

主 論 文 の 要 約

論文題目 : Interaction of N₂-fixing endophyte *Burkholderia vietnamiensis* RS1 and rice (*Oryza sativa* L.) in plant growth promotion

(窒素固定エンドファイト *Burkholderia vietnamiensis* RS1 とイネ (*Oryza sativa* L.) の植物生育促進における相互作用)

氏 名 : 新庄莉奈 (シンジョウ リナ)

窒素 (N) は作物生産に必須の栄養素であり、現在世界の農業は N 肥料に大きく依存している。N 肥料は植物の生育に大きく貢献する一方、硝酸塩の流出、亜酸化窒素やアンモニアの放出などの要因にもなることから環境への悪影響の増大が懸念されている。このような背景から N 肥料の削減と生産性の向上を実現する持続可能な作物生産が求められている。本研究では植物への持続可能な N 供給の手段として“植物-細菌”相互作用の利用に着目した。植物体内に生息する内生細菌 (エンドファイト) や根圏に生息する多様な細菌が協調的に植物生育を促進することが報告されており、これらは植物生長促進細菌 (Plant growth promoting bacteria, PGPB) と総称される。PGPB は大気 N₂ をアンモニアに還元する窒素固定能や植物ホルモン生産による根の形態変化など複合的な作用により植物の養分獲得を促進していると考えられるが、その機能は依然として不明が多い。これらの細菌を作物生産の場で利用し安定した効果を得るには生長促進の背景にある分子メカニズムの解明が重要である。

本研究では、主要穀物であるイネの生育、特に N 獲得を促進する新規エンドファイトを単離し、その背景にあるメカニズムの解明を目指した。そのためにまず植物体内から内生細菌を単離し、単離菌株群から N₂ 固定能を持つ菌株 (*Burkholderia vietnamiensis* RS1 株) を選抜した (第 2 章)。この *B. vietnamiensis* RS1 株についてイネ生育を促進する傾向が見られたことから、そのイネ生育や N 獲得に対する効果を生理学的・分子遺伝学的手法を用いて詳細に検証するとともに (第 3 章)、RS1 株の変異株群を作出し、イネとの相互作用に関わる形質を明らかにすることでイネ生育促進や N 獲得促進のメカニズム解明を目指した (第 4 章)。

第 2 章では、N₂ 固定の寄与が大きいと報告例のあるサツマイモから内生細菌の単離を行い、そのゲノム・生理的特徴を明らかにするとともに圃場におけるイネ生育に対する効果について検証した。サツマイモの茎や塊根から単離した細菌株のうち、N₂ 固定に必須のニトロゲナーゼ還元酵素をコードする遺伝子 (*nifH*) を有する 1 菌株を選抜し、これを RS1 株とした。RS1 株の全ゲノムの Average Nucleotide Identity (ANI) 値が *B. vietnamiensis* LMG10929 株 (Gillis et al., 1995) と 95% 以上の一致を示したため RS1 株は *B. vietnamiensis* であると同定された。またゲノム解析から RS1 株は窒素固定に加えて植物ホルモンの産生や制御に関与する遺伝子やシデロフォア産生遺

伝子など PGPB としての形質に関わる複数の遺伝子を有することが明らかとなった。この RS1 株の *in vitro* での N₂ 固定能についてアセチレン還元活性を測定し調べたところ、通常 N₂ 固定反応は酸素により抑制されるが、RS1 株では酸素 5% などの比較的高い酸素条件下でも高い活性を示し、また RS1 株は外部の酸素濃度が高くなるにつれて培養液が固化する性質を持つことが明らかになった。これらから RS1 株は酸素に応答して細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substances, EPS) を分泌することで細胞を酸素から防御し、N₂ 固定活性を維持している可能性が考えられた。水田圃場でイネ苗への接種による生育に対する RS1 株の効果を調査した結果、移植後 79 日 (穂揃い期) のイネ根において RS1 の定着が確認され、また移植後 93 日 (登熟期) において RS1 株を接種により地上部や地下部の乾物重が増加していた。これらの結果から RS1 株は、圃場に移植後もイネの根に定着しイネの生育を促進することが示唆された。

