

平成 22 年 3 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19580069
 研究課題名（和文） 根粒菌の環境適応性と遺伝子の水平伝播に関する研究
 研究課題名（英文） Study of environmental adaptation and horizontal gene transfer of soybean-nodulating rhizobia

研究代表者
 佐伯 雄一（SAEKI YUICHI）
 宮崎大学・農学部・准教授
 研究者番号：50295200

研究成果の概要（和文）：

本研究では、地域や土壌条件によって特定のダイズ根粒菌が優占するメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。低温から高温に至る各温度における根粒菌培養実験と *Rj* 遺伝子型ダイズ栽培時の感染根粒菌群集構造解析、pH の違いによる遺伝子発現解析、外来遺伝子獲得機構に関する生物的・無生物的遺伝子水平伝播の研究を通じて、根粒菌は外来遺伝子を取り込むことにより、様々な環境適応性を獲得し得ることが示唆され、根粒菌の土着化・優占化に関与する環境因子として、温度と pH が主要な環境因子として確認された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have studied to clarify the mechanism of occupancy of soybean-nodulating rhizobia under various environmental conditions. We clarified environmental factors, soil temperature and soil pH for establishment of soybean-nodulating rhizobia flora through the analyses about bacterial culture and composition of flora of soybean-nodulating rhizobia under various temperature, gene expression analysis under various pH conditions, and horizontal gene transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：ダイズ、*Rj* 遺伝子型、根粒菌、遺伝子水平伝播、環境適応性

1. 研究開始当初の背景

ダイズの栽培は、共生窒素固定の寄与により、化学窒素肥料を多く必要とせず、窒素の

環境への負荷が小さい作物である。また、窒素固定能の高い菌株による根粒占有率を高めた研究例では 10～20%の収量増が示され

ている。そのため、ダイズの多収を目指すと共に環境保全型農業の一環として窒素固定能の高い有用根粒菌の占有率を高める接種技術が期待されて久しい。共生窒素固定を有効利用するためには有用根粒菌を効率よく宿主に感染させることが課題であり、土壤に導入されるべき接種根粒菌は元来生息している土着根粒菌との競合に打ち勝ち、速やかに宿主根圏で増殖し得る特性を有していることが重要である。そのためには接種後の有用根粒菌の土着根粒菌との競合、走化性、増殖、根圏定着、根面への接着および宿主ダイズとの親和性などの生理・生態学的知見を蓄積する必要があるとされている。このことはそれぞれの地域に土着化している根粒菌を解析し、緯度に関わる気温や地温、土壤の理化学性など、地理的に離れたところでの環境条件の差異（環境傾度）に対する適応性や宿主による適応性の差異を解析する必要性を強く示唆している。ダイズの根粒形成に関連する遺伝子として、*Rj* 遺伝子が知られている。*Rj* 遺伝子は特定の血清型を示す根粒菌による根粒形成を抑制する遺伝子として定義されており、現在までに天然には *rj*₁、*Rj*₂、*Rj*₃、*Rj*₄ の4タイプの遺伝子型が見出されている。

申請者のこれまでの研究で、同一の土壤であっても栽培するダイズの遺伝子型によって感染する根粒菌に偏りが認められることを見出した (Saeki *et al.* 2000)。さらに、根粒菌の遺伝子多型解析を用いたここ数年の研究結果から、根粒菌の分布には環境傾度に対してある一定のニッチを示しながら変遷していることが明らかとなった (右図、Saeki *et al.* 2004, Saeki *et al.* 2006)。また、ベトナムのアルカリ土壤の土着根粒菌を解析した結果、日本の一般的土壤に存在する *Bradyrhizobium* 属根粒菌の分布とは全く異なることを報告した (Saeki *et al.* 2005)。現在、沖縄本島の琉球大学の酸性土壤とアルカリ性土壤を用いた土着根粒菌の解析を行っており、土壤の pH が8付近を境に根粒菌フローラが全く異なることを明らかにしつつある。これらの結果からダイズ根粒菌はある一定の環境傾度に順応しながら分布していると考察されるに至った。

根粒菌の環境傾度への適応は不明な点が多く、様々な環境ストレスに対する耐性機構の獲得様式の解明は大きな課題となっている。大腸菌においては特定の粘土鉱物の存在下で外来遺伝子が無生物的に導入され、形質転換することが明らかにされている (Yoshida and Saeki 2004a, 2004b)。しかしながら、根粒菌の遺伝子の水平伝播と環境に対する適応性に関しては不明な点が多く、有用根粒菌の生残性や土着化といった観点からも研究の進展が期待されている。

