

広宿主域根粒菌の遺伝子破壊が
多様な宿主植物との共生に及ぼす影響

2020 年 3 月

橋本 駿

目次

第1章：序論

1-1 マメ科植物の分類	1
1-2 マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定	2
1-3 マメ科植物と根粒菌の共生システムの多様性	5
1-4 広宿主域根粒菌 <i>Bradyrhizobium</i> sp. SUTN9-2 と <i>Bradyrhizobium</i> sp. DOA9 の特性	5

第2章：*nifV* 遺伝子を破壊した広宿主域根粒菌の共生特性

2-1 序論	7
2-2 材料と方法	10
2-2-1 使用した菌株と培養条件	10
2-2-2 NifV タンパク質の系統樹と <i>nifV</i> の遺伝子地図の作成	11
2-2-3 SUTN9-2 と DOA9 の <i>nifV</i> 遺伝子の破壊	11
2-2-4 自由生活下でのニトロゲナーゼ活性の測定	12
2-2-5 宿主植物との共生の解析	13
2-3 結果	14
2-3-1 <i>nifV</i> を保持する根粒菌	14
2-3-2 SUTN9-2 と DOA9 の <i>nifV</i> 遺伝子とそのホモログ	16

2-3-3 <i>nifV</i> 遺伝子の破壊が自由生活下でのニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響	18
2-3-4 <i>nifV</i> 遺伝子破壊株と宿主植物との共生	18
2-4 考察	25

第3章：Ⅲ型分泌系の遺伝子を破壊した *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と

Bradyrhizobium sp. DOA9 の共生特性

3-1 序論	32
3-2 材料と方法	33
3-2-1 使用した菌株と培養条件	33
3-2-2 <i>Lotus</i> 属植物との共生の解析	34
3-3 結果	34
3-3-1 SUTN9-2 と <i>L. japonicus</i> MG-20 系統との共生	34
3-3-2 SUTN9-2 と <i>L. japonicus</i> Gifu B-129 系統との共生	35
3-3-3 SUTN9-2 と <i>L. burtii</i> との共生	37
3-3-4 DOA9 と <i>Lotus</i> 属との共生	37
3-4 考察	39

第4章：*bclA* 遺伝子を破壊した *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 の共生特性

4-1 序論	43
4-2 材料と方法	44
4-2-1 使用した菌株と培養条件	44
4-2-2 <i>Bradyrhizobium</i> sp. SUTN9-2 の <i>bclA</i> 遺伝子の破壊	45
4-2-3 宿主植物との共生の解析	46
4-3 結果	47
4-3-1 宿主植物との共生表現型	47
4-4 考察	49
第5章：総括	54
謝辞	58
引用文献	59

第 1 章 序論

1-1 マメ科植物の分類

マメ科 (Leguminosae) には約 20000 種の植物が存在し、そのうち約 14000 種がマメ亜科 (Papilionoideae) に分類される (図 1)。さらにマメ亜科は、Genistoids、Dalbergioids、Phaseoloid、Galegoids の 4 つのクレードに分けられる (図 1)。Genistoids は約 5800 万年前の間に分岐したと推測されるクレードであり、食用や緑肥として利用されるルピナスはこのクレードに属する。Dalbergioids は、約 5500 万年前に分岐したと推測されるクレードであり、ラッカセイやクサネムはこのクレードに属する。Phaseoloid は、約 5400 万年前に分岐したと推測されるクレードであり、ダイズやインゲン等はこのクレードに属する。Galegoids は、約 5000 万年前に分岐したと推測され、Robinioids と IRLC (Inverted-Repeat-Lacking-Clade) のクレードにさらに分けられる。Robinioids と IRLC には、マメ科モデル植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) とタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) がそれぞれ属している。

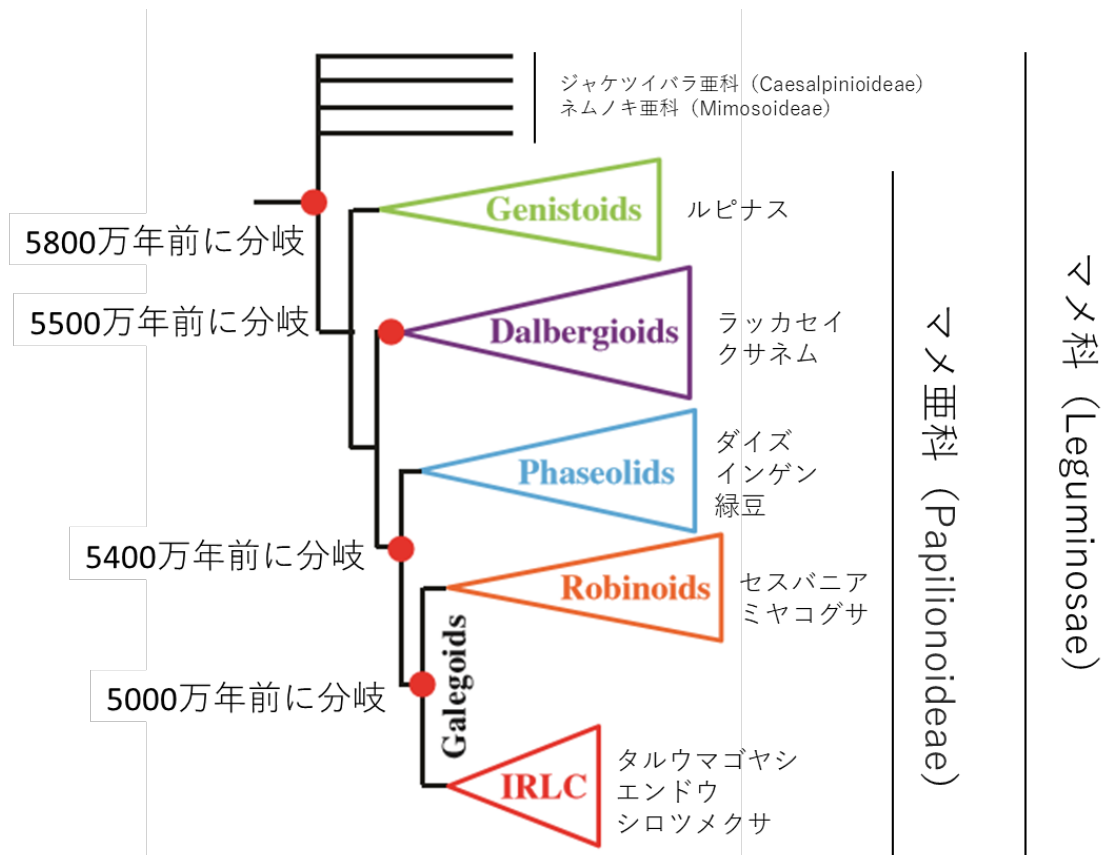


図1 マメ科植物の系統樹(Chaintreuil *et al.* 2016を改変)
各クレードの右に代表的なマメ科植物を示す。

1-2 マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定

マメ亜科に分類される種は、根で根粒菌を受け入れ、根粒と呼ばれる窒素固定器官を形成する。根粒細胞内では、根粒菌が宿主植物由来の炭素源をエネルギー源として用いて空中の窒素分子をアンモニアへ還元し、それを宿主植物に窒素栄養として供給している。そのため宿主植物は、窒素栄養が乏しい土壌でも、根粒菌との共生窒素固定のおかげで旺盛に生育することができる。マメ亜科の多くの植物が根粒菌と共生する一方で、ジャケツイバラ亜科とネムノキ亜科に分類される種は、マメ亜科と比較す

ると根粒形成が見られる種は少ない。

根粒菌は主に *Bradyrhizobium* 属、*Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属、*Sinorhizobium* (*Ensifer*) 属に分類される。根粒菌とその宿主となる植物の間には、宿主特異性が存在する。まず、宿主特異性を大雑把に見ると、*Bradyrhizobium* 属は、上位のマメ科クレード (Genistoids、Dalbergioids、Phaseoloid) のマメ科種を宿主としている傾向があり、*Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属は、下位のクレード (Robinioids と IRLC) のマメ科種を宿主としている傾向がある (Andrews *et al.* 2017)。しかしながら、それらの傾向に当てはまらない例外の根粒菌も多く存在する (Andrews *et al.* 2017)。次に、宿主特異性を根粒菌株で比較すると、宿主域が狭いものから広いものまで存在する。ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) やタルウマゴヤシ根粒菌 (*Sinorhizobium meliloti*) は、共生するマメ科種がそれぞれ *Lotus* 属と *Medicago* 属と限定されており、宿主域が比較的狭い。一方で、*Rhizobium*. NGR234 や *Sinorhizobium fredii* HH103 は、宿主域の広い根粒菌として知られており、それぞれ 112 属と 79 属のマメ科植物と共生できる (Pueppke and Broughton. 1999)。

根粒菌の宿主特異性を決定する主な因子として、根粒菌の根粒形成因子 (Nodulation Factor, NF) と III 型分泌系を挙げることができる。根粒菌は、宿主マメ科植物の根由来のフラボノイド化合物を認識すると、*nod* 遺伝子群にて NF (キチンオリゴマー) を合成し、NF を細胞外へ分泌する。NF は根粒菌種によってキチン鎖の長さ

や修飾が異なっている (Haeze *et al.*, 2002)。マメ科植物は親和性の根粒菌の NF を受容体キナーゼで認識すると、その根粒菌の受け入れと根粒形成を開始する (Radutoiu *et al.* 2003, Radutoiu *et al.* 2007)。広宿主域根粒菌である *Rhizobium*. NGR234 や *S. fredii* HH103 は NF の修飾遺伝子が多様であり、様々な構造の NF をカクテルで分泌することで、多様な宿主との根粒共生を確立していると考えられている (Pueppke and Broughton. 1999)。根粒菌の III 型分泌系も NF 合成のように、マメ科植物のフラボノイド化合物によって活性化する。第 3 章で詳細を述べるが、III 型分泌装置によってマメ科宿主細胞内に打ち込まれるエフェクタータンパク質は、宿主依存的に根粒形成を正または負に制御する場合がある。これらのように、根粒菌の NF と III 型分泌系は宿主特異性を決定する主要な因子であり、マメ科宿主はそれらを認識して、親和性の根粒菌を選別し、細胞内へ受け入れる。

細胞内へ受け入れられた根粒菌は、バクテロイドと呼ばれる状態に分化する。第 4 章で詳細を述べるが、マメ科宿主の抗菌性のペプチドと、その作用の調節に関与する根粒菌のトランスポーターが、バクテロイド分化と窒素固定の発現に必須な分子として同定されている。バクテロイドに分化した根粒菌は、共生窒素固定を開始する。窒素固定には、ニトロゲナーゼやその成熟に関わる遺伝子である *nif* (nitrogen fixation) 遺伝子群が必須である。

1-3 マメ科植物と根粒菌の共生システムの多様性

これまでに、マメ科植物と根粒菌の研究は、ミヤコグサと *M. loti*、タルウマゴヤシと *S. meliloti* を根粒共生系のモデルとして精力的展開されてきた。それらの大きな成果の一つとして、根粒菌の NF が発見され、NF は根粒菌が普遍的に持つ根粒形成に必須な分子であることが明らかになった（一部のクサネム根粒菌は除く）。しかし、モデル共生系で明らかになった仕組みは、必ずしも普遍的ではない場合もある。即ち、マメ科植物と根粒菌の共生システムは、共生系間で、ある程度の共通性はあるが、しばしば異なっている。この「根粒共生システムの多様性」には、マメ科植物と根粒菌が共生を始めた約 6 千万年前から現在に至る、長い共進化の様子を明らかにするための重要な手掛かりが含まれていると考えられる。

1-4 広宿主域根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と *Bradyrhizobium* sp. DOA9 の特性

Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 と *Bradyrhizobium* sp. DOA9 は、エダウチクサネムをタイの水田に植え、着生した根粒から単離された根粒菌である (Noisangiam *et al.*, 2012)。
SUTN9-2 と DOA9 は、マメ科植物の Genistoids、Dalbergioids、Millettioids に属する特定のマメ科種にも根粒を誘導することのできる宿主域の広い菌株である (Noisangiam *et al.*, 2012)。

本研究は、多様な根粒共生システムの理解深化のために、SUTN9-2 と DOA9 の共生関連遺伝子を破壊し、多様なマメ科宿主との共生に及ぼす影響を検討した。第 2 章では、根粒菌の窒素固定関連遺伝子である *nifV*（ホモクエン酸合成酵素）に着目した。第 3 章では、根粒菌とマメ科植物の宿主特異性に関与する根粒菌のⅢ型分泌系に着目した。第 4 章では、根粒菌がマメ科宿主の根粒細胞内でのバクテロイド分化に関与する根粒菌のトランスポーター (*bclA*) に着目した。第 5 章では、総括として、本研究と先行研究の知見から、マメ科植物と根粒菌の共進化について考察した。

第2章 *nifV* 遺伝子を破壊した広宿主域根粒菌の共生特性

2-1 序論

根粒菌は、モリブデン型ニトロゲナーゼにて窒素を固定している。ニトロゲナーゼはコンポーネント1 (MoFe protein) と、それを還元する役割を持つコンポーネント2 (Fe protein) によって構成されている。コンポーネント1は、 α サブユニット (NifD) と β サブユニット (NifK) のヘテロ2量体で構成されており、 α サブユニットの活性中心に鉄・モリブデンコファクター (Fe-Mo-co) を有し、 α と β サブユニット間に P-クラスターを有する。コンポーネント2は NifH のホモ2量体であり、サブユニット間に鉄・硫黄スラスターを有する。*Nif* 遺伝子は、*nifD*, *K*, *H* 以外にも20種類以上存在し、それらは Fe-Mo-co、P-クラスター、鉄・硫黄クラスターの構築やニトロゲナーゼの成熟に関与している。それらのうちの *nifV* は、Fe-Mo-co を構成するホモクエン酸の合成酵素である (Hoover *et al.*, 1989)。ホモクエン酸は、ニトロゲナーゼの窒素固定活性の発現に必須の化合物である (図2) (McLean *et al.*, 1989; Madden *et al.*, 1991)。そのため、*nifV* は窒素固定細菌に広く保存されている。根粒菌も、*nifV* を保持しているものが見つかっており、*Bradyrhizobium* ORS285 や *Bradyrhizobium* ORS278、*Azorhizobium caulinodans* が挙げられる。これらの根粒菌は、窒素固定細菌のように、自由生活下でもニトロゲナーゼ活性を保持する (Wongdee *et al.*, 2016)。

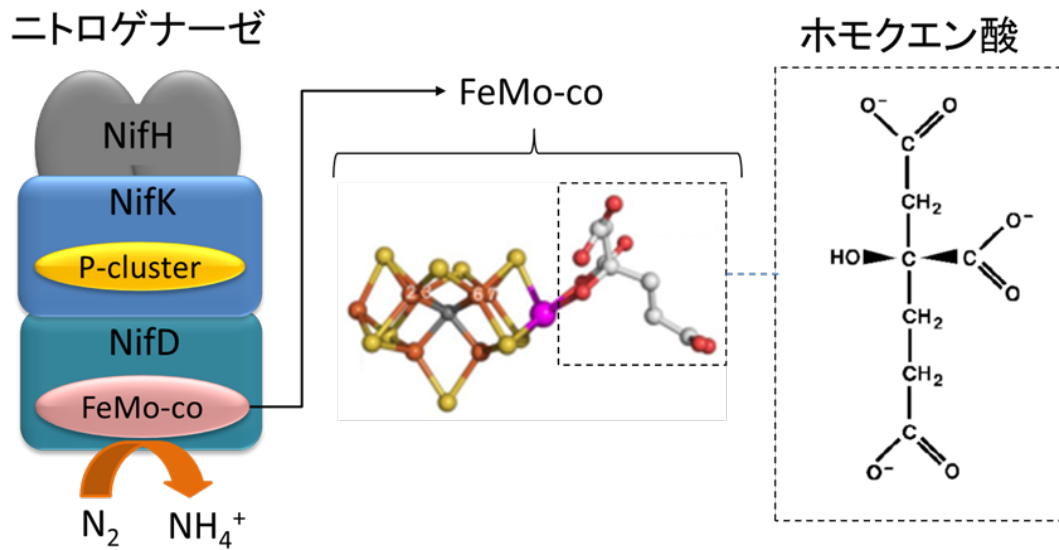


図2 ニトロゲナーゼの活性中心 (FeMo-co) に必須なホモクエン酸

ミヤコグサ根粒菌は *nifV* を保持していない根粒菌であり、宿主であるミヤコグサにホモクエン酸の供給を受け、共生窒素固定をしている (Hakoyama *et al.*, 2009)。一方、*nifV* を保持している ORS285 は、特に Cross-Inoculation group 3 (CI-group 3) のクサネム種との共生において、自身の *nifV* に大きく依存してホモクエン酸を合成し、共生窒素固定をしている (Nouwen *et al.* 2017)。

クサネム属のマメ科植物は約180種確認されており、共生相手である *Bradyrhizobium* 属の根粒菌種との交互接種試験の結果に基づいて、3 つの CI-group に分類される (図2) (Alazard, 1985; Miché *et al.*, 2010)。CI-group 1 は、エダウチクサネム (*A. americana*) や *A. elaphroxylon* に代表され、非光合成の *Bradyrhizobium* 属根粒菌のみと、NF 依存的に共生窒素固定を確立するグループである。CI-group 2 は、*A. afraspera* や *A. nilotica* が挙げられ、非光合成及び光合成の両方の *Bradyrhizobium* 属根粒菌と、NF 依存的に共生

窒素固定を確立するグループである。CI-group 3 は、*A. indica* や *A. evenia* 等が挙げられ、非光合成及び光合成の両方の *Bradyrhizobium* 属根粒菌と、NF 非依存的に共生窒素固定を確立するグループである (Giraud *et al.*, 2007)。本研究で材料としている根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と *Bradyrhizobium* sp. DOA9 は、CI-group1 と 2 のクサネムを宿主としている。一方、*Bradyrhizobium* ORS285 は CI-group 2 と 3 のクサネムを宿主としている (図 3)。

