

# 海岸自生地で採取したミヤコグサ・根粒菌・土壌の 特性について

青木俊夫，島村昌幸，明石智義，小澤貴史，近藤泰郎，  
佐藤羽香奈，松井祐太郎，三好拓哉，山本海斗，山本芙  
由美，富田実樹，松尾有里子，和佐田一樹（応用生物科  
隅田 裕明，野口 章（生命化学科）

生命科学研究所

総合研究所

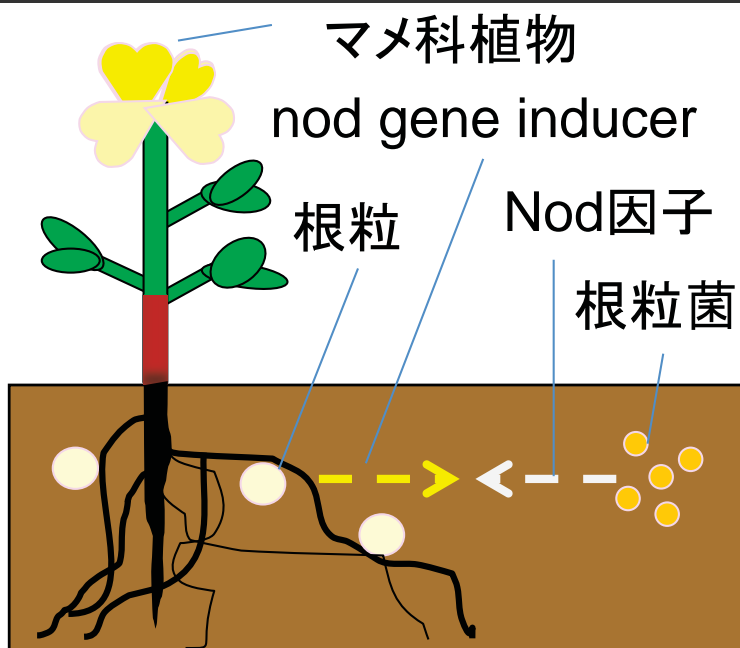
# 津波などの被害を受けた土地での塩害とその対策

- 高濃度NaClの植物への影響
  - 浸透圧の上昇
  - 細胞のイオン濃度上昇
  - Cl<sup>-</sup>による特異的な影響
- 対策
  - 湛水による塩類の除去
  - 深耕や客土による塩類濃度の希釈
  - 圃場外への持ち出し
- 低コストな対策—環境適応生物の活用
- 世界規模の食糧問題にも対応可能
  - 塩類集積土壌
  - 農業用水不足

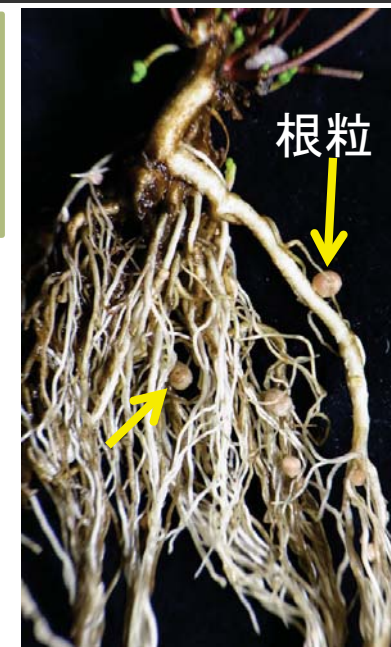


[http://www.pref.miyagi.lg.jp/soshiki/res\\_center/revival2-3-1.html](http://www.pref.miyagi.lg.jp/soshiki/res_center/revival2-3-1.html)

# マメ科植物-根粒菌共生系



マメ科植物と根粒菌との相互の化学シグナル認識により宿主特異性が決まる。



- マメ科植物と共生する根粒菌が大気中の $N_2$ を $NH_3$ に固定
- 問題土壌（塩害、酸性、重金属、ヒ素等）対策に有効
  - 問題土壌農地で耕作する作物
  - 問題土壌地帯を浄化するパイオニア植物

## [本研究の目標]

塩害土壌に適応したマメ科植物-根粒菌共生系の開発

# モデルマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus*

- 分子遺伝学研究に好適な性質
- 根粒菌 *Mesorhizobium loti* と共生窒素固定
- リソースの充実
  - ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ミヤコグサ・ダイズにより収集・配付

The image shows a screenshot of the LegumeBase website. The header includes the logo and the text "LegumeBase - NBRPミヤコグサ・ダイズ -". There are two database selection buttons: "DB ミヤコグサ Lotus japonicus" and "DB ダイズ Glycine max / soja". Below the header is a navigation menu with tabs for "概要", "ミヤコグサ", "ダイズ", "採取地マップ", "分譲と寄託", "論文情報登録", and "関連リンク". The main content area features a grid of images showing various stages of the plants, including leaves, flowers, and seed pods. A central search box is titled "リソースの検索" and contains the text: "ミヤコグサとダイズリソースの統合検索サイトです。検索結果からオンライン上でリソースを注文することができます。" Below the search box is a search input field with the placeholder "フリーワード" and a "検索" button. The search results show two checked items: "ミヤコグサ Lotus japonicus" and "ダイズ Glycine max/soja".

# モデルマメ科植物ミヤコグサのリソース (研究材料)

- ゲノムリソース
  - 遺伝子クローン, 塩基配列, 遺伝マーカー, etc.
- 植物リソース
  - 野生系統, 組換え自殖系統, 突然変異体
- 利用可能な根粒菌は2株のみ!

