

# イネ皮層細胞に効率よく侵入するクサネム根粒菌の探索

Screening of *Bradyrhizobium* sp. that nodulates *Aeschynomene indica* and also invades cortical cells of rice roots

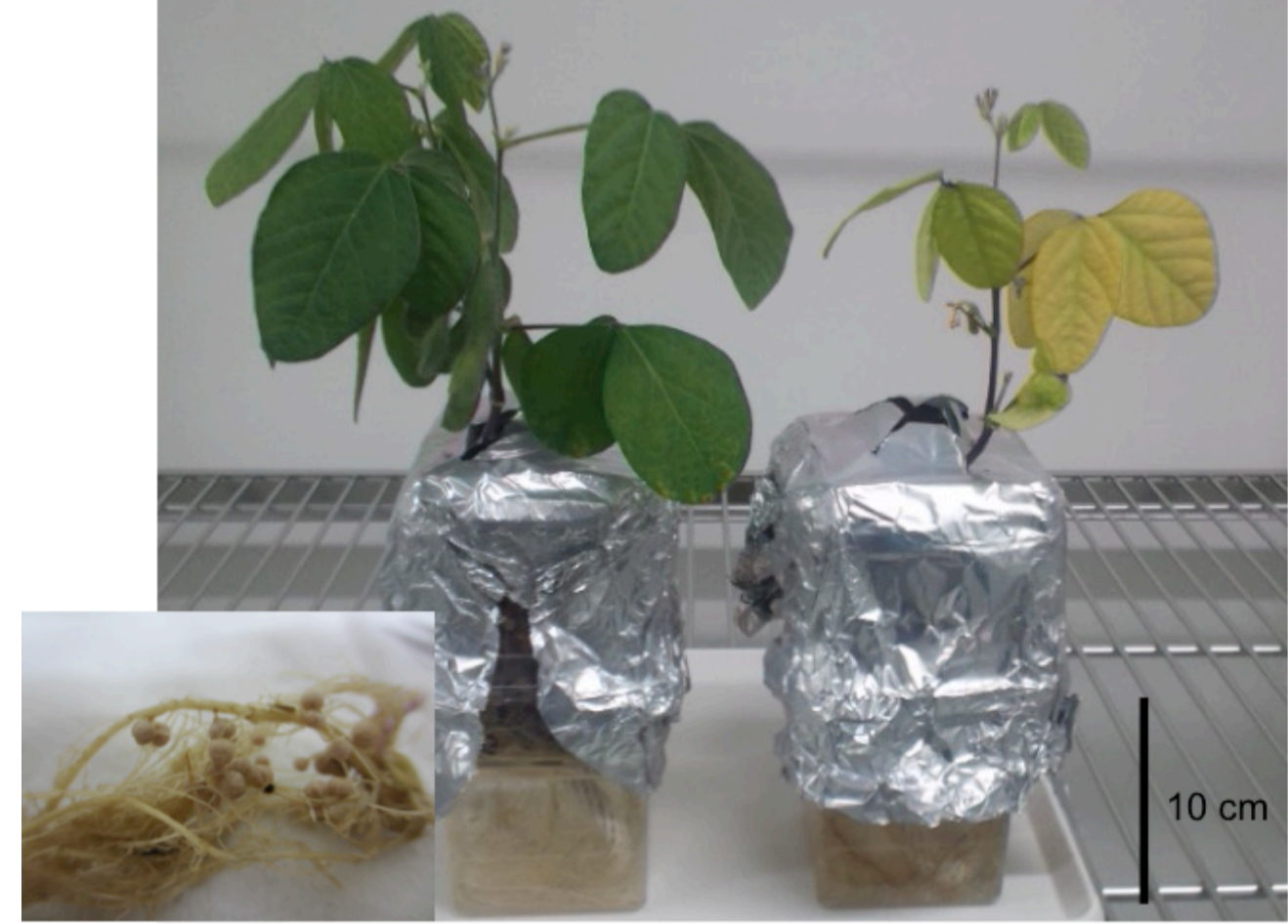
HATA, Shingo

研究代表者 畑 信吾 (農学部資源生物科学科)

