

土壤微生物のモデルとしての根粒菌ポストゲノム研究の可能性

南澤 究

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

Progresses and Perspectives of post-genome researches of rhizobia as a model of soil
microorganisms

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

Key Words: Soil microbes, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, Post-genomic analysis, Starvation

1. はじめに

17世紀の微生物自体の発見から、土壤微生物学や土壤病害の研究は、コッホの原則、純粋培養・集積培養技術、化学独立栄養細菌、物質循環を巡る土壤ポピュレーション、土壤固有型細菌、土壤バイオマス、培養困難な土壤微生物の存在など数々の発見や原理・概念を積み上げてきたといえる¹⁾。1990年代頃から分子生物学の手法により培養困難な土壤微生物の検出や群集構造の解析技術が進んできたが、肉眼で見えない微生物の在り方や機能の研究はやはり難しい。筆者は窒素固定共生細菌である根粒菌の遺伝生態研究を進めながら、土壤細菌としての根粒菌の遺伝的多様性や風土性に関心をもって、土壤細菌としての栄養飢餓、増殖、挿入配列によるゲノム再編成、遺伝子水平伝達などについて研究および議論を試みてきた²⁻⁴⁾。

近年多数の微生物のゲノム解析が進んでいるが、2000年にミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099株、2002年にダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110株の全ゲノム塩基配列が日本のカズサDNA研究所で解読された^{5,6)}。とうとう根粒菌のゲノムや全ての遺伝子の絵本を、塩基配列情報や具体的なクローンとして手にした分けである。根粒菌は宿主マメ科植物に細胞内共生し、共生窒素固定という生物学的にも農業的にも重要な形質を示すので、第一の解析目標は共生窒素固定のメカニズムの理解である。しかし、同時に、これらの根粒菌は α -Proteobacteriaに属するグラム陰性の土壤細菌であり、全ゲノム塩基配列が解読された数少ない土壤細菌でもある。そこで、筆者らは日本に根粒菌関連研究者で協力態勢（研究コンソーシアム）をつくり、根粒菌ゲノム情報やそのゲノムプロジェクトで作出された研究資源を利用して、共生機構の解明や土壤細菌としての研究にどのように生かすことができるか取組んできた。本稿では、まず根粒菌の生態やゲノムの特徴を簡単に紹介した後に、根粒菌のポストゲノム研究のアプローチで何が分かりつつあるかという点についてその概略を説明したい。

2. 共生と単生のライフサイクルを持つ根粒菌

マメ科植物が土壤を肥沃にする不思議な力のあることはローマ時代から認識されていた。

その原因が根粒菌による共生窒素固定であることが、1888年の Beijerinck による根粒菌の単離と、1892年の Hellriegel による接種実験により約 110 年前に明らかにされた¹⁾。その後、土壌や根粒菌の純粋培養菌体の接種が行われ、根粒菌は農業用の微生物接種資材として最も長い歴史がある。根粒菌の宿主特異性（宿主マメ科植物との共生可能な関係）は以外と狭い。例えば、ダイズ根粒菌はダイズに、アルファルファ根粒菌はアルファルファになどという特異性が認められ、従来は交接種群とも言われていた。根粒菌は、従来マメ科植物との共生窒素固定能により定義・分類されてきたが、近年共生窒素固定能を持たない近縁細菌も含めた根粒菌の系統分類が進み、その分類は大変流動的な状況になっている^{5,6)}。

マメ科作物を栽培すると、土壌中には対応する根粒菌が土壌細菌として住みつき、次回の栽培時に根粒を着生させる場合が多い。したがって、根粒菌は、宿主植物内における共生生活と、土壌中における単生生活のライフサイクルを持つ細菌であると言える。図 1 AB は、単生のミヤコグサ根粒菌と根粒内の細胞内共生を行っているミヤコグサ根粒菌の写真であるが、ミヤコグサ根粒菌の場合、単生でも共生でも 2-3 μm の長さの桿菌である。しかし共生状態では、植物由来の膜（ペリバクテロイドメンブレン）に包まれ、ミトコンドリアやクロロプラストのような細胞内器官のような状態になるのでシンビオソームとも呼ばれている。

