

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	イネ根皮層細胞に効率よく侵入するクサネム根粒菌の探索
研究種別	<input type="checkbox"/> 共同 <input checked="" type="checkbox"/> 個人
研究組織	畑 信吾（農学部・教授）研究代表者
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) イネ (2) エンドファイト (3) クサネム根粒菌 (4) 蛍光標識

1. 研究計画（簡潔にまとめて記入してください。）

研究代表者の長期的な研究目標は、イネに共生窒素固定根粒を着生させ、窒素肥料が不要で環境と調和した栽培体系を構築することである。本研究ではその第1段階として、イネのエンドファイトとしても知られるクサネム根粒菌の中でも、とくにイネ皮層細胞への侵入効率が高い系統を選抜する。また、イネ細胞内へ侵入したクサネム根粒菌が植物細胞膜に由来する膜に包まれているか否かも明らかにしたい。

2016年度においては

1. 兵庫県篠山市において採取したクサネム根粒から、約 10 系統の根粒菌を単離した。
2. クサネム根粒菌を sGFP や dsRED で蛍光標識するためのミニ Tn5 コンストラクトを作成した。

その成果を踏まえ、2017年度計画は以下の通りであった。

1. 単離した根粒菌から、無窒素土壌におけるクサネム生育を促進する系統を複数選ぶ。
2. それらの系統が *Bradyrhizobium* sp. であることを確認したうえ、蛍光標識する。
3. それらの系統をイネ実生に接種し、皮層細胞に効率よく侵入する系統を選抜する。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

窒素固定活性を有すると思われるクサネム根粒菌系統の同定

クサネム (*Aeschynomene indica*) 種子を表面殺菌して発芽させたあと無窒素培地を含む土壌に移植し、各菌系統を接種して 25°C で 12 h 明条件/12 h 暗条件で数週間生育させた。その結果、SET10 と SAW1 と仮に名付けた 2 系統のみが、再現性よくクサネム実生の生育を促進することがわかった (Fig. 1)。生育促進を受けたクサネムには花や莢が見られたので、十分な窒素栄養を得ていると思われた (Fig. 2)。また、いずれの菌系統によっても、多数の根粒が着生し、その一部はレグヘモグロビンによる鮮やかなピンク色であった (Figs. 3 and 4 左)。また、少数ではあるが茎粒も見られた (Figs. 3 and 4 右)。

