

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02884

研究課題名(和文)細胞内共生成立後の宿主による根粒菌選別機構の解明と土壌根粒菌叢への影響の評価

研究課題名(英文) Elucidation of the host-mediated selection mechanism for rhizobia after intracellular symbiosis establishment and evaluation of its impact on the soil rhizobial community

研究代表者

佐藤 修正 (Sato, Shusei)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70370921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：宿主によるcheating根粒菌(感染能力を持つが窒素固定を行わない根粒菌)への制裁機構は、共生関係を維持する上で重要な機構であるが、その実態は不明な点が多い。本研究では、ミヤコグサを用いて単離した制裁機構の変異体とそれを用いて圃場から単離した窒素固定レベルの異なるcheating根粒菌株を用いて宿主制裁機構の解明を行った。その結果、cheating根粒菌に対する制裁が、窒素固定能に応じた根粒菌の溶菌レベルの制御により成立していることを明らかにした。同時に、この制裁機構に関わる遺伝子が被子植物で広く保存されており、正常な根粒菌の共生により発現レベルが低下することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であった根粒特異的な抗菌ペプチドを持たないミヤコグサにおけるcheating根粒菌に対する制裁機構が、マメ科植物に特異的なものではなく、被子植物に広く保存されている防御反応を応用している可能性が示された。今後この遺伝子の機能解析や共生過程で制御機構の解析を進めることにより、細胞内共生の成立起源につながるような知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The host sanction system against cheating rhizobia (infectious but non-nitrogen fixing rhizobia) is the crucial mechanisms for maintaining symbiotic relationships. In this study, we investigated the molecular mechanisms of host sanction system by using its mutant isolated in *L. japonicus* and filed isolated cheating rhizobia with different levels of nitrogen fixation. As a result, we revealed that the sanctions against cheating rhizobia are mediated through the control of membrane mediated rhizobial lysis levels corresponding to their nitrogen-fixing abilities. Additionally, we found that the causal gene of the mutant is widely conserved in angiosperms, and their expression levels decrease during symbiosis with functional rhizobia.

研究分野：植物-微生物相互作用

キーワード：宿主-根粒菌相互作用 Cheating根粒菌 宿主制裁機構 溶菌制御 G x G 相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内への根粒菌の受け入れを伴うマメ科植物と根粒菌の共生系において、共生相手の選別は重要であり、宿主植物は根粒菌が分泌する Nod ファクターの構造や根粒菌の細胞外多糖の構造を認識し受け入れる根粒菌を選別している。このような根粒菌の侵入を制御する機構に加えて、細胞内共生成立後の根粒菌の選別応答として、窒素固定活性を持たない菌に対する”sanction”と呼ばれる宿主制裁機構が知られている。

Nod ファクター合成や細胞外多糖の合成等に関わる遺伝子とは独立である窒素固定遺伝子群に変異が生じれば、細胞内共生に至る認識経路は正常であるが、窒素固定活性を持たない菌も生じうる。”sanction”システムはこのような根粒菌(宿主に不正を行う根粒菌という意味合いで”cheating 菌”と呼ばれる)に対する防御戦略として、窒素固定活性に応じて根粒の成熟を止めるシステムとして提唱され(図1)、タルウマゴヤシやエンドウなどの根粒特異的な抗菌ペプチドを持つマメ科植物では、そのペプチドとの関連で議論が進められてきたが、ダイズやミヤコグサなど抗菌ペプチドを持たないマメ科植物では、その実態は不明であった。

我々は、ミヤコグサにおいても根粒菌の窒素固定活性を感染細胞単位で監視していること、cheating 菌による不正を検知した場合に菌を死滅させる現象が存在する発見し、この機構が破綻し cheating 菌に対しても赤色の根粒を形成する変異体のスクリーニングを行い、候補変異体(*pink4* 変異体)を単離していた(図2)。また、この変異体で cheating 菌が生残する特性を利用して、自然界に存在する cheating 菌の単離を試み、東北大学の圃場から4株の cheating 菌の候補菌株の単離に成功していた。

