

令和元年5月31日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08147

研究課題名(和文) 共生窒素固定根粒着生イネ作成の試み

研究課題名(英文) An attempt to form nitrogen-fixing symbiotic nodules on rice roots

研究代表者

畑 信吾 (HATA, SHINGO)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：40238001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、適切な形質転換イネの根にクサネム根粒菌を接種することにより、共生窒素固定根粒を形成させることを目標とした。まず、クサネム *Aeschynomene indica* 根粒から根粒菌を選抜する過程において、*Ralstonia* 属の新種を偶然発見した。さらに選抜を繰り返した結果、真の根粒菌 *Bradyrhizobium* 2系統を単離できた。一方、ダイズのレグヘモグロビンプロモーターの下流にレグヘモグロビン cDNA やタンパク質リン酸化酵素 (CCaMK) 遺伝子を繋いだ融合遺伝子をそれぞれ形質転換ベクターに組み入れ、アグロバクテリウムに導入した。それゆえ当初の計画どおり形質転換イネを作成する道が開かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たち人類は年間1億トン以上の窒素肥料を化学合成して作物収量を確保し人口を養っているが、肥料の多投は環境に悪影響があるほか、その合成には世界の全エネルギー消費の2% (天然ガス消費の5%) が費やされている。イネ科の主要穀類に共生窒素固定根粒を着生させて窒素肥料使用量を節減できれば、世界の経済や環境に限りなくよい影響をおよぼすと考えられる。本研究は、遂行上いくつもの予期せぬ問題が生じたため現時点では道半ばであるが、ようやく当初の計画にそって進む見通しが立ったところである。

研究成果の概要(英文)：The current project aims to form symbiotic nitrogen-fixing nodules on roots of specially transformed rice plants, inoculating *Bradyrhizobium* sp. that also forms nodules on *Aeschynomene* roots. During a trial to isolate *Bradyrhizobium* sp. from *Aeschynomene indica* root nodules, I found a new species of the genus *Ralstonia*, unexpectedly as a co-existing bacterium in *A. indica* root nodules. After more careful selection, I isolated two strains of *Bradyrhizobium* sp. and labeled them with fluorescent proteins. Additionally, I prepared constructs that express a soybean leghemoglobin cDNA and a constitutively active CCaMK under the control of leghemoglobin promoters. As a preliminary experiment, I transformed rice calli with another construct that expresses GFP reporter under maize ubiquitin promoter, getting a transformed rice plant with fluorescence. Therefore, it would be feasible to prepare rice transformants and promote the project in near future.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：生物間相互作用 植物微生物共生 形質転換イネ クサネム根粒菌

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

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物の共生窒素固定根粒形成機構の分子細胞生物学的解析が進展し、その知見をもとにイネ科の主要穀物に窒素固定能を付与しようという機運が世界的に高まってきた。その中であって研究担当者は、レグヘモグロビン発現能と構成的サイトカニンシグナルを併せもつ形質転換イネに強感染性のクサネム根粒菌を接種すれば窒素固定根粒が形成される可能性が高い、という独自の着想を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的は、イネにダイズのレグヘモグロビン遺伝子とレグヘモグロビンプロモーター：構成的サイトカニンシグナル伝達融合遺伝子を導入し、クサネム根粒菌を二重形質転換イネの根細胞の間に侵入させて、窒素固定能を有する根粒を形成させることである。究極的には、本研究を端緒として、イネ科主要穀類に窒素固定根粒を着生させる道を拓きたい。

3. 研究の方法

担当者が採取したクサネムとおぼしき植物からゲノミック DNA を抽出し、核のリボソーム DNA ITS/5.8S 領域ならびに葉緑体 DNA の *trnL* イントロン領域の配列を解析することにより、植物の属・種を同定した。その根粒を表面殺菌して乳鉢乳棒で破碎し、Arabinose-Gluconate 寒天培地において根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. や共存菌 *Ralstonia* sp. を単離した。菌の同定は、16S リボソーム RNA 遺伝子の配列を解析することにより行なった。また、菌の蛍光標識のためには、*pGroEL4* プロモーターと *sGFP* もしくは *dsRED* との融合遺伝子を組み入れた mini-Tn5 を接合により導入した。