The image shows a screenshot of the LegumeBase website. The header includes the logo and text "LegumeBase - NBRP ミヤコグサ・ダイズ -". There are two database selection buttons: "DB ミヤコグサ Lotus japonicus" and "DB ダイズ Glycine max / soja". Below the header is a navigation menu with tabs: "概要", "ミヤコグサ", "ダイズ", "採取地マップ", "分譲と寄託", "論文情報登録", and "関連リンク". The main content area features a grid of images showing various stages of the plants, including leaves, flowers, pods, and seeds. A central search box is titled "リソースの検索" and contains the text: "ミヤコグサとダイズリソースの統合検索サイトです。検索結果からオンライン上でリソースを注文することができます。" Below the search box is a search bar with the placeholder "フリーワード" and a "検索" button. The search results are listed as follows:

- ミヤコグサ Lotus japonicus
- ダイズ Glycine max/soja

# 本研究の取り組み

- 植物・根粒菌・土壌の一括採集（地理情報geotagを付加）
  - 植物試料
    - 植物リソース（種子増殖，特性解析）
    - 共生菌 *Mesorhizobium* の単離源
  - 土壌試料
    - 化学的性質情報
    - DNAサンプル（メタゲノム解析用）
    - 土壌微生物単離源
- 植物および根粒菌の特性解析
  - 成長・増殖，代謝，共生能能力， etc.
  - ストレス耐性
  - 分子系統

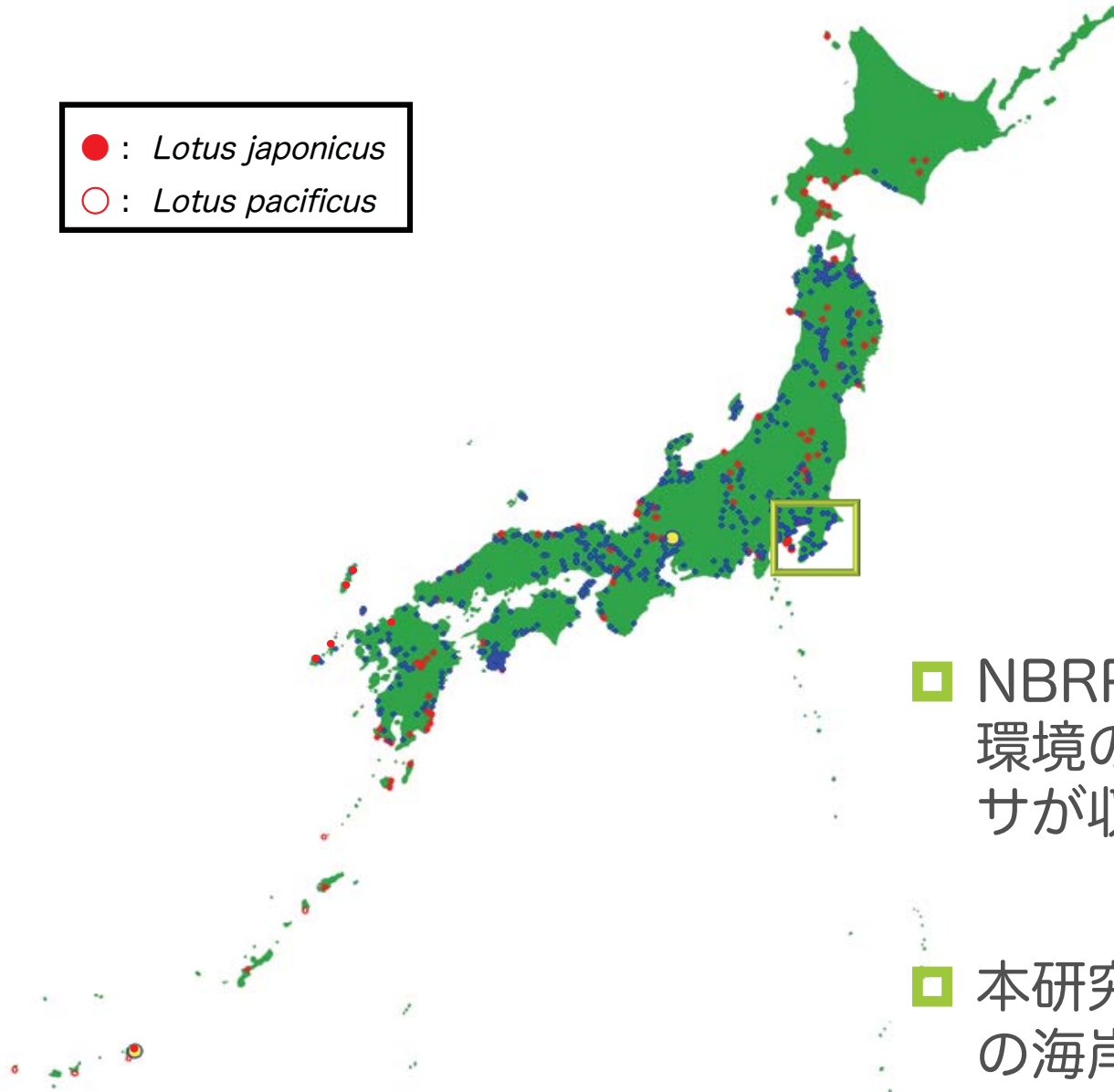


マメ科植物-根粒菌共生系が生物的非生物的環境に適応する機構を理解するために活用

# 従来のミヤコグサ野生系統の採取地

● : *Lotus japonicus*

○ : *Lotus pacificus*



- NBRPには、日本全国の様々な環境の地域に由来するミヤコグサが収集されている。
- 本研究では、採取地を関東地方の海岸地帯で重点的に採集した。

# 本研究の採集地



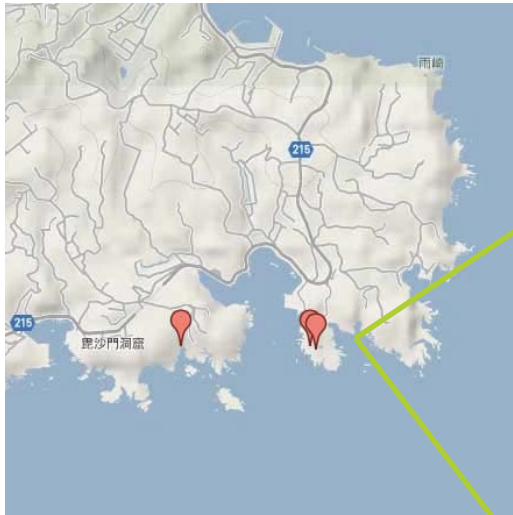


# 海岸地帯のミヤコグサ-根粒菌共生系

- 劣悪な土壌条件に適応している可能性がある。
  - 高濃度  $\text{Na}^+$
  - 高濃度  $\text{Cl}^-$
  - 低濃度リン酸
  - 極端な pH



