

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成12年博士課程入学

氏名 徐 必守

指導教官名 横田 明

論文題目: Studies on phylogeny and evolution of cyanobacteria based on 16S rRNA, *gyrB*,

rpoC1, and *rpoD1* genes

(16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* および *rpoD1* 遺伝子に基づくシアノバクテリアの
系統進化に関する研究)

シアノバクテリアは二つの光合成系 (PS I と PS II) による酸素発生型の光合成を行う、形態的に多様性に富んだバクテリアである。地球化学及び化石の研究により、先カンブリア紀の時代にシアノバクテリアが原始地球大気の嫌気状態から現在の好気状態への変化を引き起こしたものと考えられている。シアノバクテリアは形態に基づき、現在5つのサブセクション (I, II, III, IV, V) に分類されている。形態的な特徴に基づくシアノバクテリアの分類は真の系統関係を反映したものではなく、まだ混沌とした状態にある。

本研究では、16S ribosomal RNA 遺伝子の塩基配列の解析と共に、16S rRNA 塩基配列より高い解像能が期待された DNA gyrase の subunit B protein (DNA topoisomerase type II) (*gyrB*), DNA-dependent RNA polymerase の γ subunit (*rpoC1*) と DNA-dependent RNA polymerase の主要 sigma factor (*rpoD1*) 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行い、シアノバクテリアの系統関係と進化について考察した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析

近隣結合法 (NJ), 最尤法 (ML), と最大節約法 (MP) で作成された系統樹はシアノバクテリアのサブセクション V の全メンバーが単系統であることを示している。サブセクション IV に属する *Scytonema* 属のクラスターはサブセクション IV と V のクラスターの外側に位置し、これは NJ, ML

で 100%、MP で 85%のブーツストラップ値で支持された。これまでの報告では、サブセクション I と II の単細胞性シアノバクテリアとサブセクション III の糸状性シアノバクテリアは多系統であり、異質細胞を形成するサブセクション IV と V は単一系統であると考えられていた。しかし、本研究の結果、サブセクション IV も多系統であることが判明した。

サブセクション II に属する *Chroococciopsis* sp. PCC 7431 と *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203 はサブセクション IV と V のクラスターの外側に位置した。サブセクション III は少なくとも五つのクラスターに分けられた。進化距離から、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (サブセクション I) と *Oscillatoria rosea* IAM M-220 (サブセクション III) は比較的最近、分岐したものと考えられる。また、*Leptolyngbya* sp. PCC 7375 (サブセクション III) はサブセクション I の菌株とクラスターを形成した。この様に、単細胞性シアノバクテリアと糸状性シアノバクテリア (サブセクション III) は近縁であり、単細胞性シアノバクテリアから糸状性シアノバクテリアへ、あるいは糸状性シアノバクテリアから単細胞性シアノバクテリアへの形態的な変化が起きたものと推定された (Ishida et al., 2001)。実際に、サブセクション I のいくつかの種は継代培養で形態が容易に変化することが知られている (Rippka, 1988)。また、サブセクション I では系統的に異なる菌種 *Gloeobacter* が含まれており、シアノバクテリアの進化において最も早く祖先型から分岐したものと見られる。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析(NJ, ML)は *Gloeobacter* 属の分岐がクロロプラストより早くに起こったことはこれまでの報告と一致している。シアノバクテリアとクロロプラスト間の系統関係は論争中であり、16S rDNA 塩基配列解析に基づいた様々の報告はシアノバクテリアの系統樹の中でクロロプラストは後から現れた菌種に由来するのではないかと提案されている。

gyrB, *rpoC1* と *rpoD1* 遺伝子に基づく系統解析

gyrB と *rpoD1* に基づいて作成した系統樹では、シアノバクテリアのサブセクション IV と V の菌株は単系統であることを示した。興味深いことに、*Chroococciopsis* sp. PCC 7431 を含むサブセクション II と III のメンバーはサブセクション IV と V より早く分岐した。これは異質細胞形成性シアノバクテリアの進化はサブセクション II と III のいくつかのメンバーが直接・間接的に関連して起こったことを意味している。それは 16S rDNA に基づく系統解析を支持していた。サブセクション I, II と III は多系性を示した。更に、*gyrB*, *rpoC1* と *rpoD1* の解析ではサブセクション I と III のいくつかのメンバーが他のサブセクションのシアノバクテリアより先に分岐したことを示していた。それもまた 16S rDNA に基づいた系統解析の結果を支持していた (Fig. 1)。

これからの遺伝子に基づいた系統樹からは、シアノバクテリアの分岐がクロロプラストより先に起こったという証拠は見られなかった。これは 16S rDNA 塩基配列解析に基づいた多くの報告とは異なっている。

gyrB, *rpoC1* と *rpoD1* の DNA 塩基配列とアミノ酸配列の相同性比較

gyrB, *rpoC1* と *rpoD1* の DNA 塩基配列とアミノ酸配列の相同性は異なる相同性値を示した。また、アミノ酸配列の相同性は DNA 塩基配列よりもより保存性が高かった。各タンパクをコードする遺伝子の部分配列を比較したところ、*rpoD1* の DNA 塩基配列とアミノ酸配列の相同性が三つの遺伝子の中で一番高かった。なお、*rpoD1* のアミノ酸配列の置換率は 16S rDNA の DNA 塩基配列の置換率より低かった。本研究で検討した *rpoD1* 遺伝子のアミノ酸配列は 16S rDNA の DNA 塩基配列より高いかあるいは同じぐらいの保存性を示した。

結論

本研究で、16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* と *rpoD1* 遺伝子の系統解析に基づくシアノバクテリアの系統進化を考察した結果、シアノバクテリアの進化のパターンが以前の研究とは少し異なることが分かった。

