに対して、NK6 株ゲノムでは染色体やプラスミド全体に分散していた。以上の結果より、NK6 株では染色体全体で IS による DNA 再編成が起こっている可能性が示唆された。

HRS 株 NK6 と non-HRS 株の共生アイランド構造比較

HRS 株の DNA 再編成の形式を明らかにするため、まず NK6 株と non-HRS 株 USDA110 とのゲノム全体を対象とした比較を行った。ゲノムマッチャーによるゲノム比較の結果、大部分の領域で共線性(co-linearity)が見られたが、2.2 - 3.0Mb(0.8Mb)領域(V1 領域)、4.3 - 5.9Mb(1.6Mb)

領域(V2 領域)の 2 領域で共線性が観察されなかった。次に共生アイランド構造についての比較を行った。その結果、USDA110 ゲノムではクラスターをなしている共生領域が、NK6 ゲノムでは V1, V2 領域内の 5 か所(S1, S2, S3, S4, S5：S 領域)に分散しており、共生に必要なクラスターである *nif, nod, rhc* 遺伝子クラスター以外は激しくシャッフルされていた。また、約 320kb ほど該当領域が増大していた。この結果から、HRS 株 NK6 では、non-HRS 株のような共線性の高い共生アイランド構造は維持されていないが、non-HRS 株の共生アイランドに対応する可変領域は存在することが明らかとなった。

次に、NK6 の S 領域(S1-S5)と USDA110 の共生アイランド A の 2D プロットで共線性が高く、ダイズ根粒菌の共生窒素固定に関与する *nif, nod, rhc* 遺伝子の配列解析を行った。*nif* クラスター(*nifDKENXS/fixU/nifB/fixAZ/nifHQW*)は NK6 染色体において V1 領域内の S3 領域(*nifDKENXS/fixU*)と S2 領域(*nifB/fixAZ/nifHQW*)とに分断されていた。S2 領域と S3 領域の間には RSαの典型的な標的配列の一つである 5'-CTAG と RSαが存在したため、RSαの介在する DNA 再編成(シャッフル)が示唆された。また、NK6 の *nif* 遺伝子群は分断されているにも関わらず、遺伝子破壊などは起っていなかった。*nod* 遺伝子群は極めて良く保存され、IS は見出されなかった。*rhc* 遺伝子群はその上流と下流で孤立している *rhcV* と *rhcC2* 遺伝子の間に USDA110 では見られない多数の IS が観察された。しかし、*rhc* 遺伝子自体の IS 挿入などの遺伝子破壊は見当たらなかった。これらの結果から、HRS 株 NK6 ゲノムの *nif* 領域と *rhc* 領域で IS の介在する DNA 再編成の痕跡が見いだされた。したがって、NK6 ゲノムのその他の領域においても同様な IS が介在する DNA 再編成が起きていることが考えられた。

NK6 ゲノムにおける RSα配列の解析

IS による DNA 再編成が染色体全体でどのように起きているか調べることを通じ、HRS 株の表現型の理由を推測するため、NK6 株で最もコピー数が高かった IS である RSαに着目し、詳細な解析を行った。その結果、RSαは染色体全体に分散しており、コア領域に 75 コピー(NK6α1-33,49-62,87-114)、V 領域内に 39 コピー(NK6α34-48、NK6α63-86)推定された。推定コピー数でみるとコア領域の方に RSαが多く分布しているが、密度比を取るとコア領域には V 領域の 6 割ほどの RSαコピー数しかないことが分かった。また、114 個の内 108 コピーが構造上保存されていたので転移の可能性があることが分かった。

NK6 染色体上の 14 箇所で RSαが遺伝子破壊を起こしていた。破壊を起こしていた箇所は V 領域内で 7 か所、コア領域で 7 か所であった。V 領域内の 7 か所では、USDA110 株ゲノムを

基準として近接していない配列が結びつけられる(シャッフル)DNA 再編成の痕跡が見られたが、コア領域内の 7 か所では単純な RSα挿入による遺伝子破壊が観察された。RSαによる破壊遺伝子は Glutathione S-transferase や Adenylate cyclase などの生存に重要な遺伝子が含まれていた。以上の結果より、V 領域内では RSαの介在するシャッフルによる再編成が起き、一方、コア領域では RSαの単純な挿入により、再編成は抑えられていることが示唆された。

RSα挿入による破壊遺伝子の一部には解毒作用や環境シグナルの伝達など生存に重要な遺伝子が含まれており、これらの遺伝子破壊に伴って、培地上での生育が低下した可能性も考えられた。

HRS 株ゲノム安定性

IS の多い HRS 株ゲノムの安定性を検討するために、NK6 株を 15 回 HM 培地で植え継ぎ後、シングルコロニー由来の DNA を調製し、IS コピー数の推定と NK6 染色体へのマッピング解析を行った。その結果、21 種類の IS 推定コピー個数、推定コピー割合、マッピングプロファイル、非マップリード割合は植え継ぎ前後で変化しなかった。したがって、通常の単生状態の培養では NK6 株のゲノムに大きな変化は観察されず、IS が介在する DNA 再編成は活発には起きていないということが示唆された。

結論

本研究において、(1) 6 株の HRS 株では RSα, RSβ以外に、IS*1631*, ISB27, ISBj8 という特定の IS が顕著に増加すること、(2) HRS 株 NK6 では少なくとも RSαによる DNA 再編成が起っていた痕跡が観察されたこと、(3)HRS 株 NK6 ゲノムには non-HRS 株 USDA110 の共生アイランド構造よりも大きな、かつ、シャッフルされた共生アイランド該当領域が存在していたことが明らかとなった。さらに、 IS 挿入による破壊遺伝子には生存に重要な遺伝子が含まれていたので、これらが HRS 株の ESG 表現型を起こしている可能性があった。

これらの結果から HRS 株化の過程を考察する。*Bradyrhizobium* 属細菌が共生アイランドを水平伝播で獲得し、ダイズに共生窒素固定ができるダイズ根粒菌になるが、その際に獲得した多数の IS をも共生アイランドに保有することとなる。non-HRS 株ではこれらの IS は原則共生アイランド内に閉じ込められているが、何らかの環境要因および遺伝的な要因(pNK6a や pNK6d といった IS*1631* を含むプラスミドなど)によって HRS 株化が起り、IS が介在する DNA 再編成により共生アイランドが NK6 株のように崩れ、一部の IS は共生アイランド外のコア領域にも

転移し、一部の生育に必須な遺伝子の破壊も起こし、生育が極端に遅い ESG(Extra Slow Grower)表現型を誘導すると考えられる。