

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07637

研究課題名(和文)ダイズの根粒・菌根二重共生系の成立に必須なストレス応答遺伝子の発現特性とその役割

研究課題名(英文) Expression and function of stress-response gene induced during rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in soybean roots

研究代表者

坂本 一憲 (Sakamoto, Kazunori)

千葉大学・大学院園芸学研究所・教授

研究者番号：10225807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではダイズの根粒・菌根共生系の成立に必須な遺伝子であるType1メタロチオネイン遺伝子(GmMT1)の発現特性と機能解明を試みた。得られた結果は以下の通りである。(1)ダイズ根と根粒の子実肥大期のGmMT1発現量は開花期よりも高かった。(2)根のGmMT1は菌根菌の樹枝状体の周囲で発現しており、根粒ではバクテロイド感染領域の周囲で発現していた。(3)RNAi法によってGmMT1発現を抑制したダイズ変異体の菌根形成率と根粒重は親株よりも減少し、根と根粒の過酸化水素含量は増大していた。以上からGmMT1は菌根と根粒における活性酸素種を消去し共生器官を酸化ストレスから保護していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られたType1メタロチオネイン遺伝子の発現特性とその役割に関する知見によってダイズの根粒・菌根二重共生系の成立メカニズムの一端が分子レベルで明らかにされ、高い学術的貢献がなされた。本研究の成果は、今後二重共生系を強化した低肥料性・ストレス耐性ダイズの分子育種に関する研究に発展させることができ、土壌劣化や異常気象に対応した農業技術への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression and function of type 1 metallothionein gene (GmMT1) induced during rhizobial and arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses in soybean roots. The results obtained were as follows. (1) The expression level of GmMT1 of root and nodule at pod formation stage were higher than that at flowering stage. (2) The expression of GmMT1 in the root was found at the surrounding host cell of arbuscule of AM fungi colonized. Meanwhile, the expression of GmMT1 in the nodule was found at the surrounding host cell of bacteroidal infection area. (3) RNAi knock-down of GmMT1 led to significant suppression of AM fungal colonization and nodule formation and an increase in hydrogen peroxide content in soybean root. Based on the results obtained, we suggest that GmMT1 eliminates reactive oxygen species occurred in AM root and nodule, and protects symbiotic organs from oxidative stress.

研究分野：植物栄養学 根圏微生物学 土壌微生物学

キーワード：二重共生 酸素種 ストレス応答 メタロチオネイン遺伝子 ダイズ 根粒菌 アーバスキュラー菌根菌 活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ダイズはタンパク源や機能性食品として重要であるが、わが国のダイズの収量水準(約 1.8t ha<sup>-1</sup>)は世界平均よりも低く年次変動も大きい。ダイズの重要な肥料成分のひとつであるリン酸は今世紀中の資源枯渇が懸念されている。また水田転換畑で栽培されることが多いダイズは、カドミウムなどの重金属の影響が懸念され、さらに最近は温暖化が主な原因と考えられる異常気象によって高温や干ばつなどの環境ストレスを受けることが多くなった。従って低肥料性でかつ環境ストレスに耐性を持つダイズの作出が世界的に急務の課題となっている。

ダイズには根粒菌とアーバスキュラー菌根菌(以下菌根菌)が二重に共生している。両共生菌はともにダイズから光合成炭素の供給を受けながら、根粒菌は窒素固定によってダイズへ窒素を、また菌根菌はリン酸を供給している。また菌根菌は宿主のストレス耐性を高める働きも有している(Smith and Read 2008 等)。従って二重共生系の成立メカニズムが解明されれば、ダイズの窒素・リン酸獲得とストレス耐性を同時に強化することができ、低肥料性・ストレス耐性ダイズの分子育種が可能になる。

