

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380047

研究課題名 (和文) ダイズを介した根粒菌・菌根菌・病原菌間の相互作用システムの
の解明に関する研究研究課題名 (英文) The studies on the interaction system among rhizobium,
mycorrhizal fungi and pathogen through soybean root

研究代表者

氏名 (ローマ字)：坂本 一憲 (SAKAMOTO, KAZUNORI)

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：10225807

研究成果の概要：本研究は、ダイズを介した根粒菌・菌根菌・病原菌間の相互作用システムの解明を目的とした。ダイズでは根粒着生により発動するオートレギュレーション機構によって菌根形成が抑制されていること、黒根腐病菌の発病は根粒超着生変異体で高いことが明らかになった。また根粒超着生変異体の菌根形成における根浸出物の影響は小さく、ダイズの根粒非着生変異体では、Nod ファクター受容体遺伝子 *GmNFR1* に変異が生じているが明らかになった。その他ダイズの根粒着生と菌根形成に対して、リン酸施用の影響が大きいことがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ダイズ, 根粒菌, アーバスキュラー菌根菌, 病原菌, 共生関係, 生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

ダイズはタンパク源のみならず機能性食品としても重要であるが、わが国のダイズ収量は低く (2t ha^{-1} 以下)、世界平均に達していない。また近年は環境保全型の栽培技術が強く求められており、化学肥料や農薬に依存しない低肥料・耐病性ダイズの育種と現場における栽培技術の確立が急務の課題となっている。

研究代表者の坂本はダイズのオートレギュレーション機構が根粒着生のみならずアーバスキュラー菌根の形成をも同時に制御していることを発見した。オートレギュレーションが機能しないダイズ変異体 (En6500) では根粒数と菌根形成率が増大し、葉部の窒素・リン酸含量も増大していた。このことからダイズには根粒菌と菌根菌を同時に制御する共通基盤システムが存在することが予想され、また根粒菌と菌根菌は宿主の基盤シ

ステムを介して相互に影響していることが考えられる。一方、分担者の原田は根粒共生系に関与するダイズの遺伝子について検討し、オートレギュレーション機構に関与する遺伝子 (*NTSI*) を世界で初めて単離している。またマメ科のモデル植物であるミヤコグサではネコブセンチュウの感染にオートレギュレーション機構および根粒菌の Nod ファクターの受容機構が関与していることを示す報告が出ており、共生菌と病原菌との間にも宿主を介した何らかの相互作用システムが存在することが示唆されている。

以上よりダイズのオートレギュレーション機能やシグナル受容機構を操作することによって、根粒による窒素供給能の強化ばかりでなく、菌根によるリン酸・微量元素供給能と病原菌の感染抑制能の強化が図られ、低肥料性と耐病性を兼ね備えたダイズ品種の作出が期待される。このようなダイズの作出には、第1にダイズを介した根粒菌・菌根菌・病原菌間の相互作用システムの包括的説明が必要である。またそのようなダイズが育種されたとしても、圃場栽培においては土壤理化学的影響や最適な肥料条件が解明されて栽培技術が確立されないと意図したような収量は得られない。したがって第2に根粒菌・菌根菌・病原菌間の相互作用に影響する土壤・肥料要因の解析が重要となる。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者や分担者のこれまでの成果を基に、ダイズを介した根粒菌・菌根菌・病原菌間の相互作用システムと関連宿主遺伝子および相互作用システムに影響する土壤・肥料要因を解明し、根粒・菌根共生系の強化による低肥料・耐病性ダイズの作出とその栽培技術の確立に資する基礎的知見を得ることを目的とし、種々の実験を実施したものである。

各担当者の分担研究とそれぞれの研究目的は以下のとおりである。

(1) ダイズのオートレギュレーション機構が根粒着生と菌根形成の相互作用に及ぼす影響 (担当: 坂本)

ダイズの野生型品種エンレイと根粒超着生変異体 (関東100号と En6500) の根粒着生と菌根形成について調べ、オートレギュレーション機構が根粒着生と菌根形成の相互作用に及ぼす影響について検討した。また新しい菌根形成率の測定法として菌根菌特異的脂肪酸の利用を検討し、本法を用いて根粒着生と菌根形成の相互作用について解析した。

(2) 根粒超着生ダイズ変異体における病原菌の感染様式 (担当: 山本)

根粒超着生変異が特定の生物 (共生菌) 間の相互作用にだけに影響するのか、それとも不特定の生物 (病原菌) に対しても感染されやすいのかを確認した。

(3) 根粒超着生ダイズ変異体の根浸出物がアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の生長に及ぼす影響 (担当: 俵谷)