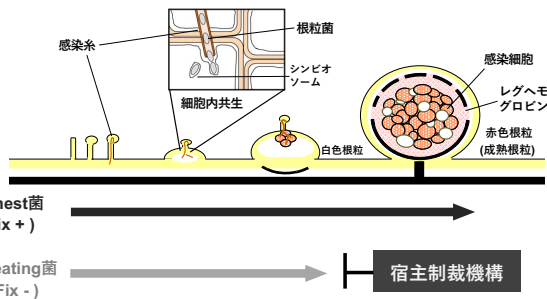


図1. 根粒菌共生過程とcheating 菌に対する宿主の制裁

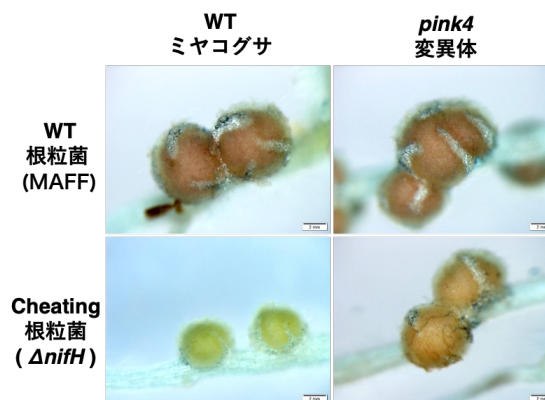


図2. *pink4* 変異体の表現型

マメ科植物は通常、赤い大きな根粒を形成するが、cheating 根粒菌に対しては白い小さな根粒を形成する。我々が単離した *pink4* 変異体は、cheating 根粒菌に対して赤い大きな根粒を形成する。

### 2. 研究の目的

本研究では、単離した *pink4* 変異体と cheating 菌の菌株を用いて、細胞内共生成立後に宿主植物がどのように cheating 菌と正常な根粒菌を識別し、cheating 菌に対してどのような機構で制裁を加えているかを明らかにするとともに、それに関与する宿主遺伝子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 圃場単離 cheating 菌の表現型解析

東北大学の圃場から単離した cheating 根粒菌の菌株を、ミヤコグサの野生系統 (MG-20) および *pink4* 変異体に接種し、形成される根粒の数や形態、窒素固定能を測定し、菌株の特性と制裁表現型の関連解析を行った。また、制裁機構についての詳細な情報を得る目的で、根粒切片の電子顕微鏡解析も実施した。

#### (2) 圃場単離 cheating 菌のゲノム解析

圃場から単離した cheating 根粒菌の菌株のゲノムを解読し、集積しているミヤコグサ根粒菌国内単離株のゲノム情報と比較することにより、cheating 菌化の原因遺伝子の解析を行った。

#### (3) 窒素固定活性に応じたミヤコグサの遺伝子発現変動の解析

圃場から単離した cheating 根粒菌の菌株および人為的に作成した cheating 根粒菌を用いて MG-20 および *pink4* 変異体に接種して形成された根粒から RNA サンプルを調整し、RNA-seq 解析を行った。MG-20 と *pink4* 変異体の間で発現変動が認められる遺伝子群に着目し、遺伝子機能との関連解析を行った。

#### (4) *pink4* 変異体の原因遺伝子の同定

*pink4* 変異体 (親株: MG-20 系統) と Gifu 系統の掛け合わせで作成した F2 集団の表現型解析を行い、*pink4* 変異体の表現型を示す 23 個体を単離した。これらの個体を使ってラフマッピングを進めるとともに、バルクシーケンス解析により候補遺伝子の検索を行った。バルク解析により同定された候補遺伝子に挿入変異のある系統をミヤコグサ *LORE1* 変異体ライブラリから選抜し表現型の確認解析を行った。同定された *PINK4* 遺伝子の発現レベルについて(3)の RNA-seq 解析のデータを用いて比較解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 圃場単離 cheating 菌の表現型解析

