

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：84202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14784

研究課題名(和文) マメ科植物の地域適応に關与する根粒菌のゲノム進化 - 共生關係の創出維持機構の解明 -

研究課題名(英文) Comparative genomics of rhizobia nodulating beach pea ecotypes between heterogeneous environments

研究代表者

大槻 達郎 (Ohtsuki, Tatsuo)

滋賀県立琵琶湖博物館・研究部・主任学芸員

研究者番号：60760189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌は、種類によって特定のマメ科植物(宿主)と共生する(寄主特異性)。宿主が同種であるが異なる環境に適応した生態型の場合、宿主特異性が維持されるかは不明である。本研究では、各々の生態型に付着する根粒菌のゲノムを明らかにすることで、宿主特異性の創出・維持機構の解明を目指した。宿主から単離培養した根粒菌の系統解析(16SrRNA遺伝子)では、生態型間における特異性は確認できなかった。そこで、宿主に相互感染実験を行い、直接特異性を明らかにすることを試みたが、根粒数や根粒の大きさには違いが見られたものの、現時点では宿主の成長には大きな違いは確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地域適応は生物多様性を創出する主要な原動力である。近年の進化研究では、分子遺伝学や生態学の知見を基に多様化プロセスに迫る研究が求められるが、本研究はそうした潮流に合致する。さらに、根粒共生系の進化という、生物間相互作用の多様性と進化の過程を明らかにする点で、生物多様性の根本的な仕組みに迫ることができる。

研究材料(寄主)は滋賀県の絶滅危惧種に指定されており、行政や地域住民から保全手法の確立が強く求められている植物である。本研究の知見は、保全に関わるステークホルダーの活動を支援できる点において、社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Soil bacteria called rhizobia infect leguminous plants to form root nodules for bacterial nitrogen fixation. Formation nodule require the specific recognition of host and rhizobium. This symbiosis has been widely studied as the model of mutualistic evolution. Especially, the genetic variants that underlie host specific adaptation are key components of models of microbial diversification.

Originally, I was planning to observe ecotypic specialization of rhizobia and characterize genomic variation to adaptive divergence between distinct environments. Phylogenetic analyses revealed vast genetic variations of the rhizobia between contrasting soil types. At the moment, results of the clustering implied no host specificities between in soil types. Further, cross-infection experiments between host plant and rhizobia respectively showed no differences in plant growth, in spite of the difference in the numbers of rhizobia between in soil types.

研究分野：生物多様性・分類

キーワード：ゲノム進化 地域適応 共生 根粒菌 マメ科植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 地域適応は生物多様性を創出する主要な原動力である。例えば、海浜と内陸に隔離分布する植物では、両環境間で種内に表現型の顕著な分化が見られる。近年の進化研究では、地域適応における遺伝子流動や生理生態の知見を基に多様化プロセスに迫る研究が求められている。申請者は、分子遺伝学的基盤と生理解析の手法が確立されているマメ科植物に着眼し、上記の視点から種内の遺伝的・生理生態的分化を実証し、地域適応機構の総合的な解明を目指してきた。

(2) ハマエンドウは海浜に生育するマメ科植物であるが、一部が淡水の水辺に進出している種である。これまでの研究では、水辺に進出した本種のエコタイプ(湖岸タイプ)は、淡水の湖岸において海浜タイプのものよりも成長することが示されている。また、湖岸・海浜エコタイプに付着した根粒菌に着目すると、根粒形成に關与する nod 遺伝子の配列が異なることが明らかとなっている。しかし、根粒菌の宿主特異性および地域特異的なゲノム進化については未解明である。特に、海浜由来の根粒菌が本種と共に水辺に定着したのか、自生の根粒菌と新しい共生関係を構築したのかについては不明である。したがって、地域適応の進化機構を理解するには、根粒菌の進化過程を分子遺伝学的に復元・推定する研究が必要である。

2. 研究の目的

(1) 現在水辺と海浜には多様な根粒菌が確認されているが、本種のエコタイプと共生関係を強化した根粒菌の系統(specialist)は存在するのだろうか？本研究は、水辺・海浜の宿主に付着する根粒菌にどの程度特異性があるのかを明示するとともに、自生地の根粒菌が宿主の成長にどの程度關与しているかを明らかにする。

(2) また、根粒菌のゲノム構造を比較することで、水辺のエコタイプに付着する根粒菌の由来・来歴とともに、共生遺伝子群の進化過程を明らかにするとともに、根粒菌接種実験の結果と総合して、地域における宿主特異性の進化過程と共生関係の創出・維持機構を解明することを目的とする。

