

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06282

研究課題名(和文) 共生の宿主植物が微生物パートナーの不正を防ぐ仕組みの解析

研究課題名(英文) host mechanism for preventing partner's cheating in legume-rhizobia symbiosis

研究代表者

中川 知己 (Nakagawa, Tomomi)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・特別協力研究員

研究者番号：90396812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌と相利共生を行っており、光合成産物の提供と引き替えに窒素栄養を得ることができる。理論的には光合成産物を宿主のために使わずに自身の繁殖にのみ使う根粒菌が有利になると推測されるが、実際にはこのような問題はほとんど起きていない。我々はマメ科植物のミヤコグサが、誠実に窒素固定する根粒菌を膨大な数に増やして土壤中に還元する一方で、窒素固定を行わない根粒菌を死滅させる「信賞必罰」の仕組みを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「異なる生物同士がどのように協調しあえるのか？」という問題は、自然界だけではなく我々人間社会においても常に重要な問題である。数理的には少数で協調-非協調の二択などの限られた状況における解析などが行われているが、自然界や実社会のように無数の参加者があらゆる選択肢を持つ条件で理想的な答えを見つけるのは不可能である。マメ科植物は7千万年以上も根粒菌と相利共生を行っており、共生パートナーによる裏切り・不正などがほとんど問題にならない。我々が発見した「信賞必罰」を明確にして誠実なパートナーを維持する仕組みは、協調関係を築いて維持するための究極の答えであると期待される。

研究成果の概要(英文)：Maintenance of good relationship is a key issue for our lives although the difficulty is always bothering us. On the other hand, legumes keep mutualistic relationships with soil bacteria, called rhizobia, more than 70 million years and provide carbon nutrients to rhizobia in exchange for the supply of nitrogen nutrient from rhizobia. In this relationships, rhizobial cheatings such as receiving carbon nutrients without nitrogen nutrients supply are rarely known in natural environment. We are focusing on this and studying the host mechanism for preventing partner's cheating in legume-rhizobia symbiosis.

We artificially create cheating rhizobia by disrupting genes for nitrogen fixation. The cheating rhizobia can infect and induce small nodules on host roots. Inside these nodules, cheating rhizobia are eliminated by host digestion. In contrast, honest rhizobia are markedly increased and released to surrounding soil. As a result, "honest rhizobia" are dominant around leguminous plants.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根粒菌 マメ科植物 cheating

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は、大気中の窒素ガスをアンモニアに変換する窒素固定活性を持つ根粒菌と共生することで、窒素栄養の乏しい土壌でも旺盛に生育できる。根粒菌は窒素固定の見返りに大量の光合成産物を宿主から受け取る。自然界には窒素固定せずに光合成産物を得る根粒菌の不正(cheating)が知られている。宿主のために働く根粒菌と比較して、自身の繁殖のみに専念する cheating 根粒菌は生存競争で有利であることは自明である。しかし実際には特殊な例を除いて、cheating 根粒菌は問題になった例は知られていない。

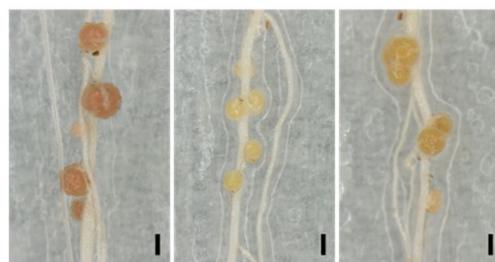
宿主に根粒菌の cheating を防ぐ仕組みがある可能性が考えられるが、この問題については世界的にもほとんど研究が行われていなかった。我々は cheating 根粒菌が感染した時に白い小さな根粒で発達が停止することに着目して、cheating 根粒菌に対して赤い大きな根粒を形成してしまうミヤコグサの変異体を世界で初めて単離していた。

窒素固定能力を持たない根粒菌は、人工的には容易に作出することが可能である。しかし自然界においては、相互認識プロセスの不備によって結果的に窒素固定能力を発現できない例は知られているが、本当に窒素固定能力を持たない根粒菌の存在は知られていなかった。つまり理論的には有利であるはずの cheating 根粒菌が、自然界で本当に発生しうるかについても不明である状況であった。