シアノバクテリアの進化は、シアノバクテリアの先祖からサブセクション I とサブセクション III への分岐が起こって、その後シアノバクテリアサブセクション I と III の一部のメンバーから系統的に異なるサブセクション I, II と III への進化が起こったと考えられる。また、その分岐以後、サブセクション I, II と III の一部のメンバーがそれらとは系統的に異なるサブセクション II と III への二次的分岐が起こったと考えられる。サブセクション II と III はサブセクション IV の進化に直接あるいは間接的に影響を及ぼしたと考えられる。サブセクション IV と V は比較的最近分岐したものである。16S rRNA, *rpoC1* と *rpoD1* 遺伝子の系統解析の結果は、サブセクション V がサブセクション IV から進化したことを示した (Fig. 1)。

これらの遺伝子は DNA とアミノ酸配列で異なる相同性と置換率を示したが、DNA とアミノ酸配列で非常に高い保存性を持っていることが判明した。また、それらの遺伝子に基づいた系統解析の結果は、各トポロジーが一致していないが、系統樹では類似したトポロジーパターンを示した。シアノバクテリアの各サブセクションは形態的特徴によって分けられているが、それらの基準は分子系統に基づいた系統体系とは一致しなかった。実際、単一クローンで形態的变化が多様な培養条件下で確認されていた。この様に形態的特徴はシアノバクテリアの真の系統関係を反映していないものと考えられる。

本研究で、16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* と *rpoD1* 遺伝子の異なる解析能はシアノバクテリアの系統分析に有効で、良い道具となることが明らかになった。

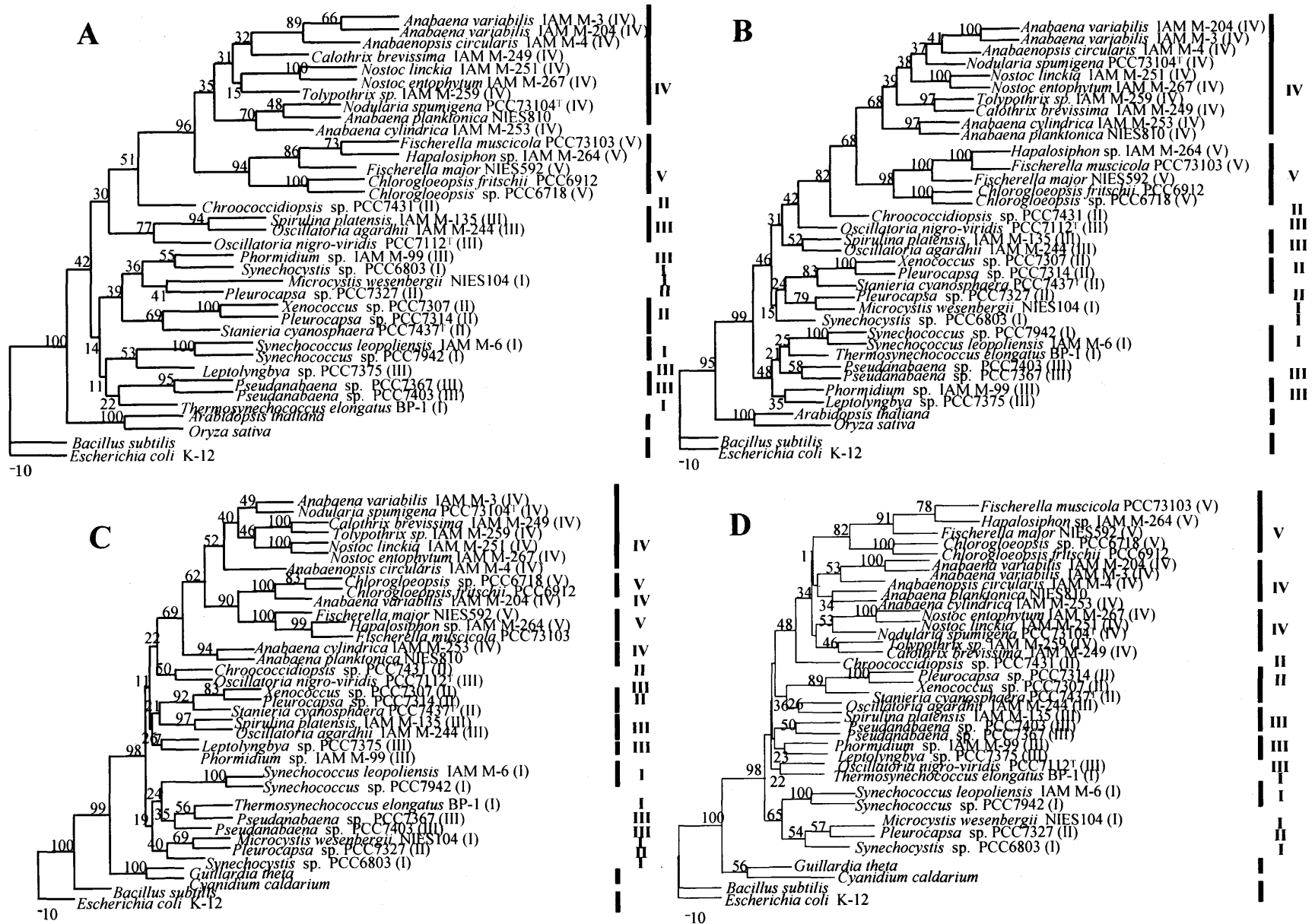


Fig. 1 Cyanobacterial tree of nucleotides analyzed by the maximum-likelihood method (DNAMLK software in PHYLIP version 3.6). A, 16S rDNA (1262 bp); B, *gyrB* (912 bp); C, *rpoC1* (799 bp); D, *rpoD1* (561 bp).