

機関番号：82706

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770098

研究課題名 (和文) シアノバクテリアの宿主非特異的共生能の機構と進化

研究課題名 (英文) Mechanisms and evolution of cyanobacterial symbiosis with non-specific host plants

研究代表者

富谷 朗子 (TOMITANI AKIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・研究員

研究者番号：60392940

研究成果の概要 (和文)：窒素固定性シアノバクテリア-植物共生系における宿主の特異性/非特異性を調査するため、自由性・共生性由来の *Nostoc* 属単離株を材料とした共生系を室内実験で再現し、細胞分化能および共生能を網羅的に調査した。一方で、*Nostoc* 属シアノバクテリアの分子系統解析を行い、共生実験の結果と統合することで、シアノバクテリア-植物宿主間の宿主多様性・特異性の機構と進化過程について考察した。

研究成果の概要 (英文)：Infection assays were carried out using *Nostoc* culture strains of both free-living and symbiotic origins in order to examine host-symbiont (non-)specificity in the association between diazotrophic cyanobacteria and plants. Molecular phylogenetic, physiological and developmental analyses of the *Nostoc* species were integrated to discuss evolutionary process of diversity and specificity of plant hosts for cyanobionts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：進化、植物、シアノバクテリア、共生

1. 研究開始当初の背景

植物にとって窒素源は成長を制限する主な要因のひとつである。植物には根粒菌や放線菌と共生して窒素源を得るものがあるが、一般に菌-宿主特異性が高く、また宿主植物もマメ科植物などに限定されている。これに対し、シアノバクテリアは、コケ、シダ、裸子、被子植物と多様な植物

に加え、単細胞性の藻類や菌類 (地衣類) と共生して固定した窒素を供給していることが知られており、多様な宿主との共生能の獲得は、生理・生態学的にも、進化学的に興味深い現象である。

これまでに、16S rRNA 配列に基づく分子系統解析から、*Nostoc* 属には様々な植物を宿主とする系統と、シダだけに共生する

系統があると報告されてきた (Papaefthimiou *et al.* 2008)。しかし、進化的推論は分子系統解析によるもので、共生能についての実験的検証はなされておらず、シアノバクテリア-植物共生系の進化過程についての詳細はよくわかっていなかった。

一方、分子レベルでの分子制御機構についても、米国を中心に *Nostoc* 属モデル生物の突然変異体の解析による機能遺伝子の探索や、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析が行われてきたが、共生の鍵となる遺伝子は特定されていなかった (Cohen *et al.* 1994; Campbell *et al.* 2007)。

そこで研究代表者は、英国リーズ大学との共同研究により、シアノバクテリア-植物共生の初期段階に重要な、ホルモゴニア形成の制御遺伝子の単離をめざし *Nostoc* 属モデル生物を用いた分子遺伝学実験を続けてきた。その結果、ホルモゴニア形成に関与する新規遺伝子の同定に成功し、その挿入変異体は植物共生能も欠くことを示した。また、16S rRNA、*hetR* 遺伝子に基づく *Nostoc* 属シアノバクテリア培養株の分子系統解析から、共生能の獲得が多系統的であること、共生シアノバクテリアと宿主植物の系統進化は対応していないという予察を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、まず(1)*Nostoc* 属シアノバクテリアの植物共生能、特に、共生宿主の(非)特異性を調査するため、自由性、共生性、野外からの単離株を用いた室内培養実験を行う。続いて、(2)*Nostoc* 属シアノバクテリアの系統進化の詳細を明らかにするため、共生実験で用いた培養株・単離株を含めた詳細な分子系統樹を作成、一方で、共生能の分子マーカーとしてホルモゴニア形成遺伝子の解析を進める。そして、(3)表現型レベルでの共生能の情報 ((1)) を、分子系統樹 ((2)) を統合し、*Nostoc* 属の宿主非特異的共生能の機構と進化の解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 共生シアノバクテリアの単離と宿主植物の培養・共生実験系の確立

野外における共生藻を実験材料とするため、糸状性シアノバクテリアを共生者とするコケ植物・被子植物からシアノバクテリアを単離した。単離株の同定のため、16S rRNA 遺伝子配列を決定した。

