

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05232

研究課題名(和文) 海洋島の実験系を利用したマメ科-根粒菌共生特異性の進化的研究

研究課題名(英文) Evolution of legume-rhizobia symbiosis at oceanic islands

研究代表者

梶田 忠 (KAJITA, Tadashi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：80301117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：大西洋の海洋島であるカナリー諸島でマメ科植物のミヤコグサ属が島毎に固有種を分化させた際に、どのような過程で根粒菌との共生関係を獲得してきたかを明らかにするために、現地調査、メタゲノム解析、接種実験を行った。6つの島で実施した現地調査では、9種の固有種と19集団からの土壌サンプルを採集して、現地研究室でDNA抽出を行った。得られたDNAを用いてメタゲノム解析実験を行った結果、土壌中の根粒菌の集まり(根粒菌相)は生育場所の環境を反映しており、各固有種は共生相手となる根粒菌を生育場所から選択的に用いるが、1種の植物が3つの異なる根粒菌属と共生するなど、共生相手の選択の幅は広いという傾向が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋島は、大陸から隔絶された環境で適応放散を観察することができることから、様々な生物の進化の研究に用いられてきた。しかし、海洋島では、マメ科植物と根粒菌の共生関係においても、独自の進化をしたかもしれないという視点からの研究は無かった。本研究で得られた結果は、カナリー諸島でミヤコグサ属植物の固有種が分化した際には、生育環境ごとに選択的に根粒菌を用いるだけでなく、3属もの多様な根粒菌と共生してきたことが示された。この結果は、海洋島でマメ科植物の固有種が適応放散する際には、共生特異性が緩む可能性を示唆しており、海洋島におけるマメ科-根粒菌の共生系の進化研究に新たな展開をもたらすものと言える。

研究成果の概要(英文)：To clarify how the symbiotic relationship of plant - bacteria has been established in the speciation process at oceanic islands, we studied endemic Lotus species (Fabaceae) in the Canary Islands. We conducted field studies at six islands and collected nine endemic Lotus species as well as 19 soil samples from their habitat. We extracted DNA from soil samples at the laboratory of La Laguna University and analyzed the metagenomic DNA by using next-generation sequencer. The results of metagenome analysis using the soil DNA suggested that rhizobia in the soil (rhizobacterial flora) reflects the environment of the habitat of the host Lotus species. Each endemic species showed the tendency of utilizing symbiosis bacteria selected from the soil rhizobial at the habitat but still keeping a wide range of symbiont partners demonstrated by the three different rhizobia genera from one host plant.

研究分野：植物分類学、植物系統学

キーワード：生物間相互作用 共生特異性 根粒菌 マメ科植物 海洋島

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マメ科は植物の中で、地球上で3番目に大きい科であり、全球的かつ多様な環境に生育している。マメ科植物が地球上でこれほど繁栄することができた理由の一つは、マメ科植物が進化の過程で獲得してきた根粒菌との共生関係にあると言われている。マメ科植物は根粒菌との共生系を獲得したおかげで、窒素源に乏しい土壌環境でも生育できるため、新大陸の熱帯雨林などでは優占樹種となることのできるほどの繁栄を遂げてきた。

一方で、マメ科植物と根粒菌の関係には共生特異性があり、ある種のマメ科植物は特定の、あるいは、少数の根粒菌としか共生しないことが知られている。しかし、このような共生特異性が、どのような過程で進化してきたのかについては、まだ十分には分かっていない点が多くある。特に、マメ科植物と根粒菌の系統進化の歴史は非常に異なるため、マメ科植物の種分化の際に起こった共生特異性の獲得を議論するには、系統樹を相互比較するような比較解析では十分では無いと考えられる。