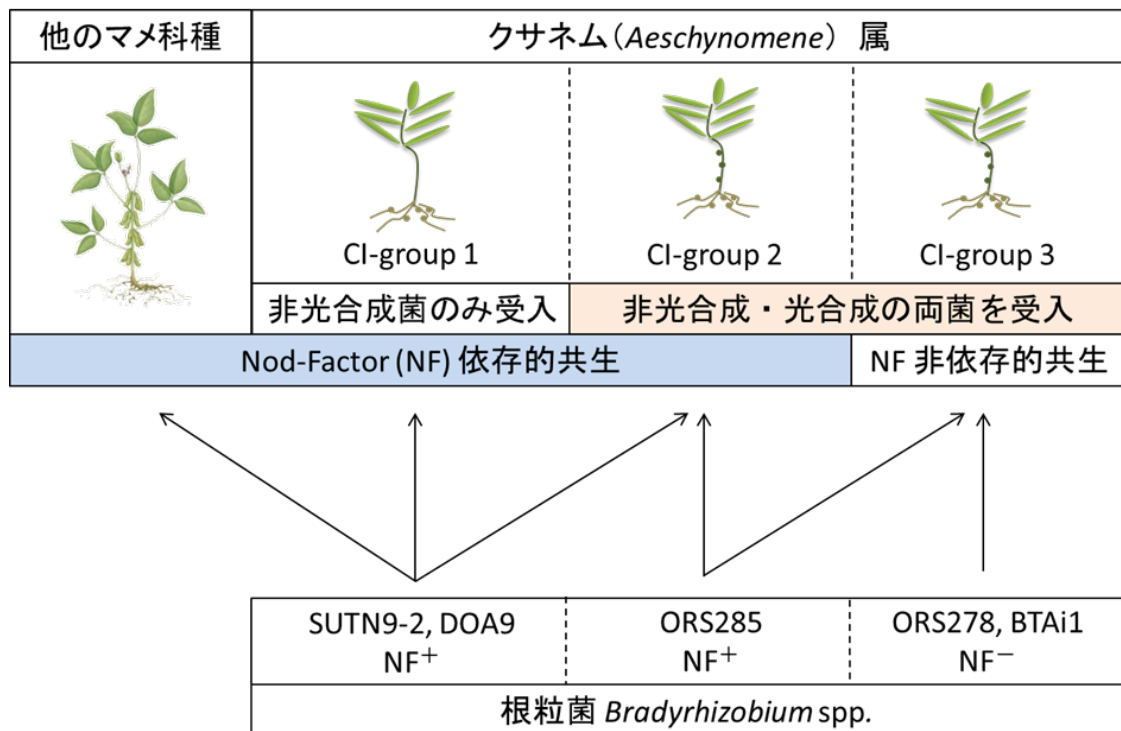


図 3 クサネム属のCross-Inoculation-Groups (CI-groups)

矢印は各根粒菌が共生窒素固定できるマメ科宿主を示す。ORS278とBTAi1は根粒菌に普遍的にみられる標準的な根粒形成因子 (NF) の遺伝子を持っていない。また、ORS285のNF欠失株はCI-group 2との共生能を失うが、CI-group 3との共生能は失わない。

ゲノム解析により、SUTN9-2 と DOA9 は *nifV* を保持していることが明らかになった (Vallenet *et al.*, 2016)。本研究では、SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* が、多様な宿主植物と

の共生に必要であるかどうかを検討した。両菌株の *nifV* 破壊株を作出し、自由生活下でのニトロゲナーゼ活性、および、4種の宿主植物との共生表現型について検討した。宿主植物には、Dalbergioids からエダウチクサネム (*A. americana*、CI-group1) とカリビアンスタイロ (*Stylosanthes hamata*)、Millettoid からタイワンコマツナギ (*Indigofera tinctoria*) とヌスビトハギ (*Desmodium tortuosum*) を使用した。本研究から、クサネムの特定の種に加えて、CI-group1 のエダウチクサネムや、クサネムとは別のクレードに属するマメ科植物は、共生窒素固定に根粒菌の *nifV* を必要とすることが明らかになった。

2-2 材料と方法

2-2-1 使用した菌株と培養条件

SUTN9-2 と DOA9 とそれらの *nifV* 破壊株は、28°Cにて、yeast-mannitol 培地 (Giraud *et al.* 2000)、BNM-B 培地 (Renier *et al.* 2011)、または、0.1%アラビノースと 0.25%yeast-extract を添加した HEPES-MES 培地 (Cole and Elkan. 1973) のいずれかで培養した。大腸菌は、Luria-Bertani 培地で 37°Cにて培養した。*nifV* 破壊株の作出のために、スクロース (10%)、セフトキシム (20μg /mL)、カナマイシン (50μg /mL)、または、ゲンタマイシン (50μg /mL) を必要に応じて各培地に添加した。

2-2-2 NifV タンパク質の系統樹と *nifV* の遺伝子地図の作成

根粒菌のNifVのアミノ酸配列は、「Homocitrate synthase」をキーワードとして、Micro Scope（バクテリアのゲノムデータベース）（Vallenet *et al.*, 2016）から収集した。また、SUTN9-2のNifVのアミノ酸配列をクエリとして、BLASTPも実施した。系統樹はClustalW2にて、*Azotobacter vinelandii*のNifVをアウトグループとして作成した。SUTN9-2、ORS285とDOA9の*nifV*とその周辺の遺伝子構成は、Micro Scopeのゲノム配列を参考に作成した。

2-2-3 SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 遺伝子の破壊

SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 破壊株を作出するために、*nifV* の ORF の上流および下流の領域を、以下のプライマーセット：up.*nifV*.BamHI.SUTN9-2.f：5'-atgccgggatcccgaccgacagcaatctcgat-3'、up.*nifV*.HindIII.SUTN9-2.r：5'-cgaaagctggaagcttgcaagagctactcattgtttgacctac-3'、dw.*nifV*.HindIII.SUTN9-2.f：5'-tagctcttgcaagcttccagcttgcacgtcagatc-3'、dw.*nifV*.XbaI.SUTN9-2.r：5'-cctcgatctagagcgcggtctcagcaggtcgtaa-3'、up.*nifV*.BamHI.DOA9.f：5'-tgcaccggatccccttgacgcttctgcaat-3'、up.*nifV*.HindIII.DOA9.r：5'-attggaggacgcaagcttgggtatcatggcctgcatcgt-3'、dw.*nifV*.HindIII.DOA9.f：5'-gccatgataccaagcttgcgtcctccaatcattcattc-3'、dw.*nifV*.XbaI.DOA9.r：5'-

acgacgtctagatgcacggattgcaacgatttc-3'、で PCR にて増幅した。上流と下流の DNA 断片はオーバーラップ PCR で連結し、*SacB* マーカーを含む自殺プラスミド pNPTS129 に *Bam*HI および *Xba*I にてクローニングした。続いて、得られたプラスミドの上流域と下流域の中間に、セフトキシム耐性遺伝子を *Hind*III にてクローニングしたものを pNPTS129/9-2nifVUP/cefotaximer/9-2nifVDW および pNPTS129/DOA9nifVUP/cefotaximer/DOA9nifVDW とした。これらの遺伝子破壊用プラスミドを大腸菌 DH5 α に形質転換し、ヘルパー大腸菌を用いた triparental-mating にて、SUTN9-2 および DOA9 に遺伝子破壊用プラスミドを接合伝達した。*nifV* 破壊株の候補は、セフトキシム (20 μ g/mL)、ゲンタマイシン (50 μ g/mL) およびスクロース (10%) を含む HM 寒天プレート上で得た。PCR によって *nifV* 遺伝子がセフトキシム耐性遺伝子で置換されたことを確認し、その菌株を *nifV* 破壊株とした。

2-2-4 自由生活下でのニトロゲナーゼ活性の測定

SUTN9-2、DOA9 とそれらの *nifV* 破壊株について、自由生活下でのニトロゲナーゼ活性を検出するためにアセチレン還元活性を測定した。まず、各菌株を yeast-mannitol 液体培地で培養した。培養した菌体を BNM-B 液体培地で洗浄し、45°C に保温した 0.8% 寒天を含む BNM-B 培地に OD600 = 0.15 の菌濃度で再懸濁した。*nifV* 破

壊株の相補実験では、ホモクエン酸を最終濃度 1 mM で添加した。これらの懸濁液 2 mL を 10 mL の採血管に移した。採血管内の気相の 10% をアセチレンに置換し、28°C で 1 週間静置した。アセチレンを基質としたニトロゲナーゼ活性の生成物であるエチレンを、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-8A) によって測定した。

2-2-5 宿主植物との共生の解析

エダウチクサネムの種子は濃硫酸中で 30 分間振盪し、滅菌水で洗浄した。カリビアンスタイロの種子は 3% 次亜塩素酸と 0.1% Tween20 中にて 5 分間振盪し、滅菌水で洗浄した。タイワンコマツナギとヌスビトハギの種子は、濃硫酸中で 10 分間振盪した後、滅菌水で洗浄し、0.2% 次亜塩素酸と 0.1% Tween20 中に 40 分間静置した後、再び滅菌水で洗浄した。表面殺菌が終わった種子は、0.8% の寒天プレート上に移し、遮光して 28°C で静置した。2 日後、得られた実生をバーミキュライトと BNM 液体培地が入った植物栽培用試験管へ移し (カリビアンスタイロは、BNM 液体培地のみで栽培)、28°C、12 時間の明暗サイクルで栽培した。植物栽培用試験管へ移植して 1 週間後に、各根粒菌の懸濁液 (OD₆₀₀=1.0) 1mL を各試験官に接種し、引き続き、28°C、12 時間の明暗サイクルで栽培した。根粒菌接種 10 日後または 21 日後に、植物の生重量、根粒数およびアセチレン還元活性を測定した。

2-3 結果

2-3-1 *nifV* を保持する根粒菌

根粒菌のうち *nifV* を保持するものの割合を算出するために、「homocitrate synthase」をキーワードとして MicroScope データベースに登録されているすべての根粒菌について、*nifV* の有無について検索した。また、SUTN9-2 の NifV アミノ酸配列をクエリとした BLASTP 検索もした。キーワード検索と BLASTP 検索からは、同じ結果が得られ、*Bradyrhizobium* 属根粒菌 148 株のうち 81 株 (55%)、*Mesorhizobium* 属根粒菌 7 株のうち 3 株 (43%)、*Sinorhizobium* 属根粒菌 85 株のうち 1 株 (1%)、*nifV* を保持する根粒菌が検出された (表 1)。*Rhizobium* 属根粒菌の全 30 株については、*nifV* は検出されなかった。これらの検索結果から、MicroScope に登録されているすべての根粒菌のうち、31%が *nifV* を保持していた。

表 1. *nifV* を保持する根粒菌

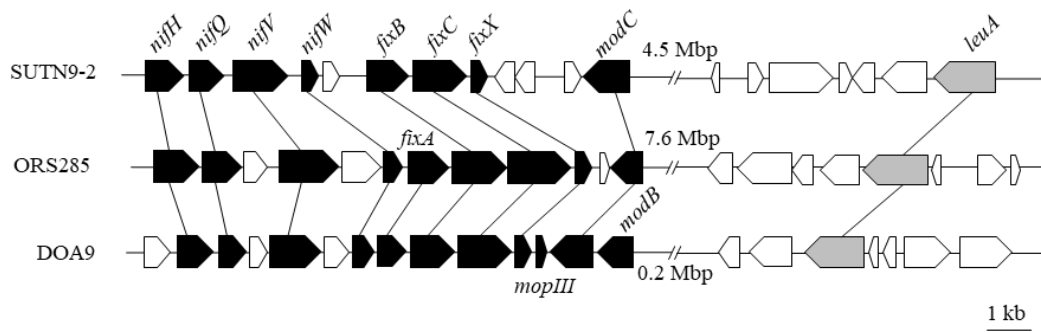
Strain	Label in MicroScope	Gene product name	Clade in tree (Fig. 1A)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	AvCA_01640	nitrogen fixation homocitrate synthase	—
<i>Mesorhizobium metallidurans</i> STM2683	MESS2v1_980052	fragment of homocitrate synthase	I
<i>M. amorphae</i> CCNWSGS0123	MEAMCv1_530020	homocitrate synthase	I
<i>M. australicum</i> WSM2073	MESAWv1_90056	homocitrate synthase	I
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 4H41	AQWP_v1_80086	homocitrate synthase	I
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	AZC_3389	homocitrate synthase	—
<i>Bradyrhizobium</i> spp.			
AT1	JXDL01_v1_12394	homocitrate synthase	II
BR 10245	LUUB01_v1_730060	homocitrate synthase	II
CCH5-F6	LSIC01_v1_480053	homocitrate synthase	II
cf659 CF659	FOQJ01_v1_180113	homocitrate synthase	II
Cp5.3	AUFA01_v1_450019	homocitrate synthase	II
DOA1	JXJM01_v1_40553	homocitrate synthase	II
DOA9	BRADOA9_v1_51508	homocitrate synthase	II
Ec3.3	AXAS01_v1_860039	homocitrate synthase	II
<i>B. japonicum</i> 22	AXVG01_v1_140448	homocitrate synthase	II
<i>B. manausense</i> BR3351	LJYG01_v1_190067	homocitrate synthase	II
<i>B. neotropicae</i> BR 10247	LSEF01_v1_260103	homocitrate synthase	II
S23321	S23_45990	putative homocitrate synthase	II
<i>B. stylosanthis</i> BR 446	LVEM01_v1_161248	homocitrate synthase	II
TSA1	LFJC01_v1_15448	homocitrate synthase	II
BR10280 p9-20	LWIG01_v1_560099	homocitrate synthase	II
BTa1	BBta_5875	homocitrate synthase	III
<i>B. oligotrophicum</i> S58	S58_23130	homocitrate synthase	III
ORS278	BRADO5390	homocitrate synthase	III
ORS285	BRAD285_v2_1843	homocitrate synthase	III
ORS375	BRAO375v1_990107	homocitrate synthase	III
STM3809	BRAS3809v1_980003	homocitrate synthase	III
STM3843	BRAO3843v1_2960004	homocitrate synthase	III
ARR65	AWZU01_v1_550005	homocitrate synthase	—
Ai1a-2	AUEZ01_v1_1270014	homocitrate synthase	IV
<i>B. elkanii</i> WSM1741	AXAU01_v1_120180	homocitrate synthase	IV
<i>B. elkanii</i> WSM2783	AXAP01_v1_860003	homocitrate synthase	IV
<i>B. jicamae</i> PAC68	LLXZ01_v1_330023	homocitrate synthase	IV
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086	LLYB01_v1_1190019	homocitrate synthase	IV
LMTR 3	MAXC01_v1_520075	homocitrate synthase	IV
<i>B. pasdlaeri</i> LMTR 21	MAXB01_v1_760050	homocitrate synthase	IV
<i>B. retamae</i> Ro19	LLYA01_v1_1890032	homocitrate synthase (fragment)	IV
Tv2a-2	AXAI01_v1_470008	homocitrate synthase	IV
<i>B. valentinum</i> LmjM3	LLXX01_v1_1670029	homocitrate synthase	IV
<i>B. valentinum</i> LmjM6	LLXY01_v1_110013	homocitrate synthase	IV
WSM2254	AXAB01_v1_150062	homocitrate synthase	IV
WSM3983	AXAY01_v1_230001	homocitrate synthase	IV
WSM3983	AXAY01_v1_290132	homocitrate synthase	IV
NAS96.2	LGHK01_v1_10011	homocitrate synthase (modular protein)	IV
<i>B. icense</i> LMTR 13	LMTR13_26450	homocitrate synthase	IV
CCGE-1A001	BCCGELA001_31050	homocitrate synthase	—
<i>B. mercantei</i> SEMIA 6399	MKFI01_v1_230945	homocitrate synthase	—
NAS96.2	LGHK01_v1_10081	homocitrate synthase	—
<i>B. liaoningense</i> CCNWSX0360	LUKO01_v1_2030012	homocitrate synthase (NifV)	—
<i>B. embrapense</i> SEMIA 6208	LFIP02_v1_60088	homocitrate synthase	V
UFLA 03-321	MPVQ01_v1_420055	homocitrate synthase	V
UFLA03-84	NSJV01_v1_120032	homocitrate synthase	V
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690	LGTB01_v1_100079	homocitrate synthase	V
C9	NWTG01_v1_330116	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> 587	AJJK01_v1_23090039	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> BLY3-8	LWU101_v1_180041	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> BLY6-1	LXEM01_v1_180011	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> CCBAU 05737	AJPV01_v1_4020045	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> CCBAU 43297	AJPW01_v1_3950013	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> USDA 3254	AXAH01_v1_260042	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> USDA 3259	AXAW01_v1_230039	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> USDA 76	ARAG_v1_51539	homocitrate synthase	VI
<i>B. elkanii</i> USDA 94	JAFC01_v1_1060046	homocitrate synthase	VI
<i>B. pachyrhizi</i> BR3262	LJYE_v1_810043	homocitrate synthase	VI
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48	LFIQ01_v1_660072	homocitrate synthase	VI
R5	FMZW01_v1_500036	homocitrate synthase	VI
WSM1743	AXAZ01_v1_20190	homocitrate synthase	—
<i>B. arachidis</i> LMG 26795	FPBQ01_v1_680095	homocitrate synthase	VII
err11 ERR11	FMAI01_v1_110319	homocitrate synthase	VII
genosp. SA-4 str. CB756	AXBC01_v1_60406	homocitrate synthase	VII
Ghvi	FOVU01_v1_350089	homocitrate synthase	VII
INPA54B	PGVG01_v1_610025	homocitrate synthase	VII
ORS3257	BRAD3257_v2_7801	homocitrate synthase	VII
ORS3409	BRAO3409v1_500145	homocitrate synthase	VII
<i>B. ottawaense</i> L2	NWTF01_v1_830037	homocitrate synthase	VII
Rc2d	FNCU01_v1_470212	homocitrate synthase	VII
Rc3b	FOUS01_v1_200023	homocitrate synthase	VII
SUTN92	SUTN92_v1_630027	homocitrate synthase	VII
USDA 3384	AXAD01_v1_90051	homocitrate synthase	VII
WSM2793	ARBF01_v1_200096	homocitrate synthase	VII
<i>B. yuanmingense</i> BR3267	LJYF_v1_290169	homocitrate synthase	VII
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071	FMAE01_v1_140007	homocitrate synthase NifV	VII
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 25021	AJQK01_v1_3620002	homocitrate synthase NifV	VII
BR10280 p9-20	LWIG01_v1_100281	homocitrate synthase	VII
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 35157	AJQL01_v1_4000104	homocitrate synthase	VII

2-3-2 SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 遺伝子とそのホモログ

ゲノムシーケンスの結果、SUTN9-2 と DOA9 は ORS285 の NifV タンパク質と、それぞれ 78% と 81% の相同性をもつ NifV を保持していた (Vallenet et al. 2016)。また、ORS285 の *nifV* と同様に、SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 遺伝子は、*nif* クラスタの中に位置していた (図 4A)。表 1 に示している根粒菌の NifV タンパク質で系統樹を作成すると、SUTN9-2 と DOA9 は、NF 非依存的クサネム種の根粒菌の NifV のクレード (III) とは、別のクレードに属していた (図 4B)。

ORS285 は自身の NifV タンパク質と 35% の相同性を持つ遺伝子 (*leuA*) を保持していた (図 4A) (Vallenet et al. 2016)。この遺伝子は、ホモクエン酸合成酵素 (EC 2. 3. 3. 14) と同じファミリーに属する、2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素 (EC 2. 3. 3. 13) をコードしていた。SUTN9-2 と DOA9 も ORS285 と同じように、それぞれの NifV と 33% と 34% の相同性を示す 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素の遺伝子を保持していた (図 4A)。SUTN9-2 と DOA9 と ORS285 の 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素の遺伝子 (*leuA*) は、*nif* クラスタには位置していなかった (図 4A)。