圃場から単離した 4 種の cheating 根粒菌の菌株 (S24, W4, S35, S33) と人為的な cheating 根粒菌 ( $\Delta nifH$ ) を MG-20 系統に接種した場合には、いずれの菌株も正常な根粒菌株 (MAFF303099) に比べて、小型の根粒を形成し、成熟根粒を示す赤色の度合いも弱いことが確認された (図 3a,b)。一方、*pink4* 変異体に接種した場合には、S24 は MG-20 と同様に白色の根粒のままであり、PINK4 以外の制裁系で排除されている可能性が示唆されたが、その他の菌株については *pink4* 変異体で MG-20 系統に比べて赤色の度合いが増しており、PINK4 依存的な制裁を受けていると考えられた (図 3a,b)。アセチレン還元活性により各菌株の窒素固定能を評価したところ、S24, W4,  $\Delta nifH$  株は完全に窒素固定活性が消失している一方、S35, S33 株では MAFF303099 株に比べて低い窒素固定活性が確認され、自然界には様々な窒素固定レベルの cheating 根粒菌が存在することが確認された (図 3c)。

各菌株で検出された窒素固定活性のレベルと制裁機構の関係を検討するために、 $\Delta nifH$  株と S35 株を接種した場合の根粒内の菌の状態を電子顕微鏡で観察した。その結果、 $\Delta nifH$  株と S35 株ともに、MG-20 系統では複数の菌株が膜構造でとり囲まれ分解を受けている状況が確認され、分解のレベルが窒素固定活性を持たない  $\Delta nifH$  株では弱い窒素固定活性を持つ S35 株より分解が進んでいる様子が観察された (図 4)。一方、*pink4* 変異体では、 $\Delta nifH$  株、S35 株ともに MAFF303099 株と同様のバクテロイド構造をとっており、これらの菌株の分解反応が PINK4 の機能に依存することが確認された (図 4)。

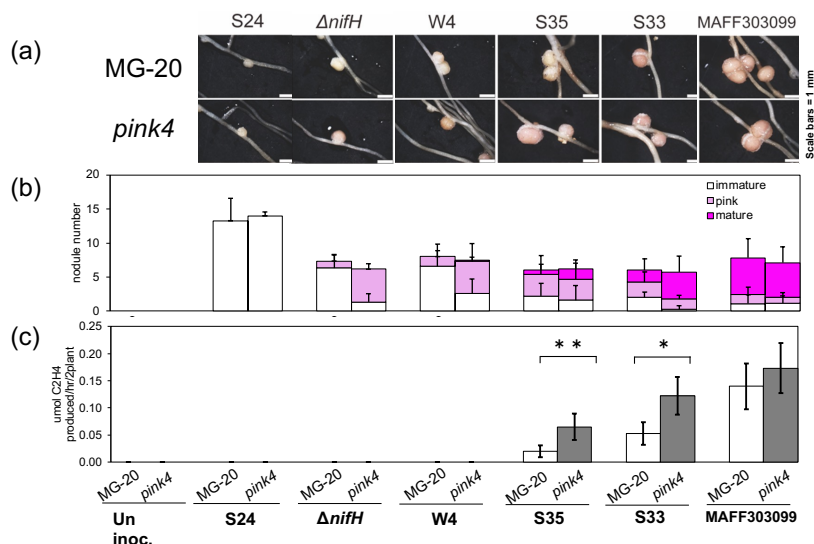


図3. cheating根粒菌接種時の表現型解析

(a)圃場単離したcheating菌 (S24, W4, S35, S33株)、人為作成の cheating菌 ( $\Delta nifH$ 株)、および、窒素固定活性の高い根粒菌 (MAFF303099株) をミヤコグサ野生系統 (MG-20)、*pink4* 変異体に接種して形成された根粒の表現型。(a)根粒の写真、(b) 根粒数と成熟度合いの評価、(c) アセチレン還元活性による窒素固定活性の評価。

