

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏 名 嵐田 亮
指導教員名 難波 成任

論文題目 ファイトプラズマの転移性遺伝子クラスターの構造に関する研究

ファイトプラズマは植物の篩部細胞内に寄生して病気を引き起こす植物病原細菌である。昆虫（ヨコバイ）を介して植物から植物へと伝搬され、700 種以上の植物に萎縮・叢生・黄化・葉化等の特徴的な病害を引き起こし、農業上大きな被害を与えている。人工培養が出来ないことからその研究は困難であったが、分子生物学的手法の導入により研究は急速に進み、近年 '*Candidatus Phytoplasma asteris*' OY (onion yellows) 系統の弱毒株 (OY-M) の全ゲノム配列が解読された。その結果、ファイトプラズマのゲノムには DNA 複製や転写、翻訳に関与する基本的な遺伝子はコードされていたものの、TCA 回路、酸化リン酸回路、アミノ酸合成系などの代謝系遺伝子がほとんどコードされておらず、最少遺伝子セットを持つ生物のモデルとされている *Mycoplasma genitalium* と比較しても代謝系遺伝子が少ないことが明らかとなった。これは、ファイトプラズマが植物や昆虫の細胞内という特殊な環境に生息し、代謝産物を宿主に依存することで退行的進化が進み、多くの代謝系遺伝子を失ったためと考えられた。このように代謝系遺伝子が少ない一方で、ファイトプラズマのゲノムには他の細菌ゲノムでは 1 コピーしか認められない *dnaB*, *dnaG*, *ssb* 等の遺伝子が複数コピー存在していた。このような重複遺伝子が OY-M ゲノム全体の約 30% を占めていたが、

その役割はこれまで不明であった。そこで本研究では、ファイトプラズマゲノムに存在する重複遺伝子の役割を明らかにすることを目的として以下の解析を行った。

1. OY-M ゲノムにおける重複遺伝子群の分布と遺伝子構造解析

OY-M ゲノムに認められる 754 個の遺伝子それぞれをクエリ配列として用いて、自身のゲノムに対して相同性検索を行うことで重複遺伝子を同定し、ゲノム内における分布を調べた。その結果、重複遺伝子は主に 4 カ所のゲノム領域に認められた。また、重複遺伝子群の遺伝子構成を調べたところ、5'-*fliA* - *ssb* - *himA* - *hflB* · · · *tmk* - *dnaB* - *dnaG* - *tra5* -3' のような約 10 ~ 20 kbp の遺伝子クラスターを形成している場合が多く、このような重複遺伝子から構成される遺伝子クラスターはゲノム中に少なくとも 7 カ所認められた。

また、重複遺伝子の遺伝子クラスターには挿入配列 IS (Insertion sequence) の転移酵素をコードする *tra5* が含まれていた。相同性検索および系統解析の結果、*tra5* がコードするタンパク質のアミノ酸配列は *Bacillus anthracis* の IS1627 がコードする転移酵素と高い相同性を示し、IS3 family と呼ばれるグループに分類される IS であることが示唆された。

これらの結果より、重複遺伝子はゲノム内においてランダムに散在しているわけではなく、重複遺伝子が集合した遺伝子クラスターの単位で重複していることが示唆された。また、この中には転移酵素をコードする遺伝子が存在していたことから、この転移因子の働きによって重複遺伝子の遺伝子クラスターがゲノム内で転移している可能性が考えられた。以下、本研究では *tra5* を含む重複遺伝子の遺伝子クラスターのことを転移性遺伝子クラスターと呼ぶ。

2. OY-W ゲノムにおける転移性遺伝子クラスターの転移の痕跡

'*Candidatus Phytoplasma asteris*' OY 系統の強毒株 (OY-W) は、OY-M と近縁なファイトプラズマであるが、OY-W のゲノムは OY-M のゲノム (約 860 kbp) よりも約 140 kbp 大きいことがパルスフィールドゲル電気泳動の解析から示唆されており、両者のゲノム構造の差異が推測されている。このようなゲノム構造の差異と転移性遺伝子クラスターとの関連を調べるため、以下の解析を行った。

まず *tra5* をプローブとして用いて OY-M および OY-W ゲノムに対してサザンブロット解析を行った。その結果、両者では異なるバンドパターンが観察され、*tra5* のコピー数や分布が異なっていることが示唆された。また OY-W の DNA ライブラリーを作製し、*tra5* を含むクローンを探索したところ、*tra5* の下流に lipoate-protein ligase A 遺伝子 (*lplA*) がコードされた約 6 kbp のクローンが得られた。一方、OY-M ゲノムにおける *lplA* の上流領域には *tra5* は認められなかった。*lplA* は OY-M、OY-W 共に 1 コピーのみ存在する遺伝子であることが

