

窒素固定微生物の共生工学

(東北大学院生命科学研究科、南沢 究)

1. はじめに

窒素は土壌環境中で植物生育の制限因子になりやすい元素である。窒素の供給源である生物窒素固定の能力は原核生物に限られているために、窒素固定細菌と植物の共生に基づく生物的窒素固定は、窒素肥料に依存しない食糧生産を目指して長らく研究されてきた。最も良く知られているのは、根粒菌(rhizobia)とマメ科植物の窒素固定共生系であるが、近年イネ科植物などの非マメ科植物にも窒素固定エンドファイト(diazotrophic endophytes)という一群の細菌が内生していることが分かりつつある。また、これらの共生系は、窒素固定ばかりでなく、共生を通じて植物や土壌環境に対する意外な効果を示す場合がある。ここでは、演者らが関わってきた窒素固定エンドファイトと根粒菌の研究で共生工学との接点になりそうなトピックを紹介したい。

2. 共生微生物が病害虫やストレスに強い植物を作る

イネ科植物には根粒菌は共生しないが、種々の窒素固定細菌エンドファイトやその他の微生物が生息している。最初に野生イネ、栽培イネなどから、アセチレン還元法により窒素固定活性をトレースしながら、窒素固定細菌の分離培養を行った。得られた窒素固定菌は *Herbaspirillum* 属、*Azospirillum* 属などのグラム陰性細菌で、分離宿主への定着能や窒素固定能は分離菌株毎に異なっていた¹⁾。定着能や窒素固定能の高い *Herbaspirillum* 属の菌株を選び、定着部位を調べたところ、主に地上部の細胞間隙で増殖していた(図1)¹⁾。さらに、窒素固定について重窒素ガス(¹⁵N₂)や *nifH* 遺伝子の発現解析で詳細に検討したところ、植物体内に内生しているエンドファイトが窒素固定を行っていることが明らかとなった¹⁾。ただ、植物が空中窒素から獲得している窒素に占める接種エンドファイトの寄与は、生活環全体では予想より低く、培養困難な窒素固定エンドファイトがイネ科植物体内で窒素固定を行っている可能性が残された。

窒素固定以外の機能はないかという議論になり、半信半疑で耐病性や耐虫性について検討を行ったところ、一部の窒素固定エンドファイトを接種したイネはいもち病に対する耐病性を示したり、イネの病害虫に対する摂食阻害を起こ

す場合のあることが分かった。糸状菌エンドファイトのアルカロイドによる耐虫性や家畜被害は有名な話であるが、細菌エンドファイトにおける耐病性や耐虫性の報告は今のところ見当たらない。

材料をパイオニア植物や東南アジアに自生している野生イネにしたところ、単独の窒素固定エンドファイトの単離ができなくなった。しかし、分離途中の試験管では窒素固定活性が検出されるので、複数の微生物が関与している可能性の検討を行った。その結果、窒素固定能を示す偏性嫌気性の *Clostridium* 属細菌と好気性の非窒素固定細菌が共同して窒素固定能を発現してことが分かり、嫌気窒素固定コンソーシアム(ANFICO: Anaerobic nitrogen-fixing consortium)と名付けた²⁾。ANFICO の相互作用は、非窒素固定細菌による酸素濃度の低下と窒素固定誘導物質の分泌であった²⁾。野外の植物中の *Clostridium* 属細菌の分布を 16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 法³⁾ で調べたところ、種々の作物や野生植物に *Clostridium* 属細菌が分布していることが分かった。あまり嫌気的な環境とは考えられない地上部も含めた植物体内に *Clostridium* 属細菌が生息していることは驚きである^{2, 3)}。定着性の高い *Clostridium* 属細菌を選抜し、*nifH* 遺伝子およびアセチレン還元法により植物体内における窒素固定を調べたところ、外部から炭素源を投与した場合に窒素固定活性が検出された。窒素固定には多量のエネルギーが必要であるので、宿主植物から潤沢な炭素源の供給が必要であると考えられる。また、ANFICO の場合も窒素固定以外の機能を調べてみたところ、宿主植物の塩ストレスの軽減効果が認められ、窒素固定エンドファイトの多機能性が示唆された。