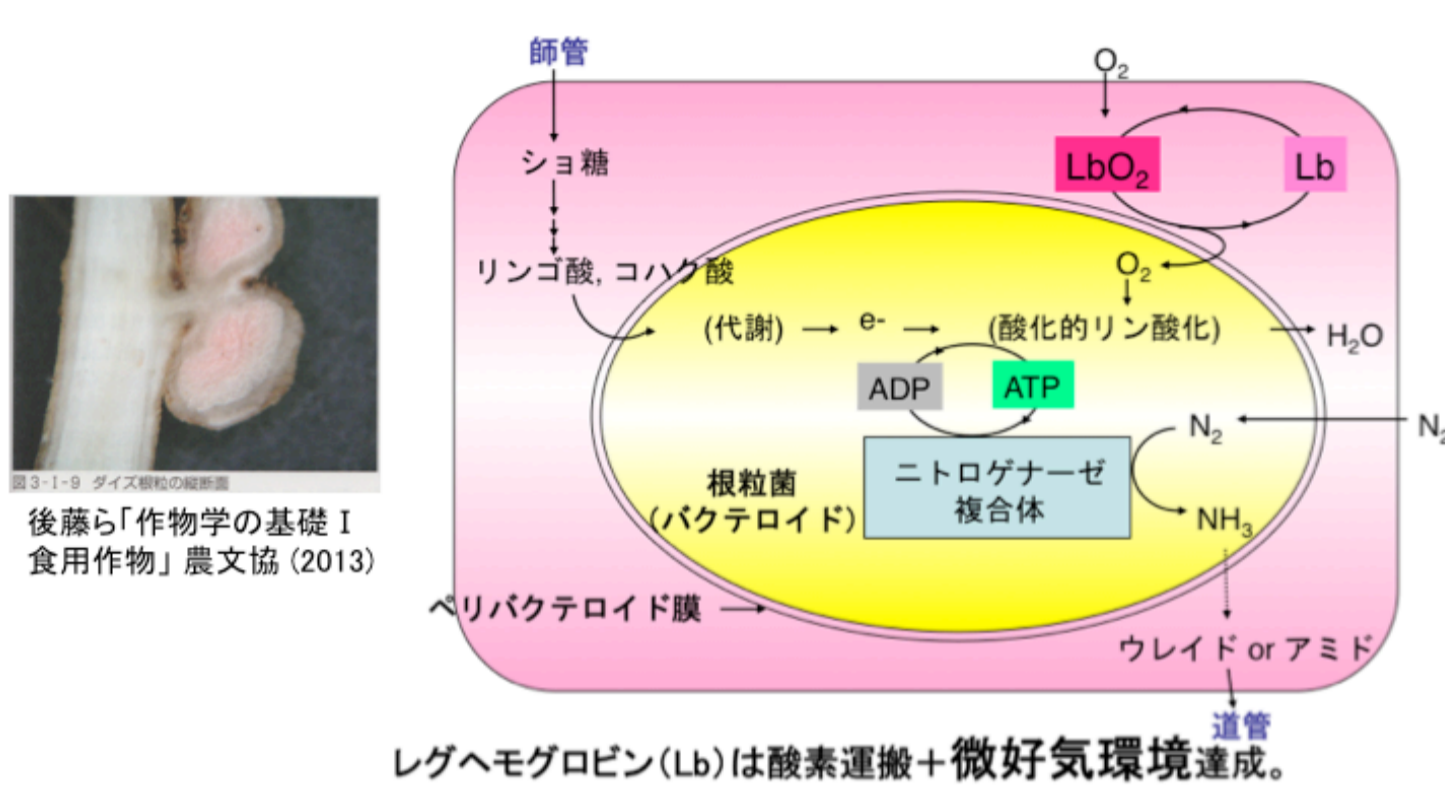
## 背景

マメ科植物は、根に根粒を形成して根粒菌に窒素固定を行わせることにより、窒素肥料がなくても生育できる(①)。根粒菌は植物皮層細胞でペリバクテロイド膜に包まれて共生し、微好気環境のもとで空気中の窒素ガスをアンモニアに転換する(②)。マメ科植物の初期の根粒ではNod factor非生産菌を細胞間侵入で受け入れていたが、その後数千万年の間に、Nod factorや菌根菌との共通シグナル経路を使う高効率型に進化した(③)。クサネムは、いまでも初期の根粒形成機構を維持している(④、⑤)。また、クサネム根粒菌(*Bradyrhizobium* sp.)はイネの根(とくに細胞間)にエンドファイトとして棲みつくことが以前から知られていた(⑥)。