宿主植物の影響がない土壌環境では栄養が不足していると考えられる。実際ミヤコグサ根粒菌の栄養培地における増殖中の細胞は図 1C のような桿菌であるが、炭素源を抜くと細胞形態が小型化し（図 1D, E）、耐久型と考えられる細胞に変化する。根粒菌はこのように、宿主植物内における共生生活と、土壌中における単生生活を通じて、外部環境の変化に応じてその生活スタイルを激しく変化させていると言える。

2. 根粒菌ゲノム構造の特徴

次に、根粒菌ゲノムについて簡単に説明したい。根粒菌のゲノムサイズは、6-9 Mb と細菌ゲノムとしては比較的大きく、大腸菌ゲノムの約 2 倍のサイズである（図 2）。特に、ダイズ根粒菌の 9.1 Mb の染色体は、現在のところ細菌ゲノムで最も大きい。また、共生窒素固定に必須の遺伝子が集中している共生領域が、染色体上の共生アイランドか、共生プラスミドかによって二つのタイプに分かれる。日本のカズサ DNA 研究所で全ゲノム塩基配列が解読されたミヤコグサ根粒菌とダイズ根粒菌はいずれも共生アイランドタイプである⁷⁻⁹⁾。一方欧米で盛んに研究されてきたアルファルファ根粒菌(*Sinorhizobium meliloti*)では共生窒素固定遺伝子の大部分は巨大な共生プラスミド上に存在している¹⁰⁾。根粒菌のゲノム上には 6,200 個から 8,400 個という多数の遺伝子が予測されている⁷⁻¹⁰⁾。特に、外界からの物質の取込みに関わるとされる ABC トランスポーターが予測遺伝子の約 1 割に達するほど多いという特徴がある⁷⁻¹⁰⁾。

共生アイランド(Symbiosis island)というのは、t-RNA 遺伝子に GC 含量の低い共生窒素固定の遺伝子群が挿入された構造をしており、病原菌の病原アイランドと構造的に似ている。しかし、ミヤコグサ根粒菌では 611 kb⁷⁾、ダイズ根粒菌の共生アイランドでは 670 kb⁸⁾ というように、共生アイランドは病原アイランドよりかなりサイズが大きい。非共生の祖先タイプの根粒菌に外来性の共生アイランドが飛び込んで根粒菌になったと考えられる。実際、ニュージーランドの Sullivan と Ronson¹¹⁾は、圃場でも、実験室でも根粒菌の共生アイランドの転移によって非共生の土壌細菌からミヤコグサ根粒菌が生成することを観察している。

3. マクロアレイによるミヤコグサ根粒菌の網羅的な発現解析

根粒菌の全遺伝子セットが予測されたら、当然それらの遺伝子発現が環境条件でどのように変化するのか調べたい。そこでまず、根粒菌の共生・微好気・飢餓条件下において、どのような遺伝子や領域がどのように発現するか調べた。ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株のマクロアレイをカズサ DNA 研究所のゲノムプロジェクトで作製された M13 クローンを用いて、約 3,700 の PCR 増幅 DNA 断片で作製した。次に RNA の抽出条件を検討し、種々の条件の MAFF303099 株細胞から Total RNA を抽出し、³³P 標識 cDNA を調製しハイブリダイゼーションを行い、発現プロファイルを描いた (図 3)^{12, 13)}。ミヤコグサ根粒菌の共生遺伝子群は水平伝達で獲得された共生アイランドと呼ばれる 611 kb の領域に存在しているが、面白いことに、巨大な共生アイランド全体が共生状態の根粒菌 (バクテロイド) で強く発現していた。細菌染色体でこれほど巨大な領域が塊となって発現している報告例はなく、あたかも真核生物の染色体が部分的にほどけて特定の領域が集中的に発現するクロマチンリモデリングを想像させる¹²⁾。微好気条件および共生条件では *fixNOPQ* 遺伝子を含む低酸素分圧のもとでの呼吸系が高く発現していた (図 2 矢印)。これは根粒内が窒素固定のために微好気条件に保たれていることと符合している¹²⁾。

