

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26450487

研究課題名（和文）植物の低酸素領域における窒素固定エンドファイトの生態と機能発現に関する研究

研究課題名（英文）The diversity and function of nitrogen-fixing endophyte in low-oxygen regions in plants

研究代表者

大脇 良成（OHWAKI, Yoshinari）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター 土壤肥料研究領域・グループ長

研究者番号：60355542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）： サツマイモの組織内における酸素濃度の分布を調査するとともに、植物体内に感染する窒素固定細菌（エンドファイト）を分離し、その特性を明らかにした。サツマイモでは、地上部器官においても組織内部に酸素濃度の低い領域が存在することが明らかになった。また、サツマイモには、酸素濃度の低い条件で窒素固定を行う多様なエンドファイトが感染していることから、植物体内の低酸素領域でこれらのエンドファイトが窒素固定を行う可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）： This study explored the presence of low-oxygen regions in plants in view of the possible site for the endophytic nitrogen fixation. We isolated phylogenetically diverse endophytes that can fix nitrogen under low oxygen condition from field-grown sweet potatoes. We found that the sweet potato possesses low-oxygen regions in the center of stems, which may serve an appropriate condition for biological nitrogen fixation.

研究分野： 土壤肥料学

キーワード： エンドファイト 窒素固定

## 1. 研究開始当初の背景

植物体内には、さまざまな菌が感染しており、感染による病徴を示さない菌はエンドファイトと呼ばれる。これらのエンドファイトの中には、植物の生育促進や病害抵抗性の向上など、有用な形質を持つものが知られている。また、これまで空中窒素を固定する能力を持つエンドファイトが分離され、微生物学的な特性の解析が進められている<sup>1)</sup>。これらの窒素固定エンドファイトの利用により、化学肥料を削減した環境調和型の農業技術の開発が期待されている。

研究代表者らは、圃場においてサツマイモの全窒素集積量の最大 40%程度が窒素固定由来である可能性を示した<sup>2)</sup>。また、圃場のサツマイモには、多様な窒素固定エンドファイトが感染していることを、植物体内から窒素固定遺伝子を直接検出する手法により明らかにし<sup>3)</sup>、さらにサツマイモの茎でエンドファイトが窒素固定活性を発現することを報告した<sup>4)</sup>。

エンドファイトは強い宿主特異性を持たず、さまざまな作物に感染する。一方、植物体内で高い窒素固定活性が確認されているのは、サツマイモやサトウキビなどの限られた作物のみである。このことは、これらの作物に窒素固定菌の定着や窒素固定活性の発現に好適な環境が存在することを示唆している。今後、窒素固定エンドファイトを幅広い作物で利用するためには、窒素固定に適した植物体内の環境と、そこに適応する窒素固定細菌の性質を明らかにすることが必要である。

## 2. 研究の目的

窒素固定酵素であるニトロゲナーゼは、酸素に対する感受性が高いため、窒素固定活性の発現には低酸素条件が必要である。活発に窒素固定を行うマメ科植物の根粒中では、酸素濃度が低く保たれており、窒素固定活性の発現に適した環境が形成されている。一方、エンドファイトが感染する植物の細胞間隙や通導管付近には、窒素固定活性の発現に適した環境が存在するのか、不明であった。そこで、これまで窒素固定の高い寄与が推定されているサツマイモ体内において、窒素固定活性の発現に適した低酸素領域を探索するとともに、サツマイモに感染する窒素固定エンドファイトの特性を調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織内酸素濃度の測定

圃場で生育したサツマイモより茎を採取し、組織内の酸素濃度の測定に供した。酸素濃度は、微小酸素電極 (OX-N, Unisense 社) を電流計 (PA-2000, Unisense 社) に接続し、茎表面より内部方向に微小電極を挿入し測定した。

### (2) 窒素固定菌の分離と系統解析

圃場のサツマイモより茎、葉柄、根および塊根を採取し、表面殺菌した後磨砕し、半流動培地に接種した(図1)。一定期間培養後、気相の一部をアセチレンに置換し、窒素固定能の指標であるアセチレン還元活性を、ガスクロマトグラフを用いて測定した。アセチレン還元活性が認められたサンプルからは、好気的および嫌気的条件下で菌の純粋分離を行った。純化した菌株は、再度半流動培地を用いてアセチレン還元活性を測定し、窒素固定能を持つ菌株を選抜した。

分離した窒素固定菌から DNA を抽出し、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子断片は精製後、部分塩基配列を決定し分子系統樹を作成した。また、一部の菌株については、窒素固定遺伝子 (*nifH*) を増幅し塩基配列を決定した。



図1 半流動培地を用いた窒素固定エンドファイトの培養

## 4. 研究成果

### (1) サツマイモ組織内の酸素濃度

微小酸素電極を用いて組織内部の酸素濃度を測定したところ、圃場で生育したサツマイモの茎では、表皮の直下から酸素濃度が低下し、茎の中心付近には低酸素の領域があることが明らかになった(データ省略)。このことから、サツマイモ体内にはエンドファイトの窒素固定活性の発現に適した低酸素領域が存在するものと考えられた。

### (2) サツマイモに感染する窒素固定エンドファイトの特性

表面殺菌をしたサツマイモの茎、葉柄、根および塊根の抽出液を、半流動培地を用いて酸素濃度勾配を形成し培養したところ、どの植物部位からもアセチレン還元活性を示すサンプルが得られた。これらのサンプルは、異なる位置にペリクルの形成が見られたことから、窒素固定活性の発現に適した酸素濃度が異なる菌が感染している可能性が考えられた。

