

シンポジウム

ゲノム情報に基づいた植物共生細菌の環境応答と
物質循環機能の解明

南澤 究・増田幸子・板倉 学・池田成志

東北大学大学院生命科学研究科, 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

Environmental adaptation of plant-associated bacteria based
on their genomic information

Kiwamu Minamisawa, Sachiko Masuda, Manabu Itakura and Seishi Ikeda

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

Key words : *Bradyrhizobium japonicum*, rhizobia, endophytes, genomics, plant-associated microbes

1. はじめに

土壤微生物研究の一つの目標は、植物生産力・環境保全への土壌の持続的機能を生物的側面から解明することである。近年種々の植物共生細菌のゲノム解析が進められ、これらの全ゲノム情報やツールを利用して、共生メカニズムや環境中における振る舞いについて種々の解析が行われている。筆者らも、ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) を中心的な材料として土壌細菌として共生細菌としての側面をゲノム情報とアレイなどのツールを利用して解明する試みを行ってきた^{1,2)}。

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株のゲノム塩基配列 (9.1 Mb)³⁾ から読み取れる特徴は、極めて多数の炭素源代謝系、呼吸系 (酸素呼吸, 硝酸呼吸), エネルギー獲得系 (水素酸化, イオウ酸化系), 分解系, トランスポーター系, 転写制御因子を保有しており⁴⁾, これらの遺伝子レパートリーは *alpha-Proteobacteria* に属する *Bradyrhizobiaceae* 科の細菌に共有されている場合が多い。また、ダイズ根粒菌も含む *Bradyrhizobium* 属細菌は低栄養環境に適応していることが知られており、共生窒素固定だけでなく、光合成, 農薬分解, 硝化など多彩な生化学的な性質を持った細菌から構成されている (図1)⁵⁾。

2. チオ硫酸によるダイズ根粒菌の化学独立栄養

ダイズ根粒菌 USDA110 株のゲノムを観察していたところ、チオ硫酸酸化遺伝子ホモログ (*sox* gene) がゲノムの4カ所に散在していた (図2)。最も大きな *sox* 遺伝子クラスター I (*sox* gene cluster I) は、*sox* 遺伝子が良く研究されている *Paracoccus pantotrophus*⁶⁾ に近縁な *alpha-Proteobacteria* 型の遺伝子クラスターであった。一方、*sox* gene cluster II は緑色硫黄細菌の *sox* 遺伝子と近縁であった

(図2)。ダイズ根粒菌の遺伝子破壊株および遺伝子相補株の増殖実験から *alpha-Proteobacteria* 型の *sox* gene cluster I がチオ硫酸酸化を担っており、低濃度のチオ硫酸存在下 (4 mM 以下) で化学独立栄養モードの生育を担っていることが分かった。さらに、野生株ではチオ硫酸依存的な酸素呼吸活性が認められたが、*sox* 遺伝子破壊株では消失したので、*sox* gene cluster I によるチオ硫酸酸化はエネルギー生成と共役していると推定された。また、*Bradyrhizobiaceae* 科の細菌においてゲノム情報やサザンハイブリッドで *sox* gene cluster I を保有している細菌は、プレートアッセイでもチオ硫酸酸化能を示した。したがって、*sox* gene cluster I によるチオ硫酸酸化系は少なくとも *Bradyrhizobiaceae* 科内のメンバーに広く分布していることが明らかとなった。

3. ダイズ根粒菌の芳香族化合物資化と C1 代謝

集積培養により得られた芳香族化合物分解菌は高濃度の基質を分解できる。しかし、落葉落枝により芳香族化合物が最も豊富であると考えられる森林土壌でも vanillate, 4-hydroxybenzoate, protocatechuate は数 mM 以下の濃度である (表1)⁷⁾。ダイズ根粒菌は、これらの芳香族化合物を低濃度 (1 mM 程度) で唯一炭素源として資化できるが高濃度になると利用できなくなる (表1)⁸⁾。他の細菌で既知の芳香族化合物の遺伝子をダイズ根粒菌のゲノム情報から抽出し、これらの芳香族化合物の好氣的分解系を予測したところ、一つの反応過程に複数の遺伝子ホモログが予測された。次に、これらの各々の芳香族化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として培養したダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株の網羅的な発現解析を行った。その結果、好氣的分解系の中心経路 (beta-Ketoadipate pathway) の鍵化合物 protocatechuate を分水嶺として、その上流では多重遺伝子の一つの分解遺伝子の誘導がかかり、下流の beta-ketoadipate pathway をコードしている遺伝子は弱いレベルで構成的に発現していることが