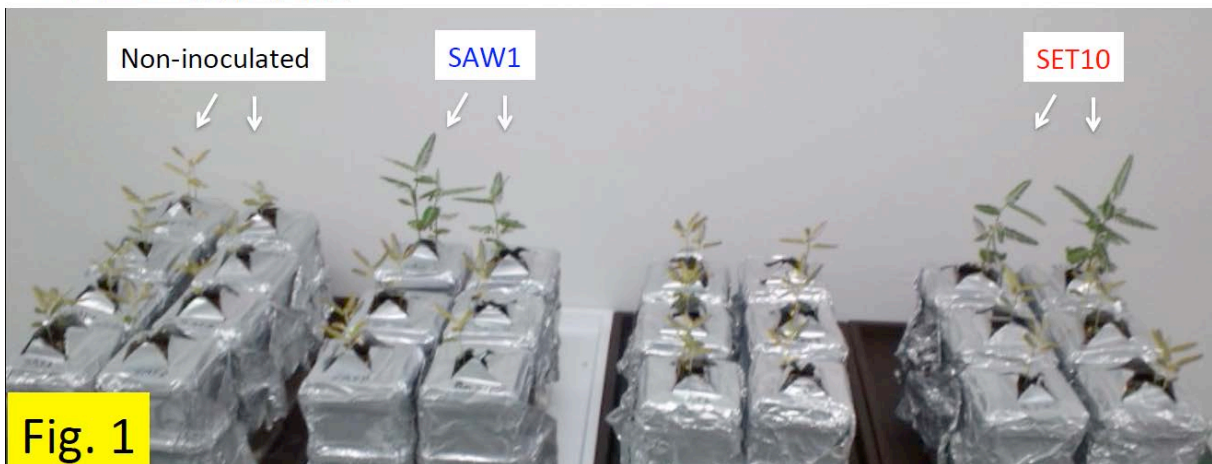
次に、16SrDNA の配列に基づいて、それらの菌系統の同定を試みた。解析の結果は、意外なことに、SET10 はトマト青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* と最も近縁であり、SAW1 は *Pantoea* sp. であることが示唆された (Fig. 5)。細分化された分野であるが、クサネムの仲間に根粒を着生するのは *Bradyrhizobium* 属の細菌のみであるというのが常識であったので (Giraud et al. PNAS 26: 14795-14800 (2000); Science 316: 1307-1312 (2007))、今回の結果はこの世界では驚天動地のものである。しかし *Ralstonia solanacearum* と極めて近縁な *Cupriavidus taiwanensis* (Fig. 5 には掲載されていない) はオジギソウ (*Mimosa pudica*) に根粒を着生することが知られているので (Marchetti et al. Appl. Env. Microbiol. 77: 2161-2164 (2011))、SET10 によるクサネム根粒着生という今回の結果が十分にあり得ると思われる。また、*Pantoea agglomerans* はエンドファイトとしてサトウキビの生育を促進することが報告され (Quecine et al. Appl. Env. Microbiol. 78: 7511-7518 (2012))、種々のマメ科植物根粒からもエンドファイトの一種としてしばしば単離されるので (Aserse et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 10117-10134 (2013))、SAW1 もクサネムに根粒を形成しても不思議ではないと思われる。現在、形成された根粒 (Figs. 3 and 4) から細菌を再単離して、その同定を進めているところである。