アレイ解析から発現上昇していることが示唆された遺伝子の一部を定量 RT-PCR 解析により個別にその mRNA 量の変化を調べたところ、アレイの結果とほぼ一致していることが分かった¹²⁾。共生では、*nif* 遺伝子や *fix* 遺伝子などの共生特異的に発現上昇が期待できる遺伝子以外に、特に共生との関係が今のところ明確でない遺伝子の発現上昇も見られた。それら遺伝子の機能を知る最適な方法は遺伝子破壊株と親株の共生の性質の比較をすることである。試しに、発現上昇していた ACC deaminase 遺伝子の破壊株を作製したところ、当該遺伝子が根粒形成を促進していることが分かった¹²⁾。実は、ACC deaminase は根圏細菌で植物の根の生育促進を起こす因子として見いだされ、*Bradyrhizobium elknaii* のリゾビトキシンと同様に宿主植物のエチレン生合成系を阻害し、共生成立を促進する因子であると考えられた^{12, 14)}。この結果は共生で発現上昇しているその他の遺伝子についても同様なアプローチで、新規共生遺伝子を見つけることも可能であることを意味する。

4. 根粒菌の飢餓応答と増殖能力の維持

土壌などの自然環境の細菌は、一般に栄養飢餓条件に曝されており、高栄養培地で得られている現在の微生物学の知識のみでは理解できない。例えば、環境中のわずか 1% 程度の細菌のみが培養可能な研究対象とされており、残りの細菌は培養困難で、Viable but non-culturable (VBNC) 状態にあるとされてきた。根粒菌は培養可能な細菌であるが、全ゲノム塩基配列が解読された数少ない土壌細菌である。ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) MAFF303099 株を対象とし、マンニトールを唯一の炭素源とする最小培地で培養し、炭素源を除く飢餓 (Carbon source starvation) 処理後 20 分間で、上述のマクロアレイ解析で発現上昇している 56 の遺伝子候補が上がってきた。その一部について、定量 RT-PCR をを行い、一過的に転写レベルが上昇する遺伝子として脂質代謝・転写因子・膜組成などに関与する遺伝子が複数見いだされた。これらのデータから推定されるミヤコグサ根粒菌の炭素源飢餓応答について 細胞の小型化 (図 1) も含めて図 4 にまとめた。

予備的な実験の段階であるが、これらの一過的に転写レベルが上昇する遺伝子の破壊株は、野生株と比較して飢餓処理後のコロニー形成能が低下する傾向が見られている。特に、細胞膜構造の安定化に関与するとされているカルジオリピン合成遺伝子の破壊株では、飢

餓処理による生残性低下が顕著であった。この結果は、これらの遺伝子の転写レベルが上昇する遺伝子が最終的に細胞の栄養枯渇耐性を与えていることを示唆している。

根粒菌は宿主植物の分泌するフラボノイドに応答して根粒形成(*nod*)遺伝子が誘導されることは既に教科書的な知見とされているが^{3,9)}、誘導実験を実際行ってみると *nod* 遺伝子誘導がかかる根粒菌の生理条件は意外と限られている。これは、高栄養培地を実験的に使用していることと関係している可能性がある(横山私信)。根粒菌の飢餓応答の解析は、根粒菌や土壌細菌の根圏における振るまいを知るためにも役立つかもしれない。

5. アレイによる *Bradyrhizobium* 属細菌の菌株ゲノム比較

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株のゲノムは、9.1 Mb という巨大な環状染色体のみからなるが、ミヤコグサ根粒菌と同様に、tRNA 遺伝子に挿入された共生アイランド構造がみられる^{8,9)}。詳しくみると、共生アイランドと類似の構造が 14 個あることが分かり、trn element と名付けられている⁸⁾。