A



B

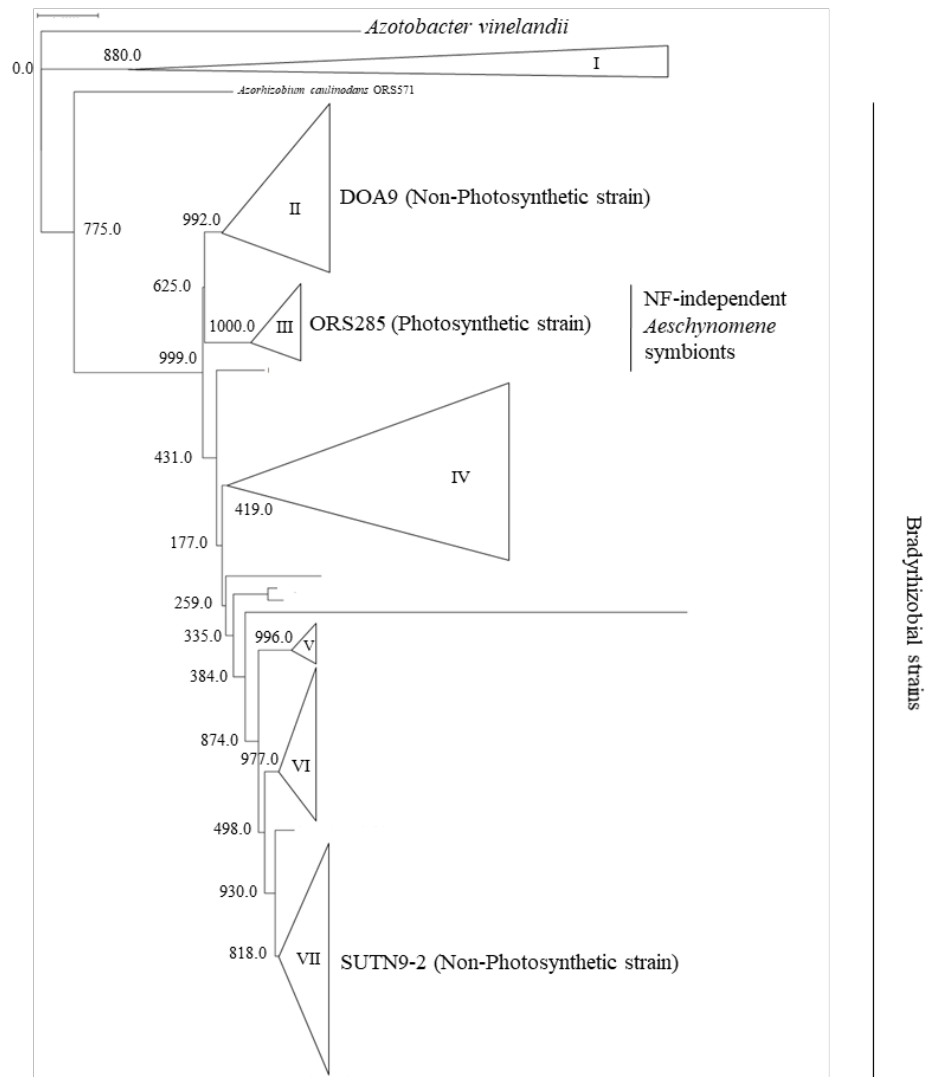


図4 NifVタンパク質の系統樹および*nifV*遺伝子の遺伝子地図

(A) *Bradyrhizobium*属根粒菌の*nifV*および2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素 (*leuA*) の遺伝子構成を示す。(B) NifVタンパク質の隣接結合系統樹。バーは10個のアミノ酸ごとに1つのアミノ酸の推定置換を示す。系統樹に使用したバクテリアのNifVと、それが分配されるクレード (I~VII) は表1に示す。

2-3-3 *nifV* 遺伝子の破壊が自由生活下でのニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響

SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* が自由生活下での窒素固定に関与しているかを明らかにするため、両菌株とそれらの *nifV* 破壊株のアセチレン還元活性を検討した。両菌株の野生株は、自由生活下でアセチレン還元活性を有した（図 5）。SUTN9-2 野生株のニトロゲナーゼ活性は、DOA9 野生株の活性と比較して、著しく低かった（図 5）。両菌株の *nifV* 破壊株はそれぞれの野生株と比較して、アセチレン還元活性が有意に低下したが、消失はしなかった（図 5）。培地へのホモクエン酸の添加は、両菌株の *nifV* 破壊株の活性の低さを回復させた（図 5）。

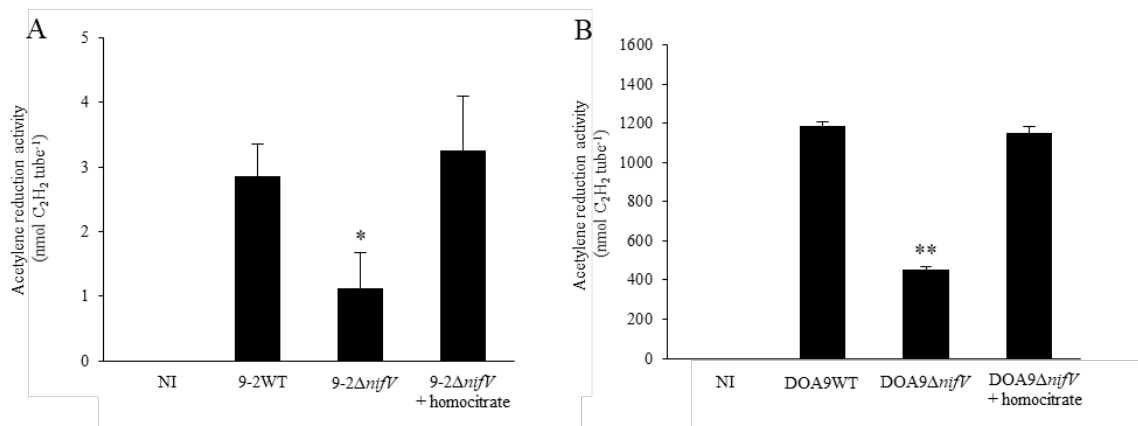


図 5 *Bradyrhizobium* 属根粒菌 (SUTN9-2 と DOA9) の自由生活下でのアセチレン還元活性 (A) SUTN9-2 の野生株および *nifV* 破壊株のアセチレン還元活性。 (B) DOA9 の野生株および *nifV* 破壊株のアセチレン還元活性。ホモクエン酸は、1mM の最終濃度で培地に加えた。NI: コントロールとしての菌接種なしの系。値は平均 ± SE (n=3) で示す。アスタリスクは、野生株とその *nifV* 破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * P < 0.05, ** P < 0.01)。

2-3-4 *nifV* 遺伝子破壊株と宿主植物との共生

nifV の破壊が宿主植物との共生に影響を与えるかどうかを検討するために、4 種のマメ科植物（エダウチクサネム、カリビアンスタイロ、タイワンコマツナギ、ヌ

スピトハギ) との共生を検討した。

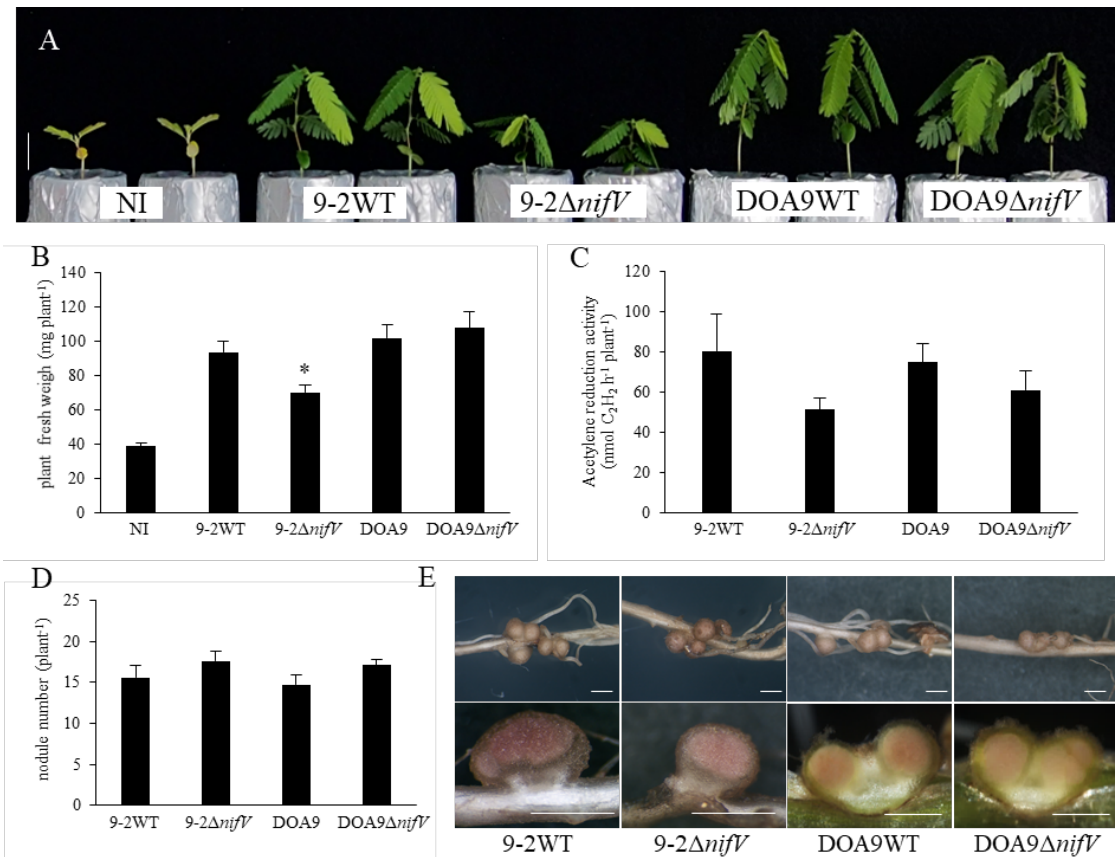


図6 *Bradyrhizobium*属根粒菌及びそれらの*nifV*破壊株とエダウチクサネムの共生表現型
共生表現型のデータは菌接種3週間後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 植物の生重量、(C) 植物1個体あたりのアセチレン還元活性、(D) 根粒数、(E) 根粒およびその内部。値は平均±SE (n=10) で示す。アスタリスクは、野生株とその*nifV*破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * P<0.05, ** P<0.01)。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種したエダウチクサネムは、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、生長が悪く (図 6A, B)、アセチレン還元活性は 36%低下し (図 6C)、根粒数は 13%増加していた (図 6D)。SUTN9-2 とその *nifV* 破壊株がエダウチクサネムに誘導した根粒の外観および内部には、大きな違いはなかった (図 6E)。DOA9 の *nifV* 破壊株を接種したエダウチクサネムは、DOA9 野生株を接種した植物体と同様の共生表現型を示した (図 6)。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種したカリビアンスタイロは、SUTN9-2 野生株を接種した植物体と同様の共生表現型を示した（図 7）。DOA9 を接種したカリビアンスタイロは、非接種の植物体よりも生長は良いものの、SUTN9-2 を接種した植物体と比較すると生長が悪く（図 7A, B）、ニトロゲナーゼ活性が著しく低い小型の根粒を形成した（図 7CE）。DOA9 の *nifV* 破壊株を接種したカリビアンスタイロは、DOA9 野生株を接種した植物体の共生表現型と差はなかった（図 7）。

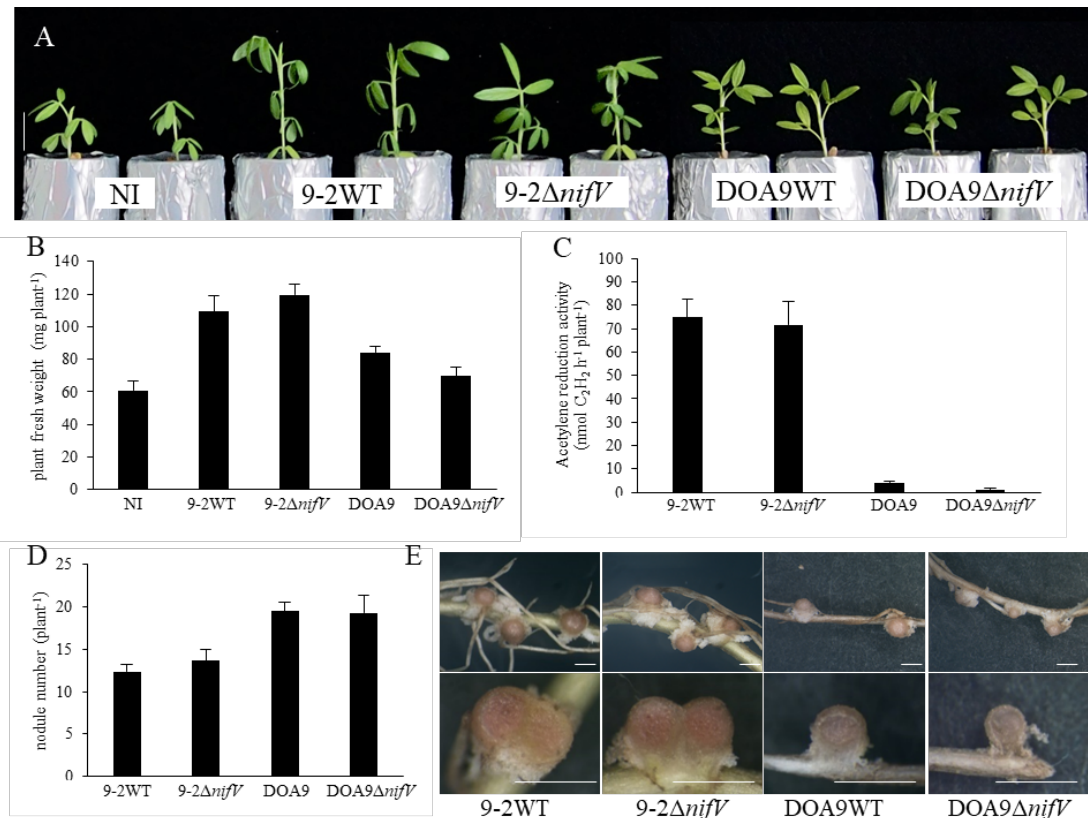


図 7 *Bradyrhizobium* 属根粒菌及びそれらの *nifV* 破壊株とカリビアンスタイロの共生表現型
共生表現型のデータは菌接種3週間後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 植物の生重量、
(C) 植物1個体あたりのアセチレン還元活性、(D) 根粒数、(E) 根粒およびその内部。
値は平均±SE (n = 10) で示す。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種したタイワンコマツナギは、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、地上部は緑色が薄い窒素栄養不足の症状が観察され（図 8A）、植物体重とアセチレン還元活性が有意に低下し（図 8B, C）、根粒数は 15%増加していた（図 8D）。SUTN9-2 の *nifV* 破壊株が誘導した根粒は、SUTN9-2 野生株が誘導したものと比較して、ピンクの色味が薄かった（図 8E）。DOA9 を接種したタイワンコマツナギは、非接種の植物体と同程度の生長を示し（図 8A, B）、SUTN9-2 を接種した植物体と比較すると、生長が悪く、ニトロゲナーゼ活性が著しく低い小型の白い根粒を形成した（図 8A, B, C, E）。DOA9 の *nifV* 破壊株を接種したタイワンコマツナギは、DOA9 野生株を接種した植物体の共生表現型と大きな差はなかった（図 8）。

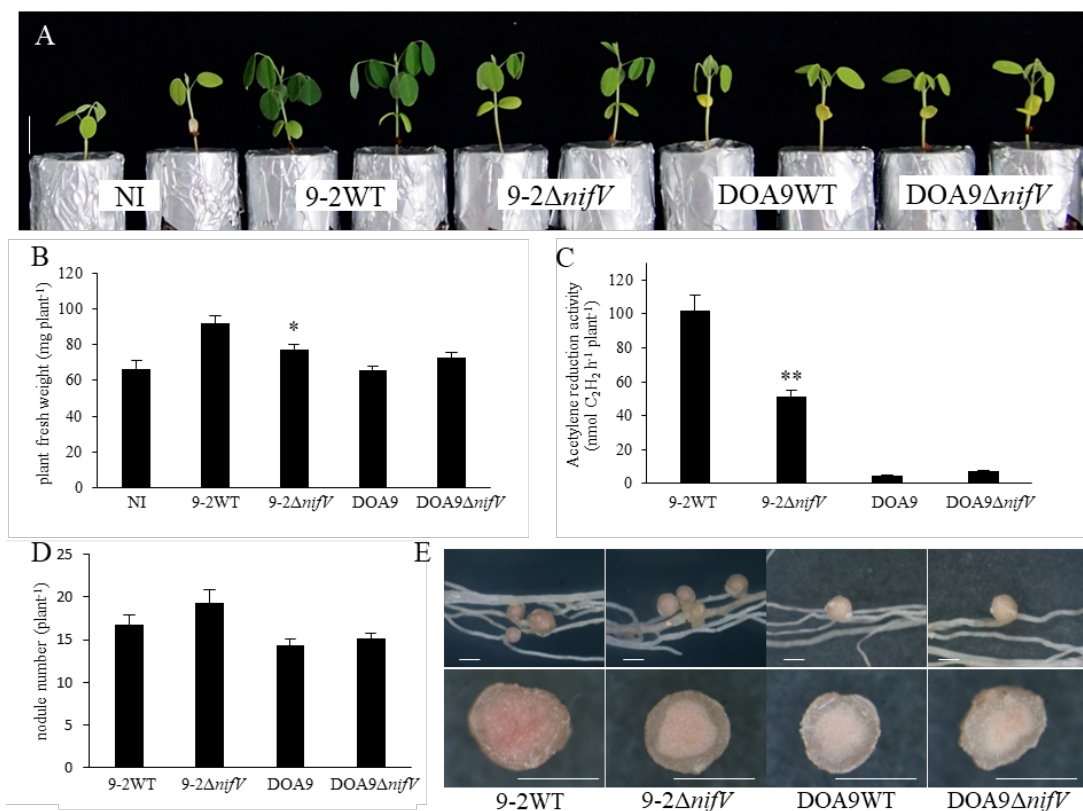


図 8 *Bradyrhizobium* 属根粒菌及びそれらの *nifV* 破壊株とタイワンコマツナギの共生表現型
共生表現型のデータは菌接種3週間後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 植物の生重量、
(C) 植物1個体あたりのアセチレン還元活性、(D) 根粒数、(E) 根粒およびその内部。
値は平均±SE (n=10) で示す。アスタリスクは、野生株とその *nifV* 破壊株の有意差を示
す (Student's *t*-test, * P < 0.05, ** P < 0.01)。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種したヌスビトハギは、SUTN9-2 野生株を接種した
ものと比較して、植物体の生重量が有意に低く生長が悪かったが (図 9A, B)、植
物体 1 個体あたりのアセチレン還元活性と根粒数は有意に増加した (図 9C, E)。
SUTN9-2 の *nifV* 破壊株が誘導した根粒は、SUTN9-2 野生株が誘導したものと比較
して、根粒およびその内部に大きな違いはなく (図 9F)、根粒重量当たりのアセチ
レン還元活性も同程度だった (図 9D)。DOA9 を接種したヌスビトハギは、非接種
の植物体より生長は良かったものの (図 9A, B)、SUTN9-2 を接種した植物体と比