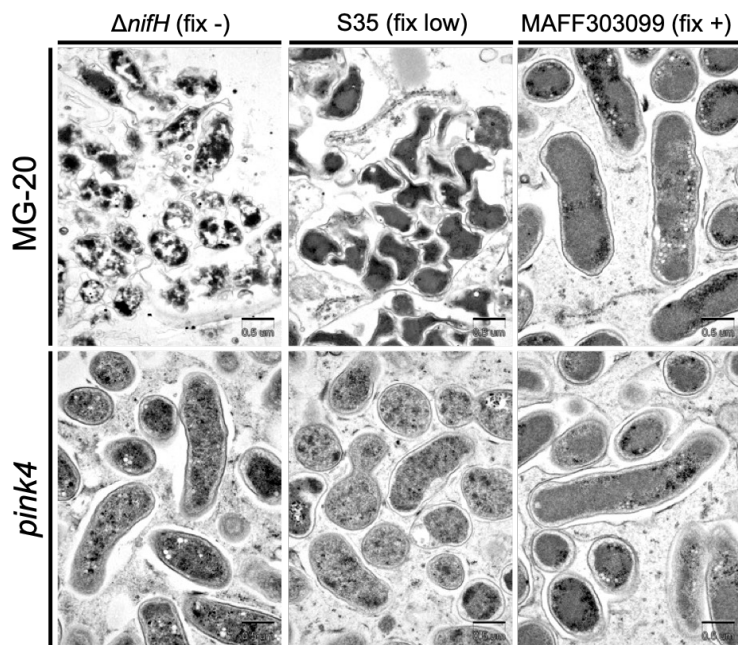


図4. 窒素固定レベルの異なる根粒菌接種時のバクテロイドの形態

窒素固定活性のないcheating菌 ( $\Delta nifH$ 株)、窒素固定活性の低いcheating菌 (S35株)、窒素固定活性の高い根粒菌 (MAFF303099株) をミヤコグサ野生系統 (MG-20)、*pink4*変異体に接種して形成された根粒の切片の電子顕微鏡画像 (スケールバー: 0.5 $\mu$ m)。野生系統に  $\Delta nifH$ 株、S35株を接種した場合に複数のバクテロイドが膜に取り囲まれて分解が進行しているが、*pink4*変異体ではこれらの菌株もFix+株と同様のバクテロイド形態が観察される。



## (2) 圃場単離 cheating 菌のゲノム解析

圃場単離した 4 株のゲノム配列を解読し、これまで単離しているミヤコグサ根粒菌のゲノム情報との比較を行った。その結果、(1)の解析で窒素固定活性を失っていることが確認された W4 株については、感染状態から窒素固定状態への遺伝子発現変化の制御に必須の *rpoN2* 遺伝子に 1 塩基の欠失が確認された。W4 株にプラスミドで MAFF303099 株の *rpoN2* 遺伝子を導入したところ窒素固定能が回復したことから、この変異が W4 株の cheating 根粒菌化の原因遺伝子であることを確認した。S24 株については、主要な窒素固定関連遺伝子への変異はなく、(1)の表現型解析の結果から、挿入過程での制裁を受けることで窒素固定活性が認められない菌株であると推定された。(1)の表現型解析で窒素固定活性が確認された、S33 株は、ゲノム配列の結果、通常のみヤコグサ根粒菌が属する *Mesorhizobium* 属ではなく *Aminobacter* 属に属する菌であることが判明し、塩ストレスをかけた圃場で、塩ストレス耐性の高い *Aminobacter* 属菌に共生アイランドが水平伝播して根粒菌化したものであることが推定され、ゲノムバックグラウンドの影響で窒素固定レベルが低い cheating 菌となっていると推定された。S35 株については窒素固定活性低下の要因を同定できていないが、いくつかの主要な窒素固定遺伝子のプロモータ領域に変異が検出されているので、遺伝子発現レベルでの影響の可能性を考えている。