# サンプリング法

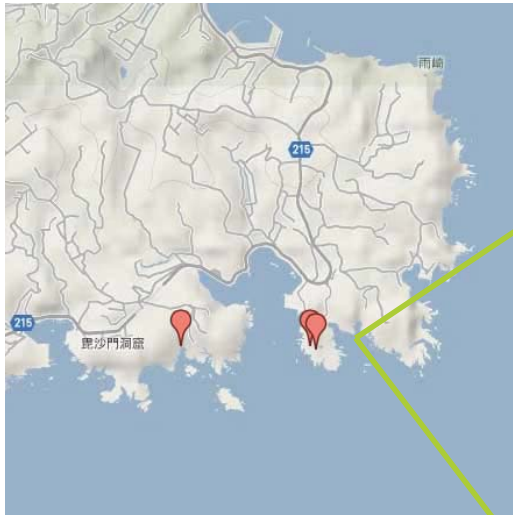


原則として1地点から3サンプル（植物および土壌）



- 一括採集（根こそぎ植物をとる）は破壊的
- 採集地点のミヤコグサ資源の保全に留意
- 3株以下しか確認できない地点での採集は見合わせ

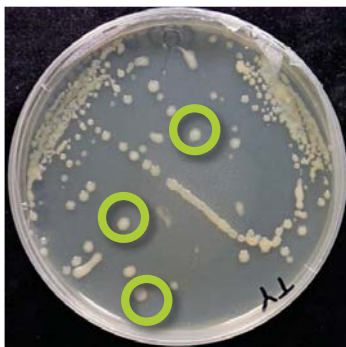
# サンプリング法



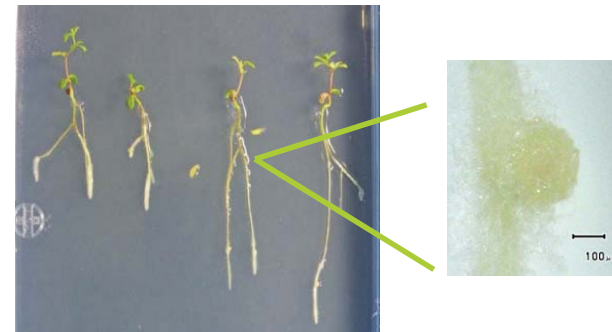
原則として1地点から3サンプル（植物および土壌）



植物あたり根粒3個



根粒あたり3コロニー



標準系統B-129 に再接種

# 土壌分析

- 風乾
- 篩別
  - 2 mmおよび0.5 mmメッシュ
- 分析（3測定／試料）
  - pH
  - 電気伝導度（EC）
    - \* 5倍量の水を加えて測定
  - 原子吸光（Na<sup>+</sup>）
  - イオンクロマトグラフィー（陰イオン類）



## 結果・考察

土壌の化学的性質

根粒菌の耐塩性，耐酸・アルカリ性

根粒菌の増殖・共生シグナル生産量

# ミヤコグサ自生地から採取した土壌の化学的性質

	最大値	最小値	差異
pH	9.02	5.89	3.13
EC (mS/m)	59.6	2.4	25
[Na <sup>+</sup> ] (mg/kg)	429	1.6	268
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)	9.7	< 0.2	49
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mg/kg)	11.5	< 0.7	16
[F <sup>-</sup> ] (mg/kg)	2.6	< 0.03	87
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] (mg/kg)	98.6	< 3.2	31
[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] (mg/kg)	16.3	< 0.7	23
[Br <sup>-</sup> ] (mg/kg)	5.2	< 0.2	26
[Cl <sup>-</sup> ] (mg/kg)	15.0	< 0.2	75

pH, ECは79試料, その他の項目については55試料の分析が完了

# 土壌の化学的特性間のスピアマン順位相関係数

	EC	[Na <sup>+</sup> ]	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	[F <sup>-</sup> ]	[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	[Br <sup>-</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
pH	0.36	0.06	0.11	0.1	0.13	-0.04	0.09	-0.20	-0.12
<b>EC</b>		<b>0.82</b>	<b>0.58</b>	<b>0.48</b>	<b>0.27</b>	<b>0.18</b>	<b>0.71</b>	<b>0.2</b>	<b>0.32</b>
[Na <sup>+</sup> ]			0.61	0.41	0.22	0.25	0.76	0.27	0.45
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]				0.42	0.40	0.45	0.80	0.30	0.45
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]					-0.06	0.25	0.55	0.01	0.40
[F <sup>-</sup> ]						0.10	0.30	0.16	0.17
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]							0.39	0.13	0.33
[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]								0.30	0.63
[Br <sup>-</sup> ]									0.43

相関係数R <sup>2</sup>							
[Na <sup>+</sup> ]	-0.2 < R ≤ 0.2						
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.2 < R ≤ 0.4						
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0.4 < R ≤ 0.6						
[F <sup>-</sup> ]	0.6 < R ≤ 0.8						
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	0.8 < R ≤ 1.0						

## 海水中のイオン濃度 (g/kg)

Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Br <sup>-</sup>
19.4	10.8	2.7	1.3	0.4	0.4	0.1	0.07

土壌が受けた海水の影響は大まかに電気伝導度 (EC) で評価できる。

# 採取地点の海からの距離と標高（城ヶ島の例）



採取地点	海からの距離 (m)	標高 (m)
1	40	2
2	70	4
3	30	5
4	20	4
5	10	2



# 採取地の海からの距離および標高と土壌イオン濃度とのスピアマン相関関数

	海岸からの距離	標高
標高	0.65	
pH	-0.372	-0.558
EC	-0.499	-0.409
[Na <sup>+</sup> ]	-0.408	-0.076
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.169	-0.407
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	-0.347	-0.176
[F <sup>-</sup> ]	0.198	-0.137
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	0.217	-0.201
[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	0.016	-0.194
[Br <sup>-</sup> ]	-0.023	-0.055
[Cl <sup>-</sup> ]	0.229	-0.233

相関係数 R <sup>2</sup>
-0.6 < R ≤ -0.4
-0.4 < R ≤ -0.2
-0.2 < R ≤ 0.2
0.2 < R ≤ 0.4
0.4 < R ≤ 0.6
0.6 < R ≤ 0.8