また、系統的に多様な宿主植物との共生関係を検証する実験系の確立のため、コケ、シダ、被子植物を培養し、共生性・自由生活性の *Nostoc* 属シアノバクテリアとの共培養を行い、ホルモゴニア (*Nostoc* 属を含む糸状性シアノバクテリアに見られる分化細胞で、一時的な運動性と化学走性を示し、宿主との共生関係の成立に重要な役割を果たす) 分化頻度および共生能を確認した。

(2) *Nostoc* 属の宿主多様性・特異性の実験的検証

シアノバクテリアと宿主植物との共生の可否、効率性、を検証するため、*Nostoc* 属の単離培養株を材料に実験環境下で共生実験を行った。共生菌としては系統解析に用いた 12 株のうち 10 株を用い、前培養後、吸光度に基づいて濃度を調整した後、宿主コケ植物のひとつである *Blasia* と窒素源欠乏下で共培養 (n=2-4) し、ホルモゴニア形成の細胞分化レベルと、栄養細胞に対する割合 (0, 2 日後)、および、コロニー形成の頻度 (1, 2, 4 週間後) を光学顕微鏡下で経時的に観察・計数した。

(3) *Nostoc* 属の系統進化の解明と共生の分子機構の解析

Nostoc 属シアノバクテリアの系統進化の詳細を明らかにするため、共生性・自由生活性の *Nostoc* 属 10 株と (1) で単離された株を材料に、ゲノム DNA を抽出し、16S rRNA、*hetR* 遺伝子を PCR で増幅、サブクローニングし、塩基配列を決定した。得られた配列をデータベースから収集した既知配列と合わせ、近隣接合法、最節約法、最尤法で分子系統樹を作成した。また、共生に先立つ分化細胞形成能の分子基盤や進

化過程復元の手がかりとするため、*Nostoc* 属 10 株を材料に、研究代表者らが同定したホルモゴニア分化の制御遺伝子の相同遺伝子の単離と解析を行った。

(4) *Nostoc* 属シアノバクテリアー植物共生特異性の進化の解明

(3) から得られた、宿主植物存在下での *Nostoc* 属シアノバクテリアの細胞分化および共生能（効率）に関する情報を、(2) で作成された分子系統関係と統合し、*Nostoc* 属の宿主非特異的共生能の機構と進化過程について考察した。

4. 研究成果

(1) 共生シアノバクテリアの単離と宿主植物の培養・共生実験系の確立

シアノバクテリアの宿主として知られるコケ植物・被子植物から、共生菌の単離を行い、無菌化操作をしたところ、顕微鏡観察から *Nostocales* 目 (subsection IV, 糸状性、異質細胞を形成) に属すると考えられる 2 株が得られた。同定の参考として、16S rRNA 遺伝子配列を決定したところ、*Nostoc* 属のシアノバクテリアであることが示唆された。

共生実験における宿主としては、自然界での宿主である被子植物 *Gunnera*、コケ植物 *Blasia* を用いた。予備的な室内共生実験の結果、*Gunnera* は安定的な培養や同調、定量データの収集が困難であったため、コケ植物 *Blasia* を材料として、各 *Nostoc* 属株との共生に伴う、細胞分化と共生能の経時的・定量的データを網羅収集することにした。なお、*Gunnera* については、上田英二講師(大阪府立大学先端科学研究所)の助力を得て行われた。

(2) *Nostoc* 属の宿主植物の多様性・特異性の実験的検証

Nostoc 属 10 株と *Blasia* を窒素源欠乏培地で共培養実験の結果、土壌や湖沼から単離された自由生活性株、またコケ植物以外の植物を宿主由来の共生株でも細胞分化が誘導され、またその分化頻度は必ずしも株の由来や宿主には対応していないこと

が示唆された。また、培養期間中に細胞分化が観察されないものが存在した。さらに、共培養後の感染性については、土壌・湖沼から単離された自由生活性、あるいは陸上植物を宿主とする共生菌にもコケ植物との共生コロニーを生成する株が多く見られる一方で、共培養後にも共生コロニーを生成しない株があり、これらには上記にある細胞分化が誘導されない株が含まれた。