1 回めの接種試験



SAT1, SAT2, SAT3, SAT4, SAT5, SAT6, SAT7, SAT8, SAT9, SET10, SAW1, Control

2 回めの接種試験



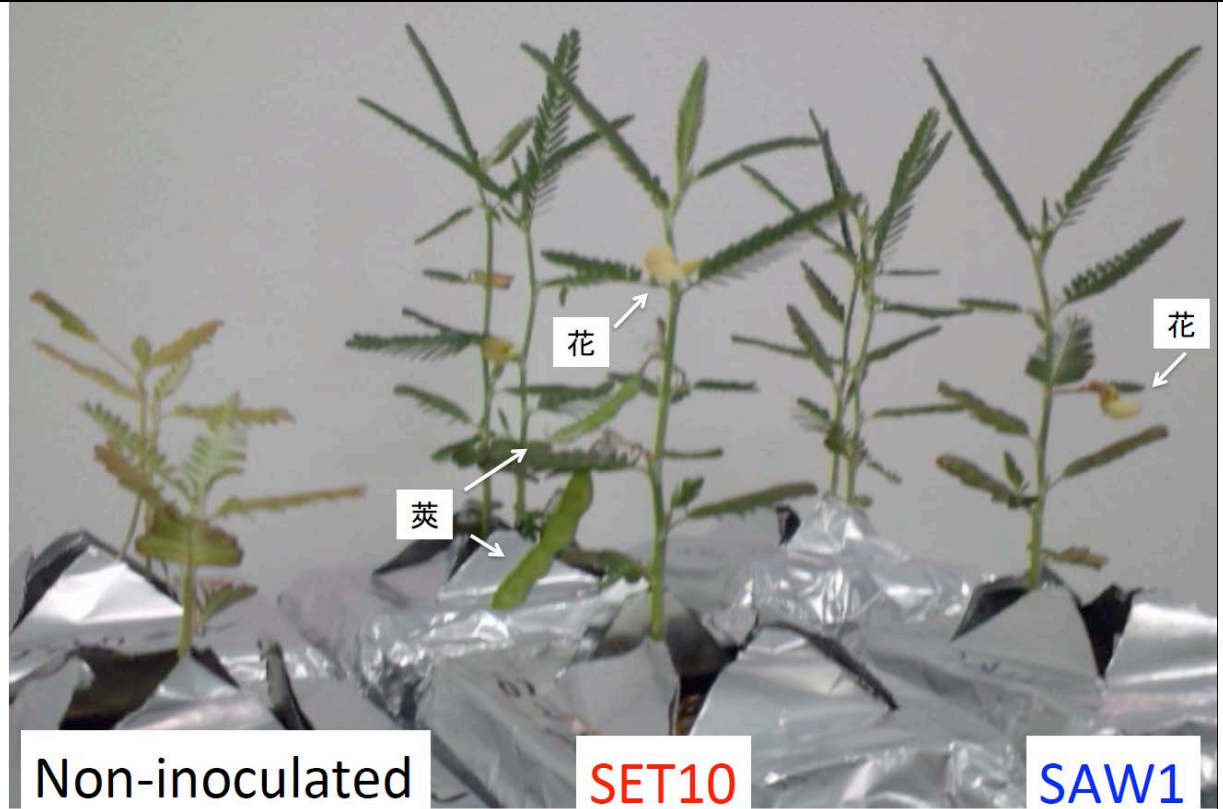


Fig. 2

SET10によってクサネムに着生した根粒(左)と茎粒(右)



Fig. 3

SAW1によってクサネムに着生した根粒(左)と茎粒(右)

