

研 究 報 告 書

「土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムの分子基盤解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 井上 晴彦

1. 研究のねらい

鉄は土壌中に豊富に存在するが、中性からアルカリ性の条件下で沈殿しやすく、植物は鉄吸収できないので、収量低下などの農業上の問題になっている。土壌中には植物の病原体が存在する一方、有益な微生物が存在することが知られている。特に、植物の生育を促進する細菌は Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) と呼ばれ、有用な生物農業資材として注目されている。

そこで、病原性細菌は宿主に感染するために進化を遂げる一方、PGPB は極限環境下では宿主を救出するための進化を遂げるのではないかと仮説を立てた。これを検証するために研究経験のある極限環境に鉄欠乏を選び、この研究の礎となるアルカリ土壌を探した。イタリアの Adamo D. Ramobora 教授の実験農場では、低生産性のアルカリ土壌において、有機農法を利用して驚くべき高収量のブドウの生産に成功していた。この様な土壌に鉄欠乏条件下で植物の生育を促進するような有用細菌が存在すると考えた。

まず、この土壌を用いてシロイヌナズナを栽培し、根に寄生する約 1,000 の細菌を限界希釈培養法により単離した。これと並行して、高 pH では不溶性となる鉄の性質を利用した新規の植物鉄欠乏アッセイ系を開発した。この鉄欠乏 MS 培地に上述の単離細菌を各々混合し、植物を鉄欠乏から回復させる細菌のスクリーニングを行った結果、60 の細菌がその能力を持つことを突き止めた。この内のバクテリア#237(PGPB237)は、*Shingobacterium* に属する新規の細菌で、特に高い鉄欠乏回復活性を持っていた。

PGPB237 による鉄欠乏回復機構を詳細に解析するために、鉄移行に関わるシロイヌナズナの種々の遺伝子欠損株を用いて、PGPB237 による鉄欠乏回復実験を行ったところ、鉄のトランスポーターである *Yellow stripe1-like (ysl1)* の変異株において、この回復効果が喪失することを見いだした。AtYSL1 は、トウモロコシの根からの鉄吸収に必須である YS1 と最も相同性が高く、葉と根で発現して鉄・ニコチアナミン錯体の輸送することが報告されている。一方、ニコチアナミンは根圏に分泌されないことから、AtYSL1 は根の表皮において、未知のキレート鉄錯体を取り込むことが強く示唆された。

本研究では、上記の仮説を植物および微生物の遺伝学と分子生物学的手法を用いて検証し、PGPB による植物の鉄欠乏回復の分子機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、土壌細菌による鉄欠乏植物を救出するメカニズムを明らかにすることに取り組んだ。この現象を、分子レベルで明らかにするために、シロイヌナズナの鉄代謝に関わる変異体を使った遺伝学的及び生化学・分子生物学のアプローチを採用した。本研究により、

植物の鉄欠乏を感知して、有用バクテリアが植物に鉄を供給するために、植物が吸収可能なシデロフォアを供給することが明らかになった。さらに、単子葉植物のイネにおいても、有用バクテリアを用いた救出機能は保存されており、植物種を超えた一般性を持つことが示唆された。

(i) 鉄欠乏救出 PGPB の分子基盤解明

本研究によって、バクテリア群は植物を鉄欠乏救出する方法を、数種持つことが明らかになった。本研究開始当初、鉄欠乏時にシロイヌナズナの根から浸出するクマリンに着目して研究を行った。研究の結果、クマリン生合成経路の代謝物を加えることで、植物を鉄欠乏から回復することが明らかになった。これに加えてバクテリアが放出するキレート物質が関与することを明らかにした。このキレート物質はバクテリア特異的物質であり、鉄欠乏植物存在下のみで放出される。土壌中で鉄とキレートして錯体を形成し、植物の特異的トランスポーターである AtYSL1 によって吸収されることが分かった。さらに、AtYSL1 は鉄欠乏状態の植物において、バクテリア存在下でのみ強く誘導される。

