

微生物と植物の共生相互作用の科学

南澤 究 東北大学大学院生命科学研究科

はじめに

約4億前に高等植物が陸上に生活圏を拡大したことに伴って、微生物と高等植物の相互関係の新たな段階が始まった。それまで、陸上には土壌も緑もない不毛の地であったに違いない。また人類は、狩猟生活から農耕文明を作り上げ、63億人の人口を支えるまでに食糧生産の技術を向上させてきた。現代はともすると、科学の世界でさえ日常の短い時間軸でしかものを見ない傾向が感じられる。しかし、分子遺伝学やゲノム科学と言った極めて現代的な学問や技術に支えられて、逆に悠久として微生物と植物が地球上で培ってきた仕組みや歴史が分かりつつある。本稿では、微生物と植物の共生相互作用の科学の一端を紹介し、それらの知見を生かした土壌—植物系における生物間相互作用の新領域やバイオテクノロジーの重要性について議論したい。

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定

マメ科植物が土壌を肥沃にする不思議な力のあることはローマ時代から認識されていた。その原因が根粒菌による共生窒素固定であることが、コッホらが病原菌を次々と発見し微生物学が勃興した約110年前にヨーロッパで突き止められた。その後、世界中で土壌や根粒菌の純粋培養菌体の接種が行われ、根粒菌はマメ科作物の微生物接種資材として最も長い歴史を持っている¹⁾。

根粒菌は、宿主植物内における共生生活と、土壌中における単生生活のライフサイクルを持つグラム陰性細菌である。マメ科植物の根粒を拡大して観察すると、根粒の感染細胞内に多数の根粒菌が詰まっているのが観察される(図1A)。根粒菌は葉緑体やミトコンドリアのような細胞内共生で、宿主と協調し窒素固定を大変効率よく行っている。

根粒菌の宿主特異性(宿主マメ科植物との共生可能な関係)は意外と狭い。例えば、ダイズ根粒菌はダイズに、アルファルファ根粒菌はアルファルファ、ミヤコグサ根粒菌はミヤコグサという宿主特異性が認められ、そのメカニズムについては永らく不明であった。また、多数の土壌微生物の中から、どのように特定の根粒菌が選ばれ、感染しするかも良く分かっていなかった。

根粒菌とマメ科植物の初期相互作用

根粒菌とマメ科植物の相互作用の研究は、1980年代後半の根粒形成遺伝子の発見に始まり、近年宿主植物側のシグナル受容と伝達の研究として発展し、微生物と植物の相互作用の一つのモデルとされている。

マメ科植物は、根毛感染という大変エレガントな様式で根粒菌を感染させる(図1BC)。根粒菌が接近すると、根毛の先端が彎曲(カーリング)し根粒菌が巻き込まれ、根毛の細胞壁を溶かして、感染糸という植物が準備する菅の中を分裂しながら根粒菌が感染する。同時に、周辺の皮層組織の細胞分裂が始まる。これらの宿主細胞内に根粒菌が放出され、バクテロイドと

呼ばれる共生状態の根粒菌に分化し、最終的に根粒という共生器官が完成する。

根粒菌の根粒形成遺伝子(*nod/nol/noe*)は、宿主植物根由来の特異的なフラボノイドにより誘導され、その結果として根粒菌は Nod ファクターと呼ばれるリポキチンオリゴサッカライドを生産および分泌する (図 1B)。Nod ファクターは、宿主植物の根毛カーリング、感染糸形成、皮層細胞の分裂といった宿主植物の根粒器官形成を誘導する (図 1B)。Nod ファクターの生合成と分泌に働く根粒形成遺伝子群は、根粒菌の共生遺伝子のうち最も重要なものである。さらに、根粒菌の宿主特異性は、根粒形成遺伝子と Nod ファクター修飾の多様性でほぼ説明できることが分かった²⁾。