較すると、生長が悪く、ニトロゲナーゼ活性が著しく低い小型の白い根粒を形成した（図 9A, B, C, D, F）。DOA9 の *nifV* 破壊株を接種したヌスビトハギは、DOA9 野生株を接種した植物体の共生表現型と大きな差はなかった（図 9）。

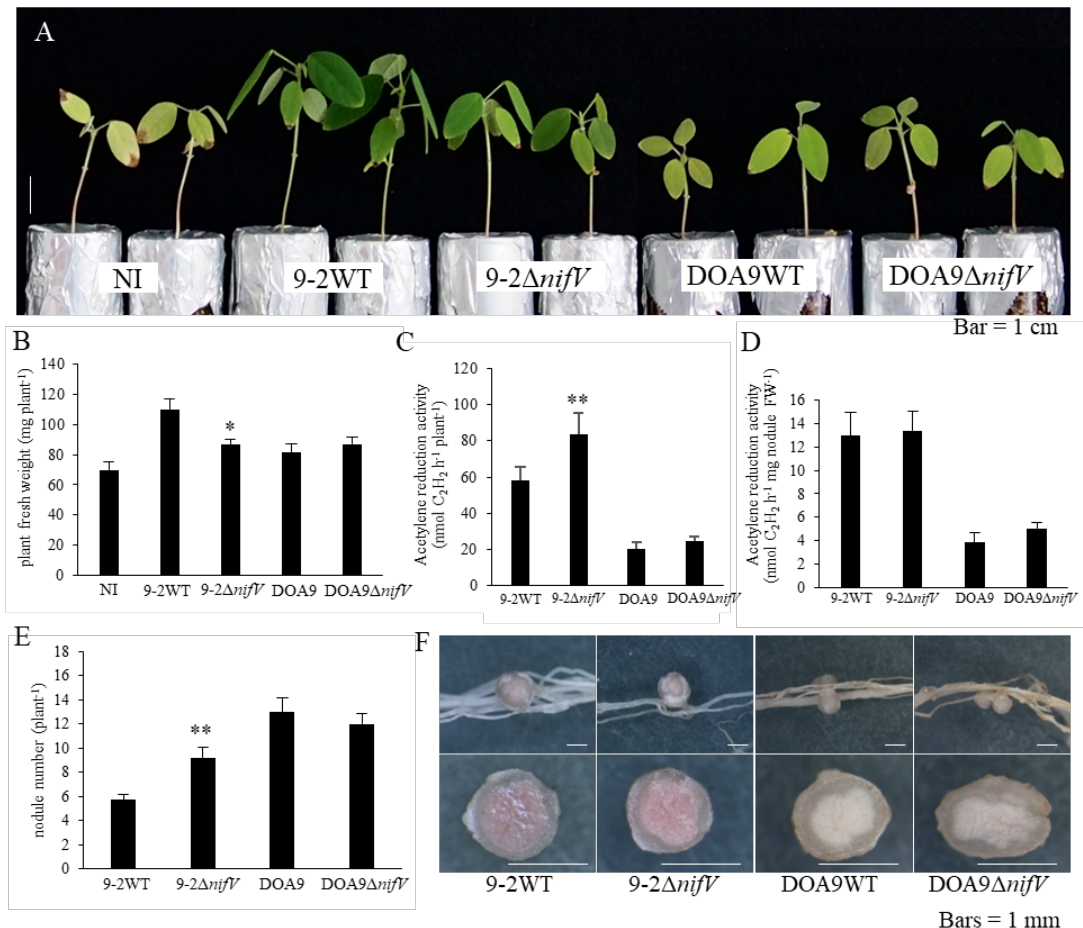


図 9 *Bradyrhizobium* 属根粒菌及びそれらの *nifV* 破壊株とヌスビトハギの共生表現型
共生表現型のデータは菌接種3週間後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 植物の生重量、(C) 植物1個体あたりのアセチレン還元活性、(D) 根粒重量当たりのアセチレン還元活性、(E) 根粒数、(F) 根粒およびその内部。値は平均±SE (n=10) で示す。アスタリスクは、野生株とその *nifV* 破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * P < 0.05, ** P < 0.01)。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種して 3 週間栽培したヌスビトハギは、SUTN9-2 野生株を接種した植物体と比較して、植物重量が有意に低くかったが、根粒重量当たりのアセチレン還元活性は同程度だった（図 9B, D）。そこで、SUTN9-2 の *nifV* 破

壊株がヌスビトハギの根に誘導した根粒は、根粒齢が若い時期のニトロゲナーゼ活性が低く、それが宿主植物の生長に悪影響を及ぼしたと仮説を立てた。その仮説を証明するために、SUTN9-2 およびその *nifV* 破壊株をヌスビトハギに接種し、接種 10 日後の共生表現型を検討した。SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種したヌスビトハギは、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、植物体重は同程度だったが（図 10A）、根粒数は 15% 上昇し（図 10B）、根粒重量当たりのアセチレン還元活性は著しく低かった（図 10C）。また、SUTN9-2 の *nifV* 破壊株が誘導した根粒は、SUTN9-2 野生株が誘導したものと比較して、ピンクの色味がやや薄かった（図 10D）。

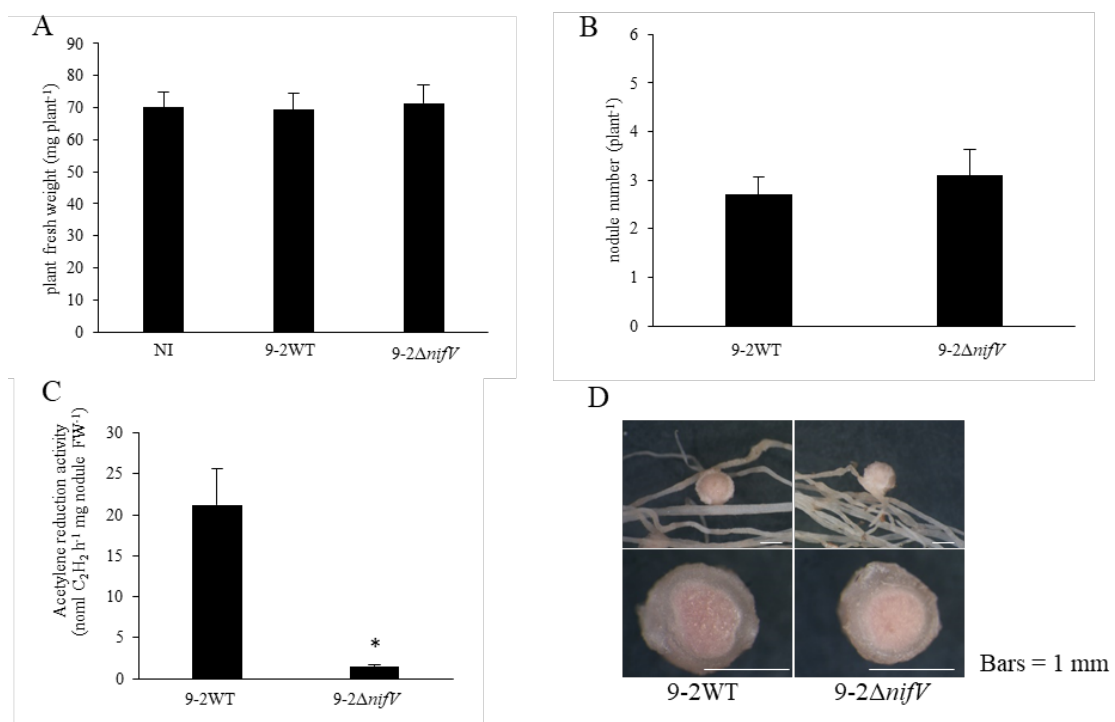


図 10 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 およびその *nifV* 破壊株とヌスビトハギの共生表現型
共生表現型のデータは菌接種 10 日後に取得した。(A) 植物の生重量、(B) 根粒数、
(C) 根粒重量あたりのアセチレン還元活性、(D) 根粒およびその内部。値は平均 ± SE
(n = 10) で示す。アスタリスクは、野生株とその *nifV* 破壊株の有意差を示す (Student's
t-test, * P < 0.05)。

2-4 考察

nifV は、ニトロゲナーゼの成熟に関連する遺伝子の 1 つであり、ニトロゲナーゼの活性中心の Fe-Mo-co を構成する化合物であるホモクエン酸の合成酵素をコードする (Hoover *et al.*, 1989)。Micro scope の検索結果から、*nifV* を保持するほとんどの根粒菌が *Bradyrhizobium* 属であることが明らかになった (表 1)。本研究では、広宿主域根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と *Bradyrhizobium* sp. DOA9 の *nifV* が共生窒素固定に関与しているかどうかを明らかにするため、両菌株の *nifV* 破壊株を作出し、自由生活下でのニトロゲナーゼ活性、及び、4 種のマメ科植物との共生表現型を検討した。

SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 破壊株の自由生活下におけるアセチレン還元活性は、消失しなかったが、それぞれの野生株と比較して有意に低下した (図 5)。ホモクエン酸の添加は、SUTN9-2 と DOA9 の両方の *nifV* 破壊株のアセチレン還元活性を回復させた (図 5)。これらの結果は、先行研究にある *Bradyrhizobium* ORS285 の *nifV* 破壊株の結果と同じであり (Nouwen *et al.*, 2017)、SUTN9-2 と DOA9 の両方の *nifV* が自由生活下でのニトロゲナーゼ活性の発現に関与していることを示唆している。ORS285、SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 破壊株のアセチレン還元活性が、自由生活下で完全に消失しなかった理由について 2 つの可能性が考えられる。第一に、これらの *nifV* 破壊株のニトロゲナーゼは、活性中心でホモクエン酸の代わりにクエン酸を使用することで、アセチレンをエチレンに還元するだけの酵素活性を残している可能性がある (しかし、

N₂還元活性はほとんどないと考えられる)。窒素固定細菌の *Klebsiella pneumoniae* と *Azotobacter vinelandii* は、モリブデン型ニトロゲナーゼを保持しており、それらの *nifV* 破壊株は自由生活下で、それぞれの野生型株の約 80%と 10%のアセチレン還元活性を有するが、N₂固定活性は 7%と 2%とほとんどない (McLean *et al.*, 1989; Madden *et al.*, 1991)。 *K. pneumoniae* の *nifV* 破壊株のニトロゲナーゼの結晶構造解析から、クエン酸が活性中心の FeMo-co に使用されている (Mayer *et al.*, 2002)。第二に、ORS285、SUTN9-2 と DOA9 の *nifV* 破壊株が他の遺伝子によって、少量のホモクエン酸を合成できる可能性がある。 SUTN9-2、DOA9 および ORS285 は、それぞれ自身の NifV タンパク質と約 33%、34%および 35%のアミノ酸配列相同性を示す 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素 (*leuA*) の遺伝子を持っている。アミノ酸配列の相同性から、LeuA が NifV のようにホモクエン酸を合成する活性を持っている可能性が考えられる。

SUTN9-2 の自由生活下でのアセチレン還元活性は、DOA9 や *nifV* を保持する *Bradyrhizobium* ORS285、*Bradyrhizobium* ORS278 や *A. caulinodans* ORS571 と比較すると、約 300~1000 分の 1 程度と著しく低かった (図 5) (Wongdee *et al.*, 2016)。それに関わらず、エダウチクサネムの根粒内において、SUTN9-2 は DOA9 と同程度のアセチレン還元活性を発揮していた (図 6C)。これらのことから、自由生活下における SUTN9-2 の *nif* 遺伝子の調節が、他の *nifV* を保持する根粒菌の調節とは異なることが考えられる。

SUTN9-2 の *nifV* 破壊株は、SUTN9-2 野生株と比較して、エダウチクサネムとタイワンコマツナギ、ヌスビトハギとの共生において、植物生重量とアセチレン還元活性が低く、根粒数は増加した（図 6、8～10）。SUTN9-2 の *nifV* 破壊株の低いアセチレン還元活性は、植物の生長低下と根粒数増加に影響したと考えられる。これらのことから、SUTN9-2 の *nifV* は、宿主植物に依存して共生窒素固定に貢献すると考察した。一方、DOA9 の *nifV* 破壊株は、4 種すべての宿主との共生において、DOA9 野生株と同様の共生表現型を示した（図 6～9）。これらのことから、DOA9 の *nifV* は、本研究で利用した宿主植物との共生窒素固定には関与していないと考察した。また、DOA9 の野生株は、SUTN9-2 野生株と比較して、エダウチクサネム以外の 3 種の宿主との共生において、白くて小型の根粒を誘導し、根粒のニトロゲナーゼ活性および植物への成長促進効果が著しく低かった（図 7、8、9）。これらのことから、DOA9 は 3 種の宿主植物（カリビアンスタイロ、タイワンコマツナギ、ヌスビトハギ）の生育に関して、SUTN9-2 よりも劣る根粒菌であると考察した。

DOA9 の *nifV* は自由生活下でのニトロゲナーゼ活性の発現に関与していたが、エダウチクサネムとの共生には関与していなかった（図 5、6）。これらのことから、DOA9 の *nifV* は、共生時よりも自由生活下で機能していると考えられる。DOA9 は、*nifA* (*nif* 遺伝子のマスターレギュレーター)、*nifD* および *nifK* を、染色体とプラスミド上にそれぞれ 1 コピーずつ、重複して保持している (Vallenet *et al.*, 2002)。これら 2 コ

ピーの *nifADK* は、エダウチクサネムとの共生窒素固定においては機能的に補い合うことができるが、自由生活下でのニトロゲナーゼ活性の発現においては、染色体上の *nifADK* が主に機能している (Wongdee *et al.*, 2016; Wongdee *et al.*, 2018)。DOA9 の *nifV* は1コピーのみで、それは染色体上に位置している。これらのことから、DOA9 の *nifV* は、自由生活下において、染色体上の *nifADK* と協調してニトロゲナーゼ活性の発現に機能していると考えられる。SUTN9-2 はプラスミドを持たず、その染色体上に *nifA*、*nifD*、*nifK*、*nifV* を1コピーずつ保持している (Vallet *et al.*, 2016)。SUTN9-2 の *nifV* は自由生活下でのニトロゲナーゼ活性に関与していることが示唆されたものの、SUTN9-2 の活性を DOA9 と比較すると、著しく低かった (約 1/300~1/1000) (図 5)。また、SUTN9-2 の *nifV* が、3種の宿主植物 (エダウチクサネム、タイワンコマツナギ、ヌスビトハギ) との共生窒素固定に貢献していることが明らかになった (図 6、8~10)。これらのことから SUTN9-2 の *nifV* は、自由生活下で機能する DOA9 の *nifV* とは対照的に、共生時において主に機能していると考えた。

エダウチクサネムにおいて、SUTN9-2 の *nifV* は共生窒素固定に貢献していたが、DOA9 の *nifV* が欠失しても共生窒素固定に影響はなかった (図 6)。これらの結果から、2つの可能性が示唆される。第一に、DOA9 は、エダウチクサネムとの共生窒素固定において、ホモクエン酸を NifV ではなく 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素によって合成している可能性がある。第二に、エダウチクサネムが SUTN9-2 に十分なホモクエ

ン酸を供給しないが、DOA9 には十分に供給している可能性がある。これら 2 つの可能性を明らかにするためには、DOA9 の *nifV* と 2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子の二重破壊株の共生表現型と、エダウチクサネムのホモクエン酸合成酵素 (*FEN1* ホモログ) の遺伝子発現を検討する必要がある。エダウチクサネム等の CI-group 1 のサネム種は、*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 などの *nifV* を保持していない根粒菌と共生できることから、*FEN1* ホモログを保持していることが予想される。しかし、エダウチクサネムの *FEN1* ホモログは、まだ同定されていない。

ヌスビトハギとの共生において、SUTN9-2 の *nifV* 破壊株は、SUTN9-2 野生株と比較して、接種 10 日後の根粒重量当たりのアセチレン還元活性が著しく低かった (図 10C) が、接種 3 週間後では同程度だった (図 9D)。これらのことから、SUTN9-2 の *nifV* は、ヌスビトハギの若い根粒 (接種後 10 日目) のニトロゲナーゼ活性の発現に必要であると考察した。ヌスビトハギは、接種 10 日の時点では SUTN9-2 へホモクエン酸をあまり供給しないが、接種 3 週間の時点までには SUTN9-2 の *nifV* が足りない程度までホモクエン酸を供給していると考えられる。また、接種 3 週間後では、SUTN9-2 の *nifV* 破壊株が誘導した根粒数は、SUTN9-2 野生株が誘導したものより有意に多く、それに伴って植物 1 個体当たりのアセチレン還元活性も有意に高かった (図 9C, E)。この *nifV* 破壊株が誘導した高い根粒数は、接種 10 日後の低いニトロゲナーゼ活性に起因したものであると考えられる。宿主植物は接種 10 日後の *nifV* 破壊株の低ニトロゲナーゼ活性

による窒素栄養不足を避けるために、接種 3 週間にかけて根粒数を増加させたと考えられる。まとめると、共生初期における SUTN9-2 の *nifV* 破壊株の低ニトロゲナーゼ活性が、接種後 3 週間後の根粒数の増加と植物生長の低下を引き起こしたと考えられる。

表 2 に本研究と先行研究の結果をまとめた。本研究にて、SUTN9-2 の *nifV* が 3 種の宿主において、共生窒素固定に貢献していることを明らかにした。それらの共生表現型に共通することとして、SUTN9-2 の *nifV* 破壊株を接種した宿主植物は、同じ種の非接種対照区の植物よりも生長が良好であったことが挙げられる（表 2 の+で示したセル）。この特徴は、NF 依存的に共生を確立するクサネム種（CI-group 2）と ORS285 の共生で見られた特徴と類似しており、NF 非依存的に共生を確立するクサネム種（CI-group 3）と ORS285 の共生の特徴とは異なっていた。一部の NF 非依存的に共生を確立するクサネム種では、ORS285 の *nifV* 破壊株を接種した宿主植物は、同じ種の非接種対照区の宿主植物と同じ程度まで、植物の生長に影響を及ぼした（表 2 の++で示したセル）（Nouwen *et al.*, 2017）。SUTN9-2 は NF を合成するための標準的な *nod* 遺伝子群を保持しており、NF 依存的に宿主植物との共生を確立すると考えられる。従って、本研究の結果は「共生における根粒菌の *nifV* の必要性は、NF 非依存的共生系において高い」という以前の研究を支持した（Nouwen *et al.*, 2017）。

表 2 から、上位のクレード（Dalbergioids、Phaseoloids）に属するマメ科植物は、共生窒素固定に根粒菌の *nifV* を必要とする傾向があり、対照的に、下位のクレード

(Robinoids、IRLC) に属するマメ科植物で、根粒菌の *nifV* を共生窒素固定に必要とするものは見つかっていない。また、*nifV* を保持する根粒菌は、主に上位のクレードを宿主とする *Bradyrhizobium* 属が 9 割以上を占めており、主に下位のクレードを宿主とする *Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属では *nifV* を保持する根粒菌は稀である (表 1)。これらのことから、マメ科植物が進化する過程で、宿主植物がホモクエン酸を根粒菌へ供給するようになり、その宿主の進化に対応するように、根粒菌は *nifV* を失った可能性がある。