(ii) 鉄欠乏救出 PGPB の宿主植物普遍性の検証

鉄欠乏シロイヌナズナは、有用バクテリアにより救出されることが明らかになっている。そこで、この現象の植物種普遍性が存在するかを検証するために、この PGPB を用いて、鉄欠乏イネを救出できるか否かを調査した。実験条件を最適化すると、草丈、クロロフィル含量共に優位に違いが見られ、有用バクテリアを含む培地でイネの生育が改善された。このことから、有用バクテリアは、双子葉植物だけではなく単子葉植物のイネも鉄欠乏条件下での生育を改善させ、植物種に依存しない一般性を有する鉄欠乏救出活性を持つことが明らかになった。

(2) 詳細

研究テーマ A「鉄欠乏救出 PGPB の分子基盤解明」

本研究によって、バクテリア群は植物を鉄欠乏から救出する方法を数種持つことが、様々な有用バクテリアを異なる鉄輸送変異株を用いてアッセイすることで明らかになってきた。本研究開始当初、鉄欠乏時にシロイヌナズナの根から浸出するクマリンに着目して研究を行った。研究の結果、クマリンの生合成経路の下流の化合物であるフラクセチンを加えることで、植物を鉄欠乏から回復させ得ることが明らかになった。

これに加えてバクテリアが放出するキレート物質であるピロロキノリンキノン(PQQ)が関与することが明らかになった。PQQ は 1979 年に NAD、FAD に次いで、3 番目の補酵素として、微生物から発見された。その後、各種微生物の代謝においてメタノール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素などの酸化還元反応に重要な役割を果たしていることが次々に明らかとなった。この PQQ はバクテリア特異的物質であり、このキレート物質

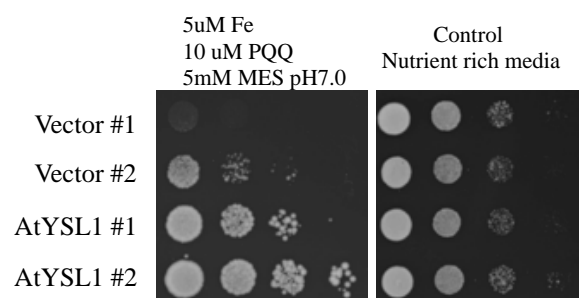


図1 AtYSL1はFe-PQQ錯体を輸送する

は鉄欠乏植物存在下のみで放出されるされることが MS 解析によって明らかになった。これによって、鉄欠乏条件で鉄とキレートして錯体を形成して可溶化する。この錯体を用いて、野生型と *ys1* 変異株で鉄欠乏救出アッセイを行うと、野生型は救出されるが変異型は回復しなかった。さらに、Fe-PQQ 錯体を用いて、シロイヌナズナの特異的トランスポーターである AtYSL1 の吸収アッセイを、酵母とアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて行ったところ、AtYSL1 が輸送タンパク質で有ることが明らかになった。加えて、AtYSL1 は鉄欠乏状態の植物において、バクテリア存在下でのみ遺伝子発現が強く誘導された。

これらのことは、植物がバクテリアに反応してトランスポーター遺伝子の発現を誘導し、他方バクテリアが植物に呼応して PQQ の産生・分泌を促すという、協調的な相互作用を行っていることを意味する。換言すると、鉄欠乏条件下における鉄のやり取りによって、植物は自身の生育を、有用バクテリアは植物の根に広く多く寄生できるという、互恵関係を結んでいると考えられる。1980 年代初頭に盛んに研究された結果に基づき、バクテリアを介した植物の鉄獲得機構である Strategy-III が提唱されている。本研究によって鉄欠乏時のバクテリアが放出するキレート物質と、植物のトランスポーター遺伝子の単離は上記の仮説を裏付ける結果となった。