2. 研究の目的

本研究テーマでは、地域や土壤条件によって特定の根粒菌が優占するメカニズムとして、根粒菌の特定環境下での遺伝子水平伝播による適応性獲得の機構を探索し、遺伝的多様性と土着化・優占化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために本研究期間内では根粒菌の分布に及ぼす環境因子の解析や根粒菌の環境因子に対する適応性に関与する遺伝子の同定および特定環境下での遺伝子の水平伝播の頻度解析を行った。日本の土着根粒菌においては北と南で根粒菌フローラが全く異なっているため、土壤温度および気候に関連した環境因子と土壤の理化学性を解析の対象環境因子とした。具体的には、これまでの研究で分離解析された日本各地域で優占しているダイズ根粒菌を選抜し、それら土着根粒菌の優占化のメカニズムを地温や pH を段階的に変化させ、それぞれの環境下での耐性・定着能の解析を行い、それに伴う遺伝子の発現様式を解析し、遺伝子の同定及びクローニングによる関連遺伝子の解明をおこなった。さらに GFP トランスポゾン(marker 遺伝子)として、いかなる環境条件が遺伝子の水平伝播の頻度を左右するのか様々な環境下における根粒菌の外来遺伝子の獲得機構の解明を研究期間内の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 温度適応性

これまで日本各地で分離された根粒菌を遺伝子多型によって分類し、これら各地の優占株を代表する *B. japonicum* USDA 123, 38, 6, *B. elkanii* USDA 76 株を選抜し、これら根粒菌を優占性に関与すると想定される土壤温度を段階的に変化させた滅菌ポットに馴化させ、マイクロコスムを調製した。さらに温度を変動させた環境をインキュベーターで実現し、長期間培養した。一定期間 (12 週) 後、マイクロコスム中の根粒菌の生息比率を ITS 領域の遺伝子多型を利用した変性剤濃度勾配電気泳動法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: PCR-DGGE 法) によって検討し、土壤中での根粒菌占有率の変化を推定した。

(2) pH 適応性

これまでの報告では *Sinorhizobium fredii* においては K/H antiporter (*pha*) 遺伝子がアルカリ耐性および根粒形成過程に関与することが報告されている。また、多くの微生物では Na/H antiporter (*nha*) 遺伝子がアルカリ耐性に関与していることが報告されている。*Bradyrhizobium* においては pH 耐性に関与する遺伝子の報告がなく、*pha* および *nha* 遺伝子に関する検討を行った。Rhizobase

(<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>)から、これらの遺伝子の候補を抽出し、プライマーを設計後、*B. japonicum* USDA 110 から3種の *nha* 遺伝子をクローニングした。PCR産物をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションによる遺伝子の保有を検討した。また、pH 5, 7, 9の液体培養で得られた菌体の遺伝子発現をおよびリアルタイムPCRを用いて検討した。

(3) *Rj* 遺伝子型と根粒菌群集構造

地温がそれぞれの根粒菌の宿主への感染能に及ぼす影響を調査するため、栽培温度を段階的に変化させたチャンバー内で、根粒菌多様性の高い東北農業研究センター福島拠点の土壌に *Rj* 遺伝子型ダイズ品種を栽培し、得られた根粒における菌株の占有率を評価し、宿主への感染と環境因子との相関解析をおこない、根粒形成における宿主ダイズ品種の遺伝子型との親和性への環境因子の影響を含めた生残性・土着化・優占化を解析した。

(4) 遺伝子の水平伝播

GFP トランスポゾン(marker 遺伝子)として、いかなる環境条件が遺伝子の無生物的な水平伝播の頻度を左右するのか特定環境下における遺伝子の獲得を解析した。ここでは微細粘土鉱物による無生物的遺伝子の水平伝播および微生物同士の接合による遺伝子の伝播に関して検討を行い、根粒菌の外来遺伝子獲得機構に関して考察を行った。

4. 研究成果

(1) 温度適応性

根粒菌の温度適応性を検討するために、温度による増殖の程度を確認した。その結果、菌株間で温度による増殖の差が認められた。特に高温(35°C)培養では南で優占している根粒菌のみの増殖を確認した。