第 3 章では、RS1 株を接種したイネについて生長解析やホルモノーム解析、さらに RNA-seq を行うことで RS1 株に対するイネの生理学的・分子遺伝学的応答を明らかにした。まず RS1 株の定着箇所を明らかにするために、蛍光タンパク質 DsRed を導入した RS1 株を作出しイネに接種したところ、根の表面や表皮細胞や皮層細胞付近の細胞間隙における RS1 株が明らかになった。またこの時 RS1 株が根の表面にバイオフィルムを形成し張り付いている様子も確認され、根への接着にも EPS を利用している可能性が示された。次に土壌の N レベルを 2 段階 (低 N 区、高 N 区) 設け、RS1 株のイネに対する効果を検証した。播種 42 日後、特に高 N 区において RS1 株によって地上部乾物重が 32 % 増加しさらに N 含有量で 31 % 増加した。そこで RS1 株による N 獲得促進のメカニズムとして (1) N₂ 固定 (2) 根の形態変化による養分吸収促進 (3) 単位根長あたりの N 吸収を促進、を想定し解析を進めた。まず N₂ 固定の効果を推定するため RS1 株を接種したイネ根のアセチレン還元活性を測定した結果、いずれの N 区においても接種による変化はなく、そのため N₂ 固定は生育促進の主要因でないことが示唆された。総根長には接種による変化はなかったが、直径 600 μ m 以上の比較的大い根の根長の増加が両 N 区において確認され、根系形態が変化していることが示唆された。次に播種後 21 日から 42 日までの生長解析の結果、高 N 区では RS1 株の接種により相対生長速度および純光合成速度、N 吸収速度が有意に増加していたことから RS1 株によるバイオマスの増加は主に根からの N 吸収速度が増加し光合成が促進されたことによると示された。RS1 株を接種したイネ根における RNA-seq の結果から、RS1 株を接種することでアミノ酸の輸送、そして硝酸態 N トランスポーター (*OsNRT1.2*, *OsNRT1.1B*) の発現が上昇していることが明らかになった。従って上述の仮説のうち RS1 株は主に (3) 単位根長あたりの N 吸収を促進しイネの N 獲得を促進していると考えられ、特に硝酸態 N の輸送促進が重要であると考えられた。また、RS1 株を接種したイネ根では比較的大い根の根長も有意に増加しており、Indole-3-acetic acid (IAA) とその代謝物 (IAAsp) の総濃度が接種によって有意に増加していたことから、RS1 株の接種は植物ホルモンの制御を介した根の形態変化もも

たらしことが示唆された。

第 4 章では、RS1 株の EPS 分泌特性に着目しそのイネとの相互作用における機能を検証するとともに、RS1 株の硝酸吸収促進についてより定量的に明らかにした。RS1 株ゲノム内へのトランスポゾンベクターのランダムな挿入により 960 の変異株を作出し、その中から EPS の生産性を欠く変異体を選抜しこれを *B. vietnamiensis* 708 株（以下 708 株）とした。708 株ではタンパク質のジスルフィド結合に関わる *dsbD* 遺伝子にトランスポゾン配列が挿入されており、大気酸素濃度下での培養液の固化程度と ARA 活性、N₂ 固定関連遺伝子（*nifH*, *nifD*, *nifK*）の発現が著しく減少していた。このことから RS1 株の分泌する EPS は N 固定を行う際、酸素に対する物理的なバリアとして機能している可能性が考えられた。次に 708 株についてイネ生育における影響を検証した結果、708 株では RS1 株に比べて地上部と根、特に根の生育促進の程度が有意に減少したことから、EPS 生産能が生育促進にも関与している可能性が示された。イネ根における菌の定着について RS1 株と 708 株で比較した結果、708 株を接種した根を表面殺菌すると根から分離される 708 株の菌数が RS1 株を接種した場合より少ない傾向にあった。この結果から 708 株ではイネの根に強く接着、もしくは内部への侵入能力が低下している可能性が考えられた。第 3 章において示唆された RS1 株が硝酸態 N の吸収促進をより定量的に明らかにするため、窒素の安定同位体 ¹⁵N を含む硝酸アンモニウム（¹⁵NH₄NO₃, NH₄¹⁵NO₃）を用いて硝酸、アンモニアそれぞれの吸収量を非接種、RS1 株接種、708 株接種のイネで比較検証した。その結果、RS1 株を接種したイネでは硝酸態 N の吸収促進の程度が有意に増加した。一方非接種及び 708 株を接種したイネではそのような増加は見られなかった。またアンモニア態 N の吸収はいずれの区においても差はなかった。したがって RS1 株の接種はイネ根による土壌からの硝酸態 N の吸収を促進すること、またイネ内への侵入や N 吸収促進に RS1 の分泌する EPS が関与していることが示唆された。

本研究では、*B. vietnamiensis* RS1 株が硝酸吸収を促進することでイネの N 蓄積やバイオマス増加をもたらすこと、さらにその背景にはイネ根への定着に EPS が関与する可能性を示した。PGPB が接種によって直接的に硝酸態 N 吸収を促進したことを示す例は限られており、本研究によって得られた結果は PGPB が硝酸吸収促進を介して植物のバイオマス増加をもたらす新たな道筋を示すものである。湛水条件で栽培されるイネはアンモニアを優先的に吸収するが硝酸も吸収することが報告されており、また硝酸とアンモニアを同時に供与することによってアンモニアを単独で与えた場合に比べてイネ生育が増加することも知られる。今後 RS1 株によって吸収促進された硝酸態 N の植物体内での動態や機能、さらに EPS の関与をより詳細に明らかにすることで農地における植物生長促進細菌の安定的な利用さらには N 肥料の節減につながると期待される。