## (3) 窒素固定活性に応じたミヤコグサの遺伝子発現変動の解析

PINK4 に依存した宿主制裁機構に関与する遺伝子群を解析する目的で  $\Delta nifH$  株と S35 株を接種した場合の根粒内の遺伝子発現について MG-20 系統と *pink4* 変異体で比較解析を行った。その結果、 $\Delta nifH$  株接種した根粒において、膜系の輸送制御に関わる SNARE や VPS、糖鎖分解酵素、脂質分解酵素、細菌細胞壁成分の加水分解に関与するリゾチーム、タンパク質分解酵素関連遺伝子の発現が *pink4* 変異体に比べ MG-20 で有意に上回ることが観測された。この結果は、(1)で実施した電子顕微鏡による観察結果と一致しており、ミヤコグサは窒素固定能を失った根粒菌との細胞内共生成立後、根粒菌を包むペリバクテロイド膜と、脂質分解酵素、タンパク質分解酵素、リゾチーム等を含む膜系成分を融合させ、酵素反応により根粒菌を溶菌させている可能性が示唆された。S35 を接種したサンプルにおいても、これら遺伝子の発現が MG-20 で上回る傾向を示したが、SNARE や VPS の発現上昇レベルが  $\Delta nifH$  株接種に比べて低い傾向が認められたことから、制裁レベルは膜輸送系の制御にコントロールされている可能性が示唆された。

## (4) *pink4* 変異体の原因遺伝子の同定

*PINK4* 遺伝子の同定を目的として、野生型ミヤコグサ Gifu 系統と *pink4* 変異体の掛け合わせを行い、得られた F2 集団の表現型解析を行い、*pink4* 変異体の表現型を示す個体をバルク化してゲノム配列解析を行った。得られたリードをマップして全てのバルク集団に共通する変異を検索することで、1つの候補遺伝子を同定した。ミヤコグサの挿入変異系統ライブラリから、同定した候補遺伝子への挿入がある系統を 3 系統選抜し、表現型解析を行った結果、いずれも *pink4* 変異体の表現型を示すことが確認され、*PINK4* 遺伝子を確定することができた (図 5)。この遺伝子は、機能未知の遺伝子であったが、マメ科植物だけでなく、被子植物に広く保存されている遺伝子であった。また、(3)で実施した RNA-seq データから *PINK4* 遺伝子は非接種の根で発現しており、正常な根粒菌を接種した場合には発現レベルが減少し、cheating 根粒菌を接種した場合には発現レベルの減少が見られないことを明らかにした (図 6)。このことから、*PINK4* は、被子植物に一般的な防御反応を担っており、正常な根粒菌との共生時にはその機能が抑制されることが示唆された。



図5. *pink4* 変異の原因遺伝子の同定

F2 集団のバルク解析で 2 つに絞り込んだ *pink4* 変異の原因遺伝子について、当該遺伝子にトランスポゾン (LORE1) の挿入がある変異系統を用いて接種実験を行った。その結果、候補遺伝子 1 について 3 種の独立の挿入変異系統がいずれも  $\Delta nifH$  株の接種で赤色の根粒を付けるという *pink4* 変異と同じ表現型を示したため、*pink4* 変異の原因遺伝子と確定された。

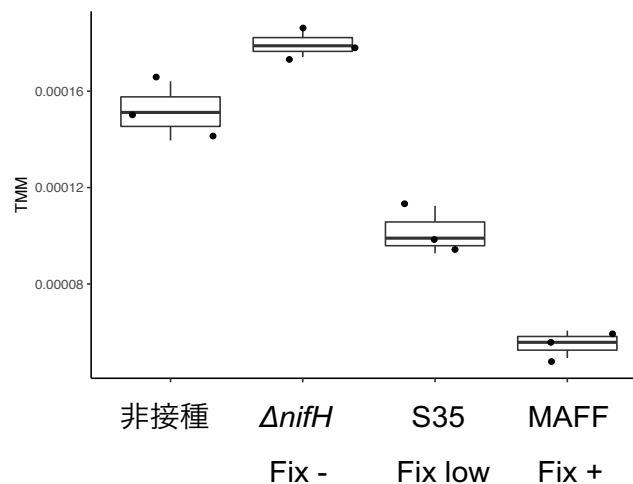


図6. *PINK4* 遺伝子の発現レベル

窒素固定活性のない cheating 菌 ( $\Delta nifH$  株)、窒素固定活性の低い cheating 菌 (S35 株)、窒素固定活性の高い根粒菌 (MAFF303099 株) を接種して 4 週目の根粒、および非接種根の RNA-seq データから抽出した *PINK4* 遺伝子の発現量。