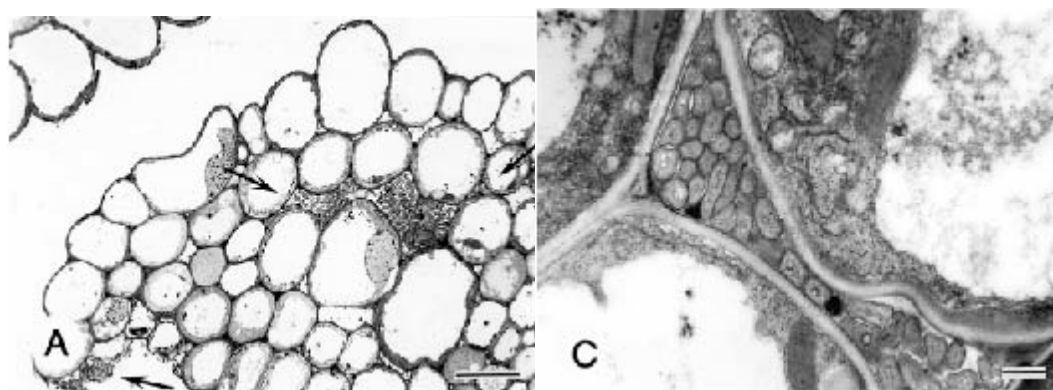


図1 野生イネの細胞間隙に生息している窒素固定エンドファイト¹⁾

3. 根粒菌の共生遺伝子で植物の形質転換効率を上げる

ダイズ根粒菌の一種である *Bradyrhizobium elkanii* はリゾビトキシンという分

分子量 190 の化合物を生産している (図 2) ⁵⁾。リゾビトキシンはダイズ植物体にクロロシスを起こし一部の病原菌も生産するので、発見された当初は植物毒とみなされていた ⁵⁾。しかし、リゾビトキシンは植物ホルモンであるエチレン生合成系 ACC 合成酵素の強力な競合阻害剤であることが分かり (図 2) ⁶⁾、植物毒ではなく宿主植物のエチレンレベルを低下させて、共生を促進する因子であることが明かとなった ^{7, 8)}。しかし、根粒菌としてはなぜ *Bradyrhizobium elkanii* しかリゾビトキシンを生産しないのか疑問が残った。根粒菌の全ゲノム塩基配列の情報 ⁸⁾ やアレイ解析 ⁹⁾ などからリゾビトキシンと同様の効果を宿主植物に与える可能性がある ACC deaminase の遺伝子 (図 2) が候補に上がり、実際リゾビトキシンと同様の共生促進効果のあることが判明した ^{8, 9)}

リゾビトキシン生合成経路はまだ解明途上であるが、リゾビトキシン生産に関わる遺伝子がクラスターをなしており、アミノアルコールのセリノール、グルタミン、ジヒドロリゾビトキシンが重要な中間体となっている ^{5, 8, 10)}。植物の ACC 合成酵素にたいしてリゾビトキシンと同様な阻害効果があるリゾビトキシンのアナログの AVG という化合物は、*Agrobacterium* による植物の形質転換効率を上昇させる ¹¹⁾。AVG は高価な試薬であるので、リゾビトキシンを生産する *Agrobacterium* 菌の作出を試みた。その結果、根粒菌のリゾビトキシン生合成遺伝子群導入 *Agrobacterium* はリゾビトキシンを生産した。形質転換の実証実験はまだ行っていないが、エチレンレベルを低下させることにより、形質転換効率の上昇が期待できる。

