

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22303

研究課題名（和文）イネ科植物への窒素固定根粒形成

研究課題名（英文）Induction of nitrogen-fixing root nodules in rice

研究代表者

岡崎 伸（Okazaki, Shin）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：40379285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、根粒形成誘導タンパク質（エフェクター）を分泌する根粒菌と、イネ根に根粒様組織を誘導する2,4-Dを利用して、イネに窒素固定根粒を形成させることを試みた。本研究の結果、（1）根粒菌はイネの根に定着し、ゲニステインを同時に添加することでエフェクター遺伝子を発現できること、（2）2,4-D添加によりイネ根に細胞分裂を誘導し、根の数力所に膨らみを形成できること、（3）根粒菌はイネ根に形成された膨らみ部分表面へ定着し、ゲニステイン同時添加により、根粒菌の定着量が増大すること、が明らかとなった。しかしながら、イネ根に形成された膨らみ内部への根粒菌の侵入は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代農業で最も多く利用される窒素肥料は、水質汚染や温室効果ガス排出など生態系に悪影響を及ぼす。一方、根粒菌はマメ科植物の根に根粒を形成し、窒素固定により宿主植物に窒素栄養を供給する。本研究ではイネ科植物への窒素固定根粒形成を試みた。結果として、2,4-Dにより人為的にイネ根に膨らみを形成できること、ゲニステインにより根粒菌のイネ根への定着を向上できることを明らかにした。これまでのところイネ根に形成された膨らみに根粒菌を侵入・感染するところまでは確認できていないため、今後、根粒菌の侵入・感染と窒素固定遺伝子発現を可能にする因子を根粒菌側、イネ側両方から解析することが必要と考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to induce the formation of nitrogen-fixing nodules in rice using rhizobia that secretes nodulation-inducing proteins (effectors) and substances that form nodule-like tissues in rice roots. As a result, we revealed that, (1) rhizobium colonized rice roots and can express effector genes by adding genistein at the same time, and (2) addition of 2,4-D enhanced cell division in rice roots. (3) Rhizobium colonized on the surface of these nodule-like structures, and simultaneous addition of genistein increased the amount of rhizobium colonization. However, we could not observe invasion of rhizobia into the nodule-like structures, and could not observe the expression of nitrogen-fixing genes.

研究分野：微生物生態学、植物生理学、植物微生物相互作用

キーワード：根粒 イネ 窒素固定 根粒菌 エフェクター

## 1. 研究開始当初の背景

窒素肥料は現代の農業で最も多く利用されるが、その生産と施用は温室効果ガスの排出など生態系に悪影響を及ぼす。一方、根粒菌はダイズなどマメ科植物の根に感染して根粒を形成し、根粒内で大気窒素を固定することで、宿主植物に窒素栄養を供給することができる。窒素肥料の大幅な使用削減を実現するための手段として、イネ科植物に窒素固定根粒を形成させる研究が世界中で進行中であるが、未だ成功には至っていない。また、大部分の研究はマメ科植物で同定された根粒形成遺伝子を遺伝子組換えによりイネ科植物に導入するものであり、実用化には組換え体の生態系への流出等が懸念される。

近年、イネ根へのオーキシン様化合物により根粒様組織が形成されることが報告されている (Hiltbrand et al. 2016)。また、申請者らは一部の根粒菌がエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌することで宿主植物の根粒形成を誘導し、細胞間隙から根粒内部に感染することを明らかにした (Okazaki et al. 2016)。さらに、根粒菌の中には、イネ科植物への根に定着し、根内部に侵入するものも報告されている (Mitra et al. 2016)。これらの状況証拠から、オーキシン様化合物やエフェクターよりイネ根に根粒様組織の形成を誘導し、イネ根に侵入可能な根粒菌を感染させることで、窒素固定根粒を形成できる可能性が考えられるが、いまだイネへの窒素固定根粒形成に成功した報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、イネ科植物に窒素固定根粒を形成させることを目指し、(1) イネ根圏における根粒菌エフェクターの発現とイネ根の応答、(2) 2,4-D 添加によるイネへの根粒様組織の誘導、および (3) イネ根に形成された根粒様組織への根粒菌感染、を検討し、イネ科植物に窒素固定根粒を形成させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) イネ根圏における根粒菌エフェクターの発現とイネ根の応答解析

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌することで宿主植物の根粒形成を誘導し、細胞間隙から根粒内部に感染することが知られている。イネに接種した USDA61 株が、イネ根圏でエフェクターを分泌するかを確認するため、エフェクター遺伝子の発現解析を行なった。また、USDA61 株接種によるイネ根への根粒形成、根粒菌定着に関連する生理的変化を解析した。イネ品種は2種類 (ジャポニカ品種日本晴、およびインディカ品種 Kasalath) を使い、50 ml コニカルチューブにパーミキュライトと MS 培地を充填し、表面殺菌したイネ科植物種子を播種した。USDA61 株は種子あたり  $1 \times 10^7$  細胞接種した。また、ダイズにおけるエフェクター遺伝子の発現誘導物質であるゲニステイン、ダイゼインをイネ根に根粒菌と同時に添加して、エフェクター遺伝子の発現量変化を解析した。