表 2 様々な根粒菌とマメ科宿主の共生における根粒菌の *nifV* の必要性

Legume clade	Plant species	<i>Aeschynomene</i> CI group	Symbiont rhizobia	Requirement of rhizobial <i>nifV</i> for plant growth	Reference
Dalbergioids	<i>A. americana</i>	CI group1	<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	+	This study
			<i>Bradyrhizobium</i> DOA9	-	
	<i>A. afraspera</i>	CI group2	<i>Bradyrhizobium</i> ORS285	-	Nouwen <i>et al.</i> 2017
	<i>A. nilotica</i>			+	
	<i>A. evenia</i> and six species*	CI group3 (NF-independent)		++	
	<i>A. virginica</i> and two species**			+	
	Phaseoloids	<i>Stylosanthes hamata</i>		<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	-
<i>Indigofera tinctoria</i>		+			
<i>Desmodium tortuosum</i>		+			
Robinioids	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> (<i>nifV</i> lacking strain)		-	Hakoyama <i>et al.</i> 2009
IRLC	<i>Medicago</i> spp.	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (<i>nifV</i> lacking strain)		-	No reference

「++」で示した濃灰色のセルは、*nifV* 破壊によって宿主の生長が非接種の対照区程度まで影響を及ぼすこと示す。「+」で示した薄灰色のセルは、*nifV* 破壊によって宿主の生長が悪くなるが、非接種の対照区よりも良好であることを示す。「-」で示したセルは *nifV* 破壊が宿主植物の生長に影響を与えないことを示す。「*」は、*A. indica* と *A. scabra*、*A. sensitiva*、*A. deamii*、*A. denticulate*、*A. tambacoudensis* を示す。「**」は、*A. pratensis* と *A. selloi* を示す。

第3章

Ⅲ型分泌系の遺伝子を破壊した *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と

Bradyrhizobium sp. DOA9 の共生特性

3-1 序論

Ⅲ型分泌系（Type III Secretion System, T3SS）はグラム陰性細菌に広く保存されており、注射針様の構造をした分泌装置から標的細胞内にエフェクタータンパク質を送り込む（Galan *et al.*, 2006）。T3SS は病原菌での研究が多く、植物病原菌は植物に感染するときに、T3SS にて植物細胞内にエフェクターを送り込み、植物の防御応答を抑制する。根粒菌も、根粒共生を確立するときに、T3SS にてマメ科宿主細胞内へエフェクターを送り込む。根粒菌エフェクターが根粒共生へ与える影響は様々であり、共生に正に働く場合と、負に働く場合の両方が報告されている（Skorpil *et al.*, 2005; Tsukui *et al.*, 2013）。

SUTN9-2 の T3SS 破壊（分泌装置の破壊によってエフェクターを送り込めない変異）は、エダウチクサネムとの共生には影響がなく、シラトロ（*Macroptilium atropurpureum*）と緑豆（*Vigna radiata*）との共生では、根粒数を減少させた（Piromyou *et al.* 2015）。また、DOA9 の T3SS 破壊は、エダウチクサネム、*Aeschynomene afraspera*、タイワンコマツナギ（*Indigofera tinctoria*）、ヌスビトハギ（*Desmodium tortuosum*）との

共生に影響を与えず、ラッカセイ (*Arachis hypogea*) と緑豆、クロタラリア (*Crotalaria juncea*)、シラトロとの共生能を向上させ、カリビアンスタイロ (*Stylosanthes hamata*) との共生能を低下させた (Songwattana *et al.* 2017)。これらのことから、SUTN9-2 と DOA9 の T3SS は上位のマメ科クレード (Dalgergioids, Phaseolids) に属する宿主との共生において、宿主依存的に正または負に働く場合がある。

本研究では、SUTN9-2 と DOA9 の T3SS 破壊が下位のマメ科クレード (Robinoids) との共生に与える影響を検討した。SUTN9-2 と DOA9 の T3SS 破壊株は、分泌装置を構成する遺伝子を破壊して、エフェクター送り込めないものを使用した (Piromyou *et al.* 2015; Songwattana *et al.* 2017)。宿主植物には、*L. japonicus* Miyakojima MG-20 と *L. japonicus* Gifu B-129、*Lotus burttii* を使用した。本研究にて、両菌株の T3SS は、*Lotus* 属との共生を妨げていることが明らかになった。

3-2 材料と方法

3-2-1 使用した菌株と培養条件

Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 とその T3SS 破壊株 (Piromyou *et al.* 2015)、
Bradyrhizobium sp. DOA9 とその T3SS 破壊株 (Songwattana *et al.* 2017)、
Mesorhizobium loti MAFF303099 は、28°Cにて yeast-mannitol 液体培地で3日間培養した。

3-2-2 *Lotus* 属植物との共生の解析

L. japonicus Gifu B-129 と *L. japonicus* Miyakojima MG-20、*L. burtii* の種子を、濃硫酸中で7分間振盪した後、滅菌水で洗浄し、0.2%次亜塩素酸と0.1%Tween20中に40分間静置した後、再び滅菌水で洗浄した。表面殺菌が終わった種子は、0.8%の寒天プレート上に移し、遮光して28°Cで静置した。2日後、実生をバーミキュライトとBNM液体培地（無窒素培地）が入った植物栽培用試験管へ移し、28°C、12時間の明暗サイクルで栽培した。植物栽培用試験管へ移植して1週間後に、各根粒菌の懸濁液（OD₆₀₀=1.0）1mLを各植物栽培用試験管に接種し、引き続き、28°C、12時間の明暗サイクルで栽培した。根粒菌接種、5週～18週後に、植物の生重量、根粒数およびアセチレン還元活性を測定した。

3-3 結果

3-3-1 SUTN9-2 と *L. japonicus* MG-20 系統との共生

L. japonicus Miyakojima MG-20 との共生表現型は、菌接種50日後に解析した。SUTN9-2 野生株を接種した植物体は、生長が悪く（非接種の対照区と同程度）（図11A, C）、根には白色でニトロゲナーゼ活性のない根粒を植物1個体あたり平均5個程度着生していた（図11B, D, E）。一方、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株を接種した植物体は、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して生長が良く（図11A, C）、根にはニ

トロゲナーゼ活性のあるピンク色の根粒を植物 1 個体あたり平均 1 個着生していた

(図 11B, D, E)。 *M. loti* の共生表現型と比較すると、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株は、宿

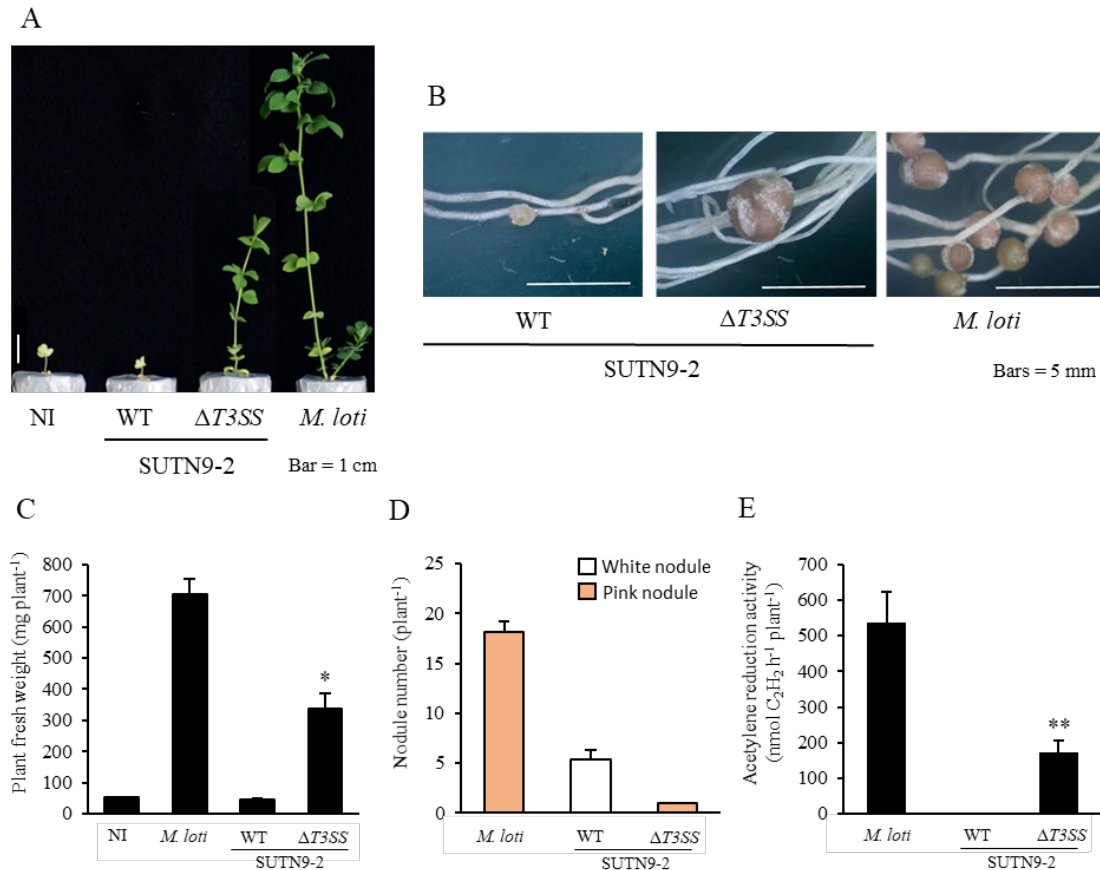


図 11 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 とその *T3SS* 破壊株、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 の *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 との共生表現型

共生表現型のデータは菌接種 50 日後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 根粒、(C) 植物生重量、(D) 根粒数、(E) 植物 1 個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均 \pm SE ($n=6$) で示す。アスタリスクは、SUTN9-2 野生株とその *T3SS* 破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

主植物の成長促進効果と根粒数、アセチレン還元活性が低かった (図 11A, C, D, E)。

3-3-2 SUTN9-2 と *L. japonicus* Gifu B-129 系統との共生

L. japonicus Gifu B-129 との共生表現型は菌接種 56 日後に解析した。SUTN9-2 野

生株を接種した植物体は、非接種の対照区と比較して、やや生長が良く（図 12A, C)、根には平均で 6 個程度の根粒を着生しているものの、そのうちニトロゲナーゼ活性を有するピンク色の根粒は 36%程度であり、残りの 64%はニトロゲナーゼ活性がほとんどない白色の根粒だった（図 12B, D)。一方、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株を接種した植物体は、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して生長が良く（図 12A, C)、着生した根粒のうち 72%程度がニトロゲナーゼ活性のあるピンク色の根粒だった（図 12D)。*M. loti* の共生表現型と比較すると、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株は、宿主植物の成長促進効果と根粒数、アセチレン還元活性が低かった（図 12A, C, D, E)。

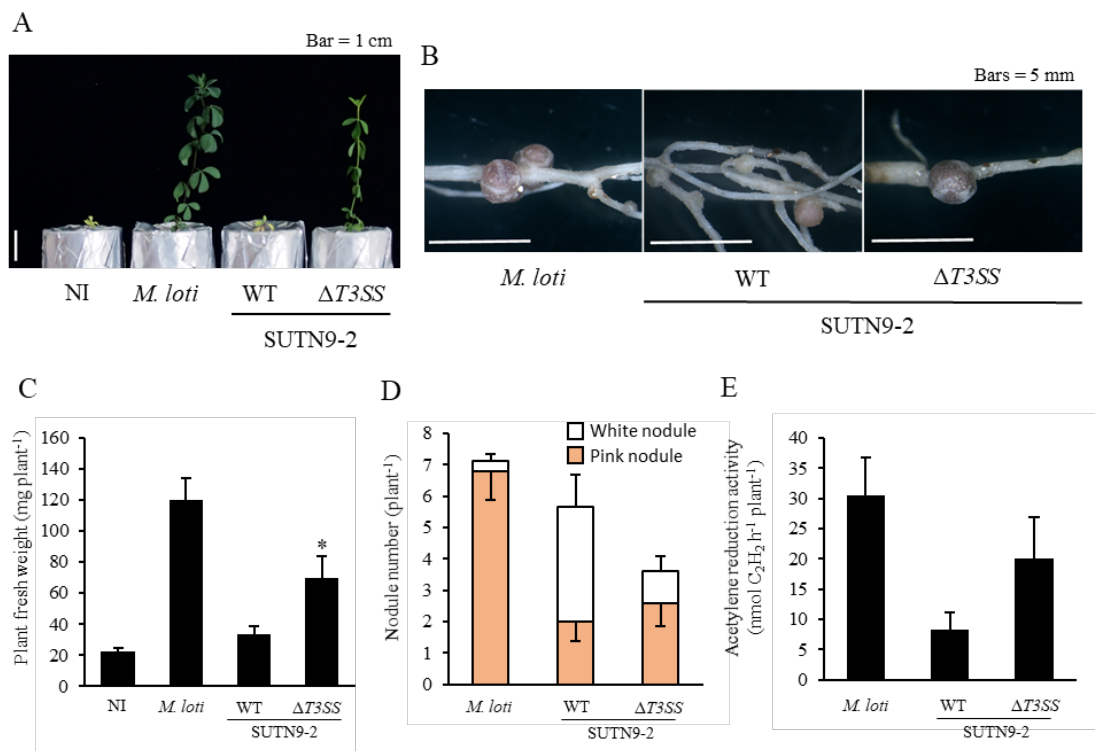


図 12 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 とその *T3SS* 破壊株、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 の *Lotus japonicus* Gifu B-129 との共生表現型

共生表現型のデータは菌接種56日後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 根粒、(C) 植物生重量、(D) 根粒数、(E) 植物1個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均 \pm SE (n = 10) で示す。アスタリスクは、SUTN9-2野生株とその *T3SS* 破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * P < 0.05)。

3-3-3 SUTN9-2 と *L. burtii* との共生

L. burtii との共生表現型は菌接種 35 日後に解析した。SUTN9-2 野生株を接種した植物体は、非接種の対照区と比較して生長が同程度であり（図 13A, C）、根には平均で 30 個程度の根粒を着生していた。しかし、そのうちニトロゲナーゼ活性を有するピンク色の根粒は約 7%であり、残りの約 93%はニトロゲナーゼ活性がほとんどない白色の根粒だった（図 13B, D）。一方、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株を接種した植物体は、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、生長が良く（図 13A, C）、白色の根粒数が著しく低くなるとともに、ピンク色の根粒数が増加していた（図 13D）。*M. loti* の共生表現型と比較すると、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株は、宿主植物の成長促進効果と根粒数は低かったが、植物 1 個体あたりのアセチレン還元活性は同程度だった（図 13A, C, D, E）。

3-3-4 DOA9 と *Lotus* 属との共生

DOA9 および、その *T3SS* 破壊株を接種した宿主植物の生重量は、それぞれ菌接種 18 週後（MG-20）、15 週後（Gifu B-129）、5 週後（*L. burtii*）に測定した。すべての宿主植物において、*T3SS* 破壊株を接種した植物体は、DOA9 野生株を接種したものと比較して生長が良好であり（図 14）、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株の特徴と同じ傾向であった（図 11–13）。しかし、DOA9 の *T3SS* 破壊株は、SUTN9-2 の *T3SS* 破壊株ほどまでには、生長促進効果は向上しなかった。

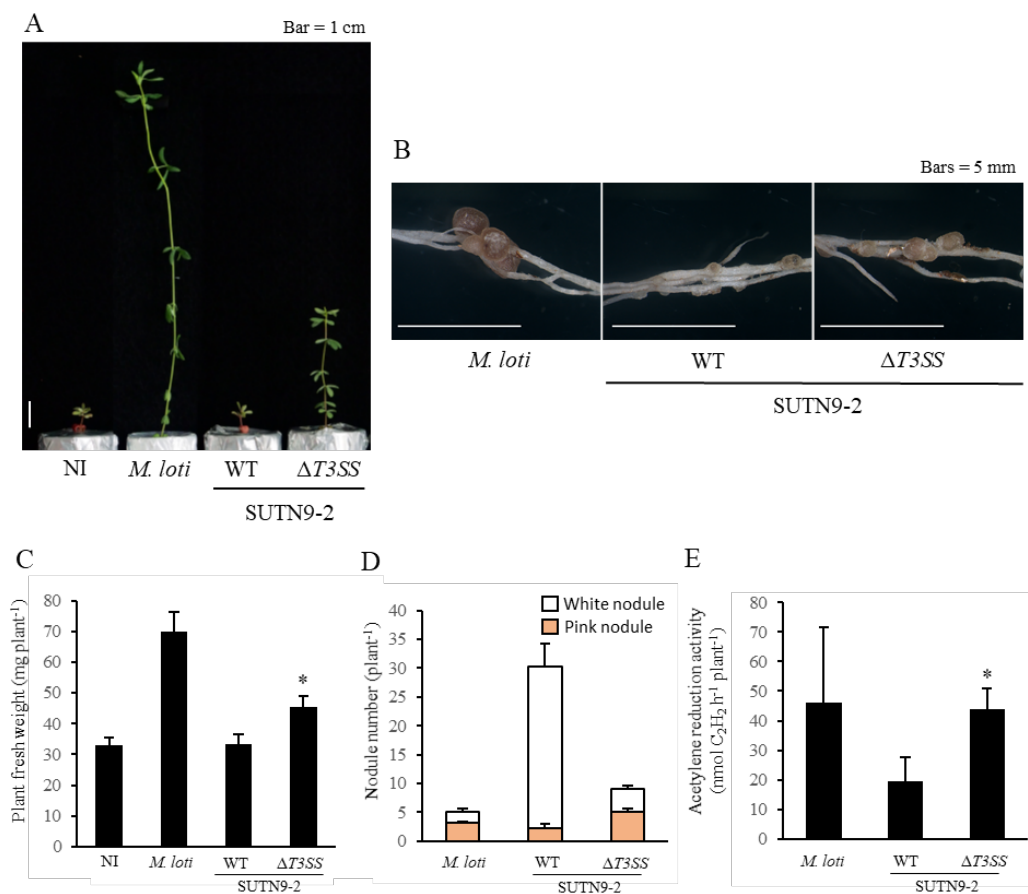


図 13 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2とそのT3SS破壊株、*Mesorhizobium loti* MAFF303099の*Lotus burtii*との共生表現型

共生表現型のデータは菌接種35日後に取得した。(A) 植物の生長、(B) 根粒、(C) 植物生重量、(D) 根粒数、(E) 植物1個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均 \pm SE (n=6~10) で示す。アスタリスクは、SUTN9-2野生株とそのT3SS破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * P<0.05)。