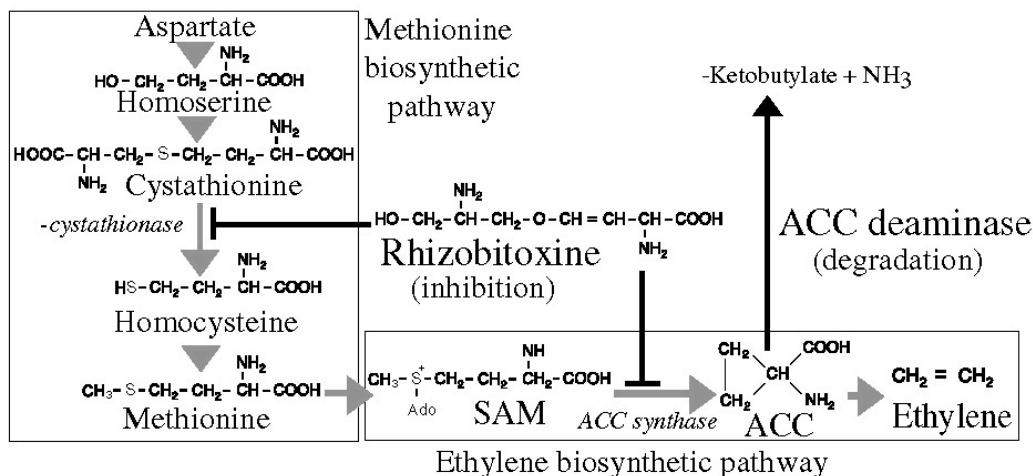


図 2 リゾビトキシンと ACC デアミナーゼの植物のエチレン合成阻害

4. 根粒菌で土壌由来の温室効果ガスを減らす

根粒菌は共生窒素固定細菌であるが、窒素循環の上では逆反応である脱窒能

を持っている場合がある。従来は、嫌氣的に条件下において単生状態で脱窒を行うことが報告されていたが、宿主植物と共生した場合も脱窒遺伝子群が発現している。これは、根粒内は微好気条件で酸素分圧が低いので、嫌気呼吸系である脱窒遺伝子がついでに誘導されているようである。ただ、最終電子受容体となる硝酸は根粒内にそれほど豊富にないので脱窒反応としては開店休業状態ではあるが、植物からの豊富な光合成産物の供給があるので、脱窒系としてのポテンシャルは高いと想定される（図3）。

農耕地生態系から土壤微生物の働きで発生する温室効果ガスとしてメタンや亜酸化窒素(N_2O)が問題とされている。亜酸化窒素(N_2O)は、土壤の水分状態、無機窒素量、有機物量に応じて、土壤微生物の硝化や不完全な脱窒によって土壤から発生する。例えば、降雨直後の畑などで N_2O の発生量が多いとされている。そこで、ダイズ根粒によってその土壤 N_2O ガスを除去できないかと考えた。

完全脱窒系($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$)を持ったダイズ根粒菌 USDA110 を接種したダイズ根粒は、窒素固定活性に相当する高い N_2O 除去能力を示した。 N_2O 還元酵素遺伝子 *nosZ* の破壊株によって形成された根粒では N_2O 吸収は全く観察されず、*nos* オペロンをその破壊株に相補すると根粒の N_2O 吸収活性は回復した。したがって、根粒の N_2O 吸収は共生状態の根粒菌バクテロイドの N_2O 還元酵素が担っていることが明らかとなった。実際の土着ダイズ根粒菌株の脱窒系を調べたところ、完全脱窒系 (N_2 放出型) 以外に、不完全脱窒系 (N_2O 放出型) を保有している単離株や脱窒系を欠いている単離株が多数見られ、圃場や系統で偏りが見られた^{1,2)}。例えば、北海道の十勝圃場では、完全脱窒系を保有しているダイズ根粒菌が見つからなかった^{1,2)}。

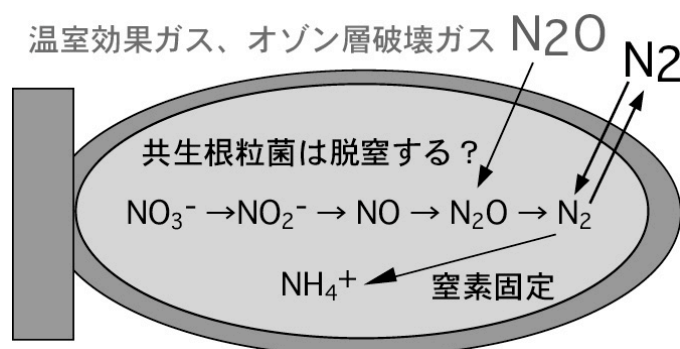


図3 共生根粒菌による亜酸化窒素ガス (N_2O) の取込み

以上の結果は、完全脱窒系を持っているダイズ根粒菌株を接種菌として利用すれば、土壤由来 N_2O の量を軽減できる可能性のあることを意味する（図3）。

根粒菌は今までマメの生産という観点から利用されてきたが、地球環境の改善という付加価値をつけることも可能かもしれない。

5. 根粒菌ゲノムの進化とその利用

以上微生物と植物共生系の利用の個別課題の紹介をしてきた。現在までに3種類の根粒菌の全ゲノム塩基配列が決定された。しかし、既知の遺伝子や他の微生物の遺伝子ホモログなどは分かっても、共生窒素固定細菌としてのゲノムの構成原理や共生進化の理解はそれほど進んでいない。演者らは、日本国内でアレイ解析を中心とした根粒菌研究者コンソーシアムに加わり、根粒菌の網羅的発現やゲノム比較の解析を進め、根粒菌ゲノムは共生アイランドなどの外来DNA領域がダイナミックに変化していることが分かりつつある(図4)⁹⁾。今後ゲノムレベルの進化を模倣した根粒菌の共生工学についても考えていきたい。