海水中のイオン濃度	
イオン	濃度 (g/kg)
Cl <sup>-</sup>	19.4
Na <sup>+</sup>	10.8
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.7
Mg <sup>2+</sup>	1.3
Ca <sup>2+</sup>	0.4
K <sup>+</sup>	0.4
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.1
Br <sup>-</sup>	0.07

pHは海岸からの距離・標高から影響を受ける（海に近いほど高pH）  
 ECも同じ影響を受けるが、各イオン濃度への影響は様々

# 根粒菌NaCl耐性

菌名	経過日数(日)		7												28																				
	NaCl濃度(%)		0			1			1.5			2			0			1			1.5			2											
	菌数		10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>						
MAFF303099			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●					
TONO			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
YOKOHAMA P2e1			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
BISHAMON 1c2			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
NOJIMAZAKI 1a1			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
ASHIKAJIMA 1b3			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
NAGASAKI A2d1			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
NAGASAKI B2c1			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
KIMIGAHAMA A2			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		
MATSUWA 1c2			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●			●●●		

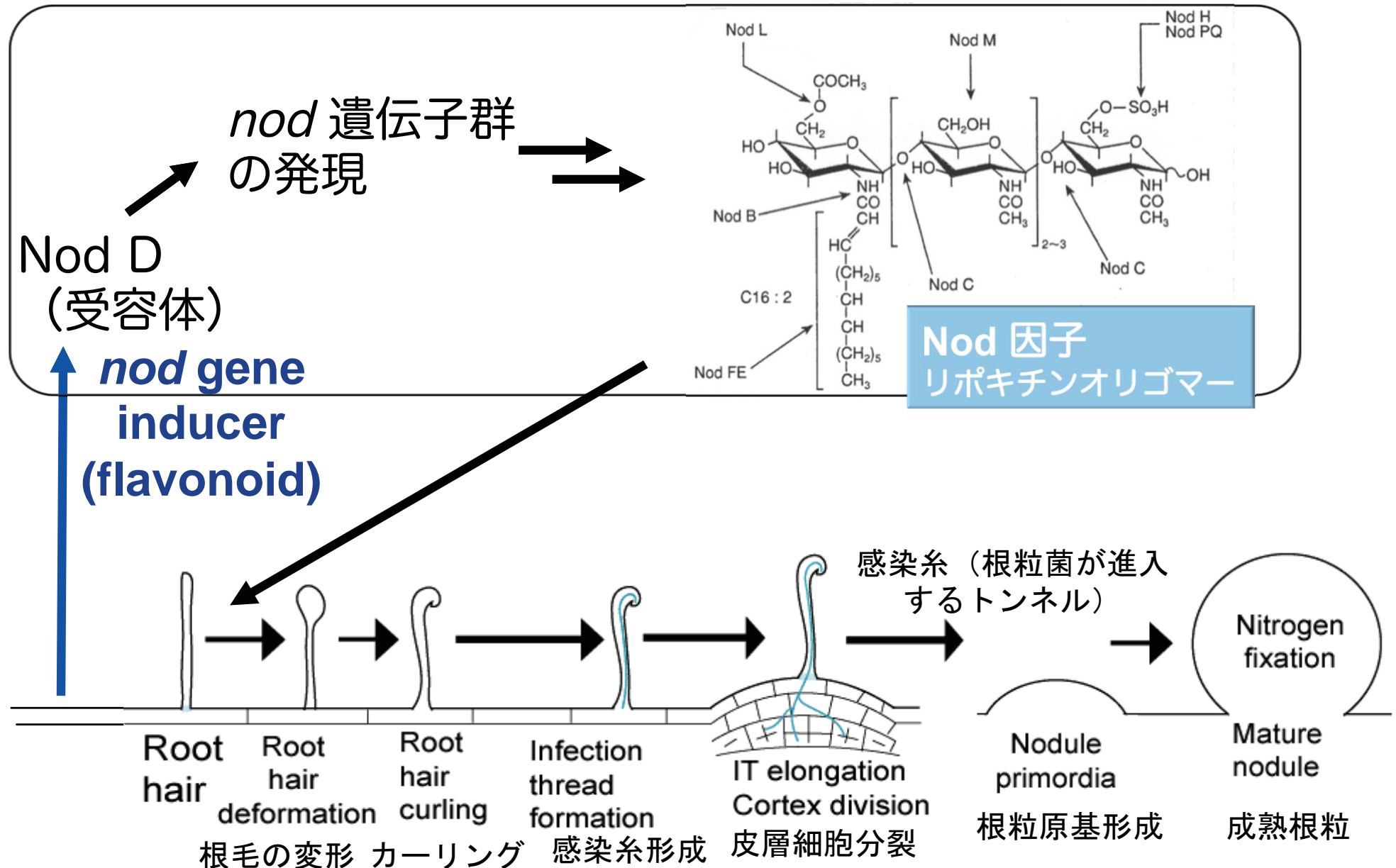
- ・ 内陸の根粒菌 (■) は1%NaClを加えた培地では増殖しなかった。
- ・ 海岸地帯の根粒菌には1.5-2%NaClに耐えられるものが存在した。

# 根粒菌の生育のpH特性

菌名	経過日数(日)														
	5			7			9			28					
	pH			7			9			7			9		
菌数	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
MAFF303099	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TONO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YOKOHAMA P2e1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BISHAMON 1c2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NOJ IMAZAKI 1a1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ASHIKAJ IMA 1b3	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
NAGASAKI A2a1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
NAGASAKI B2c1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KIMIGAHAMA A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MATSUWA 1c2	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+

海岸地帯の根粒菌の多くはpH 5およびpH 9での増殖が良好でなかった。

# マメ科植物と根粒菌との化学シグナル交換 "Chemical conversation"



# これまでに同定されている *nod* gene inducer

## Flavonoid inducers

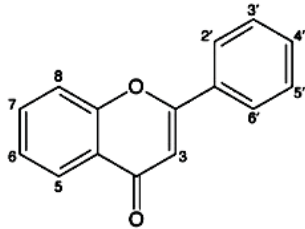
### Category

### Generic structure

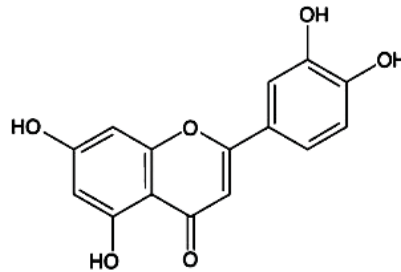
### Name/activity

### Specific structure

### Flavone



Luteolin,  
a flavone inducer from  
*Medicago* spp., active  
on *S. meliloti*



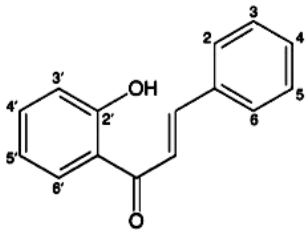
■ ミヤコグサの *nod* gene inducerとして、アルドロン酸類が報告されている。しかし…