そこで我々が注目したのは、進化の実験場とも言われる海洋島で独自の種分化を遂げたマメ科植物と根粒菌の共生特異性である。海洋によって大陸から隔絶された海洋島は、ガラパゴス諸島のフィンチや、ハワイ諸島のギンケンソウなど、適応放散を伴う急速な種分化がいかにして生じたかを研究する舞台となってきた。マメ科植物についても、スペインのカナリー諸島では Lotus 属 (ミヤコグサ属植物) が極めて多様に種分化していることが知られている。また、カナリー諸島の成立年代は島によって 1200 万年から 100 万年と異なるが、Lotus 属植物は比較的短い歴史の中で多数の固有種が分化してきたことがすでに明らかになっている。

近年、我々の共同研究者である La Laguna 大学の Milagros León-Barrios 博士らによって、カナリー諸島に固有のいくつかの Lotus 属植物と共生する根粒菌が研究され、固有種の Lotus kunkelii と他の数種は、Ensifer 属, Mesorhizobium 属, Agrobacterium 属のいずれとも共生していることが報告された。このような共生特異性のレンジの広さは、同属のモデル植物である Lotus japonicus (ミヤコグサ) が、野生環境では Mesorhizobium loti のみと共生すると言われているのとは極めて対照的であり、カナリー諸島の Lotus 属ではマメ科植物-根粒菌の共生特異性のレンジが広がっていることを示唆している。また、このような共生特異性の制約の緩みは、海洋島において急速な適応放散を経たことによって生じた可能性があり、その場合は、カナリー諸島の他の Lotus 属の固有種でも同様の現象が観察されるはずである。

2. 研究の目的

本研究では、4年間の研究期間の間にカナリー諸島で現地調査を実施することで、カナリー諸島の Lotus 属植物の固有種はいずれの種においても同様に共生特異性のレンジが広がっているか?; 固有種が生育する土壌環境にはどのような根粒菌が存在するか?; それぞれの環境ではどのような根粒菌が共生相手として選択されているか?; また、Lotus 属植物と共生する根粒菌は、双方にとって最も効率的な組み合わせになっているのか? などの疑問を明らかにすることを目的として、

- ・ 現地調査による Lotus 属植物および生育地の土壌サンプルと根粒サンプルの採集
- ・ 土壌サンプルを用いた土壌根粒菌のメタゲノム解析
- ・ 根粒サンプルを用いた共生根粒菌の特定
- ・ 接種実験による生育特性の解析
- ・ カナリー諸島の Lotus 属植物との比較のための他の環境におけるマメ科植物・根粒菌の研究

を行った。

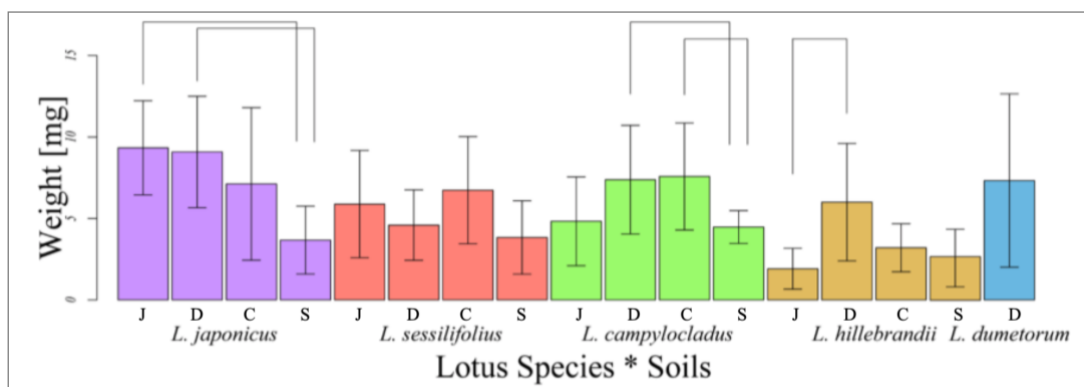
3. 研究の方法

【現地調査】: カナリー諸島のテネリフェ島にある La Laguna 大学でマメ科植物と根粒菌の研究を行っている Milagros León-Barrios 博士および Marcelino del Arco-Aguilar 博士と初年度に詳細な打合せを行い、研究協力体制を構築した。調査は H27 年から 29 年の 3 年間にカナリー諸島の全 6 島のうち 5 島で実施し、極端な希少種や、立入の難しい地域を除いて、できる限り多くの固有種の生育地を訪れるように実施した。現地調査許可や採集許可等の必要な手続きは、両博士を通して関係機関と連絡をとることで取得した。また、採集した土壌や植物サンプルは La Laguna 大学の León-Barrios 博士の研究室にもちかえり、DNA 抽出実験や栽培実験に用いた。