アレイは発現解析ばかりでなく、類縁細菌株のゲノム比較にも利用可能である。そこで、研究の蓄積がある種々のダイズ根粒菌株から調製した Total DNA を *B. japonicum* USDA110 株のマクロアレイにハイブリダイゼーションを行い、ゲノム構造の比較を行った。

B. japonicum T7 (十勝分離株) と *B. japonicum* USDA110 株 (アレイ作製株) の比較の結果を図 5 に示す。T7 株では USDA110 株に対応する DNA 領域がない部分が多数観察された。特に、ダイズ根粒菌 USDA110 株のゲノム解析で、共生アイランドと同様な tRNA 遺伝子に外来遺伝子が挿入されていると推定された 14 個の trn element の全てが T7 株で欠損しているように見える結果が得られた(図 5)。USDA110 株の 7 Mb 付近の trn 2, 3, 4 element は同じ trnK-CUU 遺伝子に 3 回独立して異なる外来遺伝子が挿入されている⁸⁾(図 5)ので、少なくとも USDA110 株では特定の tRNA 遺伝子が外来遺伝子獲得のホットスポットになっていると推定される。したがって、T7 株でも USDA110 株とは別の外来遺伝子を含む trn element が挿入されているが、USDA110 株で作製したアレイハイブリでは見えてこない可能性も考えられる。

今のところ trn element の起源や転移メカニズムは不明である。しかし、trn element が菌株の多様化や進化の過程で頻りに挿入および交換している重要な遺伝因子であることを示している。腸内細菌ではファージが外来遺伝子の運び役となっているが、根粒菌では trn element という訳である。共生アイランドも含んだこれらの trn element は微生物遺伝学的には接合トランスポソンの仲間と見られているが、trn element 内には今のところ転移に関わるインテグラーゼやトランスポゼースはほとんど見つからない。

さらに多数のダイズ根粒菌株を比較することにより、trn element の見かけ上の欠損プロファイルでみたゲノム骨格は 16S rRNA 遺伝子などの系統関係を反映していることが分かった。また、挿入配列 IS が集積している HRS 株^{3,4)}は、ゲノム骨格部分は余り変化がないが、共生アイランド領域で激しい変化が生じていた。バクテロイドでは共生アイランド全体が高発現している(図 3)ことを考慮すると、前者の変化は土壌中で、後者の変化は宿主植物内で起こっているのではないかと推定される。

さらに詳細に解析することにより、土壌細菌として共生細菌としてダイズ根粒菌のゲノムがどのように多様化および進化しているのか知ることができないかと期待している。また、土壌、超純粋などの貧栄養環境中には *Bradyrhizobium* 属に近縁な非共生細菌(non-nodulating rhizobia)が多数生息しており、これらの非共生細菌とのゲノム比較から、*Bradyrhizobium* 属のゲノム進化の足跡が観察できるのではないかと期待している。

6. 根粒菌の整列化コスミッドライブラリーによる機能遺伝子の探索

カズサ DNA 研究所の根粒菌ゲノムプロジェクトでは、グラム陰性細菌で複製可能な広宿主域プラスミド pKS800(RK2 derivative)を一つのライブラリーとして使用している^{7,15)}。これは、ゲノムプロジェクト終了と同時に整列化コスミッドライブラリーによる根粒菌ゲノムの機能解析ができることを意味している¹⁵⁾。

我々はダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株ゲノムの 99.7%をカバーする整列化コスミッドライブラリー（約 527 クローン）を作製し、全てのライブラリー別の根粒菌株へ個別に導入し、表現型の変化を調べている。初歩的な段階であるが、(1)*Rj2* と呼ばれるダイズの宿主遺伝型根粒形成抑制遺伝子が引き起こす根粒菌の共生窒素固定の不和合性を克服する根粒菌側の原因遺伝子、(2)ダイズ根粒菌の増殖速度を変化させる遺伝子、(3)乾燥などのストレス耐性遺伝子の探索を行い、興味深い領域を見出している。例えば、USDA110 株コスミッドを導入した *B. japonicum* USDA122 株の中に、USDA122 株が本来不和合性を示す *Rj2* ダイズに正常に根粒形成を起こさせるコスミッドや、USDA122 株の増殖速度が変化させるコスミッドが見つかった。整列化以前のコスミッドシリーズも手元にあるので、理論的には原因遺伝子を絞り込むことができるはずである。