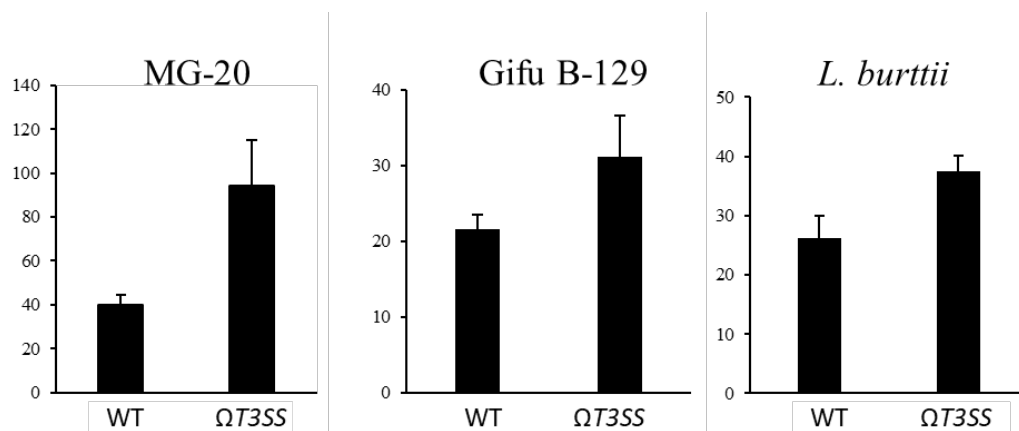


図 14 *Bradyrhizobium* sp. DOA9およびそのT3SS破壊株の*Lotus*属宿主への成長促進効果値は植物生重量 (mg) を示す。生重量はそれぞれ菌接種18週後 (MG-20)、15週後 (Gifu B-129)、5週後 (*L. burtii*) に測定した。

3-4 考察

根粒菌は、根粒共生を確立するときに、T3SSにてマメ科宿主細胞内へエフェクターを送り込む。根粒菌エフェクターが根粒共生へ与える影響は様々であり、共生に正に働く場合と、負に働く場合の両方が報告されている (Skorpil *et al.*, 2005; Tsukui *et al.*, 2013)。SUTN9-2 と DOA9 の T3SS は上位のマメ科クレード (Dalbergioids, Phaseolids) に属する宿主との共生において、宿主依存的に正または負に働く場合がある (Piromyou *et al.* 2015; Songwattana *et al.* 2017)。本研究では、SUTN9-2 と DOA9 の T3SS 破壊が下位のマメ科クレード (Robinoids) との共生に与える影響を検討した。宿主植物には、*L. japonicus* Miyakojima MG-20 と *L. japonicus* Gifu B129、*Lotus burtii* を使用した。

SUTN9-2 および DOA9 の T3SS 破壊株は、それぞれの野生株と比較して、すべての宿主植物との共生能が向上した (図 11–14)。これらの結果から、SUTN9-2 と DOA9 の野生株は「根粒形成因子を分泌して宿主植物と根粒共生をしようとするが、宿主細胞内へ送り込まれたエフェクターが宿主植物の防御応答を誘導してしまい、共生が成立しにくい」と考察した (図 15)。一方、両菌株の T3SS 破壊株は「エフェクターを宿主細胞内へ送り込めないため、宿主植物側の防御応答を誘導せず、根粒形成因子により共生を成立させる確率が上がる」と考察し (図 15)、SUTN9-2 と DOA9 のエフェクターの中には、*Lotus* 属の宿主植物との共生を阻害するものがあるものと考えた。

表 3 に本研究と先行研究をまとめた。上位のクレード (Genistoids、Dalbergioids、

Phaseoloids) のマメ科植物と根粒菌の共生系では、根粒菌の T3SS は共生を正または負に制御する場合があります、T3SS の役割と宿主植物との対応関係は非常に複雑である (表 3)。例を挙げると、*Rhizobium* sp. NGR234 の NopT や NopP のように、根粒菌の一つのエフェクターが、ある宿主との共生には正に、別の宿主では負に働く場合もある (Dai *et al.* 2008; Skorpil *et al.* 2005)。一方で、下位のマメ科クレード (Robinoids、IRLC) のマメ科植物と根粒菌の共生系では、根粒菌の T3SS は共生を負に制御する傾向が強いと考えられる。第一の理由として、*M. loti* MAFF303099 株の T3SS が *Lotus* 属の宿主に依存して、共生を正または負に制御することが報告されているが、正の働きは *L. corniculatus* subsp. *frondosu* と *L. filicaulis* の根粒数を増加させる程度であり、*L. halophilus*、*L. peregrinus* var. *carmeli*、*L. subbiflorus* においては、T3SS が作用すると根粒をほとんど形成しないからである (Okazaki *et al.* 2009)。第二の理由として、本研究にて、SUTN9-2 と DOA9 の T3SS が、*Lotus* 属との共生を阻害していることが判明したからである (図 11–14)。これらのことから、マメ科植物は、根粒菌の T3SS エフェクターを嫌い、特定のエフェクターを持つ根粒菌との共生を拒むように進化してきたと考えられる。根粒菌エフェクターの中には、植物病原菌のホモログもあることから (表 3)、宿主植物は病原菌の脅威から身を守るために、特定のエフェクターを検知して共生をキャンセルする機構を獲得したと考えられる。それに加えて、宿主自身の生育にとって有益な根粒菌のセレクションのためにも、根粒菌エフェクターを監視して

いたと考えられる。*S. meliloti* や *M. loti* R7A 株のような T3SS を持たない根粒菌（表 3）

の背景には、マメ科宿主の T3SS エフェクター監視の進化が関与している可能性がある。

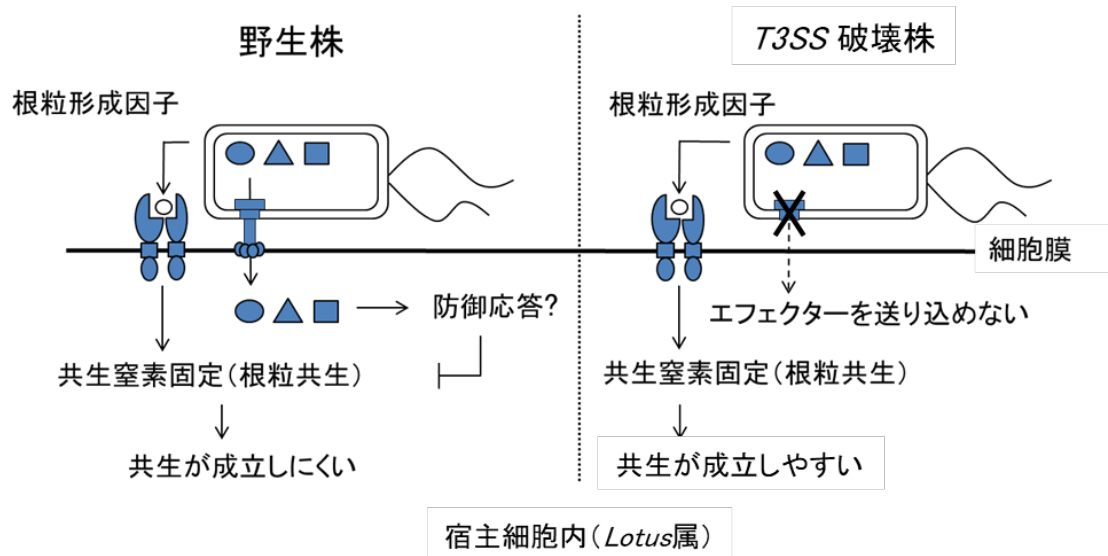


図 15 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 および *Bradyrhizobium* sp. DOA9 と *Lotus* 属との共生

表3 マメ科宿主との共生における根粒菌の T3SS の役割 (Miwa and Okazaki, 2017 を改変)

Legume clade	Plant species	Symbiont rhizobia	Role of rhizobial effector or T3SS on symbiosis	Characteristics of effector		Reference	
				Function*	Homologs in pathogens		
Genistoids	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	NopT; Negative effect on nodulation	Cysteine protease (C58)	Yes ¹	Jun Dai <i>et al.</i> 2008 Fotiadis <i>et al.</i> 2011	
		<i>Bradyrhizobium</i> DOA9	T3SS; Negative effect on nodulation	N		Songwattana <i>et al.</i> 2017	
Dalbergioids	<i>Aeschynomene americana</i> (CI group 1)	<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	T3SS disruption doesn't affect for symbiosis			Piromyou <i>et al.</i> 2015	
	<i>Aeschynomene afraspera</i> (CI group 2)	<i>Bradyrhizobium</i> DOA9				Songwattana <i>et al.</i> 2017	
	<i>Aeschynomene indica</i> (CI group 3; NF-independent)	<i>Bradyrhizobium</i> ORS3257	ErnA; Required for nodulation	Nucleic acid binding protein	Rhizobium specific	Teulet <i>et al.</i> 2019	
	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Bradyrhizobium</i> DOA9	T3SS; Negative effect on nodulation	N		Songwattana <i>et al.</i> 2017	
	<i>Stylosanthes hamata</i>		T3SS; Positive effect on nodulation	N			
	<i>Indigofera tinctoria</i>		T3SS disruption doesn't affect for symbiosis				
Phaseoloids	<i>Desmodium tortuosum</i>						
	<i>Tephrosia vogelii</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	NopT; Positive effect on nodulation	Cysteine protease (C58)	Yes ¹	Jun Dai <i>et al.</i> 2008 Fotiadis <i>et al.</i> 2011	
	<i>Flemingia congesta</i>		NopP; Positive effect on nodulation	U	Rhizobium specific	Skorpil <i>et al.</i> 2005	
			NopL; Positive effect on nodulation	Substrate of MAPK		Bartsev <i>et al.</i> 2003 Zhang <i>et al.</i> 2011	
	<i>Glycine max</i> cv. Williams 82	<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	NopC; Positive effect on nodulation	U		Jiménez-Guerrero <i>et al.</i> 2015	
			NopI; Positive effect on symbiosis				
	<i>Glycine max</i> cv.BARC2	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA61	BEL2-5; Negative effect on nodulation of soybean carrying <i>Rj4</i> allele	Cysteine protease (C48)	XopD (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Faruque <i>et al.</i> 2015	
	<i>Glycine max</i> cv. Amphor	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA110	NopE; Positive effect on nodukation	Calcium binding protein		Wenzel <i>et al.</i> 2010	
	<i>Glycine max</i> cv. Hadee	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA122	NopP; Negative effect on nodulation of soybean carrying <i>Rj2</i> allele	U	Rhizobium specific	Sugawara <i>et al.</i> 2018	
	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	NopE; Positive effect on nodulation	Calcium binding protein		Wenzel <i>et al.</i> 2010	
		<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	T3SS; Positive effect on nodulation	N		Piromyou <i>et al.</i> 2015	
	<i>Lablab purpureus</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	NopM; Positive effect on nodulation	E3 Ubiquitin ligase	Yes ²	Xin <i>et al.</i> 2012	
	<i>Vigna unguiculate</i>			NopP; Negative effect on nodulation	U	Rhizobium specific	Ausmees <i>et al.</i> 2005
		<i>S. fredii</i> HH103	NopC; Positive effect on nodulation	Jiménez-Guerrero <i>et al.</i> 2016			
			NopI; Positive effect on symbiosis				
	<i>Vigna radiata</i>	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	NopE; Negative effect on nodulation	Calcium binding protein		Wenzel <i>et al.</i> 2010	
		<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	T3SS; Positive effect on nodulation	N		Piromyou <i>et al.</i> 2015	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	NopL; Antagonazation of nodule senescence	Substrate of MAPK	Rhizobium specific	Bartsev <i>et al.</i> 2003 Zhang <i>et al.</i> 2011	
			NopT; Positive effect on nodulation	Cysteine protease (C58)	Yes ¹	Jun Dai <i>et al.</i> 2008 Fotiadis <i>et al.</i> 2011	
Robinoids	<i>Lotus</i> spp.	<i>Mesorhizobium loti</i> R7A	T3SS lacking strain				
	<i>L. corniculatus</i> subsp. <i>frondosu</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	T3SS; Positive effect on nodulation	N		Okazaki <i>et al.</i> 2009	
	<i>L. filicaulis</i>						
	<i>L. halophilus</i>		mlr6361; Negative effect on nodulation	Shikimate kinase			Yes ³
	<i>L. peregrinus</i> var. <i>carmeli</i>		T3SS; Negative effect on nodulation	N			
	<i>L. subbiflorus</i>		T3SS disruption doesn't affect for symbiosis				
	<i>L. japonicus</i> Gifu B-129	<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2 <i>Bradyrhizobium</i> DOA9	T3SS; Negative effect on nodulation and plant growth	N		This study	
	<i>L. japonicus</i> MG-20						
	<i>L. burtii</i>						
IRLC	<i>Medicago</i> spp.	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	T3SS lacking strain				

* 「N」はエフェクターが未同定 (Not identified)であることを示す。「U」はエフェクターの機能が未知 (Unknown)であることを示す。

¹YopT (*Yersinia pestis*), LopT (*Photorhabdus luminescens*), AvrPphB (*Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola).

²IpaH9.8, IpaH1.4 (*Shigella flexneri*), SspH1, SspH2, SlrP (*Salomonella enterica*), HpX29 (*Ralstonia solanacearum*).

³Putative effectors in *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas spp.*

第 4 章

bclA 遺伝子を破壊した *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 の共生特性

4-1 序論

根粒細胞内の根粒菌はバクテロイドと呼ばれ、菌体が伸長して多核化しているなど、自由生活下と異なった特徴を示す (Margaert *et al.*, 2005)。*Medicago truncatula* 等の IRLC に属するマメ科種は、根粒特異的システインリッチペプチド (Nodule-specific-Cysteine-Rich-peptide, NCR ペプチド) にて根粒細胞内の根粒菌をバクテロイドに分化させる (Van de Velde *et al.*, 2010)。NCR ペプチドは、ディフェンシンと配列が類似している抗菌性ペプチドであり、根粒菌の分裂を阻害して菌体を伸長させるなどの生理活性を持っており、共生窒素固定に必須の分子である (Van de Velde *et al.*, 2010)。一方、NCR ペプチドの作用を調節する根粒菌の遺伝子として、ABC トランスポーター遺伝子に分類される *bacA* 遺伝子が同定されている。*S. meliloti* の *bacA* は共生窒素固定に必須であり、*bacA* 遺伝子を破壊すると宿主である *M. truncatula* と共生窒素固定できなくなる (Haag *et al.*, 2011)。詳細は不明であるが、*S. meliloti* の BacA タンパク質には NCR ペプチドの作用・効果を調節する働きがあると考えられる。

IRLC と同時に分岐したとされる Robinoids に属する *L. japonicus* や、IRLC と Robinoids より先に分岐したとされる Phaseoloids に属するダイズでは、*M. truncatula* 等の NCR ペプチドに相当する遺伝子は見つかっていない (Alunii *et al.*, 2007)。それらの

宿主根粒内のバクテロイドの形態は、自由生活下状態の菌体とほとんど同じである。

また、それらと共生する根粒菌の *bacA* を破壊しても共生窒素固定能を失わない (Maruya and Saeki, 2010; Barrière *et al.*, 2017)。従って、宿主植物の NCR ペプチドと根粒菌の *bacA* が共生窒素固定に必須でない共生系もある。

近年、Phaseoloids より先に分岐したとされる Dalbergioids に属する *A. afraspera* (CI-group 2) と *A. indica* (CI-group 3) のクサネム種が NCR ペプチドに相当する遺伝子を保持していることと、その共生菌である *Bradyrhizobium* ORS285 の *bclA* (*Bradyrhizobium* 属根粒菌の *bacA*) は、共生窒素固定に必須であることが明らかになった (Guefrachi *et al.*, 2015)。

本研究では、*Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 の *bclA* 破壊が宿主植物との共生に及ぼす影響を検討するため、SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を作出し、エダウチクサネム、タイワンコマツナギ、ヌスビトハギとの共生を検討した。その結果、SUTN9-2 の *bclA* 破壊はタイワンコマツナギとの共生に負の影響を及ぼすことが明らかとなった。

4-2 材料と方法

4-2-1 使用した菌株と培養条件

SUTN9-2 とその *bclA* 破壊株は、28℃にて、yeast-mannitol 培地、または 0.1%アラビノースと 0.25%yeast-extract を添加した HEPES-MES 培地のいずれかで培養し

た。大腸菌は、Luria-Bertani 培地で 37°Cにて培養した。*bclA* 破壊株の作出のために、スクロース（終濃度 10%）、スペクチノマイシン（終濃度 200 µg /mL）、カナマイシン（終濃度 50 µg /mL）、または、ゲンタマイシン（終濃度 50 µg /mL）を必要に応じて各培地に添加した。

4-2-2 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 の *bclA* 遺伝子の破壊

SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を作出するために、*bclA* の ORF の上流および下流の領域を、*bclA* UP *EcoR*I Forward; 5'-agcgggaattcgctcaatctgtccgacgatgcg-3' と *bclA* UP *Bam*HI Reverse; 5'-cctcagcgcgcggatccgatgtgttcacagagctgg-3'、*bclA* DW *Bam*HI Forward; 5'-tgtgaacaacatcggatccgcgcgtgaggcgagcgtgg-3' と *bclA* DW *Xba*I Reverse; 5'-cggcggctctagacatgagcgttcttccg-3'のプライマーセットで PCR にて増幅した。上流と下流の DNA 断片はオーバーラップ PCR で連結し、*SacB* マーカーを含む自殺プラスミド pNPTS129 に *EcoR*I および *Xba*I にてクローニングした。続いて、得られたプラスミドの上流域と下流域の中間に、スペクチノマイシン耐性遺伝子を *Bam*HI にてクローニングしたものを pNPTS129/9-2*bclA*UP/*spec*^r/9-2*bclA*DW とした。この遺伝子破壊用プラスミドを大腸菌 DH5α に形質転換し、ヘルパー大腸菌を用いた triparental-mating にて、SUTN9-2 に遺伝子破壊用プラスミドを接合伝達した。*bclA* 破壊株の候補は、スペクチノマイシン（終濃度 200 µg /mL）、ゲンタマイシン

(終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびスクロース (終濃度 10%) を含む HM 寒天プレート上に捨現するコロニーとして得た。候補コロニーについては、PCR によって *bclA* 遺伝子がスペクチノマイシン耐性遺伝子で置換されたことを確認し、その菌株を *bclA* 破壊株とした。

4-2-3 宿主植物との共生の解析

エダウチクサネムの種子を濃硫酸中で 30 分間振盪し、滅菌水で洗浄した。タイワンコマツナギの種子を、濃硫酸中で 10 分間振盪した後、滅菌水で洗浄し、0.2% 次亜塩素酸と 0.1% tween20 中に 40 分間静置した後、再び滅菌水で洗浄した。表面殺菌が終わった種子は、0.8% の寒天プレート上に移し、遮光して 28°C で静置した。2 日後、実生をバーミキュライトと BNM 液体培地が入ったレオナルドジャーへ移し、28°C、12 時間の明暗サイクルで栽培した。レオナルドジャーへ移植して 1 週間後に、各根粒菌の懸濁液 ($\text{OD}_{600}=1.0$) 1 mL を接種し、引き続き、28°C、12 時間の明暗サイクルで栽培した。根粒菌接種 21 日後または 28 日後に、植物の生重量、根粒数およびアセチレン還元活性を測定した。

