

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18595

研究課題名(和文) マメ科植物の分布域拡大に伴う共生根粒菌ゲノムの伝播と進化

研究課題名(英文) Evolution and horizontal transfer of rhizobia genome isolated from Japanese alpine legumes

研究代表者

高梨 功次郎 (TAKANSHI, Kojiro)

信州大学・先鋭領域融合研究群山岳科学研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：10632119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌と共生することで、窒素栄養を効率よく得ることが出来る。そのためマメ科植物は高山帯崩壊地など貧栄養土壌におけるパイオニア植物として、土壌の栄養化を担っている。このマメ科植物-根粒菌共生系はある程度厳格な宿主特異性を有しているため、日本のマメ科高山植物が周極地域から日本に侵入した際に、共生根粒菌も一緒に日本に入ってきたと考えられるが、その実態は未解明であった。本研究では、日本のマメ科高山植物とその共生根粒菌の系統解析を行い、共生根粒菌のゲノムがマメ科高山植物と共に移動していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Horizontal gene transfer plays an important role in the evolution of bacteria that can add novel abilities, such as environmental tolerance, pathogenicity, and symbiotic nitrogen fixation (SNF) with legume plant. Since SNF is established in a species-specific manner, the horizontal transfer of symbiosis islands may contribute to the host specificity of symbiosis between legume plants and rhizobia, however, knowledge about the host specificity mediated by horizontal transfer of symbiosis islands in nature is very limited. In this study, genetic relationships between alpine legumes and their rhizobia were analysed and resulted that host specificity of legume-rhizobia symbiosis was conserved partly in genus-specific manner. This result suggested that the horizontal transfer contributes to keep the host specificity to some extent.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：マメ科植物 共生遺伝子 水平伝播 根粒菌 高山植物

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物はその根において窒素固定細菌(根粒菌)と共生系を確立し、高効率の窒素固定器官である根粒を形成する。そのためマメ科植物は高山帯崩壊地など貧栄養土壌におけるパイオニア植物として、土壌の栄養化を担っている。同種植物に共生する根粒菌は高度に保存された共生遺伝子群を有している。これは、マメ科植物は自身が共生する根粒菌を他種の根粒菌や病原菌と厳密に区別していることを意味している。共生遺伝子群は通常、根粒菌ゲノムの可動性の領域(共生プラスミド)に集中しており、土壌細菌(非根粒菌)が共生プラスミドを水平伝播によって獲得すると、マメ科植物と共生可能な根粒菌となる。マメ科植物の移動と共生プラスミドの水平伝播が同調するため、マメ科植物は新天地でも共生パートナーを見出すことが可能となると推測されている。しかし、野生集団における共生プラスミドの水平伝播の実態は未解明のままであり、マメ科植物が新天地で単に全く新しい共生パートナーを見出している可能性も残る。

2. 研究の目的

本研究では、日本の高山におけるマメ科植物—根粒菌共生系をモデルとして、野生集団のマメ科植物の分布域拡大に伴う根粒菌共生遺伝子の水平伝播の実態の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マメ科高山植物 根粒菌共生系の系統

日本国内の山域5地点から、2種のマメ科高山植物(オヤマノエンドウおよびイワオウギ)を採取し、その共生根粒菌を単離する。単離した根粒菌の属を16S rRNAの配列により調べた後、系統をバーコード遺伝子である *recA* と *glnI* の配列を用いて調べる。その後、共生プラスミド上の遺伝子である *nodC* や *nifH* の配列を調べ、共生プラスミドの系統も明らかにする。系統ごとに代表根粒菌を選抜し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を取得する。取得した配列ごとの相同性を調べ、根粒菌間および共生プラスミド間の系統関係を詳細に調べる。

(2) オヤマノエンドウ属 根粒菌共生系の系

統

(1)で得られた結果をより詳細に調べるため、オヤマノエンドウ属マメ科植物について、植物の系統と共生根粒菌の系統および共生遺伝子を調べる。オヤマノエンドウ属植物を5種採取し、その共生根粒菌の系統を調べる。また、カナダ東北部において *O. arctobia* と共生する根粒菌も入手し、そのゲノム配列を比較する。