それでは、宿主植物がどのように Nod ファクターを受容し、根粒の器官形成へ向けたプログラムが進行するのであろうか。近年、マメ科モデル植物の変異株とその分子遺伝学研究からそのメカニズムが解明されつつある。Nod ファクターは、少なくとも二つのレセプターキナーゼで受容され、宿主根毛細胞内でプラスチドの関与した Ca^{2+} オシレーションを経て、根粒形成へとつながっている^{3,4)}。面白いことに、このシグナル伝達経路の変異株の一部は菌根菌感染も起こらないので、根粒共生と菌根共生に共通経路のあることが知られている。菌根菌は、大部分の陸上植物が感染しており、約 4 億年前の化石が知られているリン酸の吸収を助ける植物共生菌である。マメ科植物が地球上に現れたのは約 7,000 万年前であるので、根粒共生系は「古い」共生システムを再利用していることになる。最近、寄生性の根コブ線虫のマメ科植物への感染も同様な経路で起きていることが分かってきた⁵⁾。菌根菌と線虫の分泌しているシグナル物質は、それぞれ Myc ファクター、Nem ファクターと呼ばれている。線虫という土壤動物までもが、マメ科植物の共生応答経路を一部拝借しているようである。

根粒菌ゲノム

根粒菌は *nod*, *exo* 遺伝子が根粒形成に、*nif*, *fix* 遺伝子が共生窒素固定遺伝子に必要な。しかし、根粒菌ゲノムが解読され、ポストゲノム解析が行われ、根粒菌の共生についての新たな知見も得られている。

2000 年にミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti*、2002 年にダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の全ゲノム塩基配列が日本のカズサ DNA 研究所で解読された^{6, 7)}。根粒菌ゲノムは、共生窒素固定に必須の遺伝子が集中している共生領域が、染色体上の共生アイランドか、共生プラスミドかによって二つのタイプに分かれる。共生アイランド(Symbiosis island)というのは、t-RNA 遺伝子に GC 含量の低い共生窒素固定の遺伝子群が挿入された構造をしており、病原菌の病原アイランドと構造的に似ている。ただ、共生アイランドは病原アイランドよりかなりサイズが大きく、非共生の祖先タイプの根粒菌に外来性の共生アイランドが飛び込んで根粒菌になったと考えられる^{6, 7)}。

面白いことに、根粒菌の巨大な共生アイランド全体が共生状態の根粒菌 (バクテロイド) で強く発現している (図 2)。細菌染色体でこれほど巨大な領域が塊となって発現している例はなく、あたかも真核生物の染色体レベルの発現制御クロマチンリモデリングを想像させる⁹⁾。

共生微生物と病原菌の共通点

植物関連微生物は植物ホルモンおよびその関連物質や酵素を生産する場合が多い。ここでは、植物ホルモンであるエチレンを巡る微生物と植物の相互作用の例を紹介したい。

ダイズ根粒菌の一種である *Bradyrhizobium elkanii* はリゾビトキシンという低分子化合物を生

産している (図 3)⁹⁾。リゾビトキシンはダイズ植物体にクロロシスを起こし一部の病原菌も生産するので、発見された当初は植物毒とみなされていた。しかし、リゾビトキシンは植物ホルモンであるエチレン生合成系 ACC 合成酵素の強力な競合阻害剤であることが分かり (図 3)、宿主植物のエチレンレベルを低下させて、共生を促進する因子であることが明かとなった⁹⁾。しかし、根粒菌としてはなぜ *Bradyrhizobium elkanii* しかリゾビトキシンを生産しないのか疑問が残った。根粒菌の全ゲノム塩基配列の情報⁷⁾、アレキ解析⁸⁾ プロテオーム解析などからリゾビトキシンと同様の効果を宿主植物に与える可能性がある ACC デアミナーゼの遺伝子が候補に上がり、実際リゾビトキシンと同様の共生促進効果のあることが判明した^{8, 9)}。つまり、酵素阻害、中間代謝物質の分解と別の方法で、宿主植物のエチレンレベルの低下と共生促進という同じ効果を得ているのである。最近、イネ白葉枯病菌のゲノムからリゾビトキシン生合成遺伝子が複合トランスポゾン形で見つかった¹⁰⁾。これは、植物病原菌もリゾビトキシンを感染促進因子として利用し、またその生合成遺伝子が環境中で転移している可能性を示唆しているという二重の意味で興味深い。