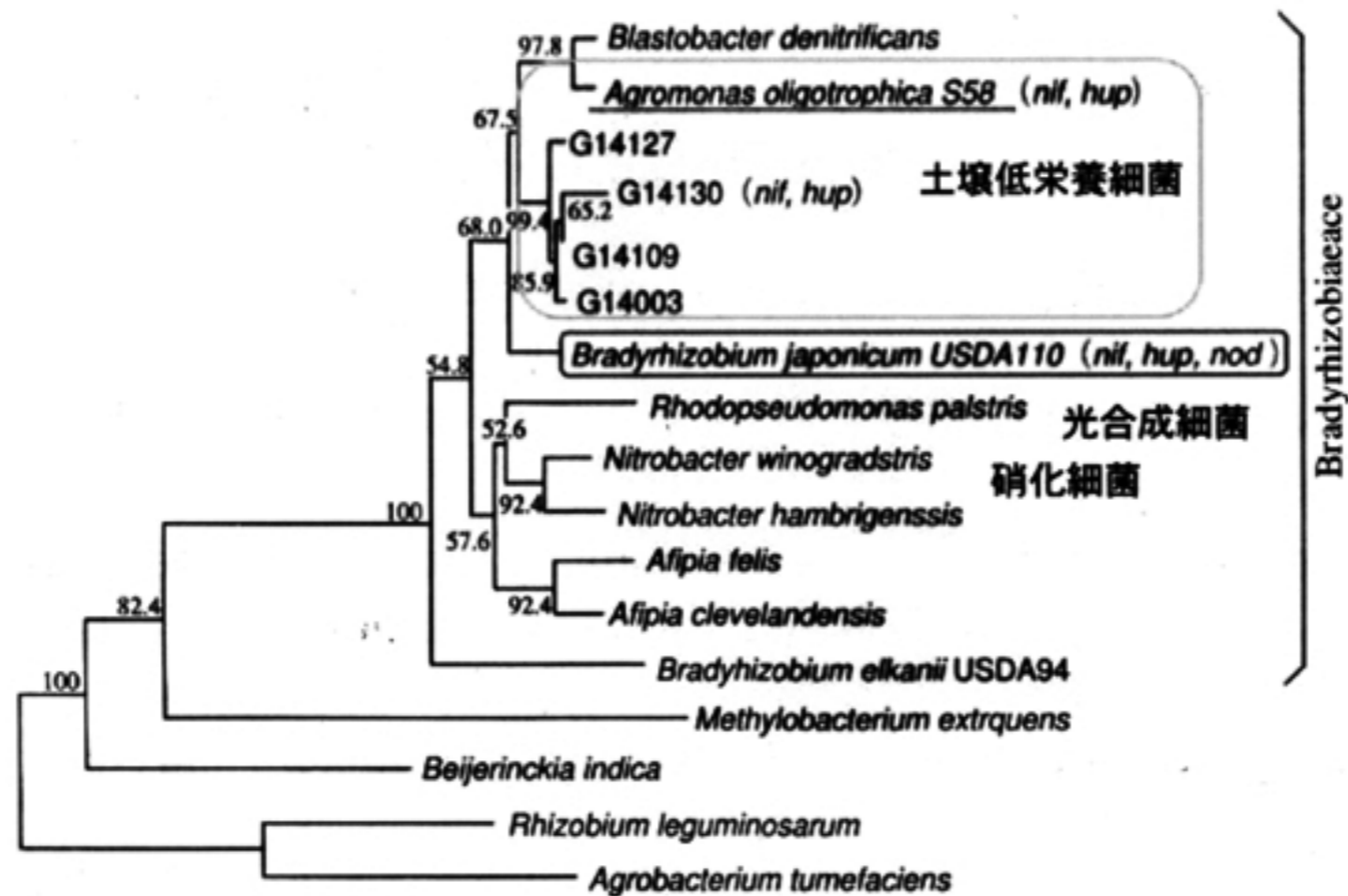


図1 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいたダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) と近縁細菌の分子系統樹