### (2) 2,4-D 添加によるイネへの根粒様組織の誘導

Hiltbrand らの論文(2016)を参考に 2,4-D 添加によるイネ根への根粒様組織の誘導を試みた。論文では 50  $\mu\text{M}$  の 2,4-D 添加により、イネ日本晴の根に栽培後 14 日で根粒様組織が観察されている。本研究ではイネ品種は日本晴および Kasalath を用いた。50 ml コニカルチューブにパーミキュライトと MS 培地を充填し、表面殺菌したイネ科植物種子を播種した。これに各濃度 (50、100、250、500 $\mu\text{M}$ ) の 2,4-D を添加して栽培し、14 日、21 日および 28 日目に根の形態観察を行った。

### (3) 2,4-D 添加によりイネ根に形成された根粒様組織への根粒菌感染

根粒菌は GUS 遺伝子を導入した USDA61 株とエフェクター変異株を用いた。50 ml コニカルチューブにパーミキュライトと MS 培地を充填し、表面殺菌したイネ科植物種子を播種した。2,4-D を 50、100 $\mu\text{M}$  添加し、さらに GUS 遺伝子導入根粒菌を種子あたり  $1 \times 10^7$  細胞接種した。接種後 14 日、21 日および 28 日目にイネ根を GUS 染色し、根粒菌の定着と、根粒様組織への感染状況を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) イネ根圏における根粒菌エフェクターの発現とイネ根の応答解析

イネ根圏での根粒菌エフェクター遺伝子の発現と、イネ根への根粒形成、根粒菌定着に関連する生理的変化を解析した。イネ (日本晴) に根粒菌 USDA61 株を接種後 14 日のイネ根圏から RNA を抽出し、根粒菌エフェクター遺伝子の発現を RT-PCR で解析したところ、エフェクター遺伝子の発現量は検出限界値以下であった。次に、同栽培条件下でゲニステイン (1  $\mu\text{M}$ )、ダイゼイン (1  $\mu\text{M}$ ) をそれぞれ根粒菌と同時に添加したところ、エフェクター遺伝子の発現量は、無添加区に比べてそれぞれ 20 倍、12 倍程度上昇した。ゲニステイン、ダイゼインの添加濃度を 5、25 $\mu\text{M}$  まで増加させた場合でも、発現量は 1  $\mu\text{M}$  と同程度であった。また、同様の実験を品種 Kasalath でも行ったが、2 種類のイネ品種間では発現量に有意差はみられなかった。以上の結果から、イ

ネ根圏では根粒菌エフェクター遺伝子の発現量は低く、ゲニステイン、ダイゼイン添加により人為的に発現誘導可能であることが明らかとなった。

次に、イネ根圏での根粒菌エフェクター遺伝子の発現による、イネ根への生理的变化を解析した。上記のようにゲニステイン (1  $\mu\text{M}$ ) またはダイゼイン (1  $\mu\text{M}$ ) を添加した条件下で根粒菌を接種し、14 日間栽培したイネ根の形態観察を行なったところ、ゲニステイン添加区で根に弱い生育阻害が認められたものの、根の膨らみ等、顕著な形態変化は認められなかった。GUS 遺伝子で標識した根粒菌株を同条件で接種した結果、GUS 染色により根粒菌の定着が確認され、ゲニステイン (1  $\mu\text{M}$ ) またはダイゼイン (1  $\mu\text{M}$ ) 添加区で、無添加区に比べて根粒菌定着量が増加していることが確認された。また、Kasalath よりも日本晴品種のイネ根に強く定着していることが観察された。

以上の結果から、根粒菌エフェクター遺伝子のイネ根圏での発現誘導にはゲニステインが適していること、根粒菌のイネ根への定着には品種間差がみとめられ、日本晴品種の方が Kasalath よりも定着しやすいことが判明した。

### (2) 2,4-D 添加によるイネへの根粒様組織の誘導

2,4-D 添加によるイネへの根粒様組織の誘導を試みた。イネ品種は日本晴およびインディカ品種 Kasalath を用いた。50ml コニカルチューブにパーミキュライトと MS 培地を充填し、表面殺菌したイネ科植物種子を播種した。これに論文に記載の 50、100、250、500  $\mu\text{M}$  の 2,4-D を添加して栽培を続けたところ、日本晴の 50、100  $\mu\text{M}$  添加区において、根の数カ所に膨らみが観察され、顕微鏡観察により膨らみ部分には比較的小さな細胞が密集しており細胞分裂が亢進されていることがみとめられた。一方、Kasalath では同様の膨らみは認められなかった。また、250 $\mu\text{M}$  以上では、イネ植物体が枯死した。