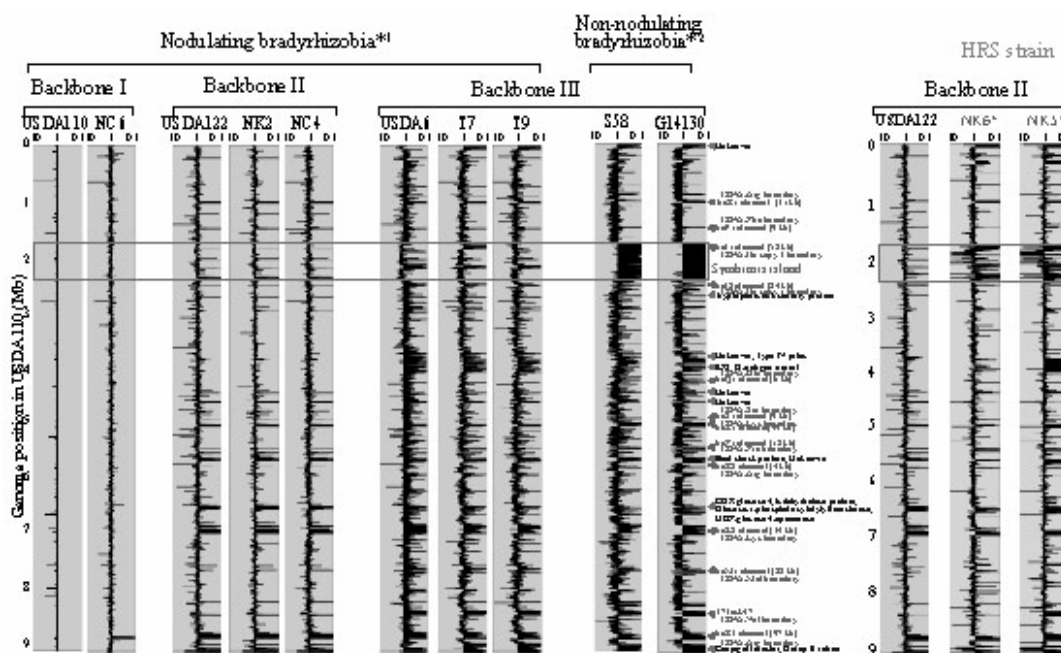


図4 ダイズ根粒菌株のゲノムスキャンによるゲノム骨格と共生アイランド

参考文献

- 1) Elbeltagy A, K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa.. 2001. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl. Environ. Microbiol. 67:5285-5293.
- 2) Minamisawa, K., K. Nishioka, T. Miyaki, B. Ye, T. Miyamoto, M. You, A. Saito, M.

- Saito, W. L. Barraquio, N., Teaumroong, T. Sein, and T. Sato. 2004. Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3096-3102.
- 3) Miyamoto, T., M. Kawahara, and K. Minamisawa. 2004. Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
 - 4) Okazaki, S., N. Nukui, M. Sugawara, and K. Minamisawa. 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environ.* 19:99-111.
 - 5) Yasuta T, S. Satoh S, and K. Minamisawa. 1999. New assay for rhizobitoxine based on inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Appl Environ Microbiol* 65:849-852.
 - 6) Yuhashi K, N. Ichikawa, H. Ezura, S. Akao, Y. Minakawa, N. Nukui, T. Yasuta, and K. Minamisawa. 2000. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2658-2663.
 - 7) Okazaki, S., K. Yuhashi, and K. Minamisawa. 2003. Quantitative and time-course evaluation of nodulation competitiveness of rhizobitoxine-producing *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45:155-160.
 - 8) Yasuta T., S. Okazaki, H. Mitsui, H. Yuhashi, H. Ezura, and K. Minamisawa. 2001. DNA Sequence and mutational Analysis of Rhizobitoxin Biosynthesis Genes in *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4999-5009.
 - 9) Uchiumi, T., T. Ohwada, M. Itakura, H. Mitsui, N. Nukui, P. Dawadi, T. Kaneko, S. Tabata, T. Yokoyama, T. Tejima, K. Saeki, H. Omori, M. Hayashi, T. Maekawa, R. Sriprang, Y. Murooka, S. Tajima, K. Simomura, M. Nomura, A. Suzuki, Y. Shimoda, K. Sioya, M. Abe, and K. Minamisawa. 2004. Expression islands clustered on symbiosis island of *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186:2439-2448.
 - 10) Okazaki, S., M. Sugawara, and K. Minamisawa. 2004. *Bradyrhizobium elkanii* *rtxC* gene is required for expression of symbiotic phenotypes in the final step of rhizobitoxine biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:535-541.
 - 11) Ezura H, K. Yuhashi, T. Yasuta, and K. Minamisawa. 2000. Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. *Plant Breeding* 119:75-79.
 - 12) Sameshima-Saito, R., K. Chiba, and K. Minamisawa. 2004. New method of denitrification analysis of *Bradyrhizobium* field isolates by gas chromatographic determination of $^{15}\text{N-N}_2$. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2886-2891.