根粒菌ゲノムが解読されて注目されている病原菌と共通する因子として、Type III, TypeIV 分泌系がある^{11, 12)}。これらは、本来病原菌が宿主に対してタンパク質などを打ち込む「毒針」の役割を果たしているが、根粒菌では、Nod ファクターとともに宿主特異性を与えている。ただ、この分泌系で感染のどの過程でどのようなエフェクタータンパク質を宿主細胞に打ち込んでいるかあまり分かっていない。

根圏相互作用の科学と応用

根圏と呼ばれる植物の根の周りの微生物が、物質循環、植物の生育促進や病気の抑制など種々の働きを持っていることが知られている^{13, 14)}。広い意味では根粒菌も根圏微生物に含まれる。根圏における微生物の多様性が農耕地生態系の持続的な生産力や安定性を与えているという議論はあるが、その中味はブラックボックスのままである。つまり、自然生態系における微生物—植物間または微生物間における相互関係、また、生態系機能において中心的な役割を果たしている微生物について実はあまり分かっていない。

しかしながら、本稿で紹介したように土壌生物とマメ科植物間ではシグナル物質を介した相互作用の理解がある程度進んできた。また、微生物ではホモセリンラクトンなどの化学物質介した会話であるクオラム (密度) センシングが良く知られているが、植物は種々の炭素源・窒素源以外に、このクオラムセンシングを攪乱する類似化合物を根圏に分泌している¹⁵⁾。また、植物はこの微生物間の会話を盗み聞きしてしているのではないかとも想像されている¹⁵⁾。今後、シグナル交換とともに、物質循環、エネルギー循環を視野にいたれた根圏微生物の新しい基礎研究領域が重要になってくると思う。その理由は、食糧・環境問題の深刻化が背景にあり、さらに、根圏研究を支える知見や技術が集積しつつあるからである。例えば、根粒菌とマメ科植物の相互作用やその受容の仕組みの研究の進歩や土壌や植物体内に生息している微生物を捕らえる分子生態学の進歩がある。また、安定同位体トレーサーを利用して環境中で機能している微生物を特定する Stable isotope probing やコミュニティゲノミックスもそれを支える技術になるはずである¹⁴⁾。

共生微生物やその相互作用の基礎研究を利用して様々なバイオ技術としての展開が考えられる。例えば、フラボノイドをマメ科作物の種子に処理して、低温条件下における根粒形成や窒素固定を促進するバイオ技術がカナダで実用化されている。紙面の都合上触れなかったが、私達も (1) エチレンを低下させる共生微生物の遺伝子を利用した植物の形質転換効率の改善、(2)

植物体内の微生物エンドファイトによる窒素固定、耐病性・耐虫性の付与、(3) 温暖化ガスである亜酸化窒素発生を減らす根粒菌接種資材などのバイオ技術につながる研究に取り組んでいる(<http://www.ige.tohoku.ac.jp/chiken/research/research.html>)。ただ、こういった自然環境下で生物間相互作用を活用するバイオテクノロジーでは、複数の生物による相互作用が環境条件により変動し、工業的テクノロジーや化学物質の投与のように再現性のある効果は必ずしも得られない難しさを持っているのも事実である。