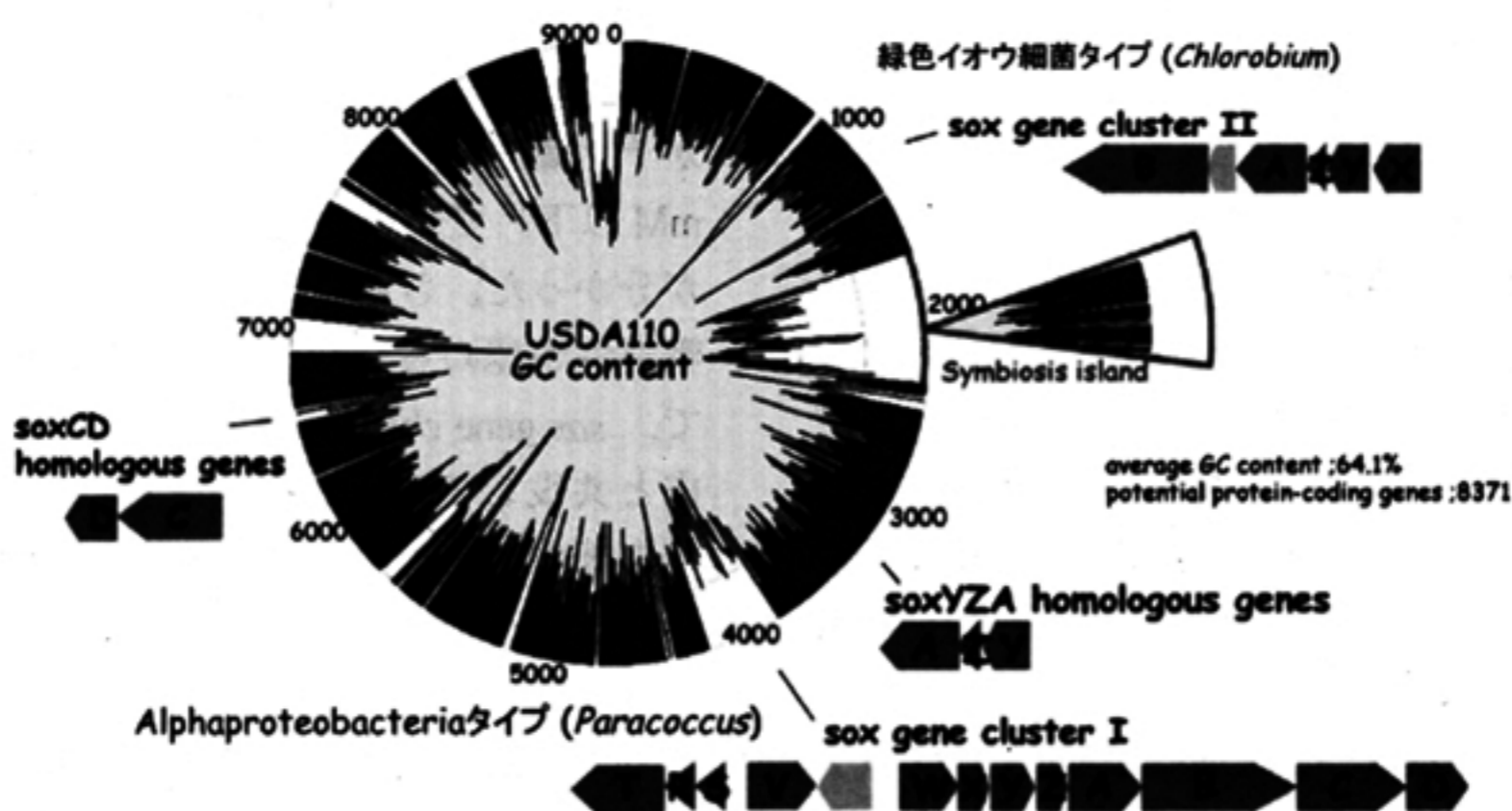


図2 ダイズ根粒菌 USDA110 株ゲノム上の sox 相同遺伝子群
真ん中の円はゲノム G + C 含量を、その外側はゲノム比較から推定したダイズ根粒菌のコア領域を示す。