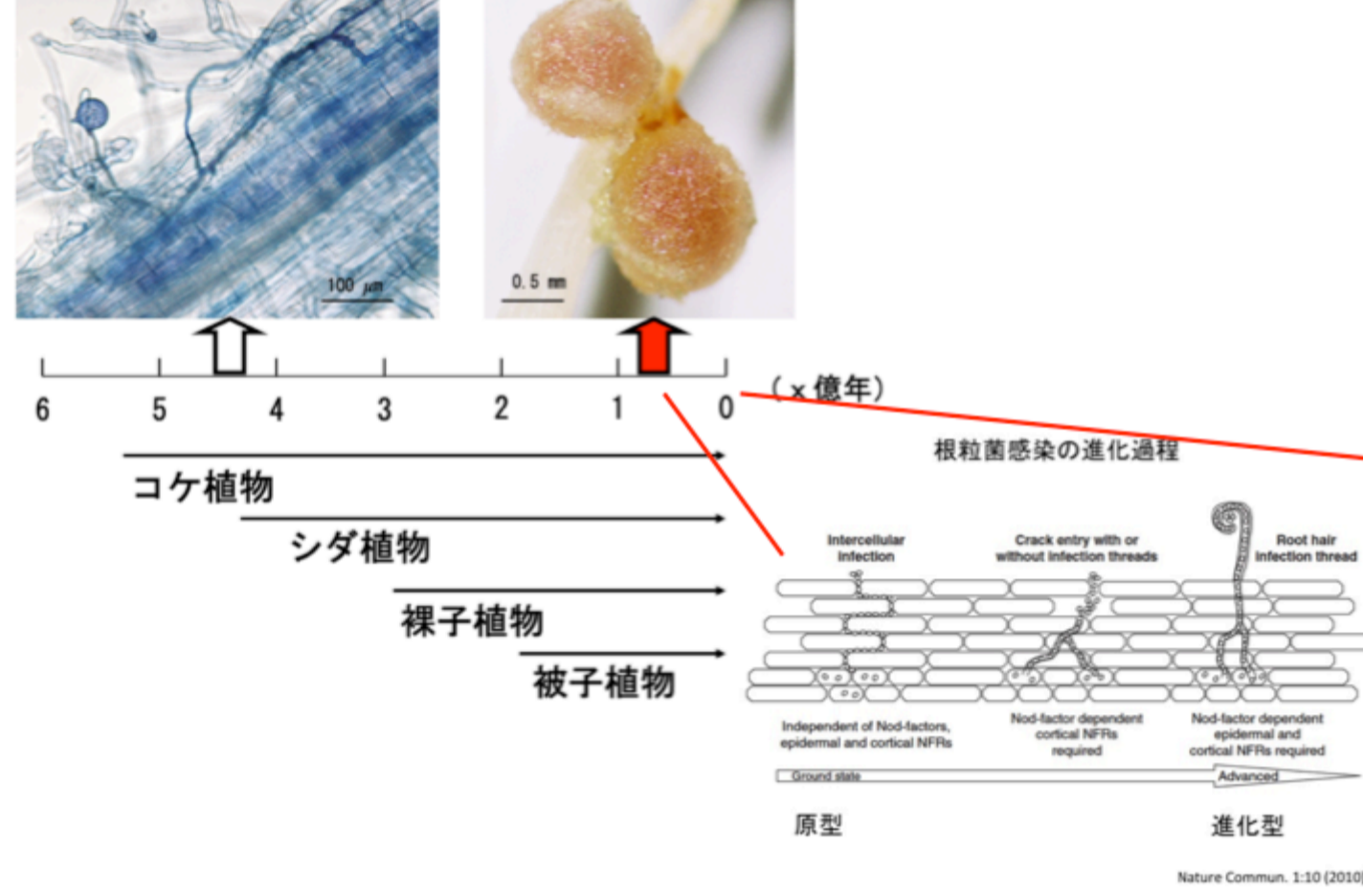
① 無窒素培地におけるダイズの生育。左、根粒菌接種; 右、無接種。



② 根粒内部ではレグヘモグロビンという色素タンパク質が大量発現し、微好気環境を整え窒素固定反応を起こりやすくしている。



③ 初期の根粒は菌を細胞間侵入で受け入れ、後に菌根菌との共通シグナル経路を使って高効率で根粒形成できる進化型になった。

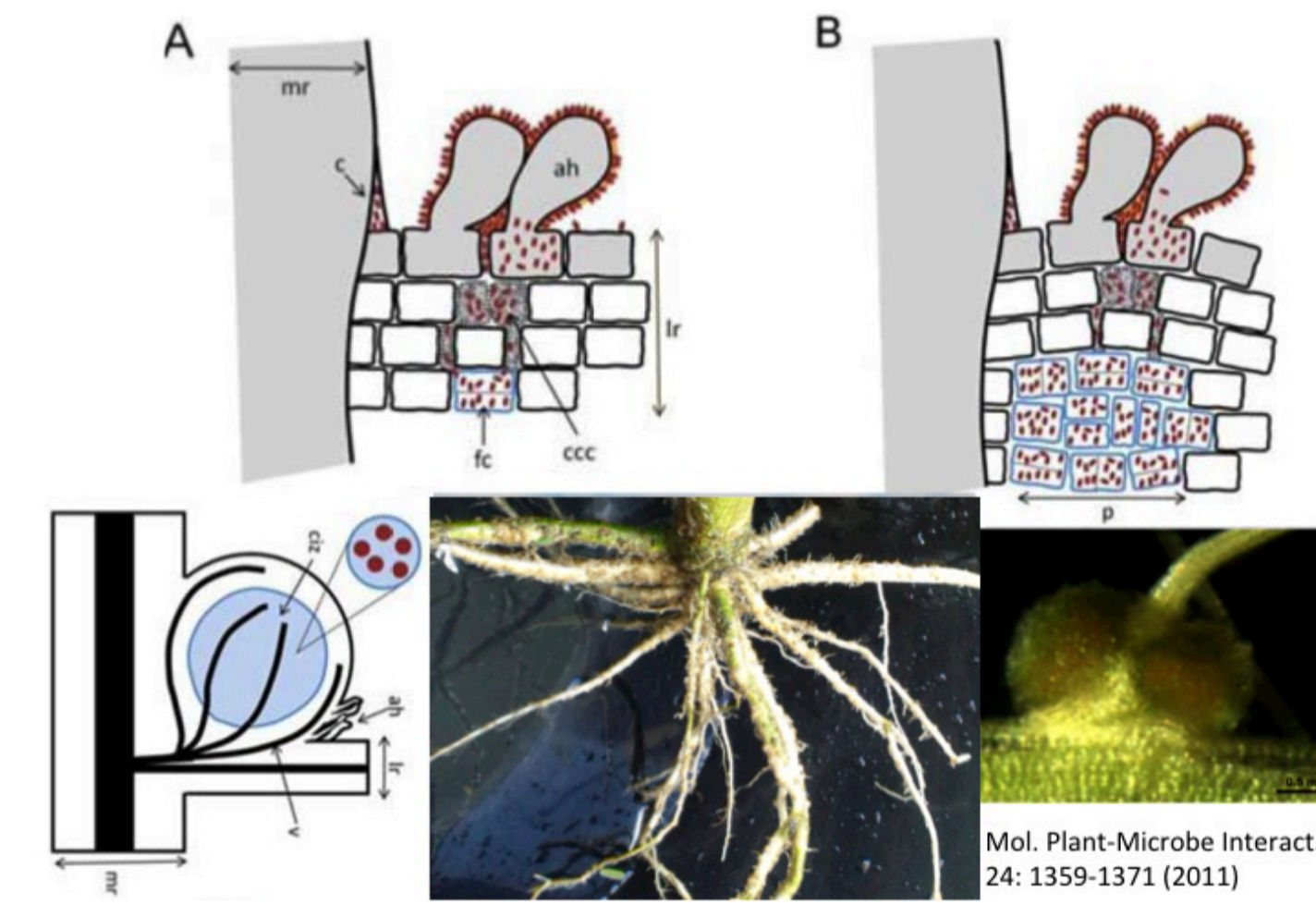


④ いまでも初期の根粒形成機構を維持しているマメ科植物の例