参考文献

- 1) 遊橋健一・南澤 究 (2000) 根粒菌・非マメ科窒素固定エンドファイトの利用と資材化, 微生物の資材化: 研究の最前線、鈴木孝仁他編、ソフトサイエンス社、pp 30-46 (東京)
- 2) Mergaert, P, Van Montagu, M and Holster, M. (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.*, **25**, 811-817.
- 3) Radutoiu S. et al. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585-592.
- 4) Imaizumi-Anraku, H. et al. (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, **433**, 527-531.
- 5) Weerasinghe R. R., Bird D. M. and Allen N. S. (2005) Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 3147-3152.
- 6) Kaneko T. et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.*, **31**, 331-8.
- 7) Kaneko, T. et al. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **31**, 189-197.
- 8) Uchiumi, T. et al. (2004) Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J Bacteriol.* **186**, 2439-2448.
- 9) Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M., Minamisawa, K. (2004) Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environ.* **19**, 99-111.
- 1 0) Lee, B. M. et al. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 577-86. Print 2005.
- 1 1) Marie, C., Broughton, W.J., Deakin, W.J. (2001) *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 336-42.
- 1 2) Hubber, A. et al. (2004) Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol.* **54**, 561-74.
- 1 3) Barea, J. et al. (2005) Microbiol co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**, 1761-1778.
- 1 4) Singh, B. K. et al. (2005) Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol.* **12**, 386-393.
- 1 5) Bauer, W. D., Mathesius, U. (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 429-433.

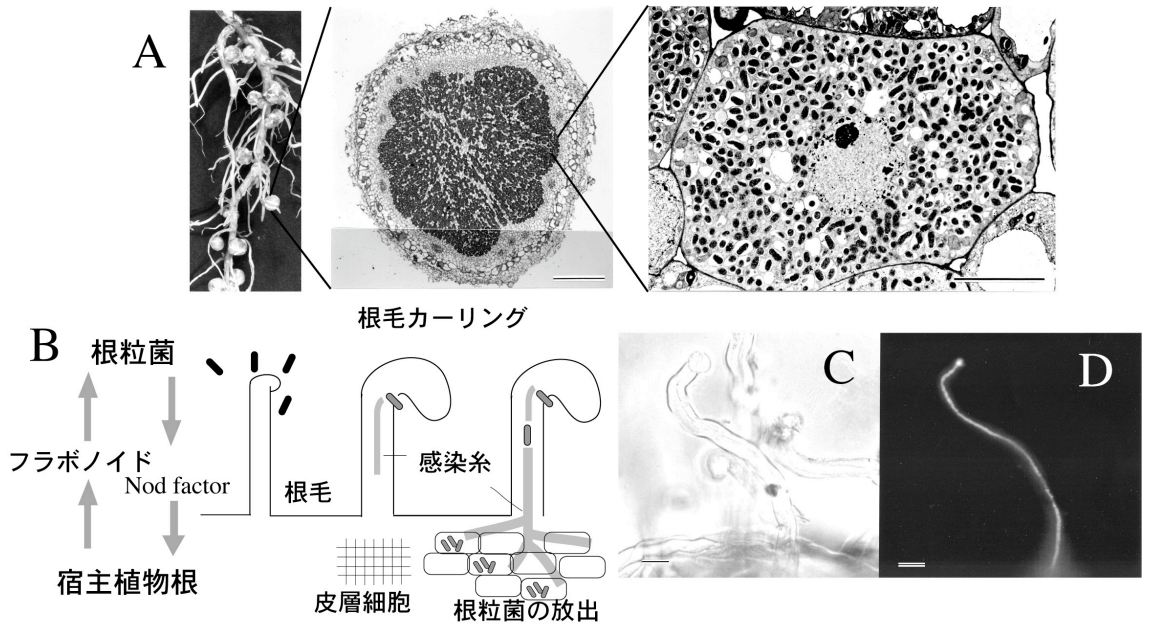


図1 根粒の構造と感染過程

A, マメ科植物の根粒の拡大図; B, 根粒菌とマメ科植物のシグナル交換と初期感染過程; C, マメ科植物の根毛中の感染糸 (左側が明視野観察、右側が標識根粒菌により見えた感染糸)