明らかとなった⁸⁾。

上流の高発現している遺伝子の *vanA1B*, *pcaG1H1* 遺伝子の遺伝子破壊株は分解能が消失したので、発現上昇しているこれらの遺伝子のみが分解を担っていた。メトキシ基のある芳香族化合物 *vanilate*, *vanilline* では、異化的 C1 代謝系の遺伝子 *mxoF*, *gfa*, *flhA*, *fdhF* が発現上昇することが見出され、遺伝子破壊株の増殖実験により、当該異化的 C1 代謝系遺伝子がこれらの芳香族化合物の分解活性を高めていることが分かった。また、*mxoF* 遺伝子は *methanol dehydrogenase* をコードしている可能性があり、USDA110 株および *mxoF* 株の休止細胞実験により、USDA110 は *methanol* を *mxoF* 遺伝子で酸化していることが示唆された。近年、環境科学の面でも、植物微生物相互作用面でも C1 代謝系が注目されており、ダイズ根粒菌に活性のある C1 代謝系があることは興味深い。

以上の結果は、ゲノム情報から推定された芳香族分解系、メタノールおよびチオ硫酸酸化の遺伝子の機能を実証したにとどまらず、低濃度の場合のみ電子供与体として機能す

表1 土壤中の芳香族化合物濃度とダイズ根粒菌の生育

	Vanillate リグニン モノマー	Protocatechuate	4-Hydroxybenzoate
森林土壌溶液 の濃度*	0.1~0.4 mM	0.1~0.5 mM	1.5~2.7 mM
ダイズ根粒菌 の生育**	0.1 mM + 1 mM ++ 10 mM -	+ ++ -	- + +