【土壌メタゲノム・根粒菌解析】: 土壌からの DNA 抽出は、現地研究機関の実験室において、Nucleo Spin for Soil を用いて行った。抽出した DNA は現地研究室で保管するとともに、日本に持ち帰り、メタゲノム解析に用いた。根粒菌のメタゲノム解析には、Glutamine synthetase II (glnII) 遺伝子に注目して、Rhizobium 属, Ensifer 属, Mesorhizobium 属, Bradyrhizobium 属の 4 属のそれぞれに特異的なプライマーを設計した。2段階の PCR で目的産物を増幅するとともに、多検体の次世代シーケンシング解析に必要なインデックスとアダプターを付加し、Illumina 社の MiSeq シーケンサで配列を決定した。得られた配列データは、プライマー除去やクローニングの後、この研究のために準備した解析パイプラインを通してクラスタ解析および多様性解析を行った。根粒から単離した DNA についても、同様の方法で解析を行った。

宿主植物に利用される根粒菌は、Bradyrhizobium 属, Mesorhizobium 属が多いが、*L. sessilifolius* と *L. dumetorum* では Rhizobium 属の根粒菌とも共生していた。ここに示した 3 種では Ensifer 属の根粒菌は検出されなかったが、先行研究から予想されたように、カナリー諸島ではそれぞれの Lotus 属植物が、多様な根粒菌と共生していることが確かめられた。一方で、根粒サンプルに現れる根粒菌は必ずしも土壌サンプルに現れない例がいくつか見られた。これは恐らく、土壌サンプル中の根粒菌の消長が激しいためであろうと考えている。今後は、土壌サンプルのレプリケート数を増やすことや、解析リード数を増やすこと、土壌の採集時期を工夫することなどが必要かと思われる。

【接種実験】：接種実験は、栽培実験に必要な種子の提供を受けられた 2016 年度に実施した。*L. japonicus* (日本のミヤコグサ)、*L. sessilifolius*, *L. campylocladus*, *L. hillebrandii*, 及び *L. dumetorum* を、根粒菌を含んだ生育地の土壌懸濁液を用いた栽培チューブ (J: *L. japonicus*, D: *L. dumetorum*, C: *L. campylocladus*, S: *L. sessilifolius*, D: *L. dumetorum*) 各 4 本ずつ程度栽培し成長量と根粒数を計測した。ここでは、有意な違いの見られた SDW (Shoot Dry Weight) の結果のみを示す (下図)。実験の結果、*L. campylocladus* では自身の生育地と、土壌根粒菌相がそれと比較的似た *L. dumetorum* における生長が、*L. sessilifolius* のものよりも有意に高かった。また、*L. sessilifolius* は、自身の生育地の土壌における生長量が *L. campylocladus* のものよりも低いという結果になった。*L. sessilifolius* の土壌懸濁液を用いた場合生長量が低くなる傾向は、コントロールとして用いた *L. japonicus* の結果でも見られた。このことは、*L. sessilifolius* は生育地である海岸乾燥地に適応して分化して、その場で手に入る根粒菌と共生しているが、その根粒菌は必ずしも *L. sessilifolius* の生長に最大の効果をもたらすものではないことを示唆している。今回行った接種実験は、宿主植物と根粒菌の対応関係を見るのに優れた方法であったが、実験を実施した年度以降は十分な数の栽培実験用の種子を入手することができず、これ以上の接種実験を続けることが出来なかった。