■ 活性が弱い

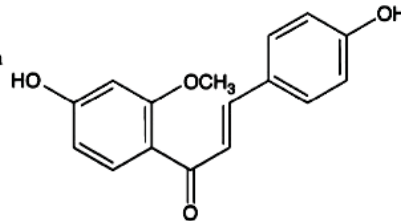
■ ミヤコグサからの分泌が未確認

■ 別に *nod* gene inducer が存在すると考えられていた。

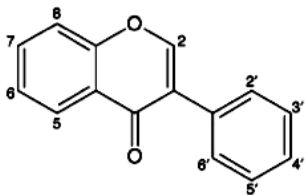
### Chalcone



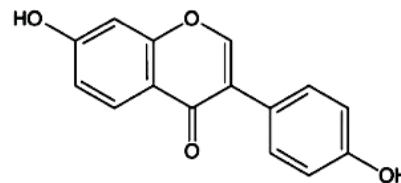
4,4'-Dihydroxy-2'-methoxychalcone,  
a chalcone inducer from  
*Medicago*



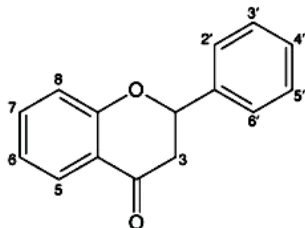
### Isoflavone



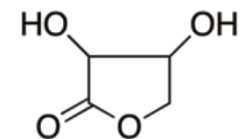
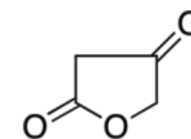
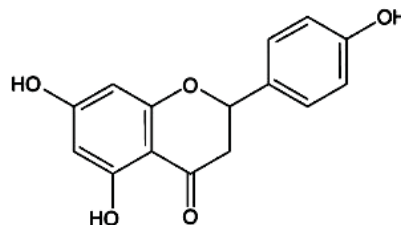
Daidzein,  
an isoflavone  
active on  
*B. japonicum*