(3) この問いへの答えは複数考えられる。Specialist が存在すれば、環境の違いから生じる根粒菌の地域適応を証明できる。宿主が多種の根粒菌と共生する場合は、宿主特異性が強くないことが明らかになる。こうした共生関係の創出・維持機構の解明は、進化多様性科学において根源的なテーマである。

3. 研究の方法

(1) ハマエンドウに付着する根粒菌の単離・培養は、「ミヤコグサ基礎実験マニュアル」を改良し、根粒菌の洗浄法や様々な培地を使用し、最適な方法を考案した。また、根粒菌は i) 植物体から切り離さず採取し、冷蔵庫に入れて保存する方法、ii) 根粒菌を植物体から切り離した後に乾燥させて保存する方法、iii) 根粒菌を植物体から切り離した後に湿ったキムワイブにくるみ冷蔵庫に入れる方法などを試行し、培養した際に安定して増殖する方法を確立した。

(2) 系統解析では、単離培養した根粒菌における 16SrRNA 遺伝子と nodBC の配列を取得した。

(3) 培養した地域株の懸濁液は濃度を合わせ、各集団の植物体に単独接種を行い、1ヶ月間成長させた。植物体を回収し、根粒と根を撮影し、付着する根粒数とサイズについて画像処理ソフトを用いて算出した。

4. 研究成果

(1) 根粒菌の単離培養系の確立し、保存方法も確立した。根粒菌は植物体から切り離さず保存することで、6か月以上経てサンプルでも単離・培養することができた。これで、単離・培養実験のスケジュールを組めるようになった。

(2) 16SrRNA 遺伝子の系統解析において、海浜で様々な系統が見つかった。*Rhizobium leguminosarum* が多数を占めたが、*R. sophorae* 等、他のマメ科植物と共生する根粒菌が確認された。海浜個体に付着する根粒菌は、土壌が砂で根茎が木化したような根に付着するものは竿型が多く、クラスターを形成していた。一方、砂粒の大きなところに生育していた植物体に付着していた根粒菌は根にまばらに付着し、丸い形状のものであった。系統解析の結果が多様である理由として、採取する段階で形態や根粒の分布が異なることが考えられた。そこで、系統解析ベースではなく、根粒菌の単独接種実験からゲノム解析用の菌株を選択することにした。

(3) 根粒菌の単独接種実験では、根粒数や根粒の大きさに違いがでるものの、現時点では湖岸と海浜由来のハマエンドウにおいて、成長の差が出るものは見つかっていない。これまでの相互移植実験では、根粒菌の付着数や植物体の大きさに違いが出たことを考慮すると、培地ではなく、滅菌した湖岸・海浜の砂を用いて再度実験する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 サゴン・ジン, キム・サンギ, チェ・ピュンソ, 田畑諒一, 大槻達郎, リュ・シヒョン, ユ・ジョンナム
2. 発表標題 韓国産テナガエビの遺伝的集団構造 (韓国語)
3. 学会等名 第74回韓国動物分類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 優介, 大槻 達郎, 野間 直彦, 原田 英美子
2. 発表標題 伊吹山に自生するヨーロッパ原産帰化植物の移入経路
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻 達郎
2. 発表標題 地表徘徊性昆虫がハマエンドウの発芽に与える影響
3. 学会等名 日本植物分類学会第19回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島優介・久保直輝・田畑諒一・大槻達郎・首藤光太郎・野間直彦・原田英美子
2. 発表標題 伊吹山に自生するヨーロッパ原産帰化植物の移入経路 イブキノエンドウの分布調査および遺伝子解析
3. 学会等名 日本植物分類学会第19回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大槻 達郎
2. 発表標題 海浜植物ハマエンドウの種子に寄生するマメゾウムシの寄生率の年変動
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大槻達郎
2. 発表標題 海浜植物の種子に寄生するマメゾウムシの寄生率の変動
3. 学会等名 日本植物分類学会第18回大会，首都大学東京 南大沢キャンパス（東京都八王子市）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻達郎
2. 発表標題 Physiological differentiation inferred from germination rate between coastal and freshwater populations of the beach pea
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会，神戸国際展示場（兵庫県神戸市）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

年報・業績目録 https://www.biwahaku.jp/research/publication/report/
--

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
---------	---------