4-3 結果

4-3-1 宿主植物との共生表現型

エダウチクサネムとの共生表現型のデータは、菌接種 21 日後に取得した。

SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を接種した植物体は、SUTN9-2 野生株を接種した植物体と

比較して、植物の生長と根粒数、アセチレン還元活性が同程度だった (図 16)。エ

ダウチクサネムとの共生と同様に、SUTN9-2 の *bclA* の破壊はヌスビトハギとの共生

に影響を与えなかった (図 17)。

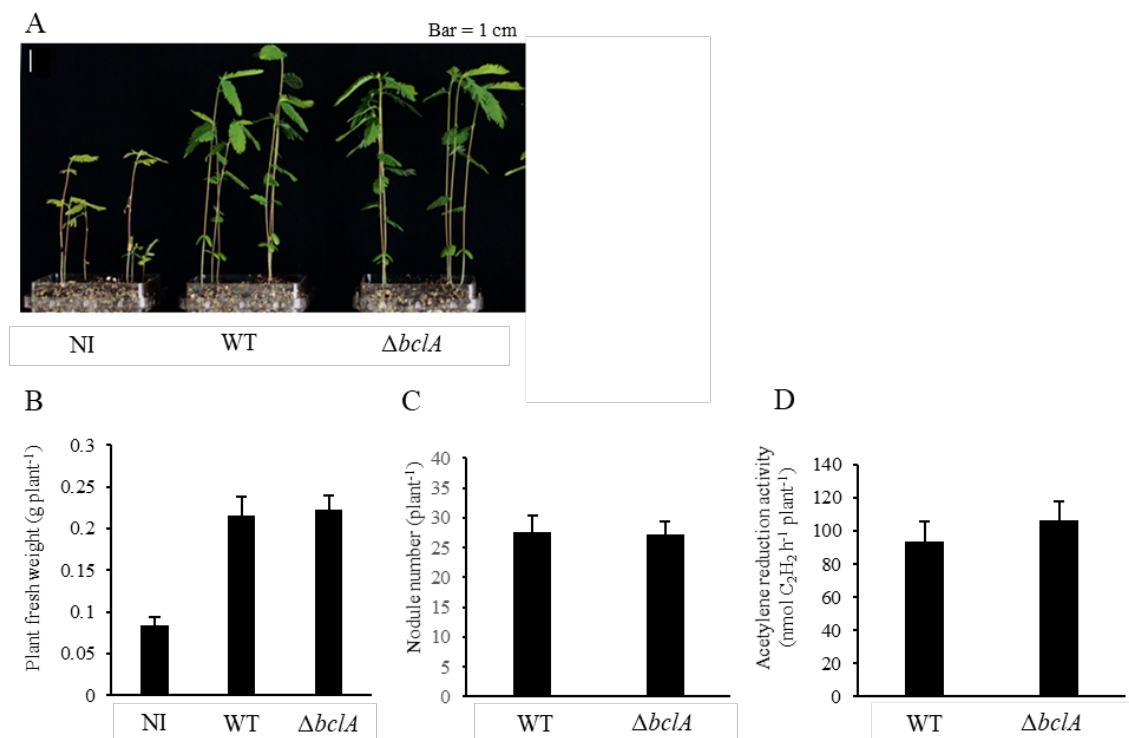


図 16 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2とその*bclA*破壊株のエダウチクサネムとの共生表現型
共生表現型は菌接種21日後に解析した。(A) 植物の生長、(B) 植物生重量、(C) 根粒数、(D) 植物1個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均±SE (n=6) で示す。

タイワンコマツナギとの共生表現型のデータは、菌接種 28 日後に取得した。

SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を接種した植物体は、SUTN9-2 野生株を接種した植物体と

比較して、植物の生長と根粒数が有意に低く、アセチレン還元活性は平均で 17%低下した（図 18）。

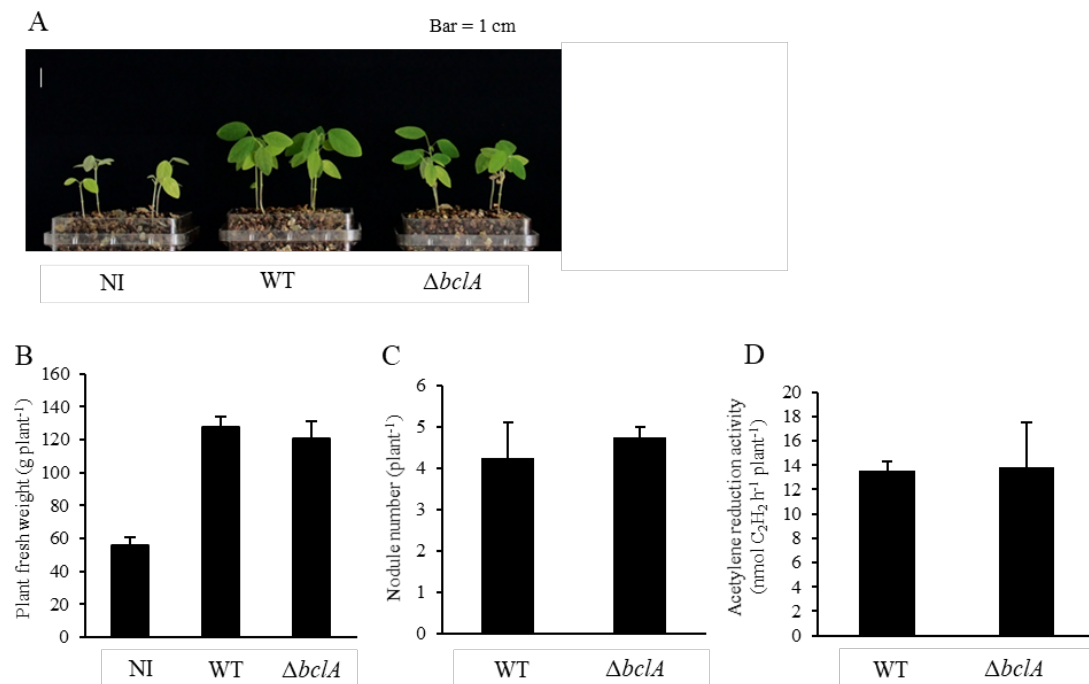


図 17 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2とその*bclA*破壊株のヌスビトハギとの共生表現型
共生表現型は菌接種28日後に解析した。（A）植物の生長、（B）植物生重量、（C）根粒数、（D）植物1個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均±SE（n=4）で示す。

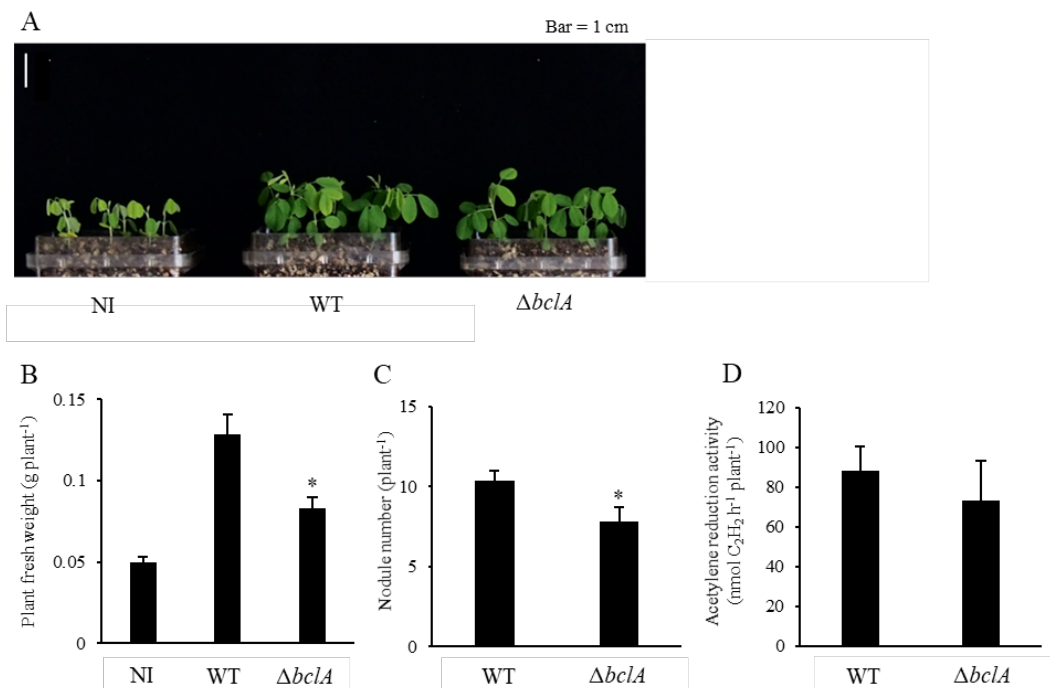


図 18 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 とその *bclA* 破壊株のタイワンコマツナギとの共生表現型
共生表現型は菌接種28日後に解析した。(A) 植物の生長、(B) 植物生重量、(C) 根粒
数、(D) 植物1個体当たりのアセチレン還元活性。値は平均±SE (n=6) で示す。アスタ
リスクは、SUTN9-2野生株とその*bclA*破壊株の有意差を示す (Student's *t*-test, * *P* < 0.05)。

4-4 考察

タルウマゴヤシや特定のクサネム種 (CI-group 2 と 3) の NCR ペプチドと、それら
の共生菌である *S. meliloti* と *Bradyrhizobium* ORS285 の *bacA* および *bclA* は、共生窒素
固定に必須の分子である。一方、NCR ペプチドが検出されないミヤコグサやダイズで
は、根粒菌の *bacA* および *bclA* は共生窒素固定に必須ではない。本研究では、
Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 の *bclA* が、CI-group 1 のエダウチクサネムや多様なマメ科
植物との共生窒素固定に関与しているかどうかを検討した。

SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を接種したエダウチクサネムおよびヌスビトハギは、
SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、共生表現型に変化はなかった (図 16, 17)。

従って、SUTN9-2 の *bclA* は、エダウチクサネムとヌスビトハギとの共生窒素固定に必須ではないと考えられる。

SUTN9-2 の *bclA* 破壊株を接種したタイワンコマツナギは、SUTN9-2 野生株を接種したものと比較して、植物の生長と根粒数が有意に低く、アセチレン還元活性は平均で 17%低下した (図 18)。この共生表現型は、*M. loti* の *bacA* 破壊株と類似していた

(Maruya and Saeki, 2010)。*M. loti* の *bacA* 破壊株を接種した *L. japonicus* MG-20 は、*M. loti* 野生型を接種したものと比較して、菌接種 14 日後から 28 日後までの間で根粒数が少なく、菌接種 42 日後の植物の生長も低下した (Maruya and Saeki, 2010)。これらのこ

とから、SUTN9-2 の *bclA* は *M. loti* の *bacA* のように、宿主植物との共生に必須ではないものの、根粒着生や植物の生長促進効果に対して負の影響を及ぼしたと考えられる。

表 4 に本研究と先行研究をまとめた。NCR ペプチドを持つマメ科植物は、下位クレードの IRLC に属する植物で多く見つかっており、それ以外のクレードでは、Dalbergioids に属するクサネム種 (CI-group 2 と 3) を除いて、見つかっていない (表 4)。これらのことから、NCR ペプチドは、進化が進んだマメ科植物が獲得した共生窒素固定に必須の分子であると考えられる。しかし、進化的に祖先の系統に分類される分類群の中でもクサネム種だけが、IRLC クレードの植物のような NCR ペプチドを保持していることに関して疑問が残る。クサネムの NCR ペプチドは、IRLC の植物の NCR ペプチドと相同性がないことから、それぞれの NCR ペプチドは収斂進化の結果と

考えることはできるが、詳細は不明である (Czernic *et al.* 2015)。NCR ペプチドの起源やその進化の解明は、共生の進化を理解する上でも重要な課題であるが、より多様なマメ科植物について、NCR ペプチドの有無とアミノ酸配列、共生に対する必要性などの情報が必要である。

NCR ペプチドを持つマメ科植物との共生窒素固定には、根粒菌の *bacA* または *bclA* が必須であるが、例外の共生系がふたつ報告されている (表 4)。ひとつは、*Aeschynomene afraspera* との共生系である。NCR ペプチドを保持する *A. afraspera* との共生には、*Bradyrhizobium* ORS285 の *bclA* が必須であるが、*B. diazoefficiens* USDA110 の *bclA* は必須ではない (表 4)。マメ科植物の NCR ペプチドの作用を調節するタンパク質として、BacA または BclA が同定されているが、*B. diazoefficiens* USDA110 は BclA 以外の未知の調節機構を保持している可能性がある (Barrière *et al.* 2017)。もうひとつは、*Glycyrrhiza uralensis* (ウラルカンゾウ) と *Sinorhizobium fredii* HH103 の共生系である。*G. uralensis* は NCR ペプチドを保持しているものの、他の IRLC のマメ科植物と比較すると、NCR ペプチドの遺伝子数が最も少ない (表 4)。NCR ペプチドの遺伝子数とバクテロイドの伸長度は相関性があり、*G. uralensis* は他の IRLC のマメ科植物と比較して、バクテロイドの伸長度も最も小さい (Montiel *et al.*, 2016)。従って、*G. uralensis* の NCR ペプチドによる根粒菌の制御は、他の IRLC のマメ科植物よりも比較的弱いと推察され、*S. fredii* HH103 は *bacA* が欠失しても *G. uralensis* からの制御に耐えることがで

き、窒素固定することができる可能性がある。本研究では、SUTN9-2 の *bclA* を破壊しても、エダウチクサネム (*A. americana*) との共生に影響を及ぼさなかった (図 16, 表 4)。その理由として、エダウチクサネムが NCR ペプチドを保持していない、または、*G. uralensis* のように制御が比較的弱い可能性が考えられる。また、エダウチクサネムが NCR ペプチドを保持していると仮定すると、SUTN9-2 が USDA110 のように *bclA* 以外に NCR ペプチドの調節機構を保持している可能性がある。CI-group 2 と 3 のクサネム種で NCR ペプチドが検出されていることから (表 4)、CI-group 1 のエダウチクサネムも NCR ペプチドを保持している可能性があるが、エダウチクサネムの NCR ペプチドの有無は未解析である。

マメ科植物の NCR ペプチドは、根粒細胞内の根粒菌を制御し、窒素固定状態であるバクテロイドに分化させる役割に加えて、共生窒素固定の効率を上げているという報告もある。*Rhizobium leguminosarum* A34 株は、NCR ペプチドが見つかっていないインゲン (*Phaseolus vulgaris*) 根粒中のバクテロイド状態 (自由生活下と同じ菌の形態) よりも、NCR ペプチドを生産する IRLC のエンドウ (*Pisum sativum*) 根粒中のバクテロイド状態 (伸長型) の方が高いニトロゲナーゼ活性を有し、宿主の生長促進効果もインゲンよりエンドウのほうが高い (Oono and Denison, 2010)。また、*Medicago* 属と *Sinorhizobium* 属根粒菌、*Aeschynomene* 属と *Bradyrhizobium* 属根粒菌の共生系でもバクテロイドの形態と窒素固定効率の相関に関する研究があり、球型、伸長型、自由生活

下型のバクテロイドの順に共生窒素固定の効率が高いことが示唆されている

(Kazmierczak *et al.*, 2017; Lamouche *et al.*, 2019)。これらのことから、マメ科植物は自身の生育のために、根粒菌を抗菌性のペプチドでより強く制御し、窒素固定の効率を上げるように進化してきた可能性がある。

表4 マメ科宿主の NCR ペプチドと共生における根粒菌の *bacA* または *bclA* の必要性

Legume clade	Plant species	Number of NCR peptides genes*	Reference (NCR)	Symbiont rhizobia	Requirement of rhizobial <i>bacA</i> or <i>bclA</i> for symbiosis**	Reference (<i>bacA</i> or <i>bclA</i>)	
Mimosoideae	<i>Leucaena leucocephala</i>	ND	Ishihara <i>et al.</i> 2011	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	-	Ardissonne <i>et al.</i> 2011	
Dalbergioids	<i>Aeschynomene americana</i> (CI-group 1)	U	Czemic <i>et al.</i> 2015	<i>Bradyrhizobium</i> SUTN9-2	-	This study	
	<i>Aeschynomene afraspera</i> (CI group 2)	10 ~ 100		<i>Bradyrhizobium</i> ORS285	++	Guefrachi <i>et al.</i> 2015	
	<i>Aeschynomene indica</i> (CI group 3; NF-independent)	10 ~ 100		<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA110	-	Barrière <i>et al.</i> 2017	
				<i>Bradyrhizobium</i> ORS285	++	Guefrachi <i>et al.</i> 2015	
Phaseoloids	<i>Indigofera tinctoria</i>	U			+	This study	
	<i>Desmodium tortuosum</i>	U			-		
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	U		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseol</i>	-	Karunakaran <i>et al.</i> 2010	
				<i>Rhizobium etli</i>	-		
	<i>Lablab purpureus</i>	U		<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	-	Ardissonne <i>et al.</i> 2011	
	<i>Vigna unguiculate</i>	U			-		
	<i>Tephrosia vogelii</i>	U	-				
		<i>Glycine max</i>	ND	Alunii <i>et al.</i> 2007	<i>B. diazoefficiens</i> USDA110	-	Barrière <i>et al.</i> 2017
		<i>Cajanus cajan</i>	U		<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	-	Respo-Rivas <i>et al.</i> 2016
-							
Robinioids	<i>Lotus japonicus</i>	ND	Alunii <i>et al.</i> 2007	<i>Mesorhizobium loti</i>	+	Maruya <i>et al.</i> 2010	
IRLC	<i>Medicago truncatula</i>	639	Montiel <i>et al.</i> 2016	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	++	Haag <i>et al.</i> 2011	
	<i>Medicago sativa</i>	469			++	Glazebrook <i>et al.</i> 1993	
	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	7		<i>S. fredii</i> HH103	-	Respo-Rivas <i>et al.</i> 2016	
	<i>Pisum sativum</i>	353		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>	++	Karunakaran <i>et al.</i> 2010	
		<i>Astragalus sinicus</i>	U		<i>Mesorhizobium huakuii</i>	++	Tan <i>et al.</i> 2009

*NDは「Not Detected」、Uは「Unknown」を示す。

**「++」で示した濃灰色のセルは、*bacA* または *bclA* の破壊によって、宿主との共生窒素固定能が失われることを示す。「+」で示した薄灰色のセルは、*bacA* または *bclA* の破壊によって宿主の生長が悪くなるが、非接種の対照区よりも良好であることを示す。「-」で示したセルは *bacA* または *bclA* の破壊が宿主との共生窒素固定能に影響を与えないことを示す。