一方、PGPB237 に変異を導入して、鉄欠乏植物を救出できない変異バクテリア株を単離する実験については、大きな前進が見られなかったのは残念である。大規模スクリーンによる鉄欠乏アッセイが、技術的理由により実施できなかったのが大きな要因の一つである。しかし、今後の研究の展開として、機能変異を起こしたバクテリアを研究に供試することは、極めて重要であると考えている。

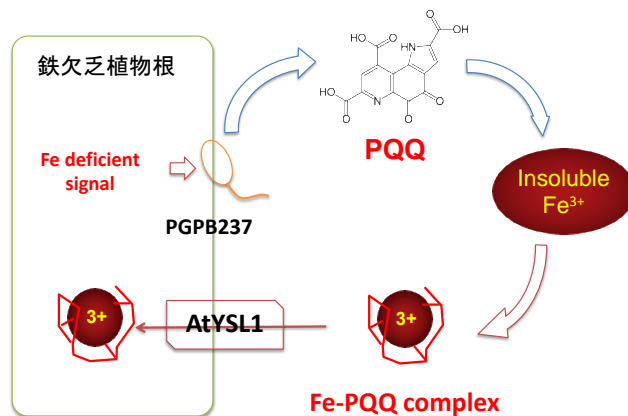


図2 AtYSL1を介した有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出機構

研究テーマ B「鉄欠乏救出 PGPB の宿主植物普遍性の検証」

鉄欠乏シロイヌナズナは、有用バクテリアにより救出されることが明らかになった。そこで、この現象の植物種普遍性が存在するかを検証するために、この PGPB が鉄欠乏イネを救出できるか否かを調査した。実験条件を工夫すると、有用バクテリアを含む培地でイネの生育が改善され、草丈、クロロフィル含量共に優位な違いが見られた。このことから、有用バクテリアは双子葉植物だけではなく、単子葉植物のイネでも鉄欠乏下での生育を回復させ、植物種に依存せず普遍的な鉄欠乏救出活性を持つことが明らかになった。

このような鉄欠乏を救出する有用バクテリアは、世界のアルカリ土壌の分布を見ても海外で使用し得る潜在性を持つ。本研究で用いてきたバクテリアは、イタリア原産なので法律的な規制が多く使用しにくいとため、日本独自の菌株を取ることにした。日本は基本的に酸性土壌であるがアルカリ土壌も点在する。珊瑚を起源とする石灰質アルカリ土壌は、内陸の石灰鉱山または日本の南方の諸島に存在する。日本全国のアルカリ土壌である 5 地点で採取し

た土壌と、対象区として茨城県つくば市で採取した土壌でイネを生育した。その結果、草丈は宮古島>小笠原>士別>美祢>高岡の順であった。土壌、根圏、根における微生物叢を解析した結果を基に、3DPCoA を描かせてみると、根、根圏、土壌と分離した(図 3)。また、土壌の微生物叢の多様性を調べると、高岡の土壌で最も高いことが分かった。高岡でサンプリングした土壌は、農業用の肥料としても定評があることから、微生物叢が豊富であることと何らかの関係がある可能性がある。

並行して、日本の土壌からバクテリアライブラリーの作製を行った。用いた土壌はアルカリ土壌にも関わらず、最も生育の良かった宮古島の土壌を用いた。この土壌より限界希釈法を用いて約 300 のバクテリアを単離した。これを、イネを用いて温室で鉄欠乏アッセイを行ったところ、300 のバクテリアのうち約 60 個を接種した区において、草丈平均値が何も接種していないイネよりも高い結果となった。今後、これらの菌株の同定、またはイネを用いたバクテリアを介した鉄獲得機構を理解し、将来的には微生物資材または鉄資材としての実用化を視野に入れた研究へと発展させていきたいと考えている。