従来の整列化していないランダムライブラリーであると全ゲノム領域をカバーするために数千以上のクローンを扱う必要があるが、整列化コスミッドライブラリーであると 500 クローン程度で全体をカバーできるので、少し手間のかかるスクリーニング方法も可能になるという利点がある。

7. 根粒菌ゲノム研究の環境保全へ応用の可能性

根粒菌は最も昔から利用されてきた微生物接種資材であるので、根粒菌の圃場レベルでの利用を考えやすく、従来からメタルチオネインなどの遺伝子導入根粒菌による重金属除去などのような共生工学による環境修復が試みられてきた¹⁶⁾。一方、□HCH などの有機塩素系農薬の *Shingomonas* 属などの分解菌が汚染土壌や集積培養系から単離され、分解遺伝子が詳細に調べられている¹⁷⁾。脱ハロゲン化酵素 LinB の相同配列は根粒菌ゲノム上にも見付き、ミヤコグサ根粒菌とダイズ根粒菌に存在する相同配列を大腸菌中で発現させ、これらが既知のものとは異なる新規の基質特異性を示す脱ハロゲン化酵素であることが明らかになりつつある¹⁸⁾。この結果は、ゲノムプロジェクトにより決定された根粒菌のゲノム塩基配列を遺伝子資源として利用し、新規反応特性を有する有用酵素遺伝子を獲得できることを意味する。さらに、人為起源物質に作用する脱ハロゲン化酵素の本来の環境中における役割を知る手がかりになる可能性がある。

8. 土壌メタゲノム—個生態学から群集生態学へ

近年、生態系そのものから抽出した DNA を元に、その群集の構成メンバーのゲノム構造や物質循環機能をまるごと調べる環境メタゲノムという領域が着目され、本年に入ってから、酸性鉱山水¹⁹⁾や海洋の微生物群集²⁰⁾について報告され始めている。米国の微生物学ワーキンググループからも、遺伝子交換・地球レベルの物質循環・生物相互作用・進化などは微生物コミュニティのレベルで起こっており、今後のメタゲノム研究の重要性を指摘している²¹⁾。土壌分野でも、水田土壌のメタン生成細菌や古細菌を対象としたメタゲノム研究が始まっていると聞いている。この場合、いかに意義のある特徴的な土壌生態系を設定し、その後どのように解析するかが重要であり、ある意味では土壌微生物学者の腕の見

せどころである。

9. おわりに

ここでは、ミヤコグサ根粒菌(*Mesorhizobium loti*)およびダイズ根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)を対象としたポストゲノム研究の端緒的な成果を紹介した。一部の実験で定量 RT-PCR を用いたが、その他の方法はいずれもどちらかという古典的な分子生物学的手法である。しかし、大量のクローン情報をや研究資源を維持及び利用するには、1種類の細菌であってもやはり情報科学の知識やツールが不可欠である。幸いミヤコグサ根粒菌およびダイズ根粒菌の全ゲノム塩基配列を解読したカズサ DNA 研究所は、他の根粒菌のデータも含めて大変利用しやすい Rhizobase というデータベースを構築しており、世界中の根粒菌研究者が利用している^{9,22)}。また、日本の根粒菌関連研究者の協力態勢(根粒菌分科会)は研究を楽しくし、実験のためのデータベースを共有しながら初めての領域の研究を進めるのに大変有効であった。根粒菌分科会で初めて出したミヤコグサ根粒菌の発現解析の論文¹²⁾に対応して、多量の発現データの一部を独自の形式で整理して supplemental data として、Web 上で公開している²³⁾。