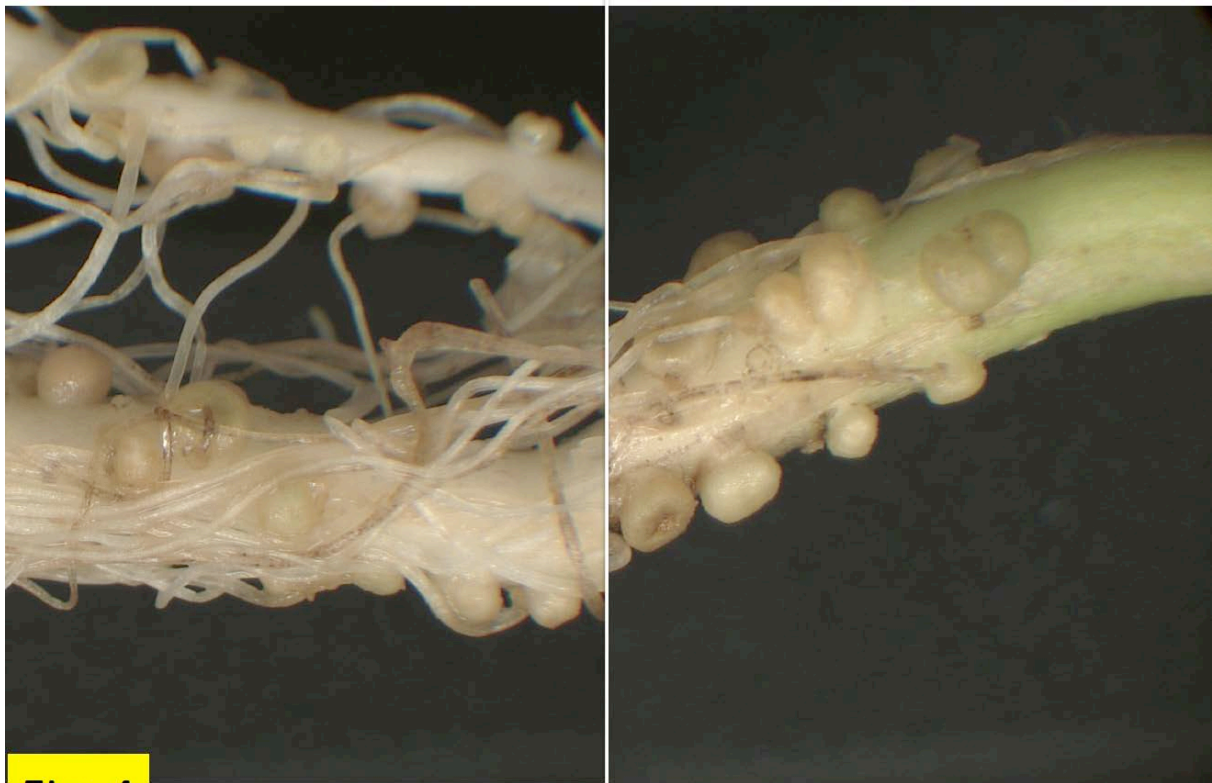


Fig. 4

SET10 は *Ralstonia* sp. で、SAW1 は *Pantoea* sp. だと示唆された

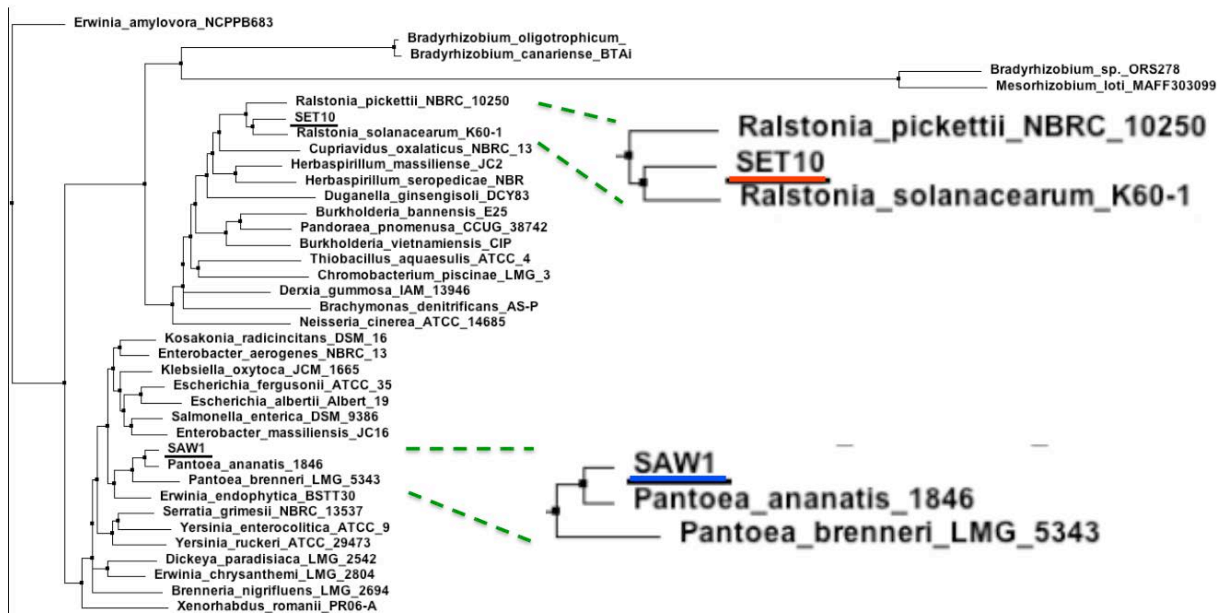


Fig. 5

クサネム根粒菌を蛍光標識する試み

上記のように、クサネムに根粒を着生するのは *Bradyrhizobium* 属のみであると思われていたのので、まず練習材料としてサツマイモから単離されたエンドファイトである *Bradyrhizobium* sp. AT1 株を共同研究者である名古屋大学・田中愛子博士から取りよせた。次いで、昨年作成した *sGFP* や *dsRED* を有するミニ Tn5 コンストラクトを大腸菌 S17-1 株に導入し、接合によってミニ Tn5 コンストラクトを AT1 株に移してゲノム上に転移させた。その結果、AT1 株のコロニーはいずれの Tn5 コンストラクトによっても強い蛍光を発した (Fig. 6)。しかし、同じ試みを *Ralstonia* sp. SET10 や *Pantoea* sp. SAW1 に対してくり返し行っても、異なる属の菌であるためか不成功におわった。そこで、昨年度本プロジェクト予算で購入したエレクトロポレーション装置を用いて SET10 や SAW1 に直接 Tn5 コンストラクトを導入して菌体を蛍光標識しようと試みたが、やはり不成功におわった。現在、研究室のひとりの学生が液体窒素を用いた Freeze-Thaw 法による *Agrobacterium tumefaciens* へのプラスミド導入に習熟してきたので、近い将来その方法を試みようとしているところである。したがって、2017 年度に計画していたイネ根皮層細胞に高効率で侵入する菌を選抜する作業を行うには至っていない。