二重共生系の成立に関して、両共生菌の感染を受容する初期シグナル伝達経路が共通であることがモデル植物を用いて近年明らかにされた(Kouchi et al. 2010 等)。また研究代表者である坂本も根粒の過剰着生を抑制しているダイズのオートレギュレーション機構(ARS)が、同時に菌根菌の樹枝状体形成も抑制していることを示し(Shrihari et al. 2000; Sakamoto and Tsukui 2005; 坂本ら 2005; Sakamoto and Nohara 2009)ARS が両共生系の共通基盤システムのひとつであることを明らかにした。一方、ダイズの根粒菌と菌根菌の間には相互作用があり、菌根形成が根粒着生を増やし窒素固定活性を高めることが知られている(Kawai and Yamamoto 1986; Antunes et al. 2006 等)。しかし根粒着生が菌根形成に及ぼす影響については一定の知見が得られていなかった(Xie et al. 1995; Antunes et al. 2006 等)。そこで坂本は野生型品種のエンレイとARS が欠損している関東 100 号を用いて根粒着生が菌根形成に及ぼす影響を調べ、根粒着生は菌根菌の樹枝状体形成を抑制しており、これはダイズのARS を介したものであることを明らかにした(Sakamoto et al. 2013)。

引き続き坂本はダイズの二重共生系の成立メカニズムを調べるために、根粒菌または菌根菌を単独に、または二重接種した時に発現する宿主遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した(日本土壤肥料学会と環境微生物系学会合同大会における招待講演などで発表)。その結果、根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生に共通して発現上昇する 34 個の遺伝子を見出し、これらは共生系の成立にとって必須な遺伝子であると考えられた。発現遺伝子は、細胞膜輸送体、防御応答および環境ストレス応答に関する遺伝子が多数を占めており、ストレス応答遺伝子には Type1 メタロチオネイン遺伝子が含まれていた。メタロチオネインは、細胞内で金属イオンの濃度調整を行っているタンパク質であり、重金属耐性に関与することが知られている。またこのタンパク質は活性酸素の消去機能もあることが最近報告されている(Hssinen et al. 2011)。

## 2. 研究の目的

以上の点を踏まえ、本研究はダイズの二重共生系の成立に必須であると考えられるストレス応答遺伝子の一つである Type1 メタロチオネイン遺伝子(*GmMT1*)の発現特性と二重共生系における役割を解明することを目的とした。まずダイズの生育に伴う *GmMT1* 発現量の変化を調べ、発現部位をプロモーター-GUS 染色法によって特定した。また発現を引き起こすシグナル物質の検出を試みた。次いで共生系での役割について、*GmMT1* 遺伝子は根細胞内の金属イオンの濃度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

調整または共生菌感染によって生じる活性酸素を消去している可能性を検討した。また RNA 干渉 (RNAi) 法を用いてダイズの遺伝子発現抑制体を作成し、これらの作業仮説を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダイズ根および根粒中の *GmMT1* 遺伝子の発現特性 (平成 28 年度)

本実験では RT-リアルタイム PCR 法を用いてダイズの生育に伴う根および根粒中の *GmMT1* 遺伝子の発現特性について調べた。実験に供試したダイズ(品種エンレイ)は温室内で栽培した。根粒菌は *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株、アーバスキュラー菌根菌は *Gigaspora rosea* MAFF520062 株を用いた。ダイズは 6 週間 (開花期) および 9 週間 (子実肥大期) 栽培し、それぞれ根と根粒を採取した。根と根粒から抽出した total RNA を試料とし、リアルタイム PCR 法に必要な *GmMT1* 遺伝子増幅用のプライマーの設計や増幅条件の検討を行い、遺伝子発現量を測定した。

#### (2) *GmMT1* 遺伝子の発現を誘導するシグナル物質の特定 (平成 28 年度)

本実験では *GmMT1* 遺伝子の発現を誘導するシグナル物質を特定することを試みた。実験で採取した根と根粒を試料とし、シグナル物質として活性酸素種の一つである過酸化水素の検出と定量を、ジアミノベンジジンを用いて行った。

