

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19276

研究課題名（和文）植物の根毛は細菌によって誘導されるのか？

研究課題名（英文）Could bacteria induce root hairs?

研究代表者

飯田 祐一郎（Iida, Yuichiro）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号：00456609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物の根の中で最も表面積の大きい根毛は、水分や無機イオンの吸収の大部分を担っている。根毛の伸長は根全体の表面積を拡大させるが、豊富な栄養条件下では抑制される。また根毛の伸長によって土壤中の病原菌と接触するリスクが増加する。本研究では、根毛伸長が土壌細菌によって誘導されるという仮説の下、分離した細菌群のシロイヌナズナに対する誘導能を解析し、供試したいずれの細菌種によっても根毛が誘導される条件を明らかにした。また、シロイヌナズナ変異体の解析からジャスモン酸シグナル経路が、細菌による根毛誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の成長に必須な肥料の3大要素（窒素、リン、カリ）のうち、リンとカリの原料となる鉱石は国内ではほとんど産出されず、ほぼ全量を海外から輸入している。また化石燃料を用いて化学合成によって生産される窒素肥料も、大半を輸入に依存している。鉱石も化石燃料も世界的に枯渇が危惧される中、いずれの肥料も価格が高騰し続けており、我が国の農業生産における重大な懸念となっている。本研究は、根毛伸長を制御することで最少の肥料を効率的に吸収させ、同時に病害に対する防除効果も付与するという、次世代の循環型農業の提案を目指している。

研究成果の概要（英文）：Root hairs are responsible for most of the absorption of water and inorganic ions but suppressed under conditions of abundant nutrients. Elongation of root hairs increase the overall root surface area in plant roots, but also increase the risk of contact with pathogens in the soil. In this study, based on the hypothesis that elongation of root hairs is induced by soil bacteria, we analyzed the induction of root hairs in *Arabidopsis thaliana* by isolated bacteria, and determined the conditions under which root hairs are induced by all bacterial species tested. Analysis of *A. thaliana* mutants also suggested that the jasmonate signaling pathway plays an important role in bacterial root hair induction.

研究分野：植物病理学

キーワード：根毛 抵抗性誘導因子 ジャスモン酸シグナル

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

### 1. 研究開始当初の背景

植物の根は、養分吸収と通道、植物体の支持という陸上植物に共通した重要な機能を果たしている。その中でも根毛は、主根や側根の表皮細胞の一部が毛状に伸長した器官であり、単一細胞から形成される特徴をもつ。また、細胞分裂を伴わず、先端が極性をもって伸長することから、細胞極性のモデルとして研究されている (Salazar-Henao et al. 2016)。最も表面積が大きい根毛が、水分やリン酸、鉄、窒素などの無機イオンの吸収の大部分を担っているとされるが、無機イオンの欠乏によって伸長し、逆に無機イオンが豊富な養液栽培 (無機養液栽培) では抑制される。しかしながら、根毛に関する以上の現象には 2 つの矛盾が存在する。一つは、水分や無機イオンなどの養分吸収の場であるはずの根毛は、なぜ無機養液のような豊富な栄養条件下では伸長が誘導されず、むしろ抑制されるのか? また根毛の伸長は根全体の表面積を拡大させるが、そのために 土壤中の病原菌と接触するリスクをも増大してしまう。我々は、根毛伸長におけるこれらの矛盾を合理的に説明する新たな仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

有機質養液栽培は、水中で有機質肥料を土壌細菌によって硝酸態窒素へと分解させ、植物に窒素源を供給する栽培法であり、有機質養液で栽培中の植物には、根毛の異常な発達認められる (Shinohara et al. 2011, Soil Sci Plant Nutr)。言うまでもなく、有機質養液には植物の成育に十分な量のリン酸、鉄、窒素などの無機イオンが存在することから、本来、根毛伸長は誘導されないはずである。回収した有機養液中の細菌は無機養液中でも根毛を誘導したことから、我々はこれら細菌群が根毛伸長に関わることを明らかにした。また多様な細菌種が回収されることから、根毛伸長を誘導する新たな因子は細菌に広く保存されていると推定された。植物に基礎的な抵抗性を誘導する MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) は、一般微生物や病原微生物を問わず共通した低分子ペプチドとして知られている。我々は、植物の根が微生物由来の抵抗性誘導因子である MAMPs を認識し、根毛伸長を誘導するのではと考えた。つまり、肥沃な土壌には枯葉などの有機物を分解する細菌が多いことから、根毛は周辺の養分濃度だけでなく、細菌の密度をバロメーターに伸長を誘導するタイミングを計っており、MAMPs は細菌密度を感知する格好のターゲット分子と考えられる。本仮説に基づけば、上述した 2 つの矛盾も説明がつく。①無機養液には豊富に無機イオンが存在し、なおかつ無菌的な環境であることから、細菌の MAMPs を根が感知できないため、根毛伸長が誘導されない。また②抵抗性誘導因子である MAMPs によって、根毛伸長に伴う病原菌の感染リスクは必然的に低減されると考えられる。そこで本研究では、微生物-植物間の相互作用における根毛伸長の作用機作の解明を目指し、根毛伸長に関わる細菌種の同定と誘導因子を探索する。