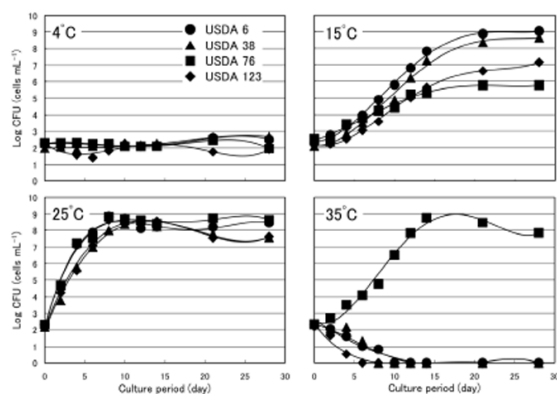


図1 培養温度による根粒菌の増殖の違い

次に、福島土壌における各種 *Rj* 遺伝子型ダイズ栽培で温度条件を変化させた時の感染

根粒菌の群集構造を ITS 領域の PCR-RFLP 法で調査し、数理生態学的解析を行った。その結果、栽培温度を高くすると沖縄で優占している *B. elkanii* 菌株の、温度を低くすると北海道で優占している *B. japonicum* USDA 123 菌株の根粒占有率が高くなることを見いだした(投稿準備中)。

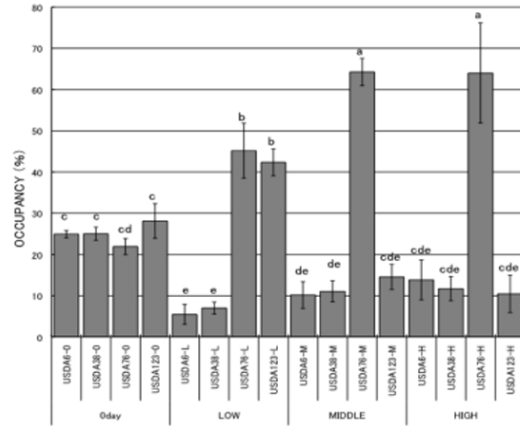


図2 土壌温度による根粒菌占有率の変化

(2) 土壌 pH

同じ地域であっても土壌 pH が 7.6-8.0 を境に土壌における *B. japonicum*・*B. elkanii* と *Sinorhizobium fredii* の優占度が逆転することが明らかとなり、土壌 pH がダイズ根粒菌の多様性に影響を与えていることが明らかとなった。

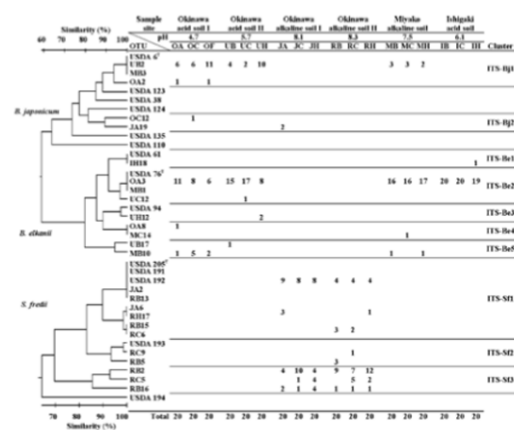


Figure 3 Dendrograms of rhizobia based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. The maximum similarity among operational taxonomic units (OTUs) of reference strains in the species used in this study was used as the criterion for differentiation of clusters in the dendrogram, 98% for *Bradyrhizobium japonicum*, 91% for *Bradyrhizobium elkanii* and 84% for *Sinorhizobium fredii*. Clusters were designated as indicated on the right. Tabulated numbers indicate the numbers of isolates in each OTU in all soil-host soybean combinations.

図3 土壌 pH と土着根粒菌フローラ(Suzuki et al. 2008 より)

アルカリ土壌において、*S. fredii* 以外に特定の *B. japonicum* が優占している場合があり、そのアルカリ環境適応性に関して、*B. japonicum* USDA 110 株のゲノム配列で確認された3種の *nha* 遺伝子のアルカリ環境下での役割について解析を行った。その結果、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌は *nha* 遺伝子

を有するが菌株によって保有様式が異なるが、アルカリ環境下で *nha* 遺伝子の高発現を示した。このことは *nha* 遺伝子がアルカリ環境適応性の機能遺伝子である可能性を示唆した（投稿準備中）。

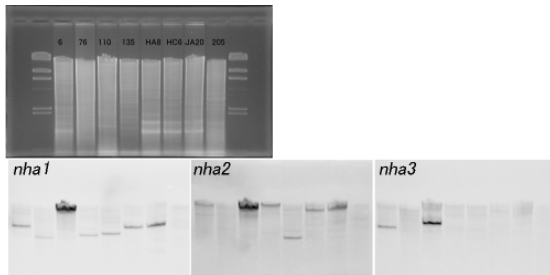


図4 サザンハイブリダイゼーションによる *Bradyrhizobium* 根粒菌の *nha* 遺伝子保有左から *Bradyrhizoibum* 属根粒菌 USDA 6, 76, 110, 135, HA8, HC6, JA20, *S. fredii* USDA 205. マーカーは λ HindIII.