本研究により根粒特異的な抗菌ペプチドを持たないミヤコグサにおける **cheating** 根粒菌に対する制裁機構が、マメ科に特異的なものではなく、被子植物に一般的な防御反応を応用している可能性が示されたことから、今後この遺伝子の機能解析や共生過程で制御機構の解析を進めることにより、細胞内共生の成立過程につながる知見が得られることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Arashida Haruka, Otake Haruka, Sugawara Masayuki, Noda Ryota, Kakizaki Kaori, Ohkubo Satoshi, Mitsui Hisayuki, Sato Shusei, Minamisawa Kiwamu	4. 巻 16
2. 論文標題 Evolution of rhizobial symbiosis islands through insertion sequence-mediated deletion and duplication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 112 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-021-01035-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimamura Masayuki, Kumaki Takashi, Hashimoto Shun, Saeki Kazuhiko, Ayabe Shin-ichi, Higashitani Atsushi, Akashi Tomoyoshi, Sato Shusei, Aoki Toshio	4. 巻 37
2. 論文標題 Phenolic Acids Induce Nod Factor Production in <i>Lotus japonicus</i> and <i>Mesorhizobium</i> Symbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME21094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kamal Nadia, Mun Terry, Reid Dugald, Lin Jie-Shun, Akyol Turgut Yigit, Sandal Niels, Asp Torben, Hirakawa Hideki, Stougaard Jens, Mayer Klaus F X, Sato Shusei, Andersen Stig Uggerhøj	4. 巻 27
2. 論文標題 Insights into the evolution of symbiosis gene copy number and distribution from a chromosome-scale <i>Lotus japonicus</i> Gifu genome sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsaa015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Bamba Masaru, Aoki Seishiro, Kajita Tadashi, Setoguchi Hiroaki, Watano Yasuyuki, Sato Shusei, Tsuchimatsu Takashi	4. 巻 96
2. 論文標題 Massive rhizobial genomic variation associated with partner quality in <i>Lotus-Mesorhizobium</i> symbiosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsec/fiaa202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嵐田遥, 中川知巳, 眞板寛子, 日下部翔平, 佐藤修正
2. 発表標題 細胞内共生成立後の根粒菌選別機構に関わるミヤコグサPINK4遺伝子の機能解析
3. 学会等名 植物微生物研究会 第30回研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruka Arashida, Tomomi Nakagawa, Hiroko Maita, Shohei Kusakabe, Shusei Sato
2. 発表標題 Functional analysis of PINK4 gene of Lotus japonicus in symbiont selection after the establishment of endosymbiosis.
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 修正, Yusdar Mustamin, 番場 大, Turgut Akyol, Stig Andersen, 橋口 正嗣, 橋口 拓勇, 田中 秀典, 明石 良
2. 発表標題 ミヤコグサリソースを活用した環境適応機構の解析
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 番場 大, 青木 誠志朗, 梶田 忠, 瀬戸口 浩章, 綿野 泰行, 佐藤 修正, 土松 隆志
2. 発表標題 マメ科植物-根粒菌共生関係における遺伝子型x遺伝子型 (GxG)相互作用に関連する植物遺伝子座に働く自然選択
3. 学会等名 日本共生物学会 (Symbio2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 修正, Yusdar Mustamin, Madihah Manggabarani, 番場 大, Turgut Akyol, Stig Andersen, Nadia Kamal, Klaus Mayer, 橋口 正嗣, 田中 秀典, 明石 良
2. 発表標題 ミヤコグサ関連リソースの最新状況とその応用
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021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