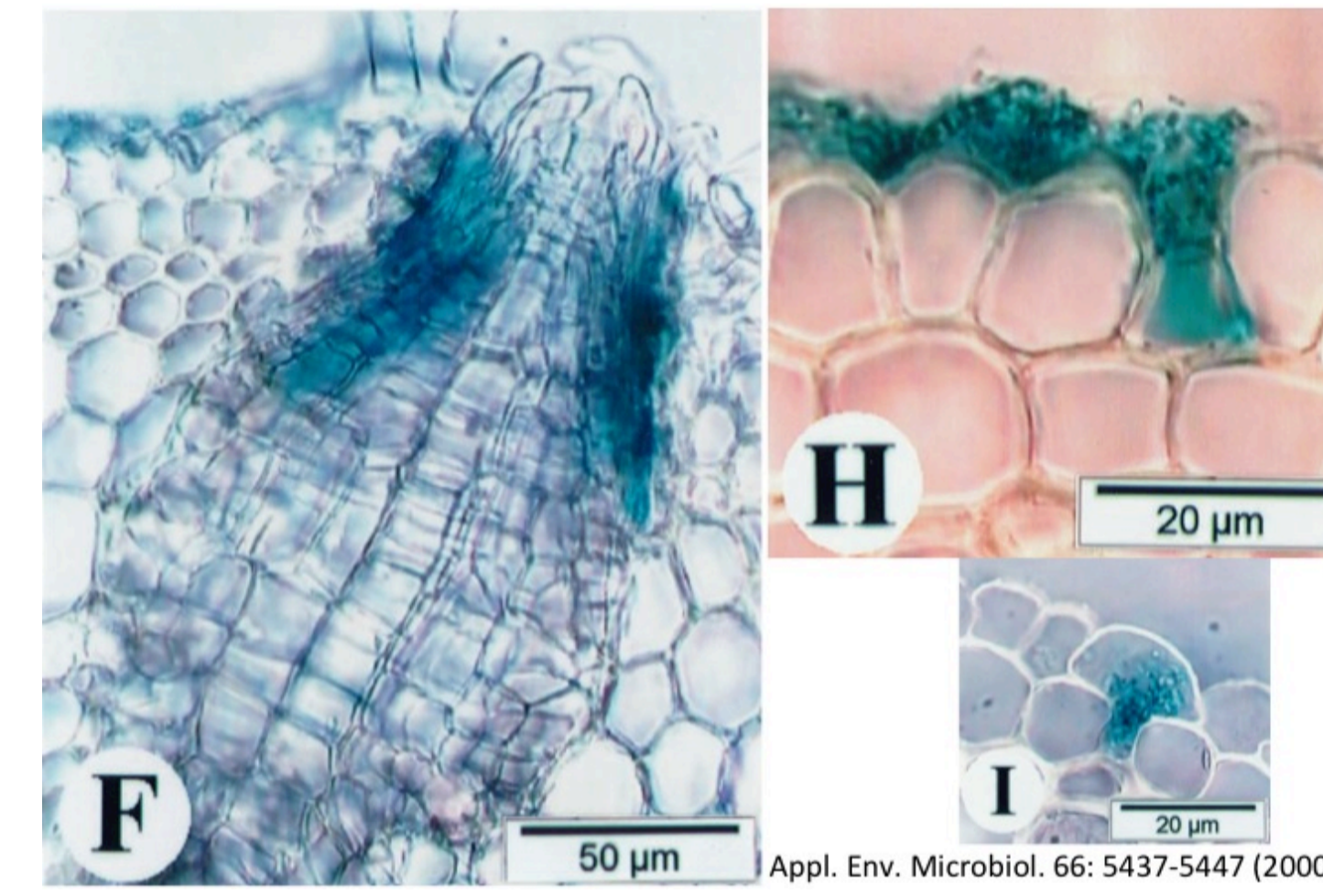


クサネム (左, *Aeschynomene indica*) やシロバナルービン (右, *Lupinus albus*) の根粒菌は細胞間から侵入する。

⑤ クサネム根粒とその形成機構



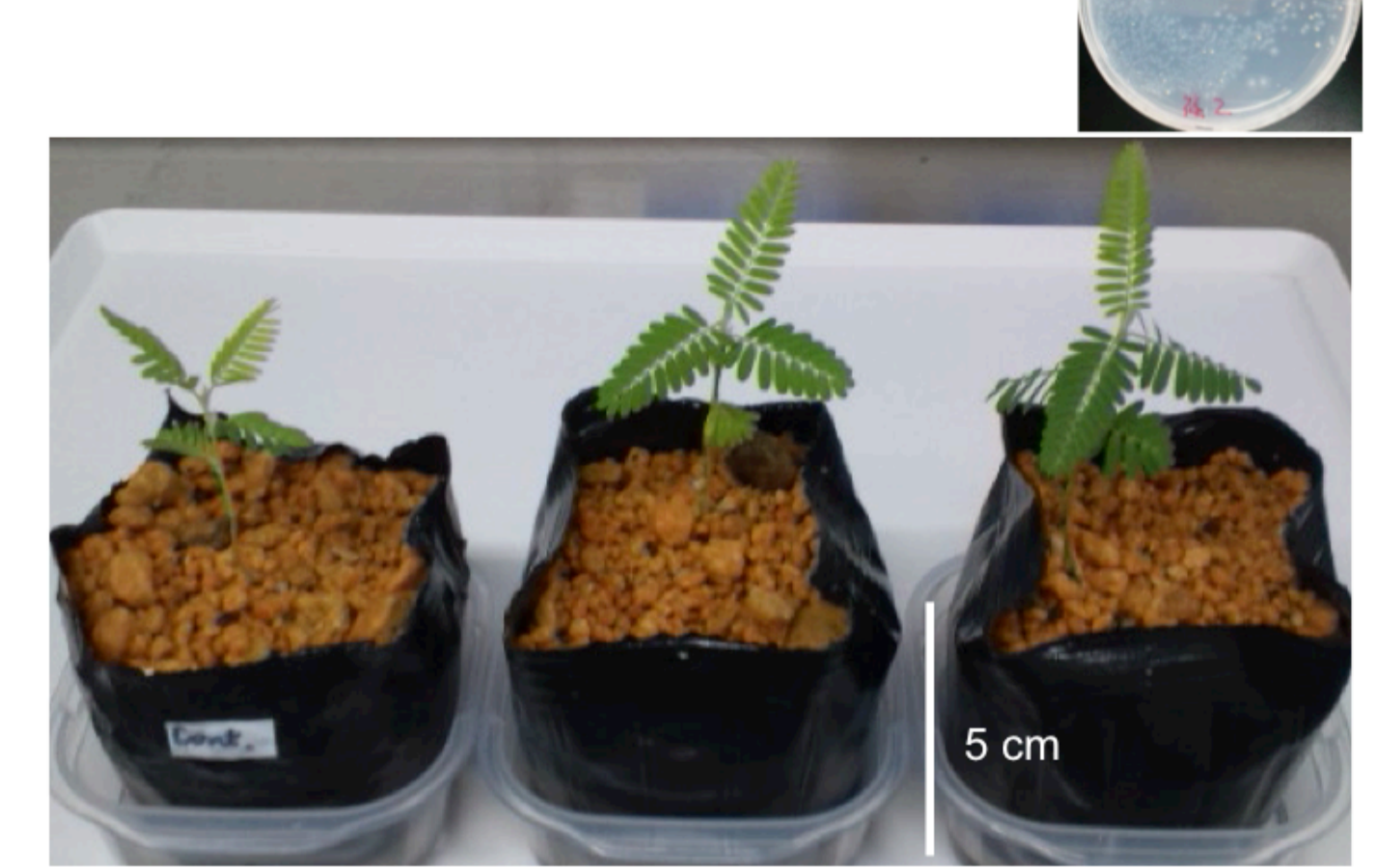
⑥ イネの根に侵入したクサネム根粒菌( $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識)