(3) *Rj* 遺伝子型と根粒菌群集構造

Rj 遺伝子型の異なるダイズ品種を同一土壤に栽培した時に得られる感染根粒菌の群集構造の数理生態学的解析法を確立し、*Rj* 遺伝子型による感染根粒菌の群集構造解析を行った。宿主の *Rj* 遺伝子によって着生する根粒菌の群集構造が異なる場合があり、試験土壤においては *Rj* 遺伝子型ダイズの根粒菌群集構造は他の遺伝子型と比較して有意に異なることが明らかとなった。

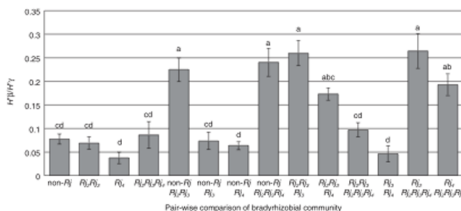


Figure 3 Pair-wise comparisons of the differences in bradyrhizobial composition expressed as the ratio of beta diversity to gamma diversity ($H\beta/H\gamma$). Each value was expressed as the mean \pm standard error ($n = 3$ or $n = 9$). Error bars represent the standard error. Bars with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$.

図5 *Rj* 遺伝子型による感染根粒菌群集構造の差異 (Minami *et al.* 2009 より)

さらに栽培温度が異なると感染する根粒菌の群集構造が異なることが示唆されている（研究継続中）。

(4) 遺伝子の水平伝播

環境適応機構の獲得様式の解析として、ダイズ根粒菌の外来遺伝子の獲得機構に関して検討を行った。GFP トランスポゾン(marker 遺伝子)として、二親接合法およびハイドロゲル曝露法の2法によってGFP形質の獲得を指標にして検討した。その結果、酸性-中性土壤で優占している根粒菌は菌同士の接合によって外来遺伝子を獲得し、アルカリ性土壤で優占している根粒菌は粘土鉱物との摩

擦によって外来遺伝子の獲得を起こしている可能性が示唆された。

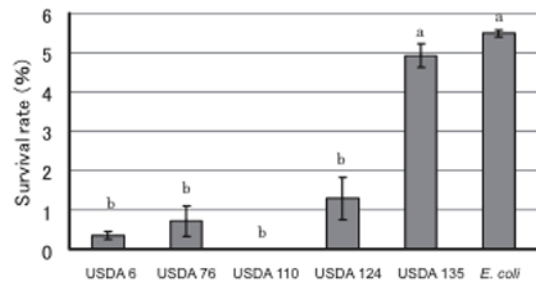


Fig. 2. Survival rates of bradyrhizobia by hydrogel exposure.

The value of this figure is the mean \pm standard error ($n=3$). Tukey's HSD test was applied for the significance test. Bars with different superscript letters are significantly different at $P \leq 0.01$.

図6 ハイドロゲル曝露による根粒菌の生存率 (城ら 2010 より)

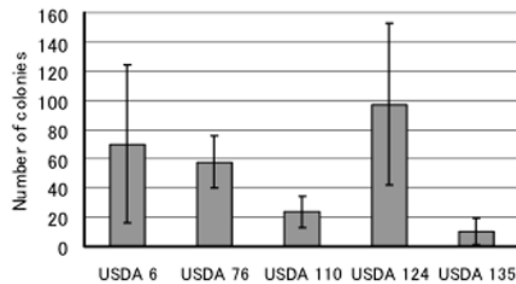


Fig. 4. The number of the colonies as for the fluorescence character of *gfp* gene acquired by the diparental mating method.

The value of this figure is the mean \pm standard error ($n=5$). Tukey's HSD test was applied for the significance test.