ダイズ (*Glycine max* L., 品種フクユタカ) のゲノミック DNA から 2 種類のレグヘモグロビンプロモーターを PCR で増幅した。また、ダイズ根粒 RNA からレグヘモグロビン cDNA とカルシウム・カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CCaMK) のキナーゼドメインのみを RT-PCR で増幅した。それらを繋いだ融合遺伝子 U4 および M12 (図 1) を、Gateway 法を用いてイネ形質転換用ベクター pGWB204 にそれぞれ組み入れ、Freeze-Thaw 法を用いてアグロバクテリウム EHA105 株に導入した。一方、トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に *sGFP* レポーター遺伝子を繋いだ融合遺伝子 K1 (図 1) を組み込んだ pGWB204 を有するアグロバクテリウムを用いて、常法 (Toki, S. et al. (2006) Plant J. 47(6): 969-976) にしたがってイネ (*Oryza sativa* L., 品種ニッポンパレ) の胚盤由来カルスを形質転換し、再生植物体を得た。

イネ形質転換用コンストラクト

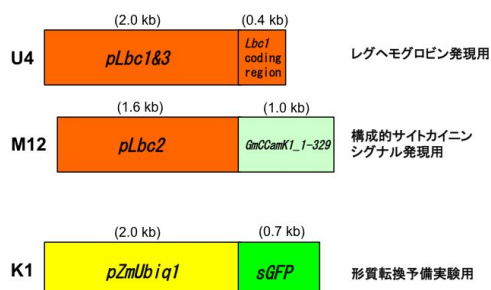


図 1

4. 研究成果

クサネム属は世界中で 160-180 種が知られている (Chaintreuil C. et al. (2013) New Phytol. 200(4): 1247-1259) が、研究担当者らが兵庫県篠山市ならびに三重県上野市で採取したクサネムは、予想どおり *Aeschynomene indica* であることがリボソーム DNA ITS 配列により明確に示された (図 2)。葉緑体 *trnL* 配列の結果も、この結論と矛盾なかった (図 2)。次に、クサネム根粒内の細菌を調べる過程において (図 3) おそらく根粒内に共存する *Ralstonia* sp. SET104 株を単離し、それが *Ralstonia* 属の新種であることを偶然発見した (図 4)。そのあと、さらに慎重に選抜を繰り返した結果、104B と 105B と名付けた *Bradyrhizobium* sp. の 2 系統を単離し、菌体の蛍光標識にも成功した (図 5)。また、蛍光標識した根粒菌を接種することにより、無窒素培地におけるクサネム生育促進を確認した (図 6)。イネ根に強く感染するクサネム根粒菌を選抜する試みは、現在も続行中である。

クサネムは *A. indica* と同定された

ITSの塩基配列の系統樹

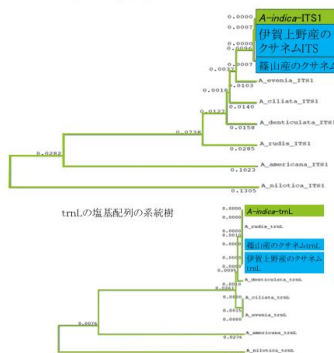


図2

クサネム根粒から *Ralstonia* sp. SET104 と *Bradyrhizobium* sp. 104B および 105B を単離

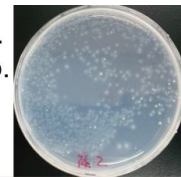


図3

SET104は *Ralstonia* 属の新種である

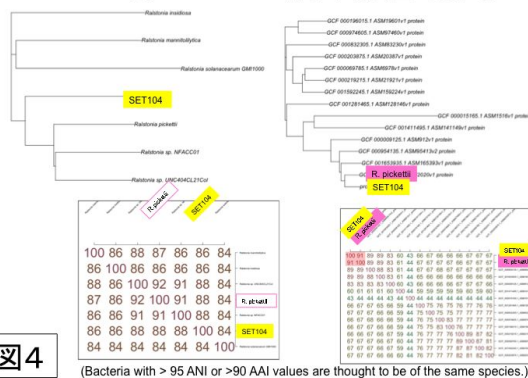


図4

(Bacteria with > 95 ANI or >90 AAI values are thought to be of the same species.)