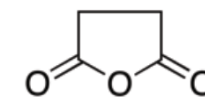
### Flavanone



Naringenin,  
a flavanone  
active on  
*R. leguminosarum*  
bv. *viciae*



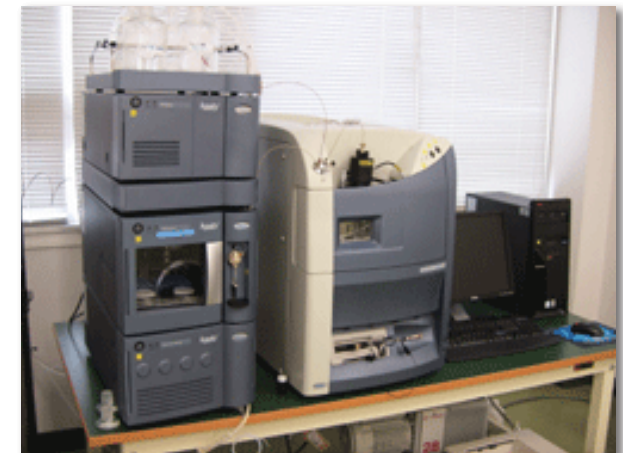
erythronic acid tetronic acid



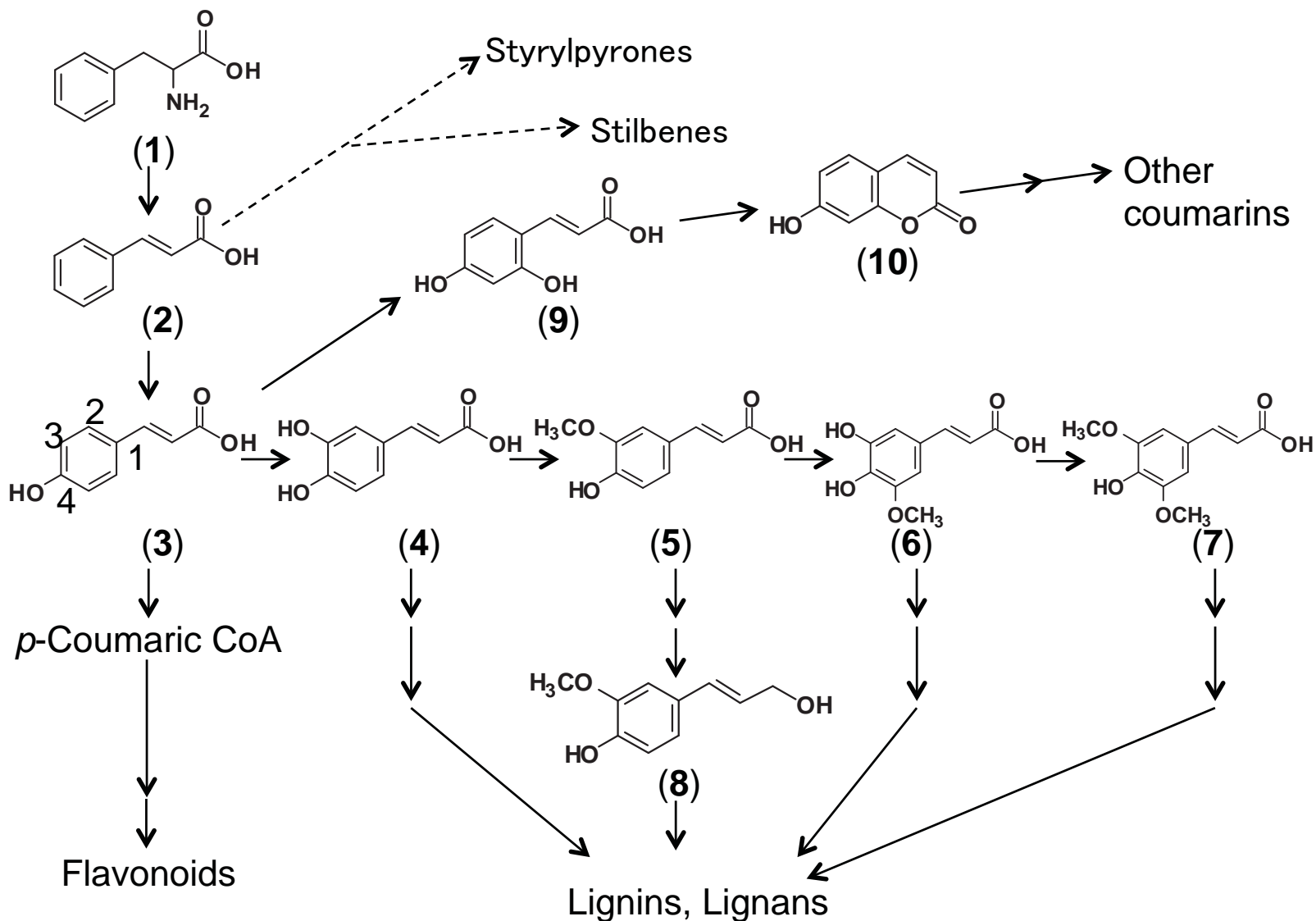
succinic anhydride