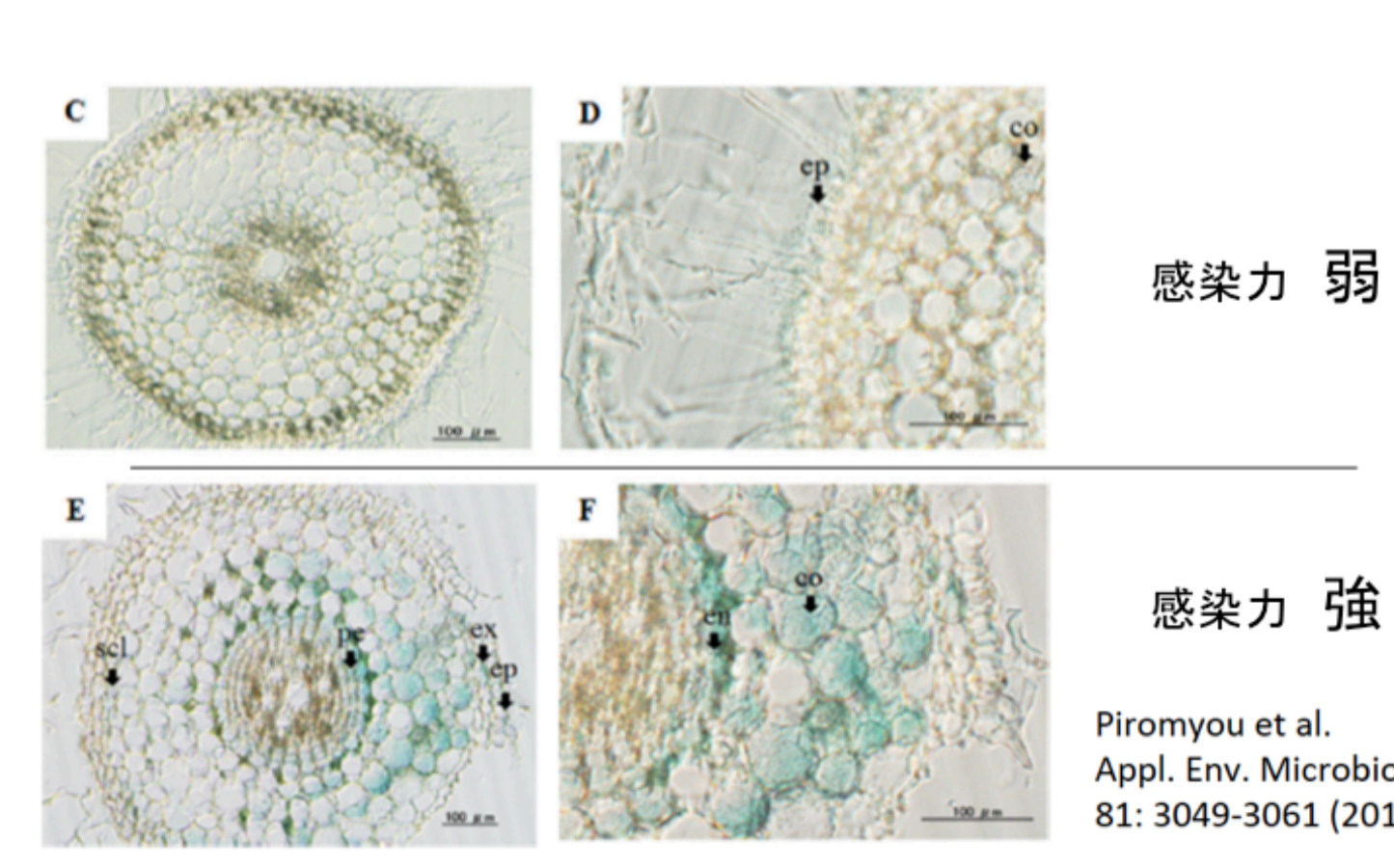
## 進捗状況

研究代表者が兵庫県篠山市において採集したクサネム根(⑤)を表面殺菌したあとと磨り潰し、寒天培地に撒いて多数のコロニーを得た(⑦、右上)。それらは無窒素培地におけるクサネム生育を促進した(⑦)。ただし、クサネム根粒菌にはイネ根表面付近にとどまる弱感染システムと皮層細胞内へも侵入する強感染システムがあることが最近報告された(⑧)。そこでまず、ダイズ根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*) GroEL4プロモーターの支配下にdsREDやGFP蛍光レポーター遺伝子を発現させるミニトランスポゾンコンストラクトを作成した(⑨)。それらは、サツマイモから単離された*Bradyrhizobium* sp.の標識に有効であった(⑩)。近日中に、クサネム根粒菌を試験的に標識する予定である。さらには、超低温で保存中のクサネム根粒から根粒菌集団を抽出し、蛍光タンパク質で集団を標識したあとイネ根に感染させ、一定期間育成後に表面殺菌して磨り潰し、皮層細胞への侵入力が強いクサネム根粒菌系統を得る予定である(⑪)。その後、クサネム根粒菌はペリバクテロイド膜様の構造体に包まれているのか否かを、電子顕微鏡などを用いて確認したい。