(A) 野性型根粒菌は大きな赤い成熟根粒を誘導するが(上)、窒素固定しない根粒菌も白い小さな根粒を誘導できる(下)。(B) 野性型ミヤコグサに根粒菌を感染させると窒素栄養を含まない土壌でも旺盛に生育する(左)。一方でミヤコグサの *nif1* 変異体では根粒菌が感染できないために生育が悪い(中)。しかし Cheating 根粒菌が感染した場合(右)は、共生しない状態(中)よりもさらに生育が悪くなる。

植物:	WT	WT	<i>pink4</i>
根粒菌:	WT	$\Delta nifSW$	$\Delta nifSW$



野性型ミヤコグサに野性型根粒菌が感染すると大きなピンク色の根粒が形成される(左)。しかし窒素固定遺伝子を欠損した  $\Delta nifSW$  根粒菌の根粒は白く小さな根粒の段階で発達が停止する(中)。我々が単離したミヤコグサの *pink4* 変異体は、 $\Delta nifSW$  根粒菌に対して野性型根粒に近い根粒を形成してしまう(右)。Bar: 1mm

## 2. 研究の目的

ミヤコグサ *pink4* 変異体を用いて、宿主が根粒菌の窒素固定をしない cheating を防ぐ仕組みを解明する。また、自然界において cheating 根粒菌がどのくらいの割合で存在するかを調べる。

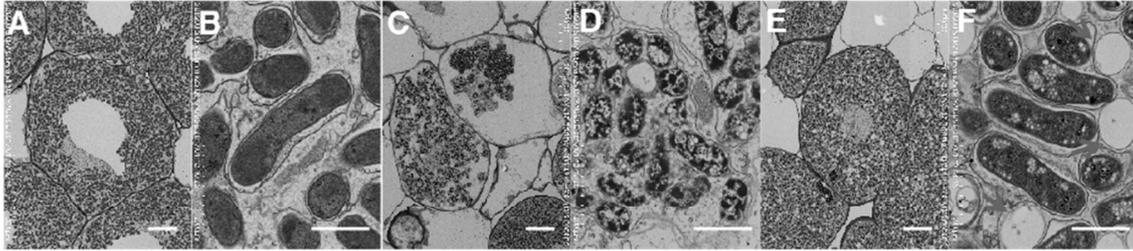
## 3. 研究の方法

これまで多くの研究者が土壌および根粒から根粒菌を単離してきたが、白い未熟根粒から根粒菌がほとんど単離できないことが知られていた。長年、この原因はわかっていなかったが、後述のように我々の研究で、cheating 根粒菌は根粒内で死滅させられることが判明した。これが主要因であれば、*pink4* 変異体で自然界の cheating 根粒菌を単離できることが期待できる。これを検証するために、研究協力者の助力を得て東北大学の鹿島台圃場で cheating 根粒菌の探索を行った。

野性型ミヤコグサおよび *pink4* 変異体の表現型を比較解析して、宿主植物が cheating を防ぐ方法を検証した。

## 4. 研究成果

最初に我々は、野性型ミヤコグサで cheating 根粒菌が感染した時に形成される白い根粒の内部で何が起きているかを解析した。電子顕微鏡で観察したところ、宿主細胞内で cheating 根粒菌が溶かされて死滅している様子が観察できた。*pink4* 変異体では根粒菌を溶かすためと推測される小胞が多数観察されたが、根粒菌を包む膜に融合する最終段階が阻害されているようで、結果として cheating 根粒菌は死滅させられていなかった。

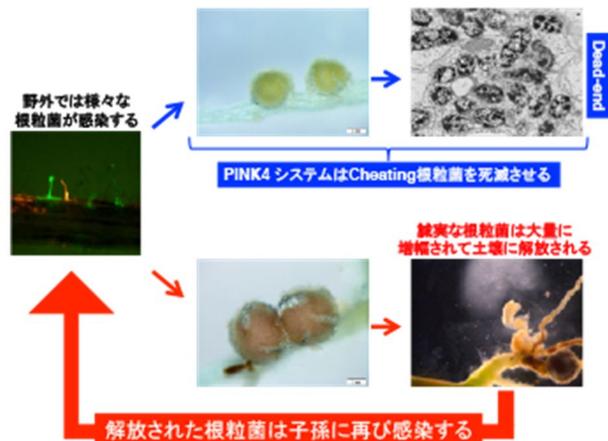


窒素固定活性を持つ根粒菌が共生する宿主植物感染細胞(A)では、バクテロイド(B)は健全である。cheating根粒菌が感染した野性型植物の感染細胞では、過敏感細胞死様の応答(C)が生じて、大部分のバクテロイドが消化され死滅している(D)。一方でpink4変異体のcheating根粒菌が感染した細胞では細胞死が生じておらず(E)、Lytic vacuoleと呼ばれる小胞(矢印)が多数形成されるがcheating根粒菌は攻撃されずに生存している(F)。スケールバー: 10 um (A, C, E)もしくは1 um (B, D, F)