図7 二親接合法による形質転換コロニーの獲得数 (城ら 2010 より)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. 城惣吉, 山本昭洋, 吉田ナオト, 佐伯雄一, ダイズ根粒菌の外来遺伝子獲得に関する菌株間差異の解析. 宮崎大学農学部研究報告, 査読有り, 55 巻, 2010, 79-87
2. Saeki Y, Oguro H, Akagi I, Yamakawa T, Yamamoto A. Intragenomic variation of internal transcribed spacer regions between 16S-23S rRNA genes among the three copies of *Sinorhizobium fredii* strains. Soil Science and Plant Nutrition, 査読有り, 55, 2009, 627-633
3. 佐伯雄一, 日本国内におけるダイズ根粒菌の分布と多様性~共生窒素固定の農業技術としての有効利用を目指して~, 化学と生物, 査読無し, 47 巻, 2009, 228-230
4. Minami M, Yamakawa T, Yamamoto A, Akao

- S, Saeki Y. Estimation of nodulation tendency among *Rj*-genotype soybeans by bradyrhizobial community isolated from an Andosol. *Soil Science and Plant Nutrition*. 査読有り, 54, 2009, 65-72
5. Saeki Y., Minami M, Yamamoto A, Akao S. Estimation of bacterial community diversity of soybean-nodulating bradyrhizobia isolated from *Rj*-genotype soybeans. *Soil Science and Plant Nutrition*. 査読有り, 54, 2008, 718-724
6. Suzuki K, Oguro H, Yamakawa T, Yamamoto A, Akao S, Saeki Y. Diversity and Distribution of Indigenous Soybean-Nodulating Rhizobia in the Okinawa Islands, Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*. 査読有り, 54, 2008, 237-246
7. Saeki Y., Murata T, Yamakawa T, Akao S. Differentiation of soybean-nodulating *Bradyrhizobium* USDA strains based on restriction fragment length polymorphisms of 23S-5S rRNA genes. *Soil Science and Plant Nutrition*. 査読有り, 53, 2007, 562-567

[学会発表] (計 12 件)

1. 城惣吉, 南麻衣, 梅原洋佐, 林正紀, 山本昭洋, 佐伯雄一 *ダイズ*の根粒着生における *Rj* 遺伝子型と温度の影響, 日本土壤肥料学会 2009 年度京都大会 (京都) 2009 年 9 月
2. 田島稔之, 大塚亜沙子, 梅原洋佐, 林正紀, 山本昭洋, 佐伯雄一 *Rj* 遺伝子型 *ダイズ*の根粒菌選択性に関する群集構造解析, 日本土壤肥料学 2009 年度京都大会 (京都) 2009 年 9 月
3. 小黒紘子, 山本昭洋, 佐伯雄一 *ダイズ*根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* のアルカリ耐性と *nha* 遺伝子発現, 日本土壤微生物学会 2009 年度大会 (福岡) 2009 年 6 月
4. 城惣吉, 山本昭洋, 佐伯雄一 *ダイズ*根粒菌の外来遺伝子獲得機構に関する検討, 日本土壤肥料学会九州支部春季例会 (佐賀) 2009 年 5 月
5. 林 正紀, 佐伯雄一, 西岡美樹, 高橋将一, 佐山貴司, 石本政男, 原田久也, 河内 宏, 梅原洋佐 特定根粒菌株に対して非親和性を示す *Rj4* 遺伝子保有 *ダイズ*の解析, 日本育種学会第 114 回大会 (滋賀) 2008 年 10 月
6. 佐伯雄一 *ダイズ*根粒菌の分布と多様性に関する分子生態学的研究, 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会 (名古屋) 2008 年 9 月
7. 小住哲, 小黒紘子, 山本昭洋, 佐伯雄一 *土着ダイズ*根粒菌の占有率に及ぼす温度の影響, 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会 (名古屋) 2008 年 9 月
8. 田島稔之, 南麻衣, 山本昭洋, 佐伯雄一 日本の *土着ダイズ*根粒菌の群集構造と分布に関する研究, 日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会 (名古屋) 2008 年 9 月
9. 佐伯雄一 *ダイズ*根粒菌の宿主への感染傾向に関する解析 -根粒着生・培養を通して見える根粒菌生態-, 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会 (東京) 2007 年 8 月
10. 南麻衣, 山本昭洋, 佐伯雄一, 赤尾勝一郎 宿主遺伝子型による *土着ダイズ*根粒菌の分離傾向, 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会 (東京) 2007 年 8 月
11. 小黒紘子, 佐伯雄一, 山本昭洋, 赤尾勝一郎 *ダイズ*根粒菌 *Sinorhizobium* 属 USDA 株の 16S-23S rDNAITS 領域の多様性, 日本土壤肥料学会 2007 年度東京大会 (東京) 2007 年 8 月
12. 小住哲, 堀真治, 佐伯雄一, 山本昭洋, 赤尾勝一郎 *ダイズ*根粒菌の土壤中における占有率評価法の開発 日本土壤肥料学会九州支部春期例会 (福岡) 2007 年 4 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/sspn/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 雄一 (SAEKI YUICHI)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 50295200