根粒菌のポストゲノム研究として、特定の環境で増加したタンパク質を扱うプロテオーム解析も共生バクテロイドと培養細胞で始まっており^{24,25)}、発現解析とともに、根粒菌のライフサイクルで機能している新規遺伝子の発見につながる可能性があると考えられる。こういったポストゲノム解析は、大量の情報やクローンなどを扱うので、どのようなフレームワークで研究を進めるかが大変重要である。私達は、まず実行可能な簡単なところから、協力分担して進めてきた。土壤微生物研究の大課題に即答はできないが、今まで見えなかった土壤微生物の側面が見えはじめてきたという感触を得ている。

近年、生態系やコミュニティレベルのメタゲノム解析が話題を呼んでいるが、全ゲノム塩基配列が解読された特定の微生物からどのようなことが分かるかという個別微生物研究がその基盤になることはやはり間違いないであろう。

要旨

根粒菌による共生窒素固定は、分子状窒素のアンモニアへの還元という地球規模の物質循環や農業の上で重要な役割を果たしているだけでなく、土壤細菌として単独で生活するという二つのライフサイクルを持っている。我が国で全ゲノム塩基配列が決定されたミヤコグサ根粒菌およびダイズ根粒菌を対象として、全ゲノム情報やゲノムプロジェクトで生み出されたクローンを利用した網羅的な発現解析や菌株ゲノム比較、整列化コスミッドライブラリーによる機能解析などの端緒的な研究成果を紹介した。特に、根粒菌の栄養飢餓条件下における耐性機構や根粒菌のゲノム進化について興味深い事実が明らかになりつつあり、それらの土壤微生物研究のモデルとしての可能性について議論を行った。

謝辞

本研究の大部分は、佐伯和彦氏(大坂大理学研究科)、内海俊樹氏(鹿児島大学)、横山正氏(東京農工大学)、大和田琢二氏(帯広畜産大学)、大森博文氏(大坂大理学研究科)、田島茂行氏(香川大学)、林 誠氏(大阪大学工学研究科)、金子貴一氏(カズサ DNA 研究所)、田畑哲之氏(カズサ DNA 研究所)、板倉学氏(東北大学)、三井久幸氏(東北大学)らとの共同研究の成果であり、各位に感謝します。また、本研究を助成して頂いた十勝農協連合会および本稿の電子顕微鏡写真を撮影した葉鬘氏に謝意を表します。

引用文献

- 1) 新・土の微生物(10) 研究の歩みと展望 (2003)、博友社、pp. 210, 東京
- 2) 南澤 究 (2000) 土壌細菌の遺伝生態研究の現状—ダイズ根粒菌の実例もまじえて—、土と微生物、54, 121-127.
- 3) Minamisawa K. and Mitsui H. (2000) Genetic ecology of soybean bradyrhizobia. In: Bollag J-M, Stotzky, G. (eds), Soil Biochemistry (Vol. 10). Marcel Dekker Inc., New York, pp. 349-377.
- 4) Minamisawa K. et al. (2002) Horizontal transfer of nodulation genes in soils and microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. Microb. Environ. **17**, 82-92.
- 5) Sawada, H., L.D. Kuykendall and J.M. Young. (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J. Gen. Appl. Microbiol. **49**, 155-179.
- 6) 澤田宏之 (2003) 根粒菌の系統分類—過去・現在・未来— 土と微生物 **57**, 39-64.
- 7) Kaneko T. et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. **7**, 331-338.
- 8) Kaneko T. et al. (2002) Complete genome sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res. **9**, 189-197.
- 9) 金子貴一 (2003) 根粒菌ゲノム構造の特徴、分子レベルからみた植物の耐病性、秀潤社、pp. 42-48.
- 10) Galibert F. et al. (2001) The complete genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science **293**, 668-672.
- 11) Sullivan, J. T., and C. W. Ronson (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5145-5149.
- 12) Uchiumi T. et al. (2004) Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. J. Bacteriol. **186**, 2439-2448.
- 13) <http://orca10.bio.sci.osaka-u.ac.jp/array01/website>
- 14) Okazaki S. et al. (2004) Rhizobial Strategies to Enhance Symbiotic Interactions: Rhizobitoxine and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase. Microbe Environ. (in press)
- 15) Hattori Y. et al. (2002) Ordered cosmid library of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 genome for systematic gene disruption and complementation analysis. Plant Cell Physiol. **43**, 1542-1557.
- 16) 室岡義勝 (2003) 共生工学による環境修復、農芸化学会誌 **77**, 146-149.
- 17) 永田裕二 (2002) 有機塩素系農薬による汚染浄化のための環境バイオテクノロジー、J. Environ. Biotechnol. **2**, 25-38.
- 18) 津田雅孝他 (2004) 環境細菌ゲノムと環境 DNA、環境バイオテクノロジー学会誌、**3**, 69-78.
- 19) Tyson G. E. et al. (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature **428**, 37-43.
- 20) Venter J. C. et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. Science **304**, 66-74.
- 21) <http://www.asm.org/ASM/files/CCPAGECONTENT/docfilename/0000026555/GENOMEweb.pdf>
- 22) <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/index.html>
- 23) <http://orca10.bio.sci.osaka-u.ac.jp/array01/>
- 24) Hoa, L., M. Nomura and S. Tajima (2004) Characterization of bacteroid proteins in soybean nodules formed with *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Microb. Environ. **19**, 71-75.
- 25) Natera, S. H., N. Guerrero and M. A. Dojordjevic (2000) Proteome analysis of differentially

displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 995-1009.

26) Freiberg C. et al. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**, 394-401.

図の脚注

図1 単生および共生のミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株の顕微鏡写真

(A) 単生根粒菌の透過型電子顕微鏡写真. (B) 根粒の感染植物細胞内の根粒菌バクテロイド. ミトコンドリアやクロロプラストのように植物由来の膜 (ペリバクテロイドメンブレン) に包まれている. (C, D, E) 炭素源を除いた最少培地におけるミヤコグサ根粒菌の形態の変化. 炭素源を抜いてから 0 時間(C), 2 時間(D), 24 時間(E)が経過すると細胞が小型化している. バーは全て 1 μm .

図2 根粒菌ゲノムのレプリコンと共生領域

太線は共生窒素固定に必須の遺伝子が集中している共生領域 (共生アイランド、共生プラスミド) を示す. 共生領域が存在するレプリコンにより、プラスミドタイプ、共生アイランドタイプに分かれる. ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* MAFF303099⁷⁾、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110⁸⁾、アルファルファ根粒菌¹⁰⁾ は全ゲノム塩基配列構造が決定されている. 広宿主域根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 は共生プラスミド pNGR234a の構造が最初に報告された株であるが²⁶⁾、今のところ全ゲノム塩基配列構造は報告されていない.