dsRED と sGFP で標識された *Bradyrhizobium* sp. のコロニー

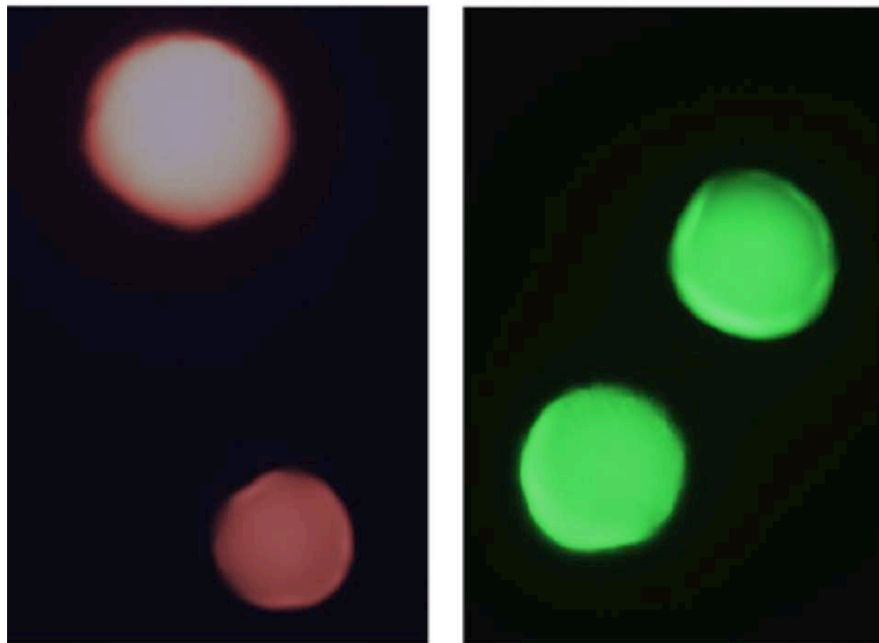


Fig. 6

結論と今後の展望

冒頭に記したように、研究代表者の長期的な研究目標は、共生窒素固定根粒を着生する形質転換イネを作成することである。その材料として、イネ根の皮層細胞に（植物細胞膜に包まれつつ）侵入するクサネム根粒菌を探索したところ、意外にも新規なクサネム根粒菌を2種発見することができた。今後は、これらによるクサネム根粒形成過程を解明し、窒素固定を証明して論文発表をめざす。また、蛍光標識は今後も試み続ける予定である。

不思議なことに、野生のクサネム根粒から未だ *Bradyrhizobium* 属の細菌が採れていない。現在凍結保存注の根粒からさらに大規模にクサネム根粒菌を捜すのも一法であるが、野生根粒を破碎して得た細菌群を直接イネ根に接種して一定期間栽培したのち、イネ根表面を殺菌して皮層の奥に侵入した菌を単離する試みも有力であると思われる。

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

<学会発表>

畑信吾¹, 河内宏² (¹龍谷大・農, ²国際基督教大) 「クサネム根粒菌の蛍光標識とその応用について」植物微生物研究会第 27 回研究交流会 P04 (2017.9.20-22, 京都大学宇治おうばくプラザ)

<学外資金獲得状況>

科研費 (基盤研究 C 一般) 「共生窒素固定根粒着生イネ作成の試み」平成 28-30 年度
直接経費合計 3,700,000 円