

論文の内容の要旨

Genome analysis of *Buchnera*, an endocellular bacterial symbiont

(細胞内共生細菌 *Buchnera* のゲノム解析)

氏名 重信 秀治

真核生物の細胞の中に原核生物が生息する細胞内共生は、異種間相互作用の中でも最も緊密なものである。その典型例がアブラムシ（アリマキ）と共生バクテリア *Buchnera*（ブフネラ）との間に観察される。アブラムシは菌細胞（bacteriocyte）と呼ばれる特殊に分化した大型の細胞を 60-80 個保持しており、その中におびただしい数のブフネラが生息している。これらのブフネラは宿主昆虫の世代を越えて永続的に垂直感染を繰り返し、自由生活の期間を全く持たない。ブフネラの 16S rDNA の分子系統樹と宿主アブラムシの化石的証拠などにより両者の共生はおよそ 2 億年前にさかのぼると推定されている。長期間の共生の結果、ブフネラとアブラムシは相互に依存度を深める形で共進化し、ブフネラは宿主の細胞外では増殖することができず、またアブラムシはブフネラを失うと成長が著しく抑えられ、生殖能力をも失ってしまう。本研究では、エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) と共生するブフネラ (*Buchnera* sp. APS) の全塩基配列を決定し、得られたゲノム情報を足がかりに、共生のメカニズムの解明、および細胞内共生における分子進化のメカニズムの解明を試みた。本論文は第 1 部および第 2 部から構成されている。

第 1 部ではブフネラゲノムの解析結果を述べた。私は、全ゲノムランダムショットガンシーケンシング法により、ブフネラのゲノム全塩基配列をエラー率 0.01% 以下の高い精度で決定した。その結

果、ブフネラゲノムは 640,681 base の染色体と約 7kb のふたつのプラスミドから成ることがわかった。そのゲノムの主な特徴を表 1 にまとめた。ブフネラは大腸菌と近縁であるが、4.6Mb の大腸菌ゲノムに比べるとそのゲノムサイズはわずかに 7 分の 1 である。また、このゲノムサイズは、最小遺伝子セットを持つバクテリアと見なされている *Mycoplasma genitalium* (マイコプラズマ・ゲニタリウム) に次いで 2 番目に小さい。私はブフネラゲノムから 583 個の遺伝子を同定し、遺伝子のレパートリーを全ゲノムが既知の他の原核生物と比較した (表 2)。リケッチアやクラミジアなどの細胞内寄生バクテリアも小さいゲノムを持つ点ではブフネラと共通の特徴を持っている。しかし、比較の結果、遺伝子のレパートリーはブフネラと寄生バクテリアは全く異なることが分かった。

ブフネラは、宿主が合成することができない必須アミノ酸の合成に関与する遺伝子を揃えているが、宿主が合成可能な可欠アミノ酸に関する合成遺伝子をほとんど持っていないことが分かった。このことは、アミノ酸合成系に関してブフネラと宿主がゲノムレベルで相補的であることを意味している。このような相補性の例は補酵素合成などの他の代謝系に関しても観察される。この特徴は、寄生性バクテリアが栄養分をほぼ全面的に宿主に依存し、それらの合成酵素の遺伝子すら自分のゲノムにもっていないことと好対照を成している。

ブフネラは DNA 修復に関与する遺伝子と細胞表層成分の合成に関与する遺伝子をほとんど失っていることも明らかになった。このことはこのバクテリアが DNA レベルおよび、細胞構造のレベルで無防備であることを意味している。また転写制御の遺伝子もほとんどみつからなかった。これはブフネラが環境の変化に対応できないことを示し、宿主細胞内の安定した環境でのみ生存可能であることを示唆している。さらに興味深いことに、ブフネラはリン脂質合成酵素をほとんど失っていることが明らかになった。このことはブフネラが自分で細胞膜を合成できず、その合成に関して宿主に何らかの形で依存していることを示している。

これらのゲノム解析の結果はブフネラとアブラムシの間の共生において、相互依存関係がゲノムレベルで規定されていることを示す強い証拠である。

さらに、私はブフネラ、大腸菌、およびインフルエンザ菌の共通祖先バクテリアの遺伝子レパートリーを推定し、細胞内共生におけるブフネラゲノムの進化を検討した。その結果、共通祖先の遺伝子数は少なくとも 1542 個であり、ブフネラのオルソログはほとんどすべてがその中に含有され、またブフネラに種分化した後に重複化した遺伝子はひとつの例を除いて存在しなかった。つまり、ブフネラは祖先バクテリアから一方的に不要な遺伝子を失いつつゲノムサイズを縮小する方向へ進化してきたことを示している。現在、多くの証拠によって、ミトコンドリアや葉緑体などのオル