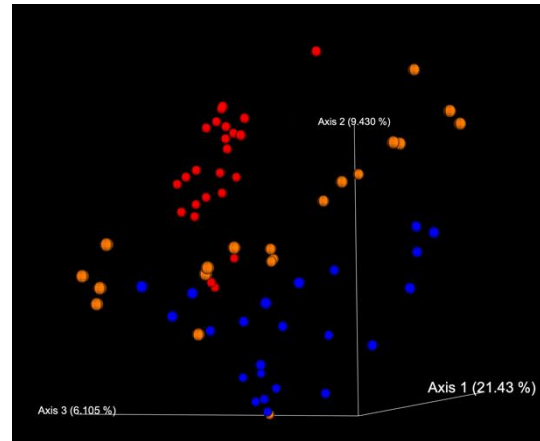


図 3 日本のアルカリ土壌における微生物叢

3. 今後の展開

本さがけ研究を通じて、土壌微生物が植物を鉄欠乏から救出する分子メカニズムの一端が明らかになった。その機構は、植物の鉄欠乏を感知すると、有用バクテリアが放出するキレート物質である PQQ が鉄と錯体を形成し可溶化して、植物の AtYSL1 を介して植物に吸収されるというメカニズムであった。しかし、この他にも土壌微生物を介した植物への吸収機構は数種有ると推定され、今後他の救出機構についても解析を行っていきたい。

世界的に見るとアルカリ土壌が広がる大地があり、農業生産が著しく低い地域がある。私は農業研究機関に所属することから、これらの土壌を抱える人々の農業に寄り添うことも使命であると考えている。将来、有用なバクテリアだけでなく、Fe-PQQ またはより強力なキレート鉄を新たに発見し、不毛な大地を緑化していく研究に邁進する所存である。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究課題では、有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出のメカニズムの解明に取り組んだ。さらに、植物種としてシロイヌナズナに加え、単子葉植物であるイネも用いて、研究を進展させた。その結果、植物の救出に必要なトランスポーター遺伝子を明らかにし、バクテリアが放出するキレート物質を単離した。また、イネにおいてもバクテリアによる効果は保存されていた。さらに、植物変異株を用いた実験により、有用バクテリアによる植物の鉄欠乏救出機構は、少なくとも数種類存在することが明らかになった。当初本研究の目的としていた、鉄欠乏救出機構

の包括的な理解をするという点において、一定の達成は得られたと考えている。しかし、バクテリアのキレートを探る段階で多分に時間を取られ、研究終了までに成果の報告ができなかったことが非常に悔やまれる。今後、必要十分な実験結果を積み上げてから研究成果として報告したい。

【研究実施体制及び研究費執行状況】

本研究実施に当たっては、さがけ研究者の井上と研究補助者 3 名が参画した。研究補助者の 1 人は経験者であったが、残り 2 人は未経験者を採用した。農研機構で研究補助員として勤務した経験があったものは、即戦力として研究所の実験機材・温室を駆使して本研究に大きく貢献した。未経験者は、文系の大学卒であったが研究手法の飲み込みが早かった。また、さがけメンバー・アドバイザー・統括・領域担当は研究に対して前向きで、非常に助けていただいた。実験の技術的なところから始まり、材料の提供・情報の交換・さらに共同研究などさまざまな局面でサポートしていただいた。

本研究では、多くの栽培スペースが必要となり、かつ数をこなす実験が必要であった。さがけ研究費を用いて、これまで研究所に眠っていた人工気象器を、検査と修理することで再利用して植物を栽培する場所を確保した。また、実験には多くの手数が必要となるが、研究補助員 3 名を当てて実験を行った。ここまでの研究成果は、さがけ研究で構築した研究体制と設備がなければ実現しなかったものと考えている。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

得られた成果はまだ未熟であり、今後、改良も含めた検討も多々必要と考えられる。しかし、さがけ研究開始時より研究者間での共同研究や、特に企業との共同研究が始まり本研究への期待が高まっているように感じられる。今後も、様々な研究者や企業と共に連携し、応用研究への展開を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. H. INOUE, M. Hashimoto, Y. Bai, A. D. Rombolà, P. Schulze-Lefert. Plant growth promoting under iron-deficiency mediated by the *Arabidopsis thaliana* bacterial root microbiota. MPMI, July 14–18, 2019, Glasgow, Scotland.