# ミヤコグサ由来 *nod* gene inducerの同定

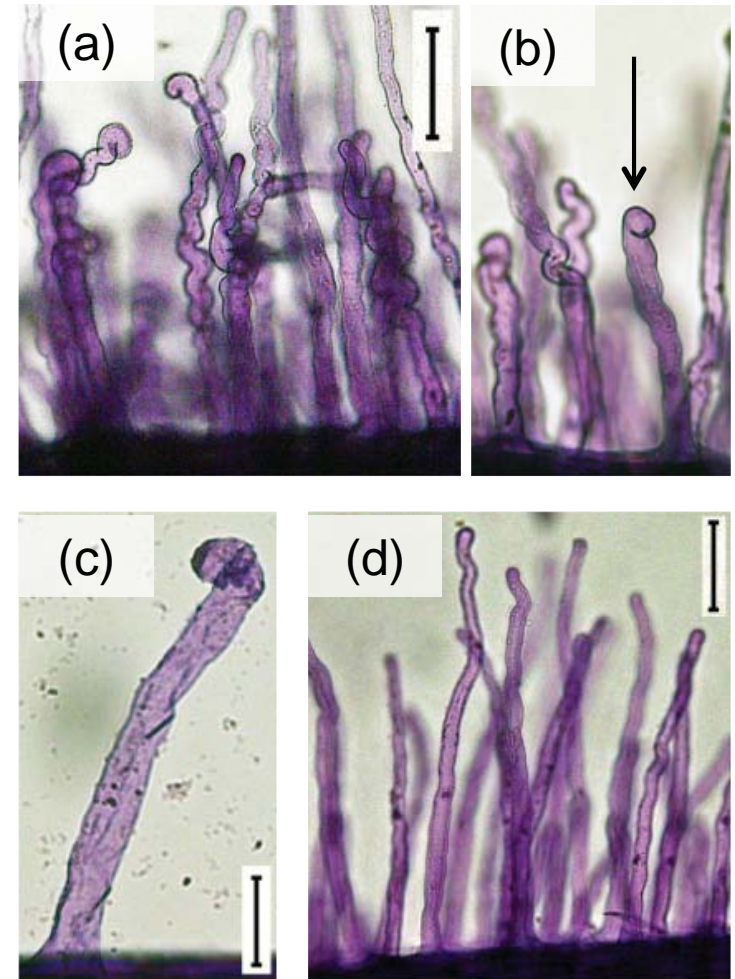
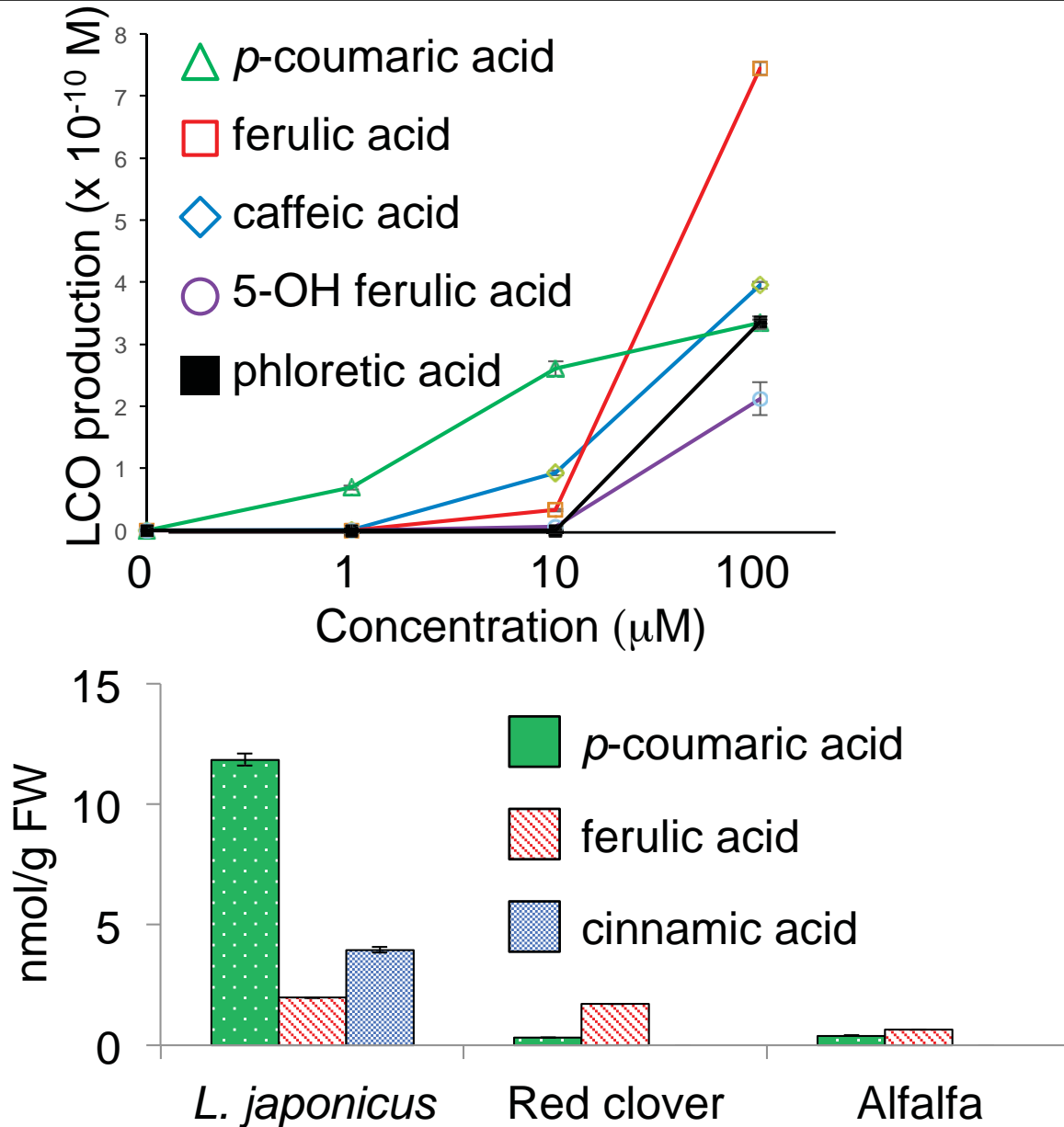
- 従来用いられてきた方法
  - *Nod* 遺伝子と融合させたレポーター遺伝子を用いて活性を検定.
  - 植物根からの滲出液成分を分画・活性検定して活性物質を単離・同定
  - ミヤコグサについては複数の研究グループが挑戦したが成功しなかった.
- 本研究で用いた方法
  - UPLC/MS/MSで*Nod*因子を直接検出
  - 市販品 or 生物変換により調製した化合物を個別に活性検定