菌根形成のオートレギュレーションが機能しないダイズの突然変異体における前共生段階における外生菌糸の生長に対する根の浸出物の影響を検討した。

(4) 根粒非着生ダイズ変異体の原因遺伝子の解明 (担当: 原田)

ダイズの根粒共生メカニズムを探るため、根粒非着生ダイズ変異体の原因遺伝子のマッピング及びマメ科のモデル植物から得られた情報を利用して根粒非着生ダイズ変異体の原因遺伝子の解明を行った。

(5) 根粒超着生ダイズ変異体の根粒着生・菌根形成に及ぼす窒素・リン酸施肥の影響 (担当: 磯井)

一般に根粒の着生は窒素によって阻害され、リン酸によって促進されるとされている。また、菌根菌の感染はリン酸によって阻害されることが知られている。本研究では窒素およびリン酸の施用レベルがそれぞれ根粒の着生と菌根菌の感染を阻害するレベルまで段階的に変化させ、根粒超着生を示す関東100号および対照として野生型エンレイをポット栽培し、ダイズの生育と土着の根粒菌と菌根菌による根粒着生と菌根形成を調査し、根粒着生と菌根形成のそれぞれが最大となる窒素およびリン酸施用量を検討した。

3. 研究の方法

(1) ダイズのオートレギュレーション機構が根粒着生と菌根形成の相互作用に及ぼす影響 (担当: 坂本)

ダイズの野生型品種エンレイとオートレギュレーション機構が欠損した根粒超着生変異体である関東100号と En6500 の発芽種子をそれぞれ滅菌した赤玉土・川砂培土に播種し、ガラス温室内でそれぞれ3, 6および9週間栽培した (En6500は9週間のみ)。試験区として非接種区、根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) 接種区、菌根菌 (*Gigaspora rosea* C1) 接種区、根粒菌・菌根菌二重接種区を設けた。収穫後、根粒数、根粒乾物重、窒素固定活性、菌根形成率、ダイズ葉リン含有量、根粒リン含有量を測定した。またダイズ根を1次根と2次根以下に分け、MIDI法を用いて根部の菌根菌特異的脂肪酸 (20:1 ω 9, 20:4 および 20:5) を測定した。

(2) 根粒超着生ダイズ変異体における病原菌の感染様式 (担当: 山本)

遺伝背景の異なる根粒超着生ダイズ変異体を圃場栽培し, 自然発生する病害に対して弱くなるのかどうかを観察した。

(3) 根粒超着生ダイズ変異体の根浸出物がアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の生長に及ぼす影響 (担当: 俵谷)

①実験 1

ダイズ野生型のエンレイおよびその根粒超着生変異体(En6500)を, リンを含まない培養液で3日間水耕培養し, 根の浸出物を回収した。アーバスキュラー菌根菌 *Gigaspora margarita* の孢子にこれらの根の浸出物及び脱塩水(対照区)を与え24時間及び48時間後に外生菌糸長及び分岐数を測定した。

①実験 2

ダイズ野生型のエンレイ, Bragg およびそれらの根粒超着生変異体(En-b0-1, NTS1007)を2段階のリンレベルで28日間水耕培養し, 根の浸出物を回収した。これらの根の浸出物及び脱塩水(対照区)中でアーバスキュラー菌根菌 *Gigaspora margarita* の孢子を7日間培養し, 外生菌糸長及び分岐数を測定した。

(4) 根粒非着生ダイズ変異体の原因遺伝子の解明 (担当: 原田)

ダイズの根粒非着生変異体 En115, En1282, En1314 に秣食豆公 503 を交配して各 F2 集団を作製し, これを原因遺伝子のマッピング集団として使用した。マメ科のモデル植物ですでに単離されている全ての根粒非着生変異体の原因遺伝子の塩基配列情報を使ってダイズ EST 配列を検索し, 高い相同性を示した EST 配列を使って各変異体の F2 マッピング集団の連鎖解析を行った。各 F2 マッピング集団において根粒非着生表現型と共分離を示した EST 配列をもとに遺伝子を単離して, 各変異体の遺伝子の塩基配列を決定した。

(5) 根粒超着生ダイズ変異体の根粒着生・菌根形成に及ぼす窒素・リン酸施肥の影響 (担当: 磯井)