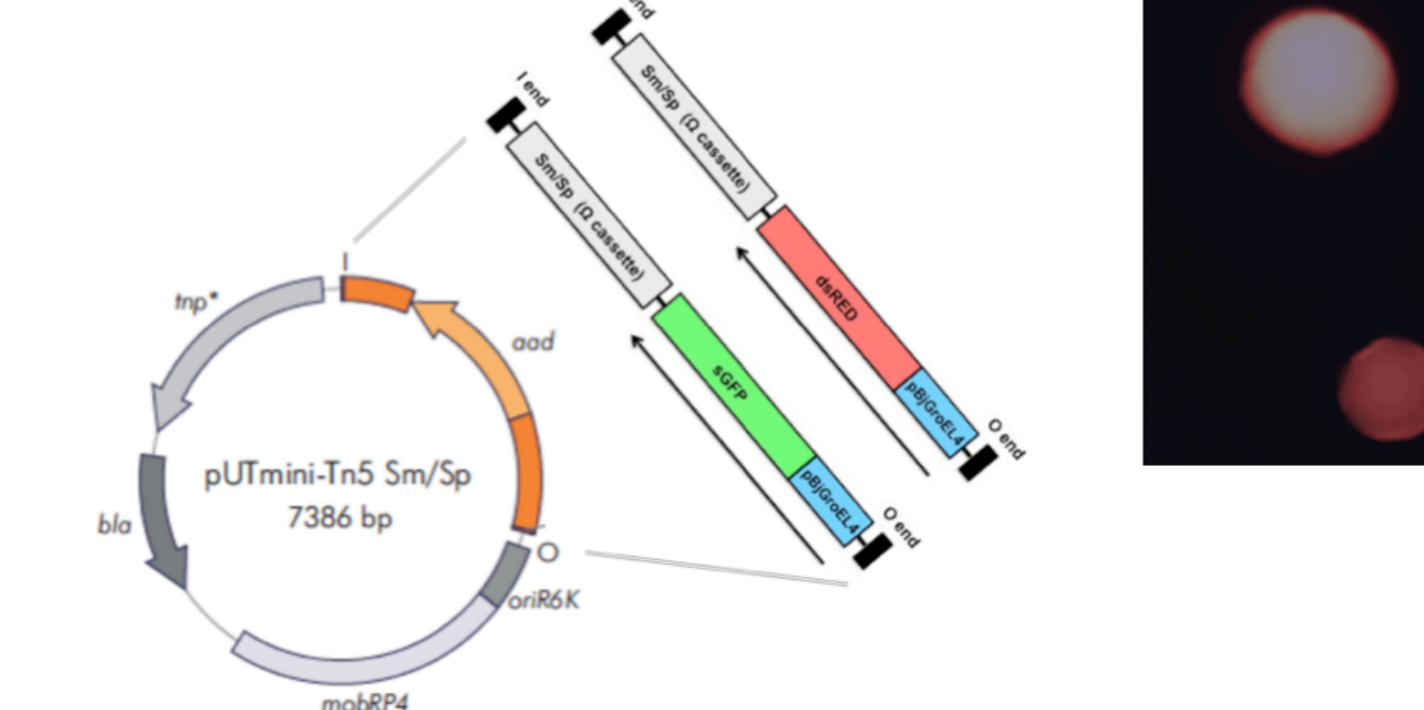
⑦ クサネム根粒菌による、無窒素培地でのクサネムの生育促進



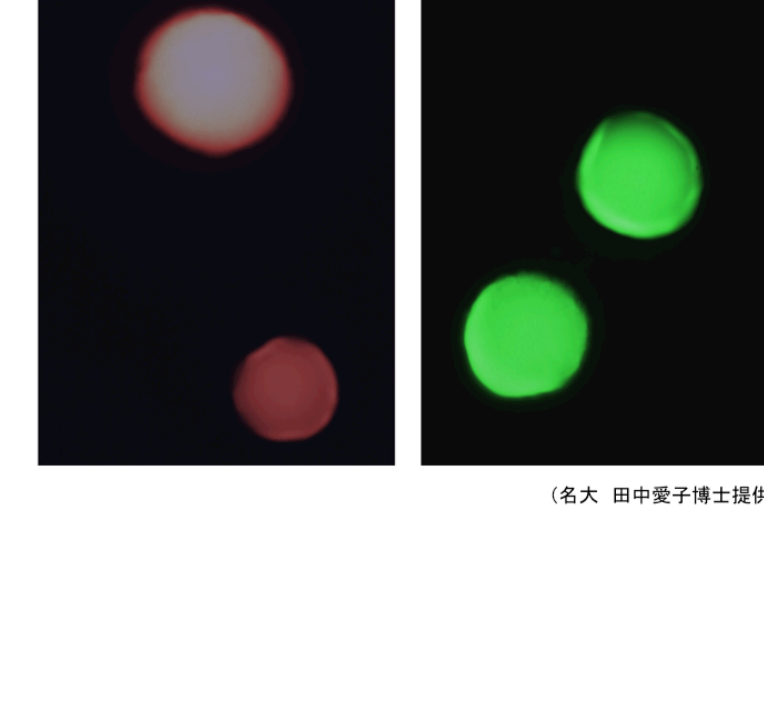
⑧ クサネム根粒菌(GUS標識)には、ほぼイネ根の表面付近にとどまる系統と皮層細胞内へ侵入しているような強感染システムがある。