# ミヤコグサの *nod* (gene) inducerはフェニルプロパノイドに属する芳香族カルボン酸

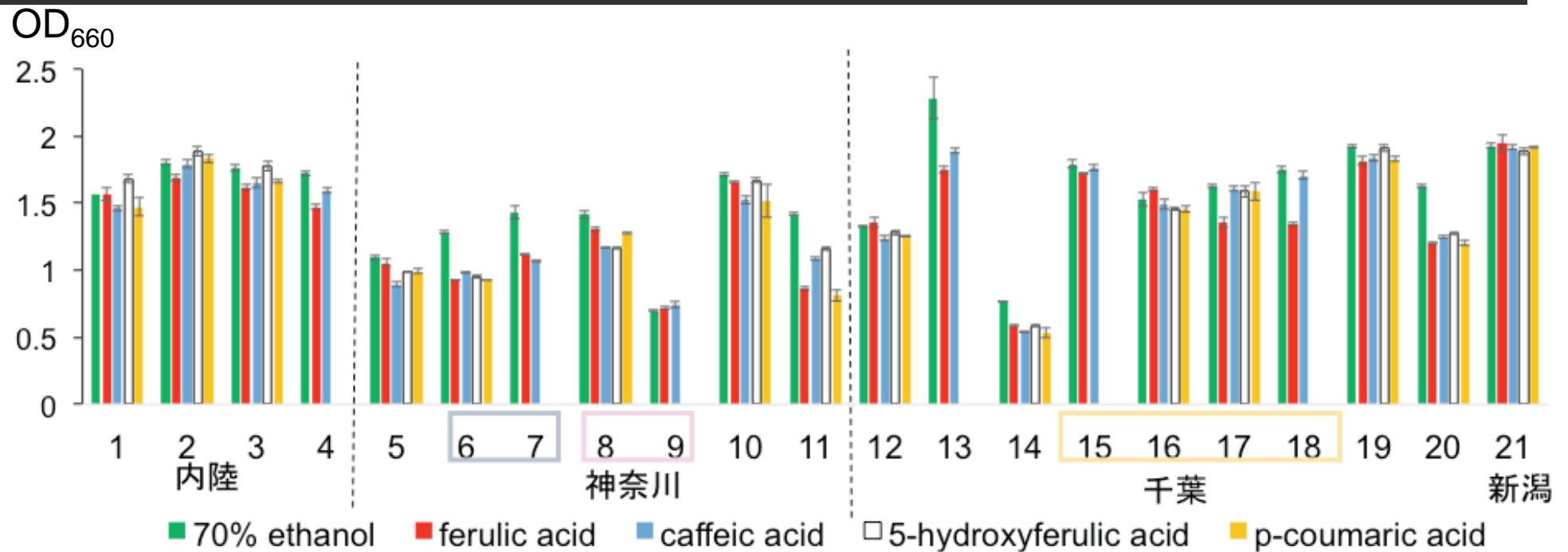


# 芳香族カルボン酸のNod因子誘導作用および植物の根からの分泌



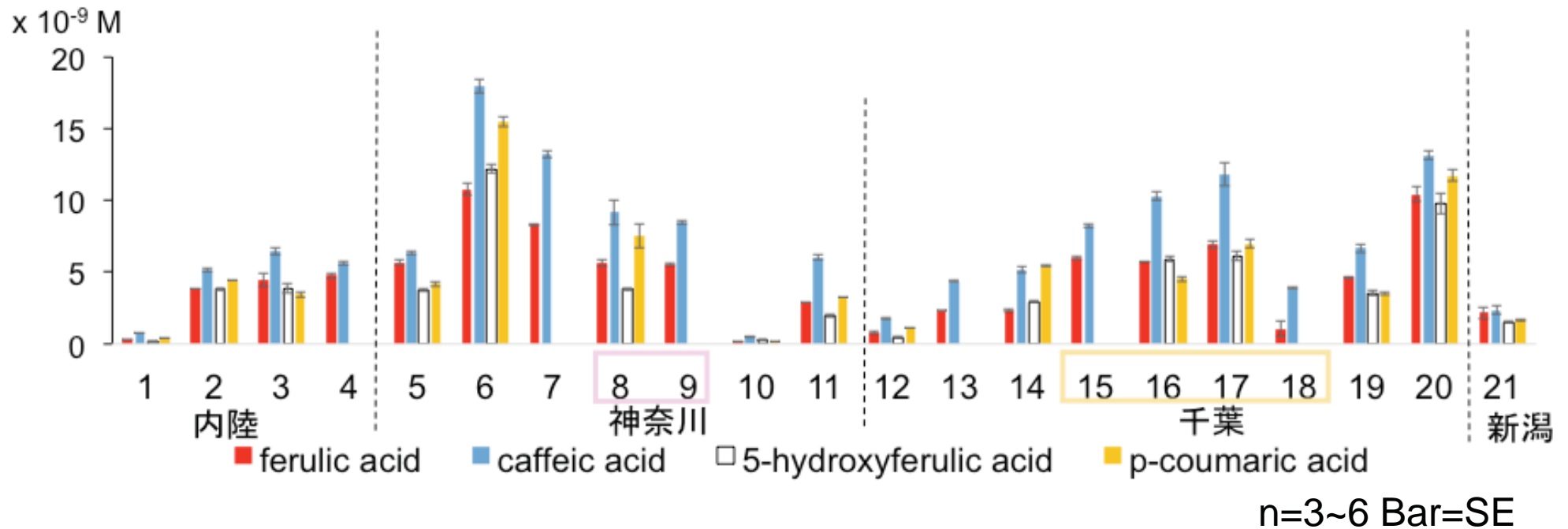


# 各地の根粒菌の成長に対する芳香族カルボン酸の効果 (66時間培養後の菌密度)



- 海岸地帯で採取された根粒菌は増殖に大きな差が見られた。
- 増殖に対する芳香族カルボン酸による顕著な影響は見られなかった。

# 各地の根粒菌の生シグナル（Nod因子）の生産に対する芳香族カルボン酸の効果



- カフェ酸が最も大量のNod因子を誘導する傾向が見られた。
- 海岸地帯で採取された根粒菌のNod因子の生産量に大きな差が見られた。
- 同じ地域で採取された根粒菌（枠）の間でNod因子生産量に差が見られる場合があった。

# 根粒菌の増殖・共生シグナル（Nod因子）生産に影響する要因

	増殖	Nod因子生産量
増殖速度		-0.332
pH	-0.386	0.354
EC	-0.314	-0.091
[Na <sup>+</sup> ]	-0.668	-0.026
海岸からの距離	-0.400	-0.075

- 根粒菌の増殖は、土壌のNa<sup>+</sup>濃度と強い負の相関が見られ、pH、EC、海岸からの距離と弱い負の相関が見られた。
- Nod因子生産量は土壌のpHと弱い相関が見られた。

# まとめ

- 海岸地帯のミヤコグサ自生地から植物・根粒菌・土壌を一括採集
  - 土壌の化学的性質 (pH, EC, Na<sup>+</sup>, 陰イオン)
  - 根粒菌の特性 (耐塩・耐酸・耐アルカリ性, 増殖, 共生シグナル生産量)
- 土壌が受けた海水の影響は大まかにはECで評価可能
- 海岸地帯の根粒菌は耐塩性が高く, 生育可能pH幅が狭い
  - 陽イオン輸送タンパク質の性質?
- ミヤコグサ由来の共生シグナルを同定, 根粒菌のシグナル分子 (Nod因子) 生産量を調査
  - 菌株により生産量に大きな差が見られたが, その要因・共生能力に与える影響は不明

# 進行中の研究・今後の課題

- ミヤコグサ・根粒菌の分子系統解析（本日省略）
  - rRNA, 共生関連遺伝子
- 根粒菌の共生能力の評価
  - 根粒着生数
  - NaCl存在下での共生能力
- ミヤコグサ・根粒菌共生系の耐塩性評価
  - 評価法の検討（成長速度, 生死）
- ミヤコグサ-根粒菌共生系が自生地土壌の化学的性質を変えているのか？
  - ミヤコグサからの距離を変えた土壌の採取・分析

# 土壌の化学的特性間のスピアマン順位相関係数

	EC	[Na <sup>+</sup> ]	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	[F <sup>-</sup> ]	[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	[Br <sup>-</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]
pH	0.36	0.06	0.11	0.1	0.13	-0.04	0.09	-0.20	-0.12
<b>EC</b>		<b>0.82</b>	<b>0.58</b>	<b>0.48</b>	<b>0.27</b>	<b>0.18</b>	<b>0.71</b>	<b>0.2</b>	<b>0.32</b>
[Na <sup>+</sup> ]			0.61	0.41	0.22	0.25	0.76	0.27	0.45
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]				0.42	0.40	0.45	0.80	0.30	0.45
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]					-0.06	0.25	0.55	0.01	0.40
[F <sup>-</sup> ]						0.10	0.30	0.16	0.17
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]							0.39	0.13	0.33
[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]								0.30	0.63
[Br <sup>-</sup> ]									0.43

相関係数R <sup>2</sup>
-0.2 < R ≤ 0.2
0.2 < R ≤ 0.4
0.4 < R ≤ 0.6
0.6 < R ≤ 0.8
0.8 < R ≤ 1.0

生物活動の影響？

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>は海水の主要成分ではない。  
考慮すべき要因は2種類？

- 海水の影響（海水による攪乱の強度・頻度）
- 生物の影響（植生の回復度）

実は、Na<sup>+</sup>濃度、ECが非常に高い土壌に自生するミヤコグサからは根粒菌が得られていない！

試料名	[Na <sup>+</sup> ] (mg/kg)	EC (mS/m)	[Na <sup>+</sup> ]順位	EC順位	根粒菌単離
Tomyozaki 2 01	<b>429.1</b>	26.2	1	12	No
Jogashima05	428.4	33.0	2	6	No
SunosakiA2	425.1	<b>59.6</b>	3	1	No
SunosakiA1	383.4	34.4	4	4	No
SunosakiA3	357.8	34.4	5	3	No
Tomyozaki 2 02	328.1	27.6	6	9	No
Jogashima01	<b>323.8</b>	23.9	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>Yes</b>
Bishyamon2	—	56.8	—	2	No
Bishyamon1	—	<b>34.3</b>	—	<b>5</b>	<b>Yes</b>

根粒菌単離法の改良が必要