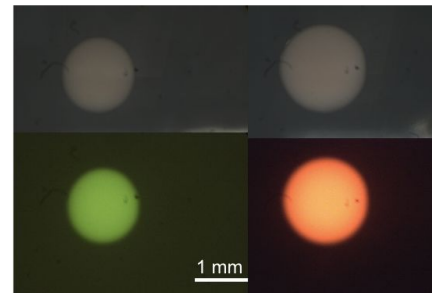
Bradyrhizobium sp. 104B株のコロニー

明視野

蛍光

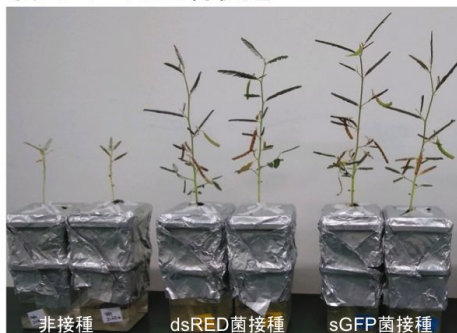
図5

sGFP標識 dsRED標識



無窒素培地における *Bradyrhizobium* sp. 104B 株によるクサネムの生育促進

図6



ダイズのレグヘモグロビンプロモーターの下流にレグヘモグロビン cDNA や CCaMK 遺伝子を繋いだ融合遺伝子 (U4 と M12)、トウモロコシユビキチンプロモーターの下流に sGFP レポーターを繋いだ融合遺伝子 (K1) をそれぞれ pGWB204 ベクターに組み入れた

コンストラクトを作成した(図1)。これらがアグロバクテリウム EHA105 株に導入されたことは、コロニーPCRで確認した(図7)。K1 遺伝子によって GFP 蛍光を発する形質転換イネが1個体得られたが、pGWB204 空ベクターを導入した2個体とは対照的に、鉢上げ後に枯死した(図8)。おそらく過剰に蓄積した sGFP タンパク質がいくばくかの毒性を発揮したものと思われる。しかしこの結果により、近い将来 U4 や M12 を導入した形質転換イネを交配して二重形質転換体を得、当初の計画どおりクサネム根粒菌を接種する道が開かれたと考える。

イネ形質転換用ベクターのアグロバクテリウムへの導入

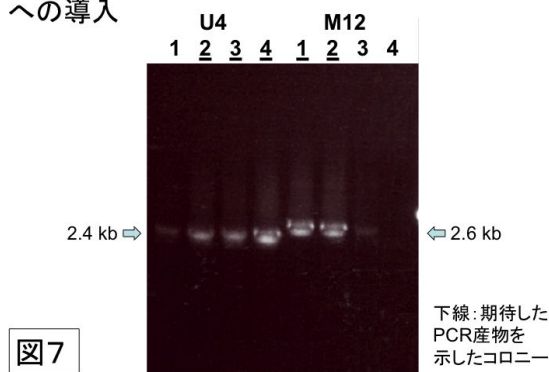


図7

sGFP標識イネ作成とその生育

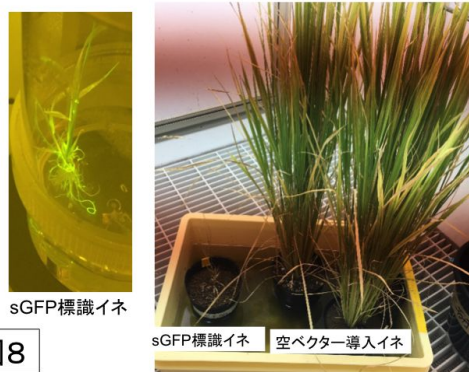


図8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Tanaka, A., Suzuki, T., Uesaka, K., Hata, S. Draft Genome Sequence of *Ralstonia* sp. Strain SET104 Isolated from Root Nodules of *Aeschynomene indica*. Microbiol. Resour. Announc. 査読有、2019 Jan 10;8(2). pii: e01441-18. doi: 10.1128/MRA.01441-18.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 畑 信吾, 玉井鉄宗, 鈴木孝征, 田中愛子「新規な プロテオバクテリア *Ralstonia* sp. によるクサネム根粒形成について」植物微生物研究会第 28 回研究交流会、2018 年 9 月 19-21 日、鳥取大学
- (2) 畑 信吾, 河内 宏「クサネム根粒菌の蛍光標識とその応用について」植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月 20-22 日、京都大学宇治おうばくプラザ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。