### 3. 研究の方法

(1) まず有機質養液の細菌ライブラリーを充実させ、それら細菌の根毛誘導性を解析する。分離した細菌の培養菌体を一定濃度で無機養液に懸濁し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の根毛伸長を検証する。分離したすべての細菌種で根毛伸長が誘導される場合には、NARO Genebank から入手した細菌や大腸菌などの一般細菌も供試し、共通した根毛誘導因子であることを明らかにする。根毛誘導能の検定は既に確立しており、プレート内で無機養液に懸濁した培養細菌を加え、養液上に浮遊させたナイロンメッシュ上に *A. thaliana* Nossen を播種する。1 週間後、倒立型顕微鏡により根毛を観察し、供試した細菌株による誘導能を検定する。また植物病原菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* を用いて、分離細菌による誘導抵抗性について解析する。

(2) これまでに細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンや、鞭毛タンパク質 (フラジェリン)、伸長因子 (elongation factor-Tu) 等で細菌種を問わず保存された 20 アミノ酸ほどのペプチド領域が MAMPs として同定されており、*A. thaliana* に抵抗性を誘導することが明らかとなっている。そこで、既知の MAMPs を *A. thaliana* に処理することで、根毛伸長の誘導性を検証する。フラジェリン flg22、伸長因子 elf18、各種ペプチドグリカン、リポ多糖類を単独、または混合して処理し、1 週間後に根毛伸長を検定する。

(3) 有機質養液における根毛伸長の誘導に関わる植物因子を解析するため、理研バイオリソースセンターより *A. thaliana* の transposon tagging library (計 550 系統) を入手し、有機質養液栽培における根毛伸長の誘導性を検証する。根毛伸長が異常となる変異体を同定することで、根圏バイオフィルムに対する植物の根毛誘導機構が明らかとなる。また、根毛伸長に関わることが報告されている、オーキシンやエチレンといった植物ホルモン、リン脂質シグナル因子、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー、活性酸素種などの変異体等については、根毛の形成様式および形態を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 細菌用培地で培養した分離細菌を  $5 \times 10^7$  cfu/ml となるよう無機養液に添加し、*A. thaliana* Nossen に対する根毛伸長を検証した結果、いずれの細菌種にも根毛伸長を誘導する能力があることが明らかとなった。これらの細菌には分類学上の共通性がないことから、根毛誘導因子は

細菌に共通する因子であることがさらに裏付けられた。そこで、分類学的に異なり、また由来が明らかな4つの細菌株、グラム陰性菌の *Pseudomonas fluorescens*( MAFF520005 )、*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ( MAFF301591 )、大腸菌 JM109 株およびグラム陽性菌である *Microbacterium luteolum*( MAFF211367 )、*Bacillus subtilis*( MAFF520025 ) についても、同様の検定を行なった。その結果、供試したすべての細菌種で根毛身長が誘導された。さらに接種する細菌濃度に依存的事であること、*A. thaliana* だけでなくトマト (*Solanum lycopersici*) においても同様に根毛が伸長すること等が明らかとなり、広く植物に保存された作用機構であることが示唆された。

(2) 細菌に共通した抵抗性誘導因子である MAMPs を無機養液中に処理し、シロイヌナズナの根毛誘導性を解析した。しかしながら、単独処理だけでなく複数の MAMPs 処理においても根毛伸長は認められなかった。現在、*A. thaliana* の根毛が伸長した無機養液内から、生化学的な精製によって 3kDa 以下の低分子ペプチドが関与することを明らかにしており、今後さらに精製を進め構造決定を行う予定である。