根粒超着生ダイズ関東 100 号と野生型エンレイを, 施用窒素濃度を3段階(20, 100, 400mgNkg⁻¹), リン酸濃度3段階(4, 40, 400mg Pkg⁻¹)にそれぞれかえて, 莢形成期までポット栽培し(褐色森林土), 植物体の乾物重, 窒素・リン吸収量, 根粒形成, 菌根形成(Trouvelot 法)について調査を行った。

4. 研究成果

(1) ダイズのオートレギュレーション機構

が根粒着生と菌根形成の相互作用に及ぼす影響(担当: 坂本)

根粒数および根粒乾物重は, 開花期である6週目まではエンレイ, 関東 100 号ともに菌根形成による影響は見られなかったが, 結実期である9週目において, エンレイ, 関東 100 号ともに菌根形成により有意に増大した。またアセチレン還元による根粒の窒素固定活性, 根粒のリン含有量も同様の傾向を示した。これらの結果は菌根菌から根粒へのリン供給が増大したためと考えられた。

一方, 菌根形成強度は, 6週目以降エンレイ, 関東 100 号の菌根菌接種区および関東 100 号の二重接種区は差が見られなかったが, エンレイの二重接種区で有意に減少した。ダイズ葉のリン含有量も同様に, 6週目から9週目にかけてエンレイ, 関東 100 号の菌根菌接種区および関東 100 号の二重接種区のリン含有量の増大と比較し, エンレイの二重接種区はリン含有量の増大が少なかった。

En6500 においても関東 100 号とほぼ同じ結果が得られた。

接種に用いた *Gigaspora rosea* の特異的脂肪酸(20:1ω9, 20:4 および 20:5)は, 検鏡法による菌根形成率と強い相関関係を示し, 本物質の測定が新しい菌根形成率の評価方法として有効であることが明らかとなった。菌根菌特異的脂肪酸の組成割合および含有量は2次根以下の方が大きかった。特に全脂肪酸量において, 9週目の1次根では菌根形成により若干増大したが, 2次根以下では6週目以降著しく増大した。したがって, 菌根形成は2次根以下に多く発達していると考えられた。

菌根菌特異的脂肪酸の組成割合は1次根, 2次根以下ともにエンレイの二重接種区で減少し, 菌根形成強度と同様の傾向を示した。しかし, 菌根菌特異的脂肪酸の含有量は1次根ではエンレイの二重接種区で減少したが, 2次根以下ではほぼ同じであった。

以上の結果より, ダイズ根では根粒着生により発動するオートレギュレーション機構によって菌根形成が抑制されていることが明らかにされた。また菌根菌特異的脂肪酸の測定結果から, 根粒が多く着生する1次根でその影響が大きいことが示唆された。

(2) 根粒超着生ダイズにおける病原菌の感染様式(担当: 山本)

観察の結果, ほとんどの病害に対していずれの超着生系統も原品種との間に病度の違いは見られなかった。唯一, 黒根腐病に対しては遺伝背景にかかわらず根粒超着生系統での発病が増えた。

(3) 根粒超着生ダイズ変異体の根浸出物がアーバスキュラー菌根菌の外生菌糸の生長

に及ぼす影響 (担当: 俵谷)

①実験 1

Gigaspora margarita の外生菌糸長及び分岐数は、根の浸出物添加 2 4 時間後には処理区間で差がなく、根の浸出物添加 4 8 時間後に En6500 でエンレイ及び対照区より大きい傾向であった。

②実験 2

Gigaspora margarita の外生菌糸長はエンレイ及び Bragg の根の浸出物中で対照区より長かった。En-b0-1, NTS1007 の根の浸出物中の外生菌糸長は対照区と差がなかった。

以上の結果から根粒超着生変異体の菌根形成における根の浸出物の影響は小さく、変異体の菌根形成は根内における内生菌糸の発達段階で調節されていると考えられた。

(4) ダイズ根粒非着生変異体の原因遺伝子の解明 (担当: 原田)

Nod ファクター受容体をコードするミヤコグサ *NFR1* 遺伝子と高い相同性を示したダイズ EST(AW569927)由来の DNA 多型が En115, En1314 変異体の各 F2 マッピング集団において、根粒非着生表現型と共分離の傾向を示し、B2 連鎖群上に位置付けられた。

AW569927 の塩基配列を利用して各変異体より遺伝子を単離し、これを *GmNFR1α* とした。各変異体における *GmNFR1α* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、En115 ではイントロン内のスプライスドナーサイトに一塩基置換が、En1314 では 678bp の欠失が存在することがわかった。また F2 マッピング集団において根粒非着生表現型が AW569927 マーカーと共分離しなかった En1282 でもアミノ酸置換を伴う一塩基置換が検出された。