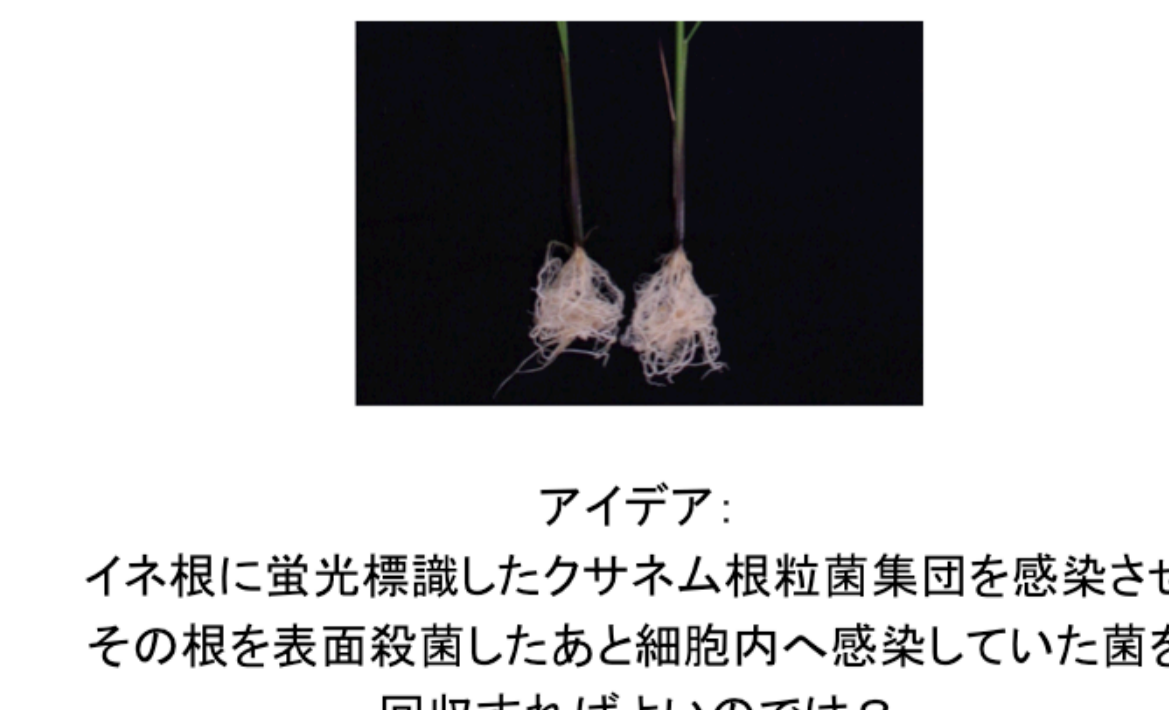
⑨ イネ根細胞強感染型クサネム根粒菌選抜用のミニトランスポゾン



⑩ dsRED と GFP で標識された *Bradyrhizobium* sp. のコロニー



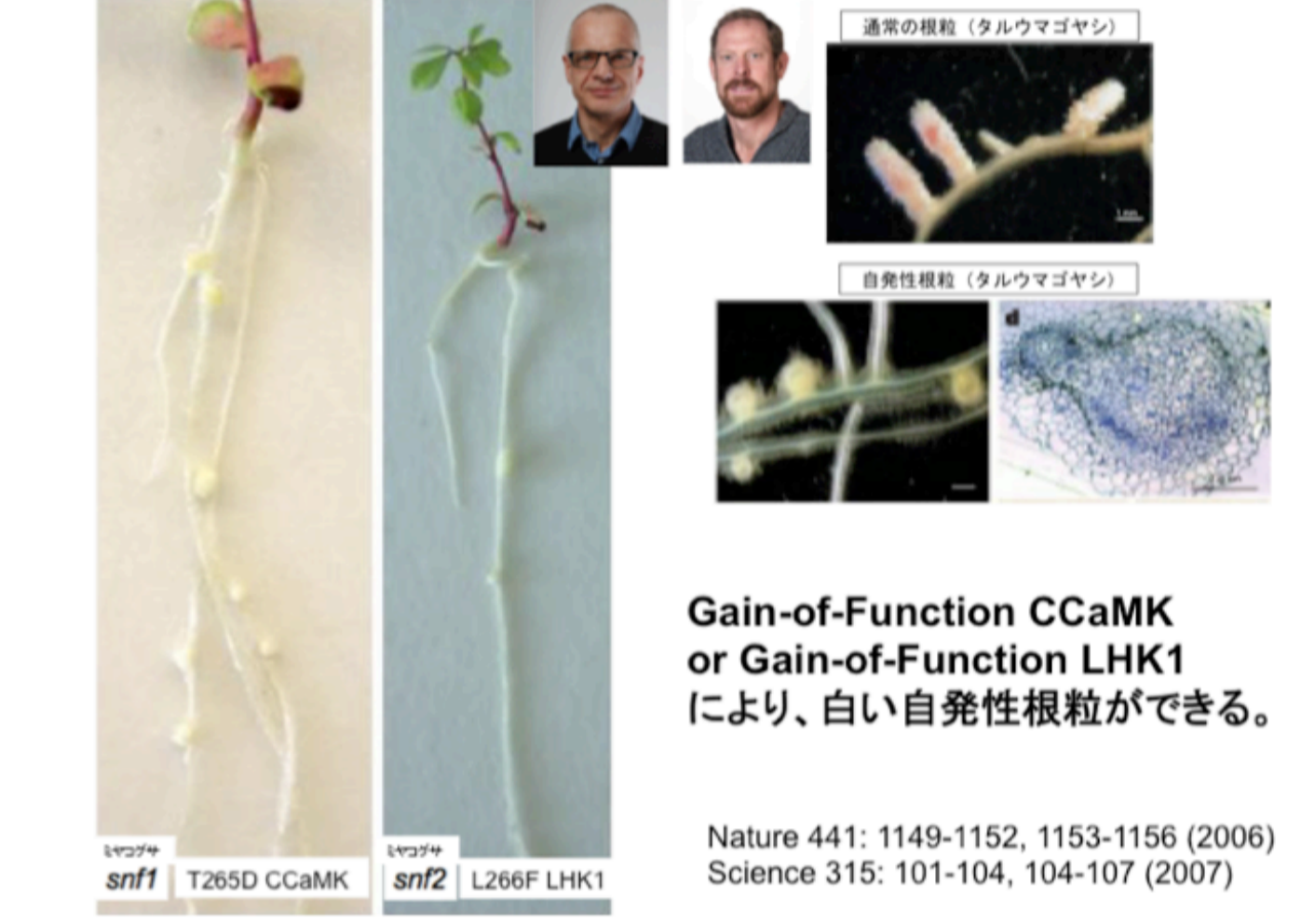
⑪ イネ根細胞強感染型クサネム根粒菌を選抜するストラテジー



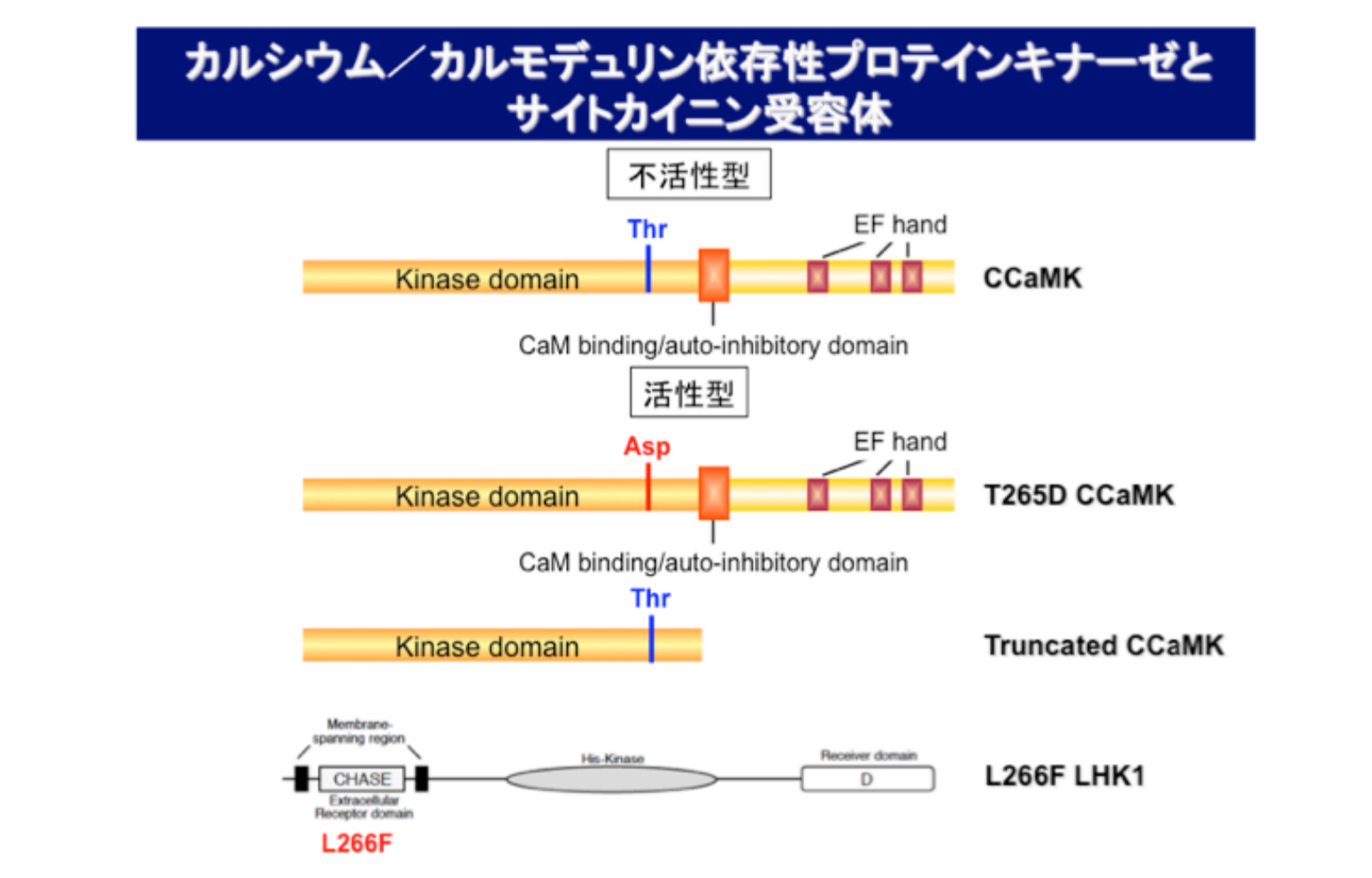
## 今後の展開に向けて

サイトカニンシグナル伝達を構成的に行うマメ科モデル植物には、根粒菌が不在でも白い自発性根粒ができる(⑫)。すなわち、活性型CCaMKやLHK1が構成的に発現されれば自発性根粒ができる(⑬)。また、イネは微生物共生の素養を有するモデル作物でもある(⑭)。これらのことを勘案して、まずレグヘモグロビンプロモーターとコード領域を導入した形質転換イネを作成し、次いで活性型CCaMKや活性型LHK1を導入したイネも作成し、それらを交配することにより二重形質転換イネを作成する(⑮)。その二重形質転換イネに強感染型クサネム根粒菌を感染させれば、細胞分裂とレグヘモグロビン発現が同時に誘起され、窒素固定根粒ができるかも知れない(⑯)。さらに、モデルマメ科植物をサイトカニン含有無窒素培地で育てるだけで自発性根粒が形成されるという報告もある(⑰)。したがって、レグヘモグロビンプロモーターとコード領域を導入した形質転換イネに強感染型クサネム根粒菌を接種し、サイトカニン存在下に育成すれば窒素固定根粒ができるかも知れない(⑱)。