(3) *A. thaliana* Nossen の変異体 550 系統を有機質養液で栽培し、根毛伸長を検定した。その結果、35 系統で根毛伸長が誘導されず、また 2 系統で根毛周辺の微生物叢が増加している傾向を示した。根毛伸長が抑制された 35 系統は、転写因子 WRKY46、ジャスモン酸で誘導される JAZ1 や転写因子 JAM2、ジャスモン酸生合成の初期段階を触媒する DAD1、F-box タンパク質 COI1 と EBF1 ( EIN3-Binding F-box protein 1 )、2 価カチオンに依存した活性を示す酸性ホスホターゼ VSP2、WD40 ドメインタンパク質、CoA リガーゼ、Fe(II)依存性オキシゲナーゼ、遺伝子発現を調整するホメオボックスやヒストン脱アセチル化酵素、根毛の先端伸長を制御する鍵酵素 phosphatidyl inositol-4-phosphate 5-kinase、重力屈性に関わる phosphatidyl inositol monophosphate 5 kinase、葉緑体局在の APO2、また残りは機能未知遺伝子の変異体であった。また、微生物叢が増加した 2 系統は、転写因子 Myb23 と受容体様キナーゼ BKK1 の変異体であった。

JAZ1 リプレッサーはジャスモン酸処理によって、F-box タンパク質 COI1 を含む SCF<sup>COI1</sup> ユビキチンリガーゼ複合体と物理的に相互作用し、プロテアソームによって分解されることが明らかとなっている (Thines et al. 2007)。また JAZ は、bHLH 型 Myc2 転写因子 JAM2 やエチレン誘導性転写因子 EIN3 を抑制しており、さらに JAM2 は根端形成の主要な転写因子である PLETHORA ( PLT ) 遺伝子を負に制御し、エチレン誘導性転写因子 EIN3 をプロテアソーム分解へと導く F-box タンパク質 EBF1 を正に制御する (Huang et al. 2017)。加えて、ジャスモン酸生合成に関わる DAD1 変異体においても根毛伸長が抑制されるなど、ジャスモン酸経路が細菌による根毛誘導に関与することが示唆された。今後は、生化学的な手法で根毛誘導因子の同定を目指し、ジャスモン酸シグナル経路との関連性を解析していく。

#### < 引用文献 >

- Shinohara et al. (2011) Microbial mineralization of organic nitrogen into nitrate to allow the use of organic fertilizer in hydroponics, *Soil Sci Plant Nutr*, 57:190-203  
Salazar-Henao et al. (2016) The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis, *Development*, 143:1848-1858  
Roland and Beutler (2010) Plant and animal sensors of conserved microbial signatures, *Science*, 330:1061-1064  
Thines et al. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signaling, *Nature*, 448:661-666  
Huang et al. (2017) Jasmonate action in plant growth and development, *J Exp Bot*, 68:1349-1359

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

飯田 祐一郎、藤原 和樹、染谷 信孝、篠原 信、Draft genome sequence of *Rhizobium* sp. strain TBD-182, an antagonist of the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, isolated from a novel hydroponics system using organic fertilizer, *Genome announcement*, vol.5, No.11, 2017, e00007-17 ( 査読有 )  
DOI:10.1128/genomeA.00007-17

##### [ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

ミーブン ジャムジャン、篠原 信、藤原 和樹、宮本 憲二、加藤 康夫、安藤 晃規、小川 順、Artificial creation of disease suppressive soil by using media immobilized with the microbial ecosystem. 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

ミーブン ジャムジャン、篠原 信、藤原 和樹、宮本 憲二、加藤 康夫、安藤 晃規、小川 順、Development of disease suppressive soil by using synthetic medium immobilized microbes. 平成 31 年度日本植物病理学会大会、2019

篠原 信、安藤 晃規、小川 順、宮本 憲二、加藤 康夫、土壌微生物を「デザイン」する・・・植物生長を最大化する基盤技術の登場、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

篠原 信、土壌をゼロからデザインする～有機質肥料活用型養液栽培から派生した新技術～、日本生物工学会 2018 年度大会、2018

篠原 信、吉田 賢啓、岡田 若子、宇佐美 晶子、サクンタラ サイジャイ、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、小川 順、高野 雅夫、エレメンタル土壌微生物接種による非土壌媒体の土壌化、平成 30 年度日本農芸化学会大会、2018

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤原 和樹

ローマ字氏名：FUJIWARA, kazuki

所属研究機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：九州沖縄農業研究センター

職名：研究員

研究者番号(8桁)：40725008

研究分担者氏名：篠原 信

ローマ字氏名：SHINOHARA, makoto

所属研究機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：野菜花き研究部門

職名：上級研究員

研究者番号(8桁)：90326075

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。