第5章 総括

約 14000 種のマメ科植物とそれらを宿主とする根粒菌による共生窒素固定は、地球規模での窒素循環で非常に大きな役割を担っており、この共生系を十分に理解し、農業の持続的な生産の維持に応用することは、喫緊の課題となっている。ミヤコグサとその根粒菌に代表されるようなモデル共生系から得られた知見が蓄積し、近年、モデル根粒共生系以外の様々なマメ科植物と根粒菌との共生系についての理解も深まりつつある。その結果、共生成立に関する基本的なシステムは、モデル共生系と共通性はあるものの、モデル共生系では知ることのできなかつた新しい知見も得られている。このような「共生システムの多様性」には、マメ科植物と根粒菌が共生を始めたといわれる約 6 千万年前から現在までの長い間に辿ってきた、宿主植物と根粒菌の共進化の過程を解き明かすための重要な手掛かりがあると考えられる。本研究では、共生システムの多様性の理解を深めるために、広宿主域根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 と *Bradyrhizobium* sp. DOA9 を材料として、共生窒素固定に関わる既知の遺伝子を破壊し、多様なマメ科植物との共生に与える影響を検討した。本章では、本研究で得られた知見を先行研究の知見と共にまとめ、マメ科植物と根粒菌の共生システムの進化について考察した。

nifV は、自由生活下で窒素固定をする細菌に普遍的にみられる。根粒菌も *nifV* を保持しているものが全体の 3 割程度いることから、根粒菌の祖先は土壌に存在した窒素

固定細菌だった可能性がある。根粒菌の *nifV* は、上位のマメ科クレードのマメ科植物との共生に必要とされる傾向が強いことから（表 2）、根粒菌がマメ科植物と共生を始めた頃は、宿主植物からのホモクエン酸の供給はなく、根粒菌の *nifV* にホモクエン酸合成を依存して共生窒素固定をしていたと考えられる。

マメ科植物は、根粒菌との共生を開始して、様々な根粒菌および土壌微生物と相互作用していく中で、植物病原菌の防除および有益な根粒菌をセレクションするためのひとつの手段として、根粒菌の T3SS エフェクター（T3SE）の監視をしていたと考えられる。一方、根粒菌もマメ科植物の細胞内、いわゆる「安全な住み家」へ入り込むために、宿主植物の監視を回避して根粒共生に正に働くエフェクターを進化させてきたと考えられる。このような、マメ科植物と根粒菌の「せめぎ合い」の痕跡が見られるのが、上位のクレード（Genistoids、Dalbergioids、Phaseoloids）のマメ科植物と根粒菌の共生系と考えられる。これらの共生系では、根粒菌の T3SE は、共生に正にも負にも働き、それらと宿主植物との対応関係が非常に複雑だからである（表 3）。また、共生窒素固定に根粒菌の *nifV* を必要とする場合があることから（表 2）、マメ科植物は特定の根粒菌をあまり優遇せず、窒素固定に必要なホモクエン酸の供給を制限していた可能性が考えられる。

「せめぎ合い」が続く中で、マメ科植物は、特定の根粒菌の T3SE を検知し、共生をキャンセルする機構をさらに進化させたと考えられる。その進化が見られるものが、

下位のクレード (Robinoids, IRLC) のマメ科植物であると考えられる。Robinoids に属する *Lotus* 属が、根粒菌の T3SS を嫌う傾向がみられたこと (表 3) は、マメ科植物が T3SE を検知する機能を進化させてきたと考えられる。T3SE 検知能等の進化により、自身の生育にとって有益な根粒菌のセレクションがより容易になったとともに、マメ科植物は受け入れた根粒菌を優遇し始め、ホモクエン酸を供給するように進化したと考えられる。それに対応するように、*Lotus* 属や *Medicago* 属の根粒菌である *M. loti* や *S. meliloti* は *nifV* を保持していない (表 2)。それらに加えて、マメ科植物と根粒菌の宿主特異性が厳密になるとともに、マメ科植物は根粒菌の窒素固定の恩恵をさらに受けようと、NCR ペプチドに代表されるような抗菌性のペプチドで根粒菌を制御し、窒素固定効率を上げるように進化したと考えられる。この NCR ペプチドによる制御が顕著にみられるのが、進化がより進んでいるとされる IRLC のマメ科植物である (表 4)。

マメ科植物と根粒菌の進化は、マメ科植物が主導権を握り、自身の生存のために土壌の根粒菌を利用してきたように見える。本研究は、SUTN9-2 と DOA9 の両根粒菌株の遺伝子破壊株を作出し、多様なマメ科宿主との共生表現型を検討した。本研究と先行研究から、根粒菌の祖先は土壌中の自由生活型の窒素固定細菌である可能性があり、マメ科植物と共生を始めて相互作用していく中で、マメ科植物が主導権を握り、植物の生育に有利になるように宿主特異性が厳密化されるシステムができ上がったと推定することができる。本研究では、広宿主域根粒菌と多様なマメ科種を材料としたこと

で、これまでに広く研究されてきたモデル共生系では知ることのできなかった共生窒素固定のシステムの一端を明らかにすることができた。これらの知見は、根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定のシステムとその進化の過程、多様性を生み出す機構の解明に貢献できるものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行と取りまとめにあたり、ご指導を賜った鹿児島大学大学院・理工学研究科の内海俊樹教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査において、数々の御助言と御指導を賜りました鹿児島大学同上の九町健一准教授、橋本雅仁教授に厚くお礼申し上げます。

論文執筆にあたり、数々の御助言と御指導賜りました、タイ・スラナリ工科大学の Neung Teaumroong 教授並びに研究室の皆さまに感謝申し上げます。

本研究の議論・検討にあたり、御教示並びに御激励賜りました鹿児島大学の東四郎名誉教授に深謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御助力頂きました研究室の皆さまに感謝申し上げます。

引用文献

- Alazard, D. 1985.** Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl. Environ. Microbiol. 50:732-734.
- Alunni, B., Z. Kevei, M. R.-Nieto, A. Kondorosi, P. Mergaert, and E. Kondorosi. 2007.** Genomic Organization and Evolutionary Insights on GRP and NCR Genes, Two Large Nodule-Specific Gene Families in *Medicago truncatula*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20:1138-1148.
- Ardissone, S., H. Kobayashi, K. Kambara, C. Rummel, K.D. Noel, G.C. Walker, W.J. Broughton, and W.J. Deakin. 2011.** Role of BacA in Lipopolysaccharide Synthesis, Peptide Transport, and Nodulation by *Rhizobium* sp. Strain NGR234. J. Bacteriol. DOI:10.1128/JB.01260-10
- Ardourel, M., N. Demont, F. Debelle, F. Maillet, F. Billy, J.C. Prome, J. Denarié, and G. Truchet. 1994.** *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. Plant Cell. 6:1357-1374.
- Ausmees, N., H. Kobayashi, W.J. Deakin, C. Marie, H.B. Krishnan, W.J. Broughton and, X. Perret. 2004.** Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. J. bacterial. DOI: 10.1128/JB.186.14.4774–4780.2004.
- Barrière, Q., I. Guefrachi, D. Gully, et al. 2017.** Integrated roles of BclA and DD-carboxypeptidase 1 in *Bradyrhizobium* differentiation within NCR-producing and NCR-lacking root nodules. Sci.

Rep. 7:9063.

Bartser, V.A., N.M. Boukli1, W.J. Deakin, C. Staehelin and, W.J. Broughton. 2003. Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. FEBS Letters. 554:271-274.

Bertioli, D.J., Moretzsohn, M.C., Madsen, L.H. et al. 2009. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. BMC Genomics, 10, 45–55.

Chaintreuil, C., J.F. Arrighi, E. Giraud, L. Miché, L. Moulin, B. Dreyfus, J.A. Munive-Hernández, M. del C. Villegas-Hernandez, and G. Béna. 2013. Evolution of symbiosis in the legume genus *Aeschynomene*. New phytol. 200:1247-1259.

Chaintreuil, C., R. Rivallan, D.J. Bertioli, C. Klopp, et al. 2016. A gene-based map of the Nod factor independent *Aeschynomene* evenia sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. DNA Res. 23, 365–376.

Cole, M.A., and G.H. Elkan. 1973. Transmissible resistance to penicillin g, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. Antimicrob. Agents Chemother. 4:248-253.

Crespo-Rivas, C.J., I. Guefrachi, K.C. Mok, et al. 2016. *Sinorhizobium fredii* HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the Inverted Repeat-Lacking Clade legume *Glycyrrhiza uralensis*. Environ. Microbiol. 18:2392-2404.

- Czernic, P., D. Gully, F. Cartieaux, et al. 2015.** Convergent Evolution of Endosymbiont Differentiation in Dalbergioid and Inverted Repeat-Lacking Clade Legumes Mediated by Nodule-Specific Cysteine-Rich Peptides. *Plant Physiol.* 169:1254-1265.
- Dai, J.-W., Y. Zeng, Z.-P. Xie, and C. Staehelin. 2008.** Symbiosis-Promoting and Deleterious Effects of NopT, a Novel Type 3 Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *J. Bacteriol.* DOI:10.1128/JB.00306-08.
- Ehrhardt, D.W., E.M. Atkinson, and S.R. Long. 1992.** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science.* 5059:998-1000.
- Faruque, M.O, H. Miwa, M. Yasuda, Y. Fujii, T. Kaneko, S. Sato, and S. Okazaki. 2015.** Identification of *Bradyrhizobium elkanii* Genes Involved in Incompatibility with Soybean Plants Carrying the *Rj4* Allele. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6710 –6717.
- Figurski, D. H., and Donald. R.H. 1979.** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 97. 76:1648-1652.
- Fotiadis, T.C., M. Dimou, D.G. Georgakopoulos, P. Katinakis, and A.P. Tampakaki. 2012.** Functional characterization of NopT1 and NopT2, two type III effectors of *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 327:66–77.
- Giraud, E., L. Hannibal, J. Fardoux, A. Verméglio, and B. Dreyfus. 2000.** Effect of

- Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitiva*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:14795-14800.
- Giraud, E., L. Moulin, D. Vallenet, et al. 2007.** Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic Bradyrhizobia. Science. 316:1307-1312.
- Glazebrook, J., A. Ichige, and G.C. Walker. 1993.** A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Eschenchla coli* peptide antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. Genes and Develop. 7:1485-1497.
- Guefrachi, I., O. Pierre, T. Timchenko, et al. 2015.** *Bradyrhizobium* BclA is a peptide transporter required for bacterial differentiation in symbiosis with *Aeschynomene* legumes. Mol. Plant-Microbe Interact. 28:1155-1166.
- Haag, F.A., M. Baloban, M. San, et al. 2011.** Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis. Plos Biol. 9: e1001169.
- Haag, F.A., M.F.F. Arnold, K.K. Myka, B. Kerscher, S.D. Angelo, M. Zanda, P. Mergaert, and G.P. Ferguson. 2013.** Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. FEMS Microbiol. Rev. 37:364-383.
- Haeze, W.D., and M. Holsters. 2002.** Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiol. 12:79R-105R.
- Hakoyama, T., K. Niimi, H. Watanabe, et al. 2009.** Host plant genome overcomes the lack of a

bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. *Nature*. 462:514-517.

Held, M., Hossain, M.S., Yokota, K., et al. 2010. Common and not so common entry. *Trends Plant Sci.*, 15, 540–5.

Hoover, T.R., J. Imperial, P.W. Ludden, and V.K. Shah. 1989. Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Biochem.* 28:2768-2771.

Jiménez-Guerrero. I., P.-M. Francisco, M. Carlos, J.O. Francisco, and J.L.-B. Francisco. 2015.
NopC Is a Rhizobium-Specific Type 3 Secretion System Effector Secreted by *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103. *Plos One*. DOI:10.1371/journal.pone.0142866.

Jiménez-Guerrero. I., P.-M. Francisco, M. Carlos, J.O. Francisco, and J.L.-B. Francisco. 2017.
The *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 Nodulation Outer Protein NopI Is a Determinant for Efficient Nodulation of Soybean and Cowpea Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e02770-16.

Kazmierczak, T., M. Nagymihaly, F. Lamouche, et al. 2017. Specific Host-Responsive Associations Between *Medicago truncatula* Accessions and *Sinorhizobium* Strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30:399-409.

Lamouche, F., N. B.-Bottino, P. Mergaert, and B. Alunni. 2019. Symbiotic Efficiency of Spherical and Elongated Bacteroids in the *Aeschynomene-Bradyrhizobium* Symbiosis. *Front. In Plant Science*. DOI:10.3389/fpls.2019.00377.

Lavin, M., Herendeen, P.S., Wojciechowski, M.F. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae

implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. Syst. Biol., 54, 575–594.

Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Promé, and J. Dénarié. 1990.

Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. 344:781-784.

Madden, M.S., T.D. Paustian, P.W. Ludden, and V.K. Shah. 1991. Effects of homocitrate,

homocitrate lactone, and fluorohomocitrate on nitrogenase in NifV mutants of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 173:5403–5405.

Maruya, J., and K. Saeki. 2010. The bacA Gene Homolog, mlr7400, in *Mesorhizobium loti*

MAFF303099 is dispensable for symbiosis with *Lotus japonicus* but partially capable of supporting the symbiotic function of *bacA* in *Sinorhizobium meliloti*. Plant Cell Physiol. 51:1443–1452.

Mayer, S.M., C.A. Gormal, B.E. Smith, and D.M. Lawson. 2002. Crystallographic analysis of the

MoFe protein of nitrogenase from a *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae* identifies citrate as a ligand to the molybdenum of iron molybdenum cofactor (FeMoco). J. Biol. Chem. 277:35263–35266.

McLean, P.A., and R.A. Dixon. 1981. Requirement of *nifV* gene for production of wild-type

nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Nature. 292:655–656.

Miché, L., L. Moulin, C. Chaintreuil, J.L.C. Jimenez, J.A.M. Hernández, M.C.V. Hernandez, F.

- Crozier, and G. Béna. 2010.** Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in tropical Africa and central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environ. Microbiol.* 12:2152–2164.
- Miwa, H., and S. Okazaki. 2017.** How effectors promote beneficial interactions. *Current Opinion in Plant Biology.* 38:148–154.
- Montiel, J., J.A. Downie, A. Farkas, P. Bihari, R. Herczeg, B. Bálint, P. Mergaert, A. Kereszt, and É. Kondorosi. 2017.** Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 114:5041-5046.
- Noisangiam, R., K. Teamtisong, P. Tittabutr, N. Boonkerd, T. Uchiumi, K. Minamisawa, and N. Teaumroong. 2012.** Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6236-6250.
- Nouwen, N., J.F. Arrighi, F. Cartieaux, C. Chaintreuil, D. Gully, C. Klopp, and E. Giraud. 2017.** The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in *Aeschynomene*/photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. *Sci. Rep.* 7:448.
- Okaszaki, S., R. Noisangiam, T. Okubo, et al. 2015.** Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. *PLoS One.* DOI: 10.1371/journal.pone.0117392.
- Okazaki, S., S. Okabe, M. Higashi, et al. 2010.** Identification and Functional Analysis of Type III

- Effector Proteins in *Mesorhizobium loti*. Mol. Plant-Microbe Interact. 23:223-234
- Ono, R., and R.F. Denison. 2010.** Comparing Symbiotic Efficiency between Swollen versus Nonswollen Rhizobial Bacteroids. Plant. Physiol. 154:1541–1548.
- Peterson, R., Slovin, J.P., Chen, C. 2010.** A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. Int. J. Plant Biol. 1:e13.
- Piromyou, P., P. Songwattana, T. Greetatorn et al. 2015.** The Type III Secretion System (T3SS) is a Determinant for Rice-Endophyte Colonization by Non-Photosynthetic *Bradyrhizobium*. Microbes Environ. DOI:10.1264/jsme2.ME15080.
- Radutoiu, S., L.H. Madsen, E.B. Madsen, A. Jurkiewicz, E. Fukai, E.M. Quistgaard, A.S. Albrektsen, E.K. James, S. Thirup, and J. Stougaard. 2007.** LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range. EMBO J. 26:3923-3935.
- Radutoiu, S., L.H. Madsen, E.B. Madsen, et al. 2003.** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature. 425:585-592
- Renier, A., F. Maillet, J. Fardoux, V. Poinso, E. Giraud, and N. Nouwen. 2011.** Photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS285 Synthesizes 2-O-Methylfucosylated Lipochitooligosaccharides for nod Gene-Dependent Interaction with *Aeschynomene* Plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:1440-1447.

Skorpil, P., M.M. Saad, N.M. Boukli, H. Kobayashi, F. Ares-Orpel, W.J. Broughton, and W.J.

Deakin. 2005. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. Mol. Microbiol. 57:1304–1317.

Songwattana, P., R. Noisangiam, K. Teamtisong, et al. 2017. Type 3 Secretion System (T3SS) of

Bradyrhizobium sp. DOA9 and Its Roles in Legume Symbiosis and Rice Endophytic Association. Front. Microbiol. DOI:10.3389/fmicb.2017.01810.

Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytol., 174, 11–25.

Tan, X.-J., Y. Cheng, Y.-X. Li, Y.-G. Li, and J.-C. Zhou. 2009. BacA is indispensable for successful *Mesorhizobium*–*Astragalus* symbiosis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84:519–526.

Teamtisong, K., P. Songwattana, R. Noisangiam, et al. 2014. Divergent nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. Microbes Environ. 29:370-376.

Teulet, A., N. Bussetb, J. Fardoux et al. 2019. The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. DOI/10.1073/pnas.1904456116.

Vallenet, D., A. Calteau, S. Cruveiller, et al. 2016. MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. Nucleic Acid Res. DOI:10.1093/nar/gkw1101.

Van de Velde, W., G. Zehirov, A. Szatmari, et al. 2010. Plant Peptides Govern Terminal

Differentiation of Bacteria in Symbiosis. *Science*. 327:1122-1126.

Wenzel, M., L. Friedrich, M. Göttfert, and S. Zehner. 2010. The Type III–Secreted Protein NopE1

Affects Symbiosis and Exhibits a Calcium-Dependent Autocleavage Activity. *Mol. Plant-Microbe*

Interact. 23:124-129.

Wongdee, J., N. Boonkerd, N. Teaumroong, P. Tittabutr and, E. Giraud. 2018. Regulation of

Nitrogen Fixation in *Bradyrhizobium* sp. Strain DOA9 Involves Two Distinct NifA Regulatory

Proteins That Are Functionally Redundant During Symbiosis but Not During Free-Living Growth.

Front. Microbiol. DOI:10.3389/fmicb.2018.01644.

Wongdee, J., P. Songwattana, N. Nouwen, R. Noisangiam, J. Fardoux, C. Chaintreuil, N.

Teaumroong, P. Tittabutr, and E. Giraud. 2016. *nifDK* Clusters located on the chromosome and

megaplasmid of *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 contribute differently to nitrogenase activity

during symbiosis and free-living growth. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29:767-773.

Xin, D.-W., S. Liao, Z.-P. Xie¹, D. R. Hann, L. Steinle, T. Boller, and C. Staehelin. 2012. Functional

Analysis of NopM, a Novel E3 Ubiquitin Ligase (NEL) Domain Effector of *Rhizobium* sp. Strain

NGR234. *PLoS pathogens*. DOI:10.1371/journal.ppat.1002707.

Zhang, L., X.-J. Chen, H.-B. Lu, Z.-P. Xie¹, and C. Staehelin. 2011. Functional Analysis of the Type

3 Effector Nodulation Outer Protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234. *J. Bio. Chemist.* DOI

10.1074/jbc.M111.265942.