4. 研究成果

(1) マメ科高山植物 根粒菌共生系の系統

まず、日本の高山5地点より、マメ科高山植物であるイワオウギ (*Hedysarum vicioides*) とオヤマノエンドウ (*Oxytropis japonica*) の共生根粒菌を単離して16S rRNAの配列を調べたところ、そのほとんどが *Mesorhizobium* 属に属する根粒菌であった。一部、*Agrobacterium* 属や *Paenibacillus* 属の細菌も単離された。*Mesorhizobium* 属と同定された系統について *recA* と *glnI* の部分配列を取得し、それぞれ系統解析を行ったところ、採取山域毎に系統的に近縁である傾向が見られた。次に共生遺伝子群である *nodC* の部分配列を取得し系統解析を行ったところ、非常に近縁であるが同一宿主ごとにまとまる結果になった。山域毎および宿主毎の代表根粒菌を選定し、それらのゲノム配列をMiSeqおよびPacBio IIを用いて調べたところ、ほとんどのゲノム領域は採取山域毎に高い類似性を有していた。一方、共生プラスミドは、採取した山域に関わらず宿主植物毎に非常に高い類似性を有していた。*nodC* の系統解析では、オヤマノエンドウ根粒菌とイワオウギ根粒菌は非常に近縁であるという結果だったが、共生プラスミド全体の相同性は低く、同じ宿主植物に共生する根粒菌間でより相同性は高かった。これらの結果から、高山植物の分布変遷に伴い共生根粒菌も移動したこと、およびその共生アイランドが移動先の土壌細菌に水平伝播したことが強く示唆された。

(2) オヤマノエンドウ属 根粒菌共生系の系統

オヤマノエンドウとイワオウギの共生根粒菌は非常に相同性の高い共生遺伝子を有していたことが判明した。この2種の植物は属は異なるものの非常に近縁であり、祖先集

団は同じ根粒菌と共生していることが示唆された。そのため、続く研究では同属であるが種が異なる植物種間において、共生遺伝子の保存性を調べることにした。オヤマノエンドウ属の植物5種（オヤマノエンドウ；マシケゲンゲ、*O. shokanbetsuensis*；レブンソウ、*O. megalantha*；ヒダカミヤマノエンドウ、*O. retusa*；*O. nigrescens*）を採取し、共生根粒菌が共生関係を種特異的に築くのか、もしくは属特異的に築くのかを確認した。まず、採取したオヤマノエンドウ属植物の系統解析を葉緑体遺伝子である *rbcL* および *matK* を用いて行ったところ、オヤマノエンドウ属は大きく2つのグループに分かれることが明らかとなった。採取した5種の中では、*O. japonica* と *O. nigrescens* が同じグループに属し、他の3種はもう1つのグループに属した。続いてそれぞれの共生根粒菌の系統解析を行ったが、オヤマノエンドウ属のグループ特異的な共生関係は見られず、また、種特異的な関係も見られなかった。代表根粒菌を選定し、PacBio II を用いて全ゲノム配列を調べたところ、生育地が近い根粒菌程、共生プラスミドを含むゲノム領域の相同性が高いことが判明した。これらのことから、高山におけるマメ科植物—根粒菌共生系の宿主特異性は属レベルで維持されていることが推測された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Takanashi K., Yamada Y., Sasaki T., Yamamoto Y., Sato F., Yazaki K. A multidrug and toxic compound extrusion transporter mediates berberine accumulation into vacuoles in *Coptis japonica*. *Phytochemistry* (2017) 138: 76-82. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.03.003>.

Sugiyama A., Saida Y., Yoshimizu M., Takanashi K., Sosso D., Frommer W.B., Yazaki K. Molecular characterization of LjSWEET3, a sugar transporter in nodule of *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* (2017) 58: 298-306. 査読有

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw190>.

Takanashi K., Sasaki T., Kan T., Saida Y., Sugiyama A., Yamamoto Y., Yazaki K. A dicarboxylate transporter, LjALMT4, mainly expressed in nodules of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2016) 29:584-592. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-04-16-0071-R>.

〔学会発表〕（計 7 件）

川井友裕、瀬尾直登、池田啓、佐藤修正、矢崎一史、高梨功次郎、日本のマメ科高山植物—根粒菌共生系の系統と宿主特異性、日本植物分類学会第16回大会、2017.3.10-12、京都

川井友裕、瀬尾直登、池田啓、矢崎一史、高梨功次郎、マメ科高山植物に共生する根粒菌の宿主特異性、第26回植物微生物研究会、2016.9.7-9、仙台

高梨功次郎、佐々木孝行、菅智博、齊田有佳、余湖未笛、杉山暁史、山本洋子、矢崎一史、ミヤコグサ根粒で発現する有機酸輸送体の解析、第26回植物微生物研究会、2016.9.7-9、仙台

高梨功次郎、池田啓、瀬尾直登、佐藤修正、矢崎一史、日本の高山帯から単離された根粒菌のゲノム解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016.3.27-30、札幌

瀬尾直登、高梨功次郎、矢崎一史、日本高山のマメ科植物共生根粒菌の系統と宿主特異性、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016.3.4-5、東京

高梨功次郎、池田啓、瀬尾直登、佐藤修正、矢崎一史、マメ科高山植物から単離した共生根粒菌のゲノム配列、第25回植物微生物研究会、2015.9.14-16、つくば

高梨功次郎、池田啓、瀬尾直登、佐藤修正、矢崎一史、マメ科高山植物の分散に伴う共生根粒菌ゲノムの水平伝播、日本植物学会第79回大会、2015.9.6-8、新潟

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/molecularsymbiology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高梨 功次郎 (TAKANASHI, Kojiro)

信州大学・先鋭領域融合研究群山岳科学研究所・助教 (特定雇用)

研究者番号 : 10632119