以上の結果から、2,4-D 添加によるイネへの細胞分裂亢進の誘導が可能であることが確認できた。しかしながら、Hiltensbrand らの論文にみられるような根粒様組織は本研究ではみとめられなかった。

### (3) 根粒様組織への根粒菌感染の観察

研究成果 (2) に記載のとおり、2,4-D を 50、100 $\mu\text{M}$  添加したイネ (品種日本晴) において、根の数カ所に膨らみが観察され、顕微鏡観察により膨らみ部分には比較的小さな細胞が密集していることを確認した。また、研究成果 (1) にある通り、根粒形成を誘導するエフェクターの発現は、1  $\mu\text{M}$  ゲニステイン添加により 20 倍上昇することが明らかとなった。そこで、2,4-D (50  $\mu\text{M}$ ) およびゲニステイン (1  $\mu\text{M}$ ) 存在下で、イネへ根粒菌を接種し、根粒様組織の誘導と根粒菌感染の観察を行なった。その結果、根粒菌接種と非接種でいずれもイネ根の数カ所に膨らみが形成された。膨らみの形成頻度や膨らみの大きさに接種、非接種間で、統計的に有意な差は認められなかった。また、根粒菌の感染を GUS 遺伝子導入根粒菌により観察したところ、根粒菌は側根の付け根部分への強い定着が確認された。さらに、2,4-D で誘導されたと考えられる膨らみ部分の表面への定着も確認された。膨らみ部分について、切片を作成して内部への根粒菌感染の程度を検討したが、根粒菌の存在は確認できず、イネの根表層で感染が止まっていることが推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ratu Safirah Tasa Nerves, Amelia Lidia, Okazaki Shin	4. 巻 87
2. 論文標題 Type III effector provides a novel symbiotic pathway in legume-rhizobia symbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 28 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ratu Safirah Tasa Nerves, Hirata Atsushi, Kalaw Christian Oliver, Yasuda Michiko, Tabuchi Mitsuaki, Okazaki Shin	4. 巻 12
2. 論文標題 Multiple Domains in the Rhizobial Type III Effector Bel2-5 Determine Symbiotic Efficiency With Soybean	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1:12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.689064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ratu Safirah Tasa Nerves, Teulet Albin, Miwa Hiroki, Masuda Sachiko, Nguyen Hien P., Yasuda Michiko, Sato Shusei, Kaneko Takakazu, Hayashi Makoto, Giraud Eric, Okazaki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Rhizobia use a pathogenic-like effector to hijack leguminous nodulation signalling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81598-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Hien P., Ratu Safirah T. N., Yasuda Michiko, Teamroong Neung, Okazaki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Bradyrhizobium elkanii USDA61 Type III Effectors Determining Symbiosis with Vigna mungo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 474 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11050474	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teulet Albin, Busset Nicolas, Fardoux Joel, Gully Djamel, Chaintreuil Clemence, Cartieaux Fabienne, Jauneau Alain, Comorge Virginie, Okazaki Shin, Kaneko Takakazu, Gressent Frederic, Nouwen Nico, Arrighi Jean-Francois, Koebnik Ralf, Mergaert Peter, Deslandes Laurent, Giraud Eric	4. 巻 116
2. 論文標題 The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21758 ~ 21768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904456116	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu
2. 発表標題 The rhizobial type III effector Bel2-5 plays a dual role in symbiosis with soybean
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting Japanese Society of Plant-Microbe Interaction (Online conference: <a href="http://jspmi.brc.miyazaki-u.ac.jp/blog/30th-annual-meeting-2021">http://jspmi.brc.miyazaki-u.ac.jp/blog/30th-annual-meeting-2021</a> )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu
2. 発表標題 Type III effector of Bradyrhizobium elkanii USDA61 Bel2-5 possesses multiple domains determining symbiotic efficiency with soybeans
3. 学会等名 14th European Nitrogen Fixation Conference (Online conference: <a href="https://events.au.dk/enfc2021/conference">https://events.au.dk/enfc2021/conference</a> ) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡崎 伸
2. 発表標題 マメ科植物- 根粒菌共生における新規共生経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会【BBB連携シンポジウム】(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu, Christian Oliver Kalaw, Michiko Yasuda, Shin Okazaki
2. 発表標題 Functional analysis of rhizobial pathogenic-like effector hijacking soybean nodulation signaling
3. 学会等名 International Conferences on Agriculture and Biological Sciences 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学 岡崎研究室 <a href="https://www.plant-microbiology.jp">https://www.plant-microbiology.jp</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------