#### (3) *GmMT1* 発現量と金属イオン含量および過酸化水素発生量との関係 (平成 29 年度)

本実験では、ダイズ根および根粒中の金属イオン (亜鉛・銅) 含量と平成 28 年度に確立した方法を用いて過酸化水素発生量を測定し、*GmMT1* 遺伝子が共生菌の定着に伴う細胞内金属イオンの濃度変動を調整している可能性と、共生菌の定着によって発生する過酸化水素 (活性酸素種) の消去を行っている可能性を検討した。

#### (4) *GmMT1* 遺伝子の発現部位の解明 (平成 29 年度)

本実験では *GmMT1* 遺伝子の発現部位の解明を行なった。まず *GmMT1* 遺伝子のプロモーター領域を増幅するプライマーを設計し、これを用いてダイズ根からプロモーター領域を含む配列を増幅した。GUS 遺伝子を含む binary vector へこれを組み込み、さらに *Agrobacterium rhizogenes* MAFF210265 株 (国内野生株) へ導入した。次にダイズの下胚軸に本菌を接種し毛状根を発生させた。毛状根に根粒菌と菌根菌を接種し、数週間生育させた後に GUS 染色を行なって *GmMT1* 遺伝子の発現部位を特定、観察した。

#### (5) RNAi 法を用いた *GmMT1* 遺伝子の発現抑制が根粒着生と菌根形成に及ぼす影響 (平成 30 年度)

本実験ではダイズ毛状根の遺伝子発現抑制体を作成し、*GmMT1* 遺伝子の役割を解明することを試みた。まず *GmMT1* 上の特定配列を 2 本鎖(ds)RNA 領域に持つ、short hairpin RNA を生産するコンストラクトを作製した。そしてこれを導入した *Agrobacterium rhizogenes* MAFF210265 株をダイズ根に接種し毛状根を発生させた。毛状根に根粒菌と菌根菌を接種して栽培し、*GmMT1* 遺伝子の発現抑制が根粒着生と菌根形成に及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(1) ダイズ根および根粒中の *GmMT1* 遺伝子の発現特性 (平成 28 年度)

実験の結果、ダイズ根と根粒における *GmMT1* 遺伝子発現を定量化することに成功した。根と根粒の子実肥大期の *GmMT1* 発現量はいずれも開花期よりも高いことが明らかとなった。

(2) *GmMT1* 遺伝子の発現を誘導するシグナル物質の特定 (平成 28 年度)

実験の結果、過酸化水素の特異的染色試薬であるジアミノベンジジンを用いることで、根と根粒内の細胞で生成されている過酸化水素の検出に成功した。またインターネット上にあるソフトを用いた画像解析によって、ジアミノベンジジンによる細胞の染色度合を数値化できることがわかり、過酸化水素発生の定量化に成功した。

(3) *GmMT1* 発現量と金属イオン含量および過酸化水素発生量との関係 (平成 29 年度)

実験の結果、ダイズ根および根粒における *GmMT1* 遺伝子の発現量は、金属イオン含量とは相関関係を示さず、過酸化水素発生量と強い相関関係にあることが明らかとなった。従って *GmMT1* 遺伝子の役割として、ダイズ根および根粒中の活性酸素の消去を行っている可能性が示唆された。

(4) *GmMT1* 遺伝子の発現部位の解明 (平成 29 年度)

実験の結果、*GmMT1* 遺伝子はダイズ根では感染しているアーバスキュラー菌根菌の樹枝状体の周囲で主に発現していることが認められ、また根粒中ではバクテロイド感染領域の周囲で発現していることが見出された。以上のことから *GmMT1* 遺伝子は両共生菌に接する部位で発現していることが明らかとなり、本遺伝子は共生特異的に発現していることが明確となった。