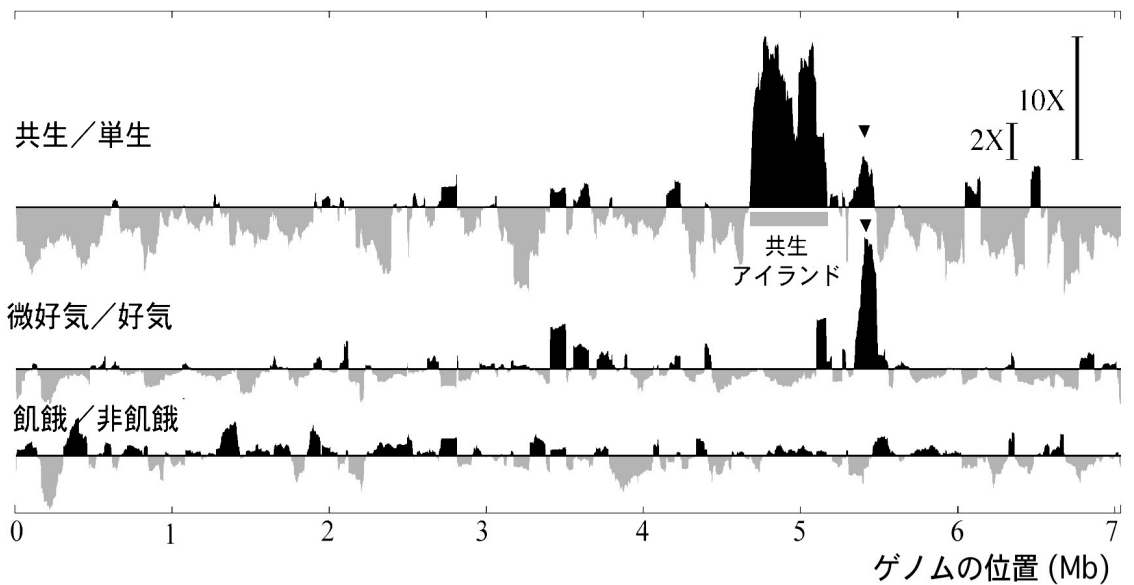


図2 ミヤコグサ根粒菌の網羅的な発現プロファイル

最上段は共生と単生の比較で、共生アイランド上の遺伝子全体が高発現している。微好気と好気培養細胞、炭素源飢餓と非飢餓細胞ではそのような顕著な高発現領域は見えない。