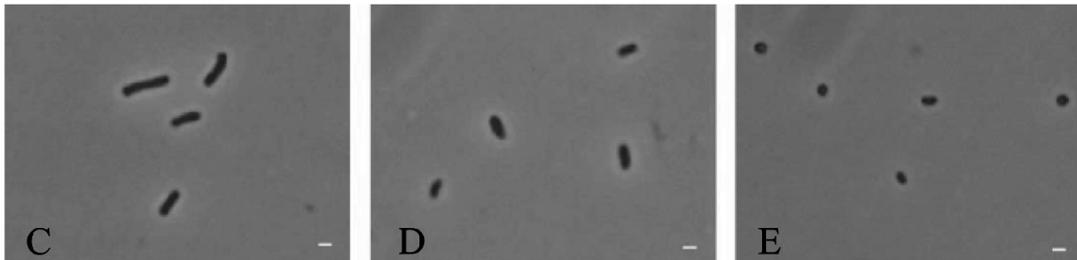
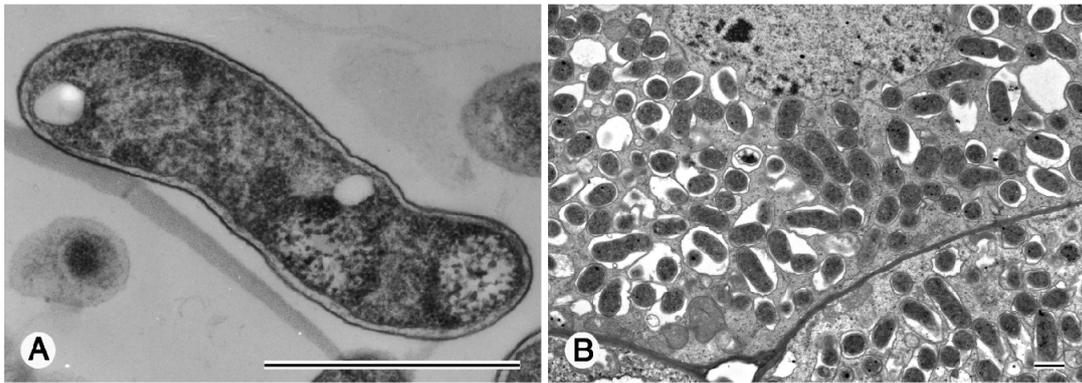
図3 共生・微好気・飢餓条件におけるミヤコグサ根粒菌の全ゲノム領域の発現¹¹⁾

ミヤコグサ根粒菌の全ゲノム領域に渡って発現上昇した部分を上側に、発現抑制された部分を下側に表した. 共生/単生は根粒バクテロイドと TY 培地の培養菌体の比較. 微好気/好気は、培養菌体を 30 分間 1.5% O₂ 存在下に暴露した細胞と 21% O₂ で培養した細胞の比較. 飢餓/非飢餓は、マンニトールを唯一の炭素源とする最小培地から炭素源を除いて 20 分後の細胞と炭素源を除かない培地中の細胞の比較. バクテロイドでは、共生アイランド上の遺伝子が塊となって発現していた.

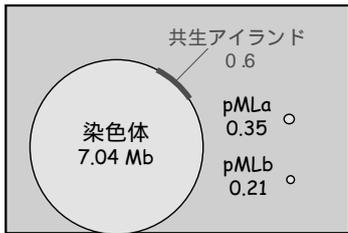
図4 発現解析から推定されるミヤコグサ根粒菌の炭素源飢餓応答

図5 アレイによるダイズ根粒菌株のゲノム比較

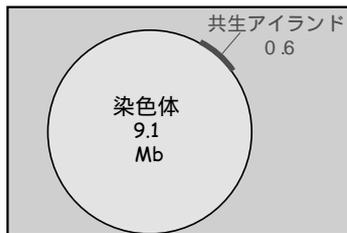
B. japonicum T7 (十勝分離株) と *B. japonicum* USDA110 株 (アレイ作製株) の Total DNA をプローブとしてマクロアレイでハイブリダイゼーションしたシグナル比を USDA110 株のゲノム位置にプロットした. 右側への振れは T7/USDA110 比が小さいこと、すなわち T7 株では対応する領域がないこと (矢印) を意味する. 灰色の矢印の後の 110 trn は、USDA110 株の全ゲノム塩基配列の解析で、trn element と推定されていたものを、T7 trn は今回の比較から trn element と推定されていたものを示している. 白抜きの矢印は、trn element 構造が認められなかった T7 株欠損領域.



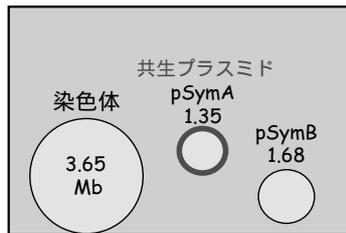
ミヤコグサ根粒菌
Mesorhizobium loti



ダイズ根粒菌
Bradyrhizobium japonicum



アルファルファ根粒菌
Sinorhizobium meliloti



広宿主域根粒菌
Rhizobium sp. NGR234