ガネラが細胞内共生に由来することが支持されている。ブフネラは宿主との共生による進化の過程で生存に必須な遺伝子さえ失いながら、宿主の栄養補給に特化した遺伝子セットを保持していることを考慮すると、ブフネラは寄生バクテリアよりもオルガネラに似た特徴を呈しているといえる。

第2部では、第1部で得られたゲノム情報に立脚し、ブフネラのタンパク質のユニークな進化について、理論的解析を行った。

垂直感染によってのみ伝播される細胞内共生微生物は、宿主の世代ごとにボトルネックがかかる点と、実質的に組換えの機会が少ない点から、軽度の有害変異が自然選択によって淘汰されずに蓄積することが示唆されてきた。実際、ブフネラゲノムはDNAの配列の進化速度が速いことが報告されてきた。そこで、私は、加速化したDNA配列の進化がタンパク質の機能にどのような影響を与えているのかを比較ゲノムの手法によって調べた。ブフネラの全タンパク質についてそれぞれ全ゲノム配列が既知の34種の原核生物を対象にホモロジー検索し、相同遺伝子のマルチプルアライメントを作製した。その結果、ほとんどすべての生物種において保存されているアミノ酸残基さえ、ブフネラでは他のアミノ酸に置換している例が多く観察された。種間で高度に保存されているアミノ酸残基は、そのタンパク質の機能にとって重要であることを意味しているため、この部位の変異はブフネラのタンパク質の機能に大きな影響を与えていることを示している。事実、種特異的変異の蓄積により、多くの機能モチーフがブフネラのタンパク質から消失していることが確認できた。注目すべきことに、ブフネラ特異的変異はそれぞれのタンパク質の全体にわたって一様に入っているのではなく、特定の機能部位に蓄積し、タンパク質が持っているいくつかの機能のうち一部を失わせる傾向にある。これは第1部で明らかにしたブフネラのユニークな遺伝子レパートリーによって説明することができる。ゲノムの縮小進化によって遺伝子レパートリーが再編されると、タンパク質どうしの相互作用も変化するはずである。その結果、アミノ酸置換の制約を強く受けていた部位がその制約から解放され中立的変異が蓄積することが期待される。実際、ブフネラにとっては中立的、もしくは正の淘汰によると考えられる変異が蓄積している遺伝子がいくつか見いだされた。また、ブフネラのタンパク質がほかの生物の相同タンパク質にはない機能を獲得している実験的証拠も蓄積しつつある。これらの事実を考えあわせると、ブフネラのタンパク質はアミノ酸配列と機能の上で独自の進化をしているといえる。

本研究は絶対共生細菌についての初めてのゲノム解析であり、それによって、この細菌のゲノムおよびタンパク質のもつユニークな特徴を明らかにすることができた。これらの特徴は、自由生活性、寄生性のいずれのバクテリアとも全く異なるものであり、細胞内共生が生物進化に与える大き

な影響について興味深い結果を得ることができた。この種の緊密な共生系の研究は、絶対的な相互依存関係のために実験的手法が限られていたが、当ゲノム解析がブレイクスルーとなって実験的解析が進むことが期待される。また、必須遺伝子をブフネラが失っていることから推測できるとおり、宿主側から供給される構成成分が存在するはずである。このことは、アブラムシ菌細胞のように高度に統合化された共生系においては、常に宿主と共生者の両方を考慮しつつ研究を進めることが重要であることを示している。

表1 ブフネラゲノムの特徴

| | |
|-----------------|------------|
| 全般 | |
| ゲノムサイズ | 640,681 bp |
| G+C 含量 | 26.3 % |
| 遺伝子数 | 583 |
| くり返し配列 | なし |
| RNA | |
| rRNA | 1 セット |
| tRNA | 32 |
| ORF | |
| 平均長 | 988 bp |
| 平均等電点 | 9.6 |
| 機能分類 | |
| 機能既知タンパク質に相同 | 500 |
| 他種の機能未知タンパク質に相同 | 80 |
| ブフネラ固有 | 3 |

表2 細菌の遺伝子レパートリーの比較*

| 遺伝子 | ブフネラ | 大腸菌 | リケッチア | マイコプラズマ |
|-------------|------|------|-------|---------|
| アミノ酸合成 | 55 | 131 | 6 | 0 |
| ヌクレオチド合成・代謝 | 34 | 58 | 14 | 19 |
| エネルギー代謝 | 51 | 243 | 67 | 33 |
| 脂質・リン脂質代謝 | 6 | 48 | 25 | 8 |
| 輸送タンパク質 | 18 | 427 | 38 | 33 |
| 調節機能 | 7 | 178 | 14 | 5 |
| 総遺伝子数 | 583 | 4289 | 834 | 480 |

*ブフネラ: *Buchnera* sp. APS, 大腸菌: *Escherichia coli* K-12, リケッチア: *Rickettsia prowazekii*, マイコプラズマ: *Mycoplasma genitalium*