アセチレン還元活性の認められたサンプルから、好気的条件下および嫌気的条件下で菌の分離を行い、コロニー形態や生育特性が異なる多数の菌株を得た。16S rRNA の部分塩基配列による分子系統解析の結果、組織内部に低酸素部位を持つサツマイモ体内には、酸素濃度の低い条件下で窒素固定活性を示す、多様な

属の細菌が感染していることが明らかになった。(図2)また、塊根とそれ以外の部位では、感染する窒素固定菌の種類が大きく異なることも明らかになった。地上部と地下部に感染する菌では、窒素固定活性が発現する培地の炭素源が異なる傾向にあることから、サツマイモの器官における窒素固定菌の分布は、組織から供給される炭素源の組成と関連がある可能性が考えられた。今後は、これらの菌の接種試験等により、植物体内における窒素固定の発現機構の解析を進める予定である。

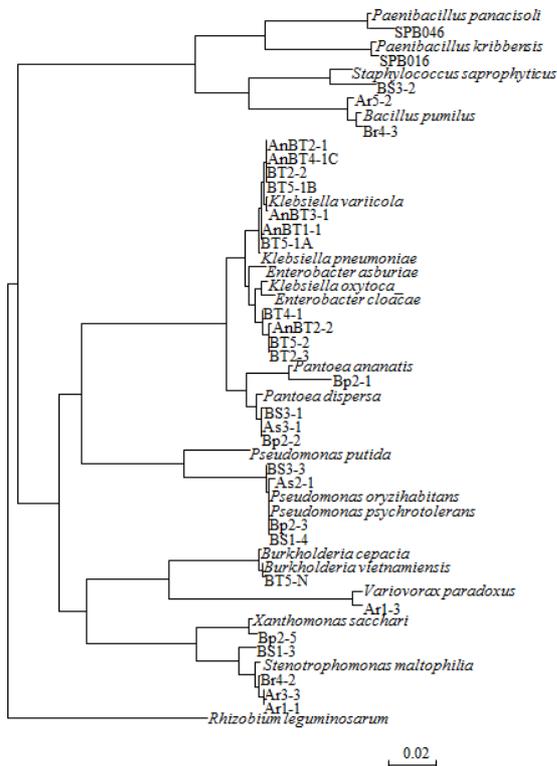


図2 サツマイモより分離した窒素固定エンドファイトの系統解析

従来まで、植物体内における低酸素部位は、湛水条件の根の内部や発芽種子、肥大中の塊根内部など特殊な条件に限定されると考えられていた<sup>5)</sup>。しかし本研究により、サツマイモでは通常の栽培条件においても、組織内部に窒素固定活性の発現に適した低酸素領域が存在することが示された。また、サツマイモ体内には、低酸素条件で窒素固定活性を示す多数のエンドファイトが存在することから、これらの低酸素領域で窒素固定活性が発現する可能性が示唆された。

今後、植物体内における低酸素領域の分布や形成要因が明らかになることで、エンドファイトの生態や機能に関する研究が進展するものと期待される。

## 引用文献

- 1) 安藤象太郎ほか (2005): 化学と生物 43, 788-794
- 2) 大脇良成、藤原伸介(2002): 農業技術 57, 399-403
- 3) Terakado-Tonooka J et al. (2008): Microbes Environ., 23, 89-93
- 4) Terakado-Tonooka J et al. (2013): Plant Soil, 367, 639-650
- 5) Geigenberger P (2003): Current Opinion Plant Biol., 6, 247-256

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

塔野岡(寺門)純子、鈴木章弘、田中福代、蔵之内 利和、大脇良成. 窒素固定エンドファイト(*Bradyrhizobium* sp. AT1)の接種がサツマイモの収量に及ぼす影響 日本土壤肥料学会. 2016.9.21 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

Ohwaki Y, Terakado-Tonooka J, Okazaki K, Tanaka F. The diversity of nitrogen-fixing endophyte in association with the roots and shoots of rice and sweet potatoes. 16th International Symposium on Microbial Ecology. 2016.8.23 Montreal (Canada)

塔野岡(寺門)純子、鈴木章弘、田中福代、大脇良成. サツマイモへの窒素固定エンドファイト(*Bradyrhizobium* sp. AT1)の接種効果. 日本土壤肥料学会. 2015.9.9 京都大学(京都府・左京区)

塔野岡(寺門)純子、鈴木章弘、田中福代、大脇良成. 圃場条件下におけるサツマイモへの窒素固定エンドファイトの接種効果. 環境微生物系学会合同大会. 2014.10.23 アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

塔野岡(寺門)純子、鈴木章弘、田中福代、大脇良成. サツマイモ品種における窒素固定エンドファイト(*Bradyrhizobium* sp. AT1)の接種効果について. 植物微生物研究会. 2014.9.20 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

大脇良成、塔野岡(寺門)純子. 抗生物質耐性株を用いたサツマイモへのエンドファイト接種効果の解析. 日本土壤肥料学会. 2014.9.9 東京農工大学(東京都・小金井市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大脇 良成 (OWAKI, Yoshinari)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター 土壤肥料研究領域・グループ長

研究者番号：60355542

(2)研究分担者

塔野岡 純子 (TONOOKA, Junko)

佐賀大学・農学部・特定研究員

研究者番号：00713314

(3)連携研究者

岡崎 圭毅 (OKAZAKI, Keiki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研

究機構・中央農業研究センター 土壌肥料研

究領域・主任研究員

研究者番号：40414750