ところが、*GmNFR1α* 遺伝子の変異を検出するプライマーを設計してマッピングを行った結果、*GmNFR1α* 遺伝子は AW569927 マーカーとは異なる D1b 連鎖群上に座乗することがわかった。En115, En1314 変異体の各 F2 マッピング集団では、この単離した *GmNFR1α* 遺伝子と AW569927 マーカーの遺伝子型がいずれも変異体型になると根粒非着生の表現型を示したことから、ダイズには D1b 連鎖群上の *GmNFR1α* 遺伝子の他に B2 連鎖群上に *GmNFR1β* 遺伝子が存在し、En115 と En1314 では、これら両方の遺伝子に変異が生じている可能性が示唆された。

(5) 根粒超着生ダイズ変異体の根粒着生・菌根形成に及ぼす窒素・リン酸施肥の影響 (担当: 磯井)

①施用窒素濃度の影響

関東 100 号の根粒着生はエンレイの数倍量を示し、窒素 400mgNkg⁻¹ 施用区では両品種の根粒着生は大きく抑制されたが、乾物重、窒素・リン吸収量、菌根形成への影響は顕著で

はなかった。

②施用リン酸濃度の影響

菌根形成強度および樹枝状体形成率はエンレイに比べて関東 100 号において高い傾向を示し、両品種ともリン施用量の増加に反比例して減少した。植物体の乾物重、窒素・リン吸収量、根粒形成は、リン施用量の増加に伴い増加した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

① Sakamoto, K. and Nohara, Y. (2009) : Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) shoots systemically control arbuscule formation in mycorrhizal symbiosis. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **55**, 252-257 (査読有)

② 荻山慎一・鈴木弘行・坂本一憲・犬伏和之 (2008) : 豚ふんコンポスト施用土壌におけるアーバスキュラー菌根菌の接種および木炭の施用がトウモロコシの亜鉛と銅の吸収に及ぼす影響 -MIDI システムを用いた土壌中の菌根菌プロパギュールの測定-. *土肥誌*, **79**, 255-262 (査読有)

③ Yasutaka Tsubokura, Ryutaku Onda, Shusei Sato, Zhengjun Xia, Masaki Hayashi, Yukie Fukushima, Satoshi Tabata and Kyuva Harada: Characterization of the Soybean Genome Based on Synteny Analysis with *Lotus japonicus*. *Breeding Sci.*, **58**, 157-167 (2008) (査読有)

④ Taishi Umezawa, Kyuva Harada (19 番目) and Masaki Hayashi (全 32 名): Sequencing and Analysis of Approximately 40 000 Soybean cDNA Clones from a Full-Length-Enriched cDNA Library. *DNA Res.*, **15**, 333-346 (2008) (査読有)

⑤ Zhengjun Xia, Masaki Hayashi and Kyuva Harada (21 番目) (全 21 名): An Integrated High-density Linkage Map of Soybean with RFLP, SSR, STS, and AFLP Markers Using A Single F2 Population. *DNA Res.*, **14**, 257-269 (2007) (査読有)

⑥ Tawaraya K, TurJaman M & Ekamawanti HA 2007: Effect of arbuscular mycorrhizal colonization on nitrogen and phosphorus uptake and growth of *Aloe vera* L. *HortScience*, **42**, 1737-1739 (査読有)

⑦ Tawaraya K, Naito M & Wagatsuma T 2006: Solubilization of insoluble inorganic

phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr.*, **29**, 657-665 (査読有)

⑧Turjaman M, Tamai Y, Santoso E, Osaki M & Tawarayama K 2006: Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species *Dyera polyphylla* and *Aquilaria filaria* under greenhouse conditions. *Mycorrhiza*, **16**, 459-464 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

①林 正紀, 原田久也: ダイズにおける PCR ベースの DNA マーカー開発へ向けた PCR-RF-SSCP 法の適用, 日本 DNA 多型学会第 17 回学術集会(日本大学会館 2008 年 11 月)

②梶 智光・坂本一憲: ダイズ品種エンレイ および関東 100 号における根粒着および菌根形成の相互作用, 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会 (2008 年 9 月 9 日, 名古屋市)

③Kyuya Harada, Masaki Hayashi, Yasutaka Tsubokura, Makita Hajika and Keisuke Kitamura: Molecular Characterization of the β -Conglycinin Deficient Soybeans, 4th Annual Soybean Biotechnology Symposium (Missouri, USA) April, 2008