*Nardi et al. 2003, 文献7: **最小培地における生育 a

るという特徴が見られた。このように、ダイズ根粒菌は低濃度基質を前提とした複数の増殖モードが、低栄養環境細菌としての振る舞いを示したものであると考えられた。

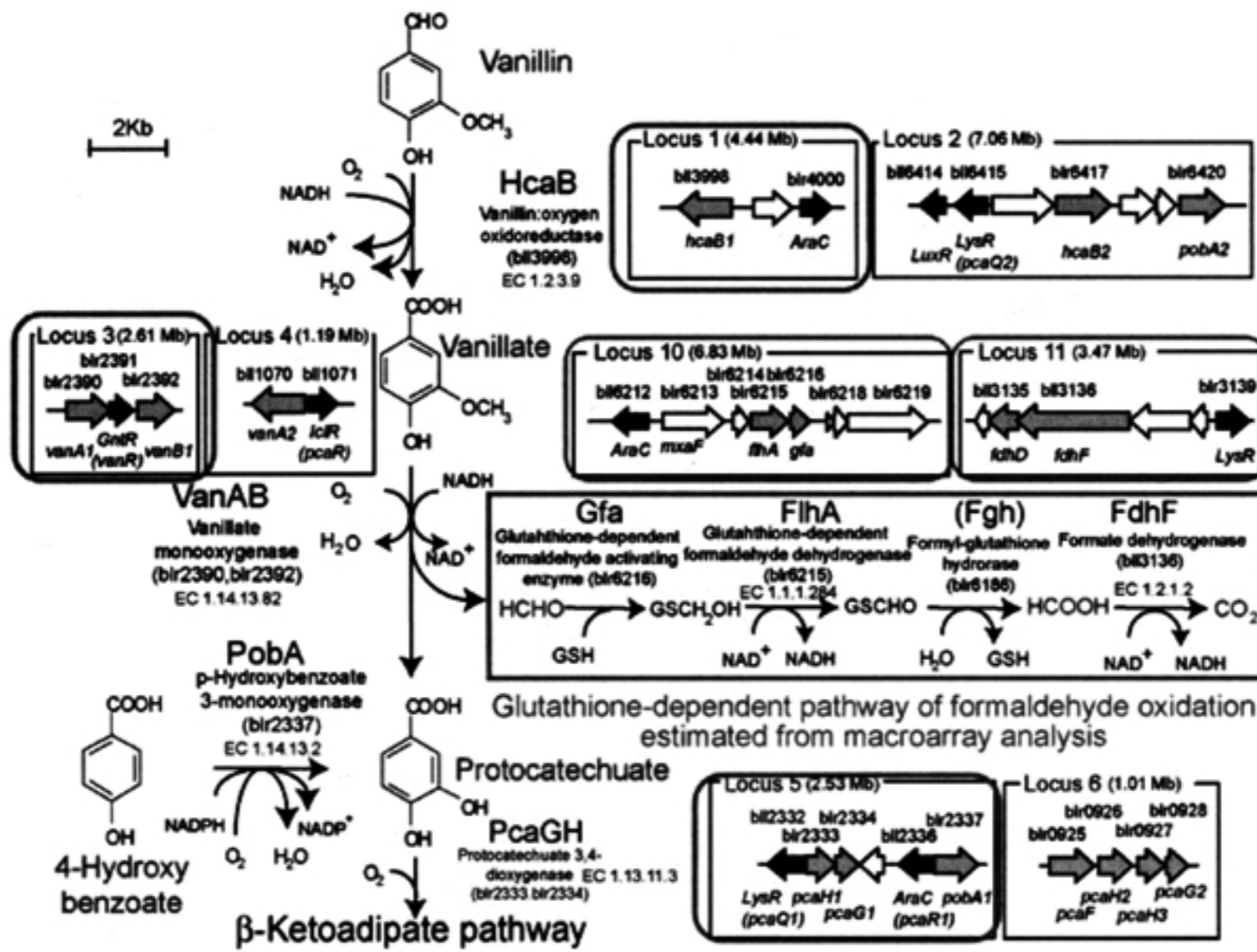


図3 ダイズ根粒菌のゲノムから推定された芳香族化合物分解系

4. 根粒菌の菌株比較と共生窒素固定能

現在では700種以上の微生物ゲノムが明らかにされつつあるが、ゲノムの構造は極めてダイナミックであることが分かってきた。例えば、全ゲノム塩基配列が決まったダイズ根粒菌、光合成基粒菌などの *Bradyrhizobium* 属細菌を比較するとそのことが良くわかる⁹⁾。私どもは *Bradyrhizobiaceae* 科内のメンバーに対して、ダイズ根粒菌のアレイによりゲ

ノム比較を行ってきたが、16S rRNA 遺伝子の系統樹では全く区別されないくらいに「近縁」な株のゲノム構造がダイナミックに異なっていた¹⁰⁾。逆に16S rRNA 遺伝子の系統樹で識別される株のアレイゲノム比較では、比較実験そのものが成立しにくい、という意外な結果となった。一方、広範囲の細菌ゲノム情報から分子進化や分類の緻密化の研究も進められており¹¹⁾、「近縁」と「遠縁」を融合させた土壌微生物ゲノムの見方なども必要かもしれない。

根粒菌の共生窒素固定効率については菌株により異なるにも関わらず、その原因の候補としてはニトロゲナーゼから発生する分子状水素を酸化する吸収型ヒドロゲナーゼ、リンゴ酸トランスポーターなど少数の因子が知られているにすぎない。筆者らは、共生窒素固定能が異なる9株のゲノム領域をマクロアレイで比較し、その共生窒素固定パラメーターと当該ゲノム領域の有無の相関解析をマクロアレイにスポットしてあるすべての領域で行った¹⁰⁾ (図5)。線形モデルを用いた重回帰分析により、ダイズ根粒菌ゲノム上の10個の Genomic island を含む領域が共生窒素固定効率を上昇させているという結果となった。このようなアプローチは、病原性