(5) RNAi 法を用いた *GmMT1* 遺伝子の発現抑制が根粒着生と菌根形成に及ぼす影響 (平成 30 年度)

実験の結果、RNAi 法を用いて作出したダイズ毛状根の *GmMT1* 発現抑制変異体では親株に比べて菌根形成率および根粒重が減少し、根および根粒の過酸化水素含量が増大していることが認められた。このことから *GmMT1* 遺伝子は共生器官における活性酸素種を消去し根粒および菌根を酸化ストレスから保護する役割を担っていると結論された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ibiang, Y.B. and Sakamoto, K. (2018) Synergic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and bradyrhizobia on biomass response, element partitioning and metallothionein gene expression of soybean-host under excess soil zinc. *Rhizosphere*, 6, 56-66 査読有

DOI: 10.1016/j.rhisph.2018.03.002

Sakamoto, K. and Kaji, T. (2017) Estimation of the root colonization of soybean by an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora rosea*, based on specific fatty acid profiles. *Soil Science and Plant Nutrition*, 63 (6), 536-542 査読有

DOI: 10.1080/00380768.2017.1396879

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Ibiang, Y.B., Mitsumoto, H., and Sakamoto, K. (2017) Bradyrhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi modulate manganese, iron, phosphorus, and polyphenols in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under excess zinc. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 1-13 査読有  
DOI: 10.1016/j.envexpbot.2017.01.011

〔学会発表〕(計7件)

坂本一憲・小山浩由・小八重善裕・中村郁郎 2018 .ダイズの根粒・菌根共生系における*GmMT1* 発現の局在性解析, 日本土壌肥料学会講演要旨集, 64, p.27 (8月29日)

Ibiang, Y. B. and Sakamoto, K. 2018. Biomass response and metallothionein gene expression of soybean colonized by rhizobia and AM fungi under excess zinc, 日本土壌肥料学会講演要旨集, 64, p.28 (8月29日)

大草遥・北澤悠里香・坂本一憲・園田雅俊 2017. ダイズの根粒・菌根共生系における各種抗酸化酵素遺伝子の発現とそれらの相互関係, 日本土壌肥料学会講演要旨集, 63, p.30 (9月5日)

北澤悠里香・小山浩由・坂本一憲・中村郁郎・園田雅俊 2017 .RNAi 法を用いた *GmMT1* の発現抑制がダイズの根粒・菌根共生系に及ぼす影響, 菌根研究会 2017 年度大会 (JCOM2017) 講演要旨集, p.18 (12月9日)

北澤悠里香・坂本一憲・小山浩由・園田雅俊 2016. ダイズの根粒・菌根共生系における過酸化水素発生量と*GmMT1*発現量との関係, 日本土壌肥料学会講演要旨集, 62, p.25 (9月20日)

小山浩由・坂本一憲・小八重善裕・中村郁郎 2016. ダイズの根粒・菌根共生系における Type1 メタロチオネイン遺伝子発現の局在性解析, 菌根研究会 2016 年度大会 (JCOM2016) 講演要旨集, p.15 (12月10日)

Ibiang, Y.B., Mitsumoto, H., and Sakamoto, K. 2016. Effect of arbuscular mycorrhizal and rhizobial inoculants on manganese and iron nutrition in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under zinc excess, 菌根研究会2016年度大会 (JCOM2016) 講演要旨集, p.17 (12月10日)

〔図書〕(計1件)

坂本一憲:「驚きの菌ワールド 菌類の知られざる世界」, B5 変形版, 89p. , 日本菌学会編, 植物と共生するアーバスキュラー菌根菌, p.24-25, 東海大学出版部, 平塚 (2017) (2月28日)

〔その他〕

ホームページ: <https://sites.google.com/site/sakamolab/project>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 園田 雅俊

ローマ字氏名: SONODA, Masatoshi

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院園芸学研究科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

職名：講師

研究者番号(8桁): 70376367