④坂本一憲・津久井真: ダイズの根粒超着生変異体に定着したアーバスキュラー菌根菌と非菌根性糸状菌のフロラ解析, 第 17 回植物微生物研究会 (2007 年 9 月 19 日, 鹿児島市)

⑤林 正紀・荒井三千代・梅原洋佐・夏正俊・赤尾勝一郎・坂本一憲・河内宏・原田久也: 根粒非着生ダイズにおける GmNFR1 遺伝子の変異, 第 17 回植物微生物研究会 (2007 年 9 月 19 日, 鹿児島市)

⑥Sakamoto, K., Tsukui, M. and Nohara, Y.: Soybean shoot systemically regulates arbuscular mycorrhizal colonization as well as rhizobial nodulation. 2nd International Conference of Rhizosphere (2007 年 9 月 11 日, モンペリエ市, フランス)

⑦吉良(岡) 恵利佳, 宮澤日子太, 佐藤直人, 呉 国江, 佐藤修正, 田畑哲之, 林 正紀, 原田久也, 川口正代司: ミヤコグサ根粒過剰着生変異体 klavier の原因遺伝子同定, 第 17 回植物微生物研究会 (鹿児島大学 2007 年 9 月)

⑧坪倉康隆, 佐藤修正, 恩田隆卓, 夏正俊, 林 正紀, 福島有紀恵, 西岡美樹, 田畑哲之, 原田久也: ミヤコグサとのシンテニー解析によるダイズゲノムの特性解明, 日本育種学会第 112 回講演会 (山形大学 2007 年 9 月)

⑨荻原菜津子・坂本一憲・野原慈久: アーバスキュラー菌根形成と根粒形成がダイズ根部の脂肪酸プロファイルに及ぼす影響, 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会 (2007 年 8 月 22 日, 東京)

⑩磯井俊行・藤本慎也: 窒素施用が根粒超着生ダイズの根粒形成および菌根形成に及ぼす影響, 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会 (2007 年 8 月 22 日, 東京)

⑪Masayoshi Kawaguchi, Rieko Nishimura, Guo-Jiang Wu, Hikota Miyazawa, Erika Oka-Kira, Yasuhiro Murakami, Satoshi Shibata, Haruko Imaizumi-Anraku, Yosuke Umehara, Hiroshi Kouchi, Shinji Kawasaki, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Masaki Hayashi and Kyuya Harada: Introduction of an Early Flowering *Lotus japonicus* Ecotype "Miyakojima" MG-20 and the Novel hypernodulating mutants, The Kazusa Conference on Legume Genetics and Genomics in Asia (Kisarazu, Japan) November, 2006

⑫野原慈久・坂本一憲: ダイズ品種エンレイと Williams の菌根形成に及ぼす作物体茎葉部の影響, 日本土壤肥料学会 2006 年度秋田大会 (2006 年 9 月 5 日, 秋田市)

⑬Sakamoto, K. and Nohara, Y.: Soybean shoot suppresses the arbuscule formation of arbuscular mycorrhizal fungi, Abstracts of 5th International Conference on Mycorrhiza (2006 年 7 月 24 日, グラナダ市, スペイン)

⑭坂本一憲・津久井真紀: ダイズの根粒超着生変異体に共生するアーバスキュラー菌根菌のフロラ解析, 日本土壤微生物学会 2006 年度大会 (2006 年 6 月 11 日, 仙台市)

⑮Masaki Hayashi, Yukie Fukushima, Talaat A. Ahmed, Yasutaka Tsubokura, Ryutaku Onda, Satoshi Watanabe, Taishi Umezawa, Toyoaki Anai, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Kazuo Shinozaki and Kyuya Harada: Development of Molecular Markers by PCR-RF-SSCP Technique Using Full-Length cDNA Sequences in Soybean, 3rd International Conference on Legume Genomics and Genetics

(Brisbane, Australia) April, 2006

〔図書〕(計1件)

1) 種子の科学とバイオテクノロジー, 種子生理生化学研究会編, 原田久也監修, 学会出版センター, 396p., 東京, 2009年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 一憲 (SAKAMOTO KAZUNORI)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号: 10225807

(2) 研究分担者

山本 亮 (YAMAMOTO RYO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所・大豆生理研究チーム・研究員
研究者番号: 60391439

俵谷圭太郎 (TAWARAYA KOUTARO)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 70179919

原田 久也 (HARADA KYUYA)
独立行政法人農業生物資源研究所・基盤研究領域・研究員
研究者番号: 70011913

磯井 俊行 (ISOI TOSHIYUKI)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号: 30211733

(3) 連携研究者

なし