(3) シアノバクテリアの系統進化の解明と共生の分子機構の解析

共生性・自由生活性の *Nostoc* 属 12 株を含む *Nostocales* 目の系統樹 (*hetR*, ML/NJ/MP 法による) は、*Nostoc* 属自体が *Nostocales* 目のなかで多系統的起源を持つこと、また培養株が採取された場所や植物の情報に基づくと、共生能は多系統的であること、*Nostoc* 属と宿主の系統関係は一致しないことが示された。また、先行研究から示唆されるように、宿主シダ植物から単離された *Nostoc* は、他の共生性 *Nostoc* とは独立のクラスターをなした。

一方で、研究代表者らが同定したホルモゴニア形成を制御する 2 遺伝子の相同遺伝子の単離を試みたところ、1 遺伝子について自由生活性・共生性の *Nostoc* 株から検出されたが、その分布は各株のホルモゴニア分化頻度とは明白な相関がみられなかった。他方の標的遺伝子については、コケ植物の単離株 1 株のみからの検出となり、これが当該遺伝子の系統的分布を反映しているのか、実験条件上の問題によるのか、今後の精査が必要である。

(4) *Nostoc* 属シアノバクテリアー植物共生の特異性／非特異性の進化

Nostoc 属の細胞分化・共生能に関する情報を分子系統樹と統合すると、①コケ植物による細胞分化および共生コロニー形成を示す株は、系統樹上で 2 クラスターをなすが、それぞれの中では比較的新しく出現したグループであること、さらに② *Nostoc* 属の系統関係と、自然界での宿主の系統は必ずしも一致しないが、自由生活性→(少

なくとも) コケ植物に感染するもの→コケ植物と陸上植物に感染するもの、という進化的傾向が見られた。一方で③共生実験で細胞分化が観察されなかった株は独立のクラスターをなし、さらに、その中に宿主コケ植物の存在下でも細胞分化・感染性を持たない株が含まれていた(図1)。このことは、宿主特異性は植物によるシグナルへの認識・応答機構の獲得から、安定した共生関係の構築へという段階を踏んで進化した可能性を示唆する。さらに、以上から④*Nostoc* 属にはシダ植物に特化した宿主特異的グループと、広範な宿主と共生関係をむすぶ宿主非特異的なグループに大別でき、本課題による室内共生実験の結果を加味すると、後者では植物からの細胞分化シグナルを受容する機構が共通である可能性が推察される。

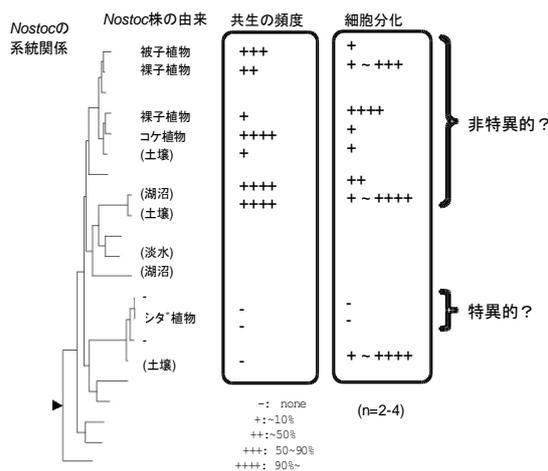


図1: *Nostoc* 属シアノバクテリアの系統進化と地理的分布、および実験環境下における細胞分化・共生能の比較

今後、実験環境下での細胞分化および共生能の定量的評価を他の宿主植物でも可能することで、*Nostoc* 属シアノバクテリア-植物共生系に見られる宿主の多様性や(非)特異性の機構や進化過程のさらなる理解が期待される。

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)

[学会発表] (計 1件)

①Tomitani, A. Photosynthetic activity and community structure of intertidal microbial mats. Anoxygenic Phototrophic Ecosystems workshop. 2010年10月11日 (Craftsman Inn, Fayetteville, NY)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富谷 朗子 (TOMITANI AKIKO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・研究員

研究者番号: 60392940