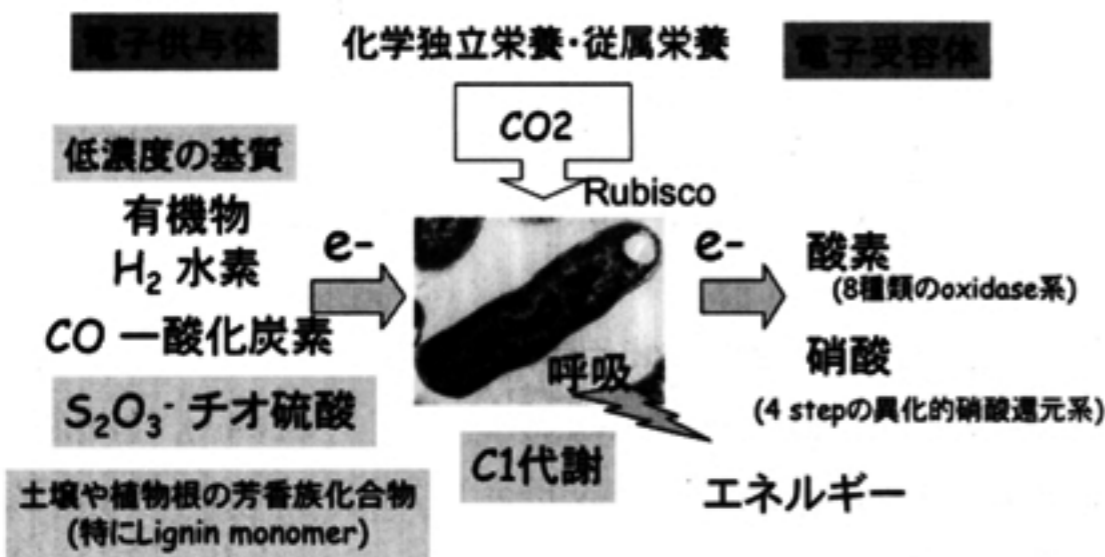


図4 ダイズ根粒菌のエネルギー代謝

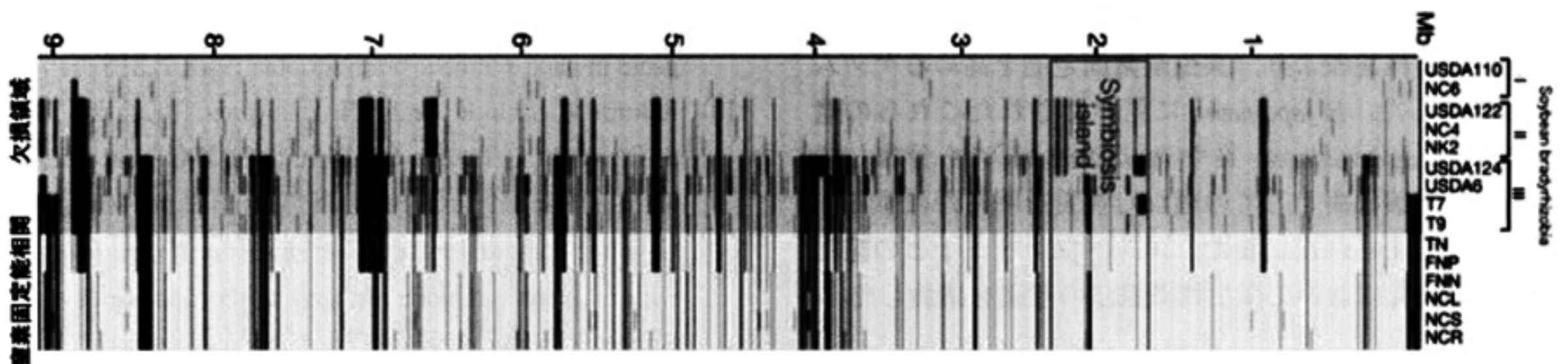


図5 種々のダイズ根粒菌株のゲノム比較と共生窒素固定相関解析
上部がダイズ根粒菌株のゲノム比較を、下部は共生窒素固定パラメーターとゲノム領域の有無の相関解析である。線が引かれているゲノム領域が欠損(上部)と正の相関(下部)を示す。

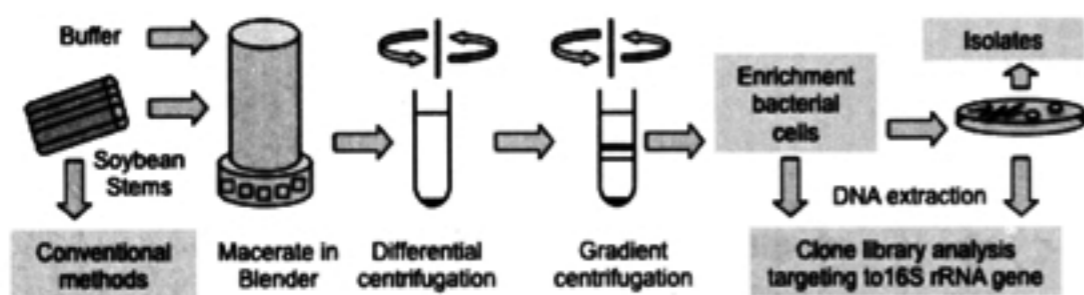


図6 植物体からの濃縮細菌細胞の調製とその多様性解析

大腸菌 O157 の劇毒化領域の探索に利用されているが、共生微生物ではまだ行われていない。特定されたゲノム領域内の遺伝子の大部分は機能未知ではあるが、精度を高め、共生で高発現している遺伝子を絞り込むなどの方法で、今後ダイズ栽培品種に適応し共生窒素固定を上昇させている遺伝子や仕組みの解明につなげたいと考えている。