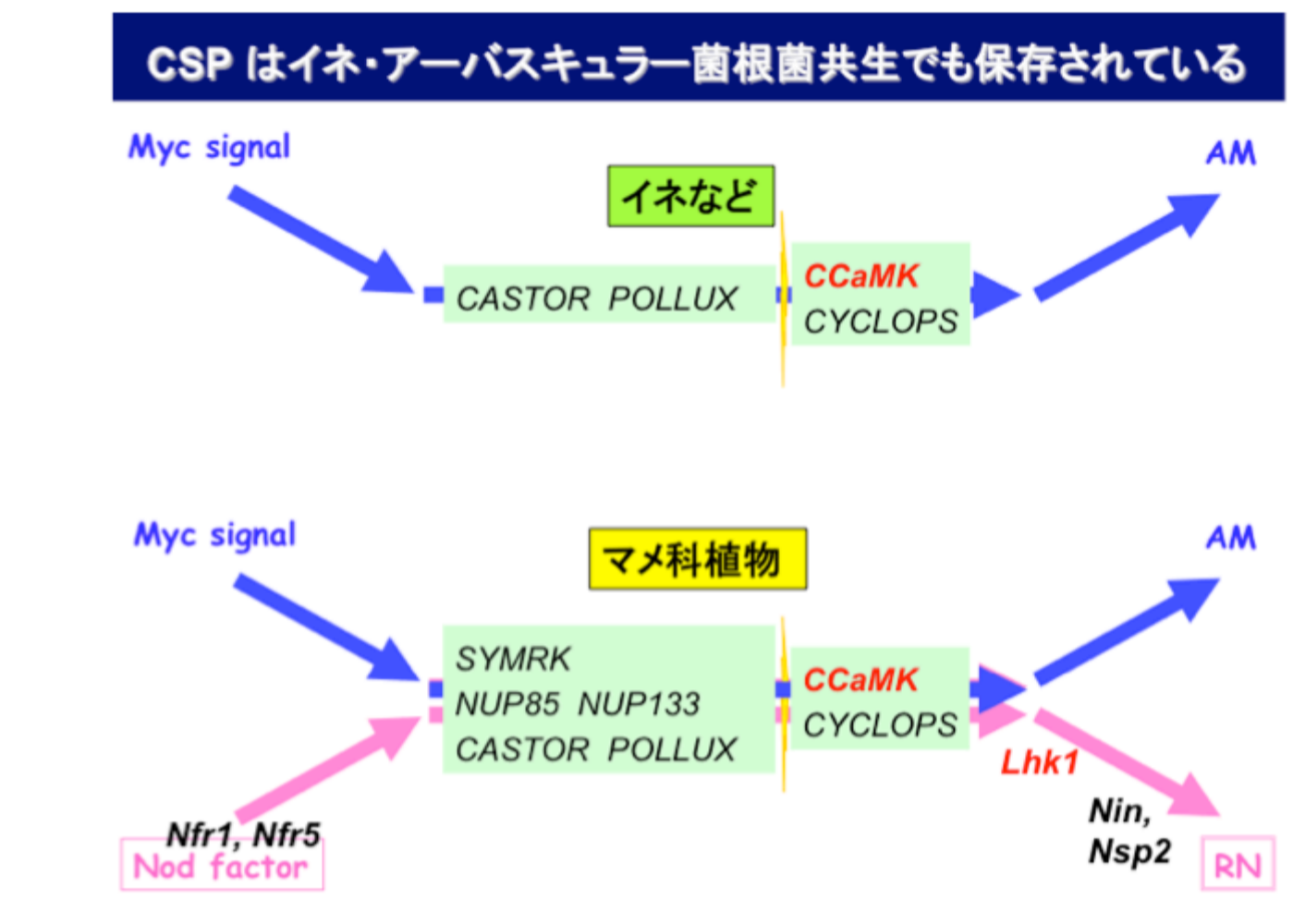
⑫ サイトカニンシグナルを構成的に伝達するマメ科植物の根粒



⑬ 自発性根粒着生のメカニズム



⑭ イネは共通シグナル経路(CSP)を有し、微生物共生しやすい



⑮ 初めの着想

クサネム根粒の形成過程をまねて菌の感染後に細胞分裂を誘起させ、レグヘモグロビンの発現を誘導できれば、何とかなるかもしれない。たとえば、形質転換と交配により  $pLb$   $Lb$  coding region と  $pLb$  L266F LHK1,  $pLb$  T265D CCaMK 等をイネに入れてクサネム根粒菌を接種すれば、微好気環境と感染細胞増殖が同時達成?

⑯ 研究代表者のストラテジー(1)

イネ:クサネム根粒菌侵入に応じて  
(1)細胞分裂誘起と  
(2)レグヘモグロビン発現ができるよう改変  
↓  
改変イネ根に高感染クサネム根粒菌接種  
↓  
根粒形成、窒素固定活性発揮を期待

⑰ 研究代表者のストラテジー(2)

レグヘモグロビン発現ができるイネ根に  
高感染クサネム根粒菌接種  
↓  
サイトカニン含有無窒素培地で栽培  
↓  
根粒形成、窒素固定活性発揮を期待(?)

## 展望

本研究の究極の目的は、まずイネに共生窒素固定根粒を着生させ、次いでイネ科の主要な穀類を窒素肥料なしで生育させる技術を開発することにある(⑲)。いうまでもなく私たち人類は現在、多量のエネルギーを費やしながら年間1億トン以上の窒素肥料を合成して耕地に投与し、環境を汚しながら作物の収量を保っている。本研究は、その問題を解決するための端緒となるかも知れない。

⑲ もしこれらのイネ科穀類を窒素肥料なしで育てられたら、

世界の禾穀類収量 (単位100万トン)  
FAO 2010年

| 穀類            | 収量 (100万トン) |
|---------------|-------------|
| 1. トウモロコシ     | 844         |
| 2. コメ         | 672         |
| 3. コムギ        | 651         |
| 4. オオムギ       | 123         |
| 5. モロコシ(ソルガム) | 56          |

三大穀物

(ダイズ) 265