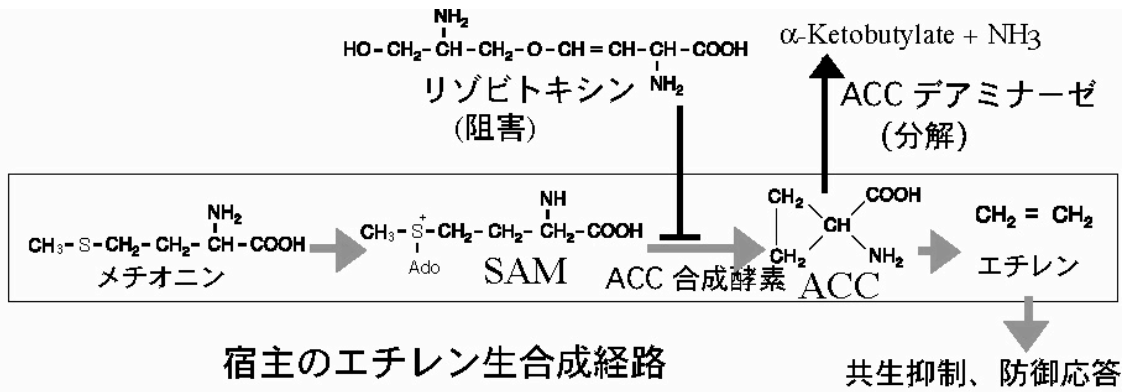


図3 根粒菌の生産するリゾビトキシンと ACC デアミナーゼによる植物のエチレン合成阻害

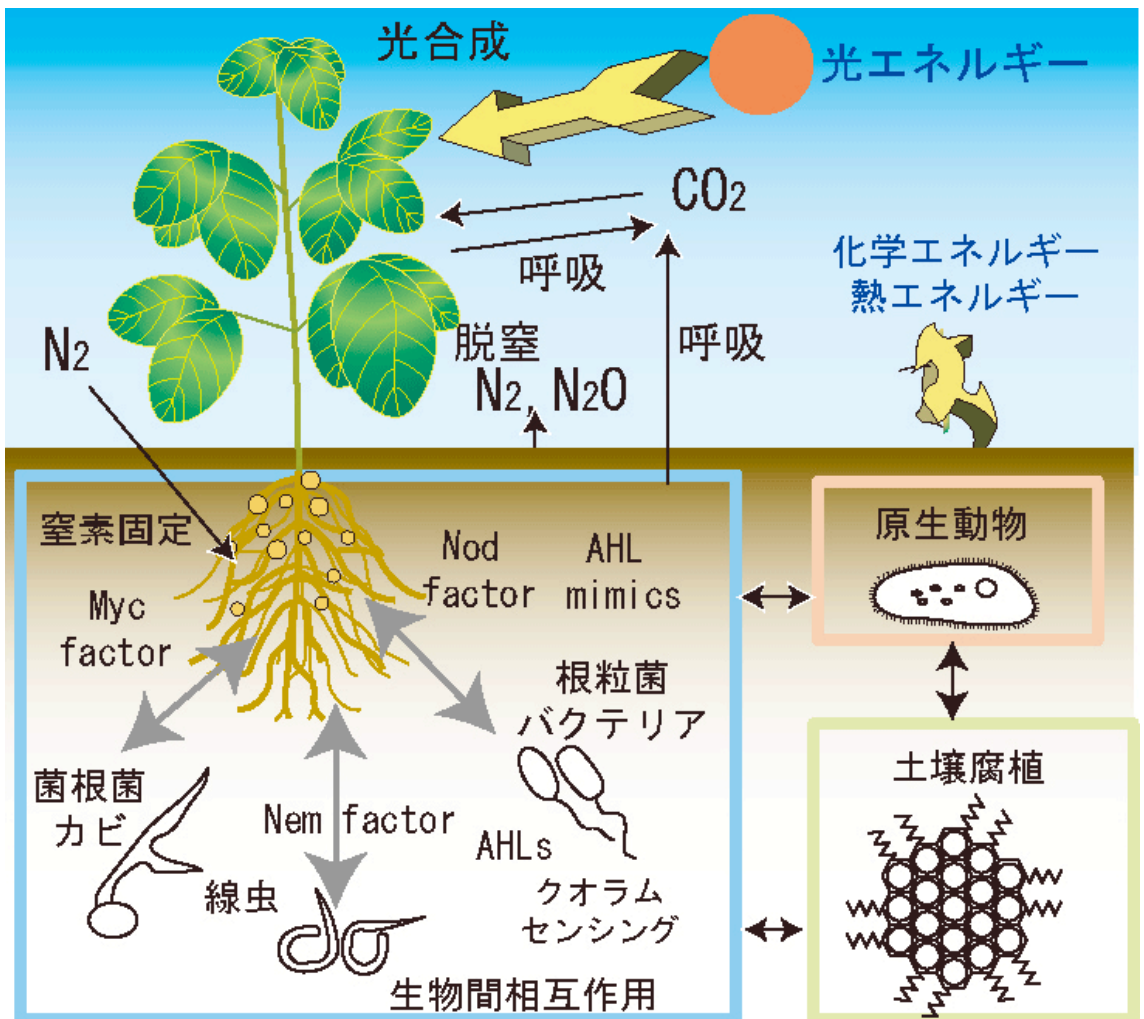


図4 根圏における生物間相互作用と物質・エネルギー循環
太い線は相互作用を、細い線は炭素及び窒素の循環を示す。