5. エンドファイトなどの植物関連細菌の多様性

根粒菌だけでなく、エンドファイト（植物内生細菌）、エピファイト、根圏細菌などの植物と緩い「共生」関係を結んでいる微生物も、植物やそれを通じた環境因子に対する応答や農耕地生態系の物質循環において重要な役割を果たしている。これらの植物関連細菌の微生物群集構造解析やメタゲノム解析のためには、植物体からこれらの微生物をどのように取り出し、濃縮（Enrichment）するかという上流技術が重要である。筆者らは、ダイズの茎の細菌細胞を分別遠心や密度勾配遠心で濃縮する方法を検討してきた（図6）。濃縮細菌細胞画分は、非培養法および培養法の両方において細菌の OTU（Operational Taxonomic Unit）の多様性が従来法より高くなる傾向が観察されている。最近では優れた DNA 抽出キットの普及や特異的な PCR primer の開発などで、環境から微生物をきたまま分別、濃縮することが一見軽視されている感があるが、今後土壌微生物等でも微生物多様性を解明し議論するのならば、再度そのような上流部分の実験手法の検討も重要となるであろう。

要 旨

ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 株のゲノム情報から推定されたチオ硫酸酸化、芳香族分解系の遺伝子の新規機能を明らかにした。いずれの場合も低濃度の基質が電子供与体となり、重複遺伝子群の一部が機能していた。これらの結果は、ダイズ根粒菌の低栄養環境細菌としての振る舞いを示したものであると考えられた。ダイズ根粒菌の菌株比較より、共生窒素固定能を高めるゲノム領域を同定した。*B. japonicum* に見いだされたこれらの遺伝子群は *Bradyrhizobiaceae* 科や *Proteobacteria* にも分布しているため、土壌細菌としての隠れた性質を明らかにする一助になると考えられた。また、エンドファイトなどの植物関連細菌の研究において微生物濃縮法の意義を議論した。

謝 辞

ダイズ根粒菌の研究は科学研究費（ゲノム特定比較ゲノム、基盤 B : No. 17380046）で、植物関連細菌の多様性解

析は振興調整費（ゲノム情報に基づいたダイズ共生微生物の多様性と共生機構の解析）の補助のもとで実施された。

引用文献

- 1) 南澤 究 (2000) 土壌細菌の遺伝生態の現状—ダイズ根粒菌の実例もまじえて—, 土と微生物, 54, 121-127
- 2) 南澤 究 (2004) 土壌微生物のモデルとしての根粒菌ポストゲノムの可能性, 土と微生物, 58, 69-77
- 3) Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M and Tabata S (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.*, 9, 189-197
- 4) Gottfert M, Hennecke H and Tabata S (2005) Facets of the *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. In *Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms*, Ed. R. Palacios and W. E. Newton, p. 99-111, Springer, Dordrecht, The Netherlands
- 5) Minamisawa K and Mitsui H (2000) Genetic ecology of soybean bradyrhizobia. In *Soil Biochemistry* (Vol. 10), Ed. J-M. Bollag and G. Stotzky, p. 349-377, Marcel Dekker, New York
- 6) Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A and Fischer J (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 253-259
- 7) Nardi S, Pizzeghello D, Bragazza L and Gerdol R (2003) Low-molecular-weight organic acids and hormone-like activity of dissolved organic matter in two forest soils in N Italy. *J. Chem. Ecol.* 29, 1549-1563
- 8) Ito N, Itakura M, Eda S, Saeki K, Oomori H, Yokoyama T, Kaneko T, Tabata S, Ohwada T, Tajima S, Uchiumi T, Masai E, Tsuda M, Mitsui H and Minamisawa K (2006) Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. *Microbes. Environ.*, 21, 240-250
- 9) Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C and Sadowsky M (2007) Legumes symbioses: Absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316, 1307-1312
- 10) Itakura M, Saeki K, Omori H, Yokoyama T, Kaneko T, Tabata S, Ohwada T, Tajima S, Uchiumi T, Honnma K, Iwata H, Saeki Y, Hara Y, Ikeda S, Eda S, Mitsui H and Minamisawa K Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other *Bradyrhizobiaceae* members. *The ISME J.* (in press)
- 11) Gupta SR and Mok A (2007) Phylogenomics and signature proteins for the alpha proteobacteria and its main groups. *BMC Microbiol.*, 7, 106