【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト・今後の展望】：マメ科植物と根粒菌の研究は、様々な方面からの研究が行われているが、急速な適応放散と種分化を経験した海洋島の固有種が、どのような根粒菌を利用しているかに注目した研究は、これまでほとんど行われてこなかった。カナリー諸島の Lotus 属植物の固有種が、多様な根粒菌を利用しているという結果は、海洋島における急速な適応放散や種分化の際には、共生特異性の幅が狭くなるような進化は起こりにくいことを示唆しているのかもしれない。このことは、栽培実験で *L. sessilifolius* の例が示したように、固有種の分化の際にはその場で入手可能な根粒菌を利用するように適応が進んだという考えと矛盾しない。

また、土壌のメタゲノム解析で生育地の根粒菌相を明らかにした上で、宿主植物が利用している根粒菌との対応を検証するという本研究で行った試みは、これまでほとんど行われてこなかった。今回の土壌メタゲノムの解析結果が示す様に、土壌根粒菌相は生育地の環境毎に分化しており、そこに生育する植物はその場で利用可能な根粒菌相の中から選択的に根粒菌を利用していると思われる。共生相手の選択の際に、海洋島では共生特異性の幅が狭くなるような進化は起こらなかったようだが、海洋島以外では共生特異性の幅が狭くなるような進化が起こっていると思われる。今後は土壌メタゲノムの解析をさらに発展させることで、さまざまな環境における土壌根粒菌相が明らかになると期待できる。また、環境毎の根粒菌相が明らかになれば、マメ科植物が種分化する際に、特定の土壌根粒菌相を選ぶように分化した例が見つかるのかもしれない。土壌メタゲノムの解析は、今後のマメ科植物-根粒菌の共生特異性の研究に、新たな展開をもたらすだろう。

【その他の成果】 最終年度には La Laguna 大学の共同研究者である Milagros Leon-Barrios 博士と Marcelino Jose Del Arco Aguilar 博士を日本に招へいし、千葉大学、琉球大学、京都大学でワークショップ、セミナー、一般公開講演会を実施した。また、2018 年 8 月 29 日から 9 月 2 日に仙台で開催され、世界 27 ヶ国から 130 名を超えるマメ科研究者が参加した第 7 回国際マメ科会議においては、Leon-Barrios 博士、代表者、および信州大学の高梨功次郎博士がオー

ガナイザーとなって、下記の国際シンポジウムを開催した。8月30日に開かれたこのシンポジウムでは、本研究課題のメンバーと国内外のマメ科植物-根粒菌共生系の研究者が、次世代シーケンシングデータを用いた今後の研究の進展について議論を深めた。

国際シンポジウム “Evolution and diversity of Legume - Soil Bacteria Symbiosis”

日時・場所： 2018年8月30日 17:30 - 19:00・仙台市戦災復興記念館

オーガナイザー： Milagros Leon Barrios (La Laguna University, Spain); Kojiro Takanashi (Shinshu University, Japan); Tadashi Kajita (University of the Ryukyus, Japan)