サザンブロット解析から示唆されており、OY-W の *lplA* 上流に *tra5* を含む転移性遺伝子クラスターが挿入されたことによってこのような遺伝子構造の差異が生じたのではないかと考えられた。

OY-M と OY-W の *lplA* の上流領域について塩基配列のアラインメントを行ったところ、OY-W の *tra5* の下流約 350 bp 付近を境に配列の相同性が大きく変化しており、この付近で DNA の組換えが起こったことが示唆された。また OY-M ゲノム中の複数の *tra5* 下流領域について塩基配列のアラインメント解析を行ったところ、全ての *tra5* について終止コドンから約 350 bp 下流の領域まで塩基配列が保存されていた。これらの結果は、*tra5* の約 350 bp 下流が、転移する際の組換えサイトであることを示唆している。

以上の結果より、OY 系統のゲノム内では *tra5* を一端とした転移性遺伝子クラスターの転移が起こっていたことが示唆された。

3. 重複遺伝子の系統解析

OY-M ゲノム中の重複遺伝子は、全てが転移性遺伝子クラスター上にコードされていたわけではなく、保存性の高いゲノム領域にコードされているものも認められた。保存領域にコードされる重複遺伝子の周囲の遺伝子構成を見ると、リボソームタンパク質遺伝子等のハウスキーピング遺伝子に囲まれていた。そこで、本研究では周囲の遺伝子構成から判断し、保存領域にコードされた重複遺伝子を FUG (fundamental gene)、転移性遺伝子クラスター上にコードされた重複遺伝子を MUG (mobile unit gene) と定義した。

重複遺伝子が遺伝子クラスターの転移によって生じたパラログであることを確認する目的で、*dnaG*, *dnaB*, *tmk*, *uvrD*, *ssb*, *himA*, *hflB*, *rpoD* の 8 種類の重複遺伝子について系統解析を行った。その結果、全体的に以下のような傾向が認められた：(1) FUG 同士、MUG 同士はそれぞれ単一のクレードを形成した (2) FUG と MUG のクレードは離れていた (3) MUG クレード内の進化距離は短かった (4) FUG は *Mycoplasma* 等の *Mollicutes* 綱細菌とクラスターを形成する傾向にあった。これらの結果から、FUG は他の細菌が持つ遺伝子のオーソログであり、MUG は転移性遺伝子クラスターがゲノム内で複製したことで生じたパラログであることが示唆された。また、MUG が進化距離の短い単一のクレードを形成したことから、転移性遺伝子クラスターの重複はファイトプラズマの進化の中で比較的最近生じた出来事であると考えられた。

4. 近縁なファイトプラズマ系統間における転移性遺伝子クラスターの分布の比較

OY-M に続き、米国において 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' AY-WB (Aster yellows witches' broom) 系統の全ゲノムが 2006 年に決定された。AY-WB は OY-M と同種であるが、宿主植

物や媒介昆虫が異なり、ゲノムサイズも OY-M よりも約 150 kbp 小さい。そこで、OY-M と AY-WB の比較ゲノム解析を行い、両ゲノムにおける転移性遺伝子クラスターの分布およびゲノム構造の差異について解析した。

相同性検索を用いた手法により AY-WB ゲノム上の重複遺伝子を探索したところ、シングルコピー遺伝子の数は AY-WB と OY-M でほぼ一致しており、AY-WB と OY-M の遺伝子数の差は重複遺伝子の数の差によるものであることが示唆された。

OY-M と AY-WB 間におけるオーソログを相同性検索を用いた手法で同定し、遺伝子の並び順を比較した。その結果、OY-M と AY-WB とは同一種でありながら、両ゲノム間には遺伝子の並び方の保存されていない、多様性に富んだ約 300 kbp の領域が認められた。この領域は転移性遺伝子クラスターが多数存在する領域と一致しており、転移性遺伝子クラスターがゲノムの多様性を生み出す原因の一つである可能性が示唆された。

5. まとめ

本研究により、ファイトプラズマゲノムにコードされる重複遺伝子群は、転移性遺伝子クラスターの形でゲノム内を転移・重複していることが示唆された。また、OY-W ゲノムに転移性遺伝子クラスターが挿入された痕跡が認められたことや、OY-M ゲノムと AY-WB ゲノムとでは転移性遺伝子クラスターの分布が大きく異なっていたことは、ファイトプラズマが各系統に分化した後にも、転移性遺伝子クラスターが頻繁に転移したことを示唆している。

転移性遺伝子クラスターには機能未知な遺伝子が多数存在しており、生物学的な役割には未だ不明な点が多く残されているが、本研究により転移性遺伝子クラスターにはゲノムの可塑性を増大させる効果があるのではないかと考えられた。ファイトプラズマは同種であっても各系統間で宿主や病原性が異なる場合が多いが、転移性遺伝子クラスターによってもたらされるゲノム可塑性が、宿主範囲などの多様性を生じさせる原因の一つなのかもしれない。