我々は窒素固定する誠実な根粒菌の共生終了後の動態についても解析を行った。ミヤコグサとは異なる形態の根粒を形成するグループに属するエンドウやタルウマゴヤシにおいては、正常に窒素固定する根粒菌も共生終了後に死滅させられることが判明している。ミヤコグサやダイズなどのグループにおける共生終了後の根粒菌の動態については解析されていなかったが、我々はミヤコグサで共生終了後に根粒菌が大量増殖して土壤中に脱出することを発見した。つまりミヤコグサでは、cheatingが判明すると根粒菌は土壤中に脱出できずに死滅させられてしまう一方で、誠実な根粒菌は膨大な数が土壤中に放出される。結果として宿主植物の周囲の土壌は、誠実な根粒菌が優性になっていくと推測された。

これを検証するために、閉鎖系ポットで誠実な根粒菌とcheating根粒菌を混合接種して動態を調べたところ、最初にcheating根粒菌の1/60しか存在しなかった誠実な根粒菌が、共生を経ることで優占種になることが実証できた。また研究協力者の佐藤修正博士によって、ダイズ圃場跡にミヤコグサを植えると、実験開始当初はダイズ根粒菌が優占であったものが、速やかにミヤコグサ根粒菌に置き換わることが判明している。したがってミヤコグサなどの根粒菌共生の宿主植物は、働いた根粒菌を繁殖させて働かない根粒菌を死滅させる「信賞必罰」の仕組みによって、周囲の微生物群集を制御していることが明らかとなった。

次に自然界におけるcheating根粒菌の存在についても解析を行った。鹿島台圃場のミヤコグサが生えていない土壌を用いてpink4変異体に根粒を形成させた。形成された根粒の中で、他の根粒と比較して赤みの薄いcheating根粒菌の感染が疑われる根粒を採取して、根粒表面を滅菌後に根粒を破碎して培地で培養した。得られたコロニーを野性型ミヤコグサおよびpink4変異体に再接種して、窒素栄養を与えずに生育させた。その結果、根粒が形成されているにもかかわらずミヤコグサの生育が悪い根粒菌株が得られた。これらの根粒菌株はゲノムシーケンスによって解析を行っているが、一部は窒素固定遺伝子群の発現を制御するマスター因子に異常があり、実際に窒素固定を全く行えない可能性が高い。つまり実際に自然界ではcheating根粒菌が発生し続けているが、宿主植物のPINK4システムによって排除される一方で誠実な根粒菌は繁殖させる信賞必罰の仕組みによって、誠実な根粒菌が周囲の優占種になるように制御されている可能性が示唆された。上述の我々の発見は近年特に注目されている土壌微生物群集の研究に新しい概念をもたらすことが期待される。



マメ科植物は働かない根粒菌を過敏感細胞死様の応答で死滅させる一方で、働いた誠実な根粒菌は爆発的に増殖させて土壤中に解放する。解放された根粒菌は次世代の宿主植物に感染するので、世代を経るごとに誠実な根粒菌が土壌中で優勢となっていく。我々の発見したPINK4は、働かない不正な根粒菌を死滅させる役割を果たしていると推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokumoto Y, Hashimoto K, Soyano T, Aoki S, Iwasaki W, Fukuhara M, Nakagawa T, Saeki K, Yokoyama J, Fujita H, Kawaguchi M	4. 巻 133
2. 論文標題 Assessment of <i>Polygala paniculata</i> (Polygalaceae) characteristics for evolutionary studies of legume-rhizobia symbiosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Plant Res.	6. 最初と最後の頁 109-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-019-01159-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobae Y, Ohtomo R, Morimoto S, Sato D, Nakagawa T, Oka N, Sato S	4. 巻 8
2. 論文標題 Isolation of Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi within Young Thalli of the Liverwort <i>Marchantia paleacea</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plants (Basel)	6. 最初と最後の頁 E142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants8060142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomomi Nakagawa
2. 発表標題 Legumes strategically control their microbial environment
3. 学会等名 The Plant Microbiome 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川知己
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌の共生開始に防御応答を担うCERK1が関与する
3. 学会等名 JCOM2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------