- ① Wide diversity of the endemic Lotus and their symbiotic rhizobia in the Canary Islands: an overview
Milagros Leon-Barrios^{*1}, Marcelino del Arco-Aguilar² (¹Department of Biochemistry, Microbiology, Cell Biology and Genetics. Universidad de La Laguna. Tenerife. Canary Islands. Spain. ; ²Department of Botany, Ecology and Plant Physiology. Universidad de La Laguna. Tenerife. Canary Islands. Spain.)
- ② Lotus species in Canary Islands and nodulating bacterial communities in their habitats
Masaru Bamba^{*1}, Milagros León-Barrios², Marcelino del Arco-Aguilar², Seishiro Aoki³, Koji Takayama⁴, Tadashi Kajita⁵ (¹Graduate school of Science and Engineering, Chiba University ; ²Universidad La Laguna ; ³Graduate School of Science, the University of Tokyo ; ⁴Graduate school of Science, Kyoto University ; ⁵Iriomote Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus)
- ③ Comparative genome analysis of rhizobia associated with Japanese accessions of *Lotus japonicus*
Hiroko Maita¹, Mingzhuo Wang¹, Shogo Nitanda¹, Shohei Kusakabe¹, Hideki Hirakawa², Kazuhiko Saeki³, Shusei Sato^{*1} (¹Graduate School of Life Sciences, Tohoku University ; ²Kazusa DNA Research Institute ; ³Faculty of Science, Nara Women)
- ④ Dispersal of *Oxytropis*-rhizobia symbiosis from the Arctic to Japanese alpine region
Kojiro Takanashi* (Fac. Sci., Shinshu University)
- ⑤ From Beta- to Alpha-proteobacteria: The origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*
Seishiro Aoki^{*1}, Motomi Ito², Wataru Iwasaki¹ (¹Graduate School of Science, The University of Tokyo ; ²Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo)
- ⑥ Experimental evolution of bradyrhizobial symbiosis island by symbiotic incompatibility
Kiwamu Minamisawa* (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Masaru Bamba, Seishiro Aoki, Tadashi Kajita, Hiroaki Setoguchi, Yasuyuki Watano, Shusei Sato, and Takashi Tsuchimatsu. Exploring Genetic Diversity and Signatures of Horizontal Gene Transfer in Nodule Bacteria Associated with *Lotus japonicus* in Natural Environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 査読有. in press. 2019. DOI: 10.1094/MPMI-02-19-0039-R
- ② Masaru Bamba, Sayuri Nakata, Seishiro Aoki, Koji Takayama, Juan Nunez Farfan, Motomi Ito, Masaki Miya, Tadashi Kajita. Wide distribution range of rhizobial symbionts associated with pantropical sea-dispersed legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 査読有. Vol. 109. 2016. 1605-1614. DOI: 10.1007/s10482-016-0761-y

[学会発表] (計 12 件)

- ① Masaru Bamba, Milagros Leon-Barrios, Marcelino del Arco-Aguilar, Seishiro Aoki, Koji Takayama, Tadashi Kajita. Lotus species in Canary Islands and nodulating bacterial communities in their habitats. 7th International Legume Conference. 2018.
- ② Milagros Leon-Barrios, Marcelino del Arco-Aguilar. Wide diversity of the endemic Lotus and their symbiotic rhizobia in the Canary Islands: an overview. 7th International Legume Conference. 2018.
- ③ Seishiro Aoki, Motomi Ito, Wataru Iwasaki. From Beta- to Alpha-proteobacteria: The origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*. 7th International Legume Conference. 2018.
- ④ 番場大, Milagros Leon-Barrios, Marcelino Jose Del Arco Aguilar, 青木誠志郎, 高山浩司, 梶田忠. カナリア諸島における Lotus 属植物と共生者群集の関係. 日本植物分類学会第17回大会. 2017.
- ⑤ Masaru Bamba, Seishiro Aoki, Koji Takayama, Motomi Ito, Masaki Miya, Tadashi Kajita. Spatial structure of rhizobial communities in sandy beach environments. International Botanical Congress 2017. 2017.

- ⑥ 番場大・青木誠志郎・高山浩司・伊藤元己・宮正樹・梶田忠. 西表島海浜土壌に含まれる根粒菌群集. 日本植物分類学会第16回大会. 2017.
- ⑦ 番場大, 中田さゆり, 青木誠志郎, 高山浩司, J. N. Farfan, 宮正樹, 伊藤元己, 梶田忠. 汎熱帯海流散布マメ科植物に共生する根粒菌. 日本植物学会第79回大会. 2015.

[その他]

ホームページ等: 7ILC Symposium http://7ilc.info/regform/Symposium_toc.php?s_order=011

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 高山 浩司

ローマ字氏名: TAKAYAMA, Koji

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 理学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 60647478

研究分担者氏名: 青木 誠志郎

ローマ字氏名: AOKI, Seishiro

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 大学院理学系研究科

職名: 特任研究員

研究者番号 (8桁): 60647478

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 番場 大

ローマ字氏名: BAMBA, Masaru

研究協力者氏名: León-Barrios, Milagros

研究協力者氏名: del Arco-Aguilar, Marcelino

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。