

新素材キチンナノファイバーによるダイズの窒素固定能の 促進効果に関する研究

上中弘典^{*1}・磯和由希子¹・三浦千裕¹・江草真由美¹・伊福伸介²

¹鳥取大学農学部生命環境農学科

²鳥取大学大学院工学研究科

Promotion of Nitrogen Fixation Ability by a Novel Material Chitin Nanofibers in Soybean

Hironori KAMINAKA^{*1}, Yukiko ISOWA¹, Chihiro MIURA¹,
Mayumi EGUSA¹ and Shinsuke IFUKU²

¹Department of Agricultural, Life and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture,
Tottori University, Tottori 680-8553

²Graduate School of Engineering, Tottori University, Tottori 680-8552

ABSTRACT

Legumes can effectively utilize atmospheric nitrogen by symbiosis with rhizobia. The reduction of usage of nitrogen fertilizer, therefore, would be feasible by promoting legume-rhizobia symbiosis. In this study, we conducted basic research on the promotion effect of chitin nanofibers (NF) on rhizobial symbiosis in a main legume crop soybean, providing the fundamental knowledge for development of utilization technology of chitin NF to reduce the use of fertilizer on soybean cultivation. The addition of chitin NF promoted the growth of the aerial part of the soybean inoculated with rhizobia, as shown previous study in *Lotus japonicus*. We newly found that the treatment of chitin NF increases nitrogen fixation ability as acetylene reduction activity. Transcriptome analysis of soybean treated with chitin NF demonstrated that there are many genes specifically induced by chitin NF. Of those, expression levels of genes involved in the maintenance of nitrogen fixation, like transcriptional regulators related to signal transduction of jasmonic acid, and leghemoglobin, were increased. These results revealed that the chitin NF-specific promotion effect on rhizobial symbiosis is widely common among legumes, and that this effect is caused by the activation of nitrogen fixing ability of symbiotic rhizobia. *Soy Protein Research, Japan* **20**, 31-36, 2017.

*〒680-8553 鳥取市湖山町南4丁目101番地

Key words : chitin nanofiber, nitrogen fixation, soybean-rhizobia symbiosis, transcriptome

キチンはN-アセチルグルコサミンが直鎖状に連なった高分子多糖類であり、カニやエビなどの甲殻類の殻、およびきのこなどの菌類の細胞壁の主成分である。植物にはキチンを認識する能力があり、キチンの認識により植物は病害抵抗性を誘導できるだけでなく、共生土壌微生物である根粒菌が分泌するキチン骨格をもつ物質を認識し、共生関係を成立させている^{1),2)}。

我々は、キチンを高分子のままナノレベルの繊維にした新素材キチンナノファイバー (NF) の製造技術を独自に開発し³⁾、本素材がもつ植物に対する機能について研究を行ってきた^{4),5)}。その過程で、本素材の処理によりマメ科植物ミヤコグサにおいて根粒共生による窒素固定能を飛躍的に増強できるという独自の知見を得た。近年、化学肥料の大量投入による様々な問題が生じていることから、減肥料農業を実現できる新しい技術が強く求められている。マメ科植物は根粒菌との共生により大気中の窒素を効率的に利用できることから、キチンNFを用いて本共生を促進することで、窒素肥料削減が実現可能であると期待される。

本研究では、マメ科の主要作物であるダイズを対象に、キチンNFによる窒素固定能の促進効果に関する基礎研究を行うことで、ダイズの減肥料農業が実現可能な本素材の利用技術を開発するための基盤となる知見を得ることを目的とした。

方 法

キチンオリゴ糖溶液・キチンナノファイバー分散液の調製

キチンオリゴ糖溶液は、キチンオリゴ糖 (焼津水産化学工業NA-COS-Y) に蒸留水を1%(w/v)になるように添加し、スターラーで一晩攪拌して溶解させ、調製した。キチンNFは既往の論文に従い製造し⁶⁾、1%(w/v)の水分散液を得た。

根粒共生させたダイズにおけるキチン類の処理効果の評価

ダイズ (品種:エンレイ) は、川砂とバーミキュライトを2:1で混合したものを培土として生育させた。キチンオリゴ糖とキチンNFの処理は、体積あたり0.01%になるよう培土と混合することにより行った。根粒共生は、無施肥で生育した播種後1週間の植物に根粒菌である*Bradyrhizobium japonicum* (USDA110

菌株) を接種することで行った。根粒菌の接種後4週間の植物体について、地上部と根の長さおよび乾重量、根粒数ならびに根粒の大きさを測定した。菌根菌の接種後4週間の植物体について、地上部と地下部の長さならびに乾重量を測定した。

根粒菌の窒素固定能はアセチレン還元法⁷⁾を用いて調査した。根粒菌接種後4週間のダイズにおける根粒数を計測後、根を密封可能なバイアルに入れ、アセチレンガスを注入して30分間インキュベート後、ガスクロマトグラフ (GLサイエンスGC-4000) により生成したエチレン量を測定し、根粒あたりのアセチレン還元活性を算出した。

キチン類を処理したダイズのトランスクリプトーム解析

滅菌したダイズ (品種:エンレイ) の種子を、バーミキュライト上で保湿しながら発芽させ、1週間後の芽生えを0.01%(w/v)のキチンオリゴ糖水溶液もしくはキチンNF水分散液に1時間浸漬処理した。同様にコントロールのサンプルは蒸留水に浸漬した。これらのサンプルよりTotal RNAを抽出し、次世代シーケンサー (イルミナHiSeq1500) を用いたRNA-seqを行った。Tophatを用いて得られたリード配列をダイズのリファレンスゲノム配列 (Glycine max v1.0) にマッピングし、Cufflinksを用いてFPKM値を算出し、Cuffdiffを用いて発現変動遺伝子 (DEG) の情報を得た (FDR adjusted p -value < 0.05)。各遺伝子のアノテーション情報には、LegumeIPより得たダイズのGene Ontology Annotation Data Set (Release 1.1)を用いた。

結果と考察

キチンナノファイバーによるダイズにおける根粒共生による窒素固定能の促進効果

キチンオリゴ糖、もしくはキチンNFを添加した無栄養の培土にダイズを播種し、1週間後に根粒菌を接種し、4週間栽培後の植物体について、地上部と根について長さおよび乾重量を測定した (Fig. 1)。その結果、キチンNF処理では地上部の成長が有意に促進されたが、一方で根の成長が抑制された。また、キチンNFより劣るがキチンオリゴ糖処理でも地上部の成長が促進された。一方で、キチンオリゴ糖処理により根の成長が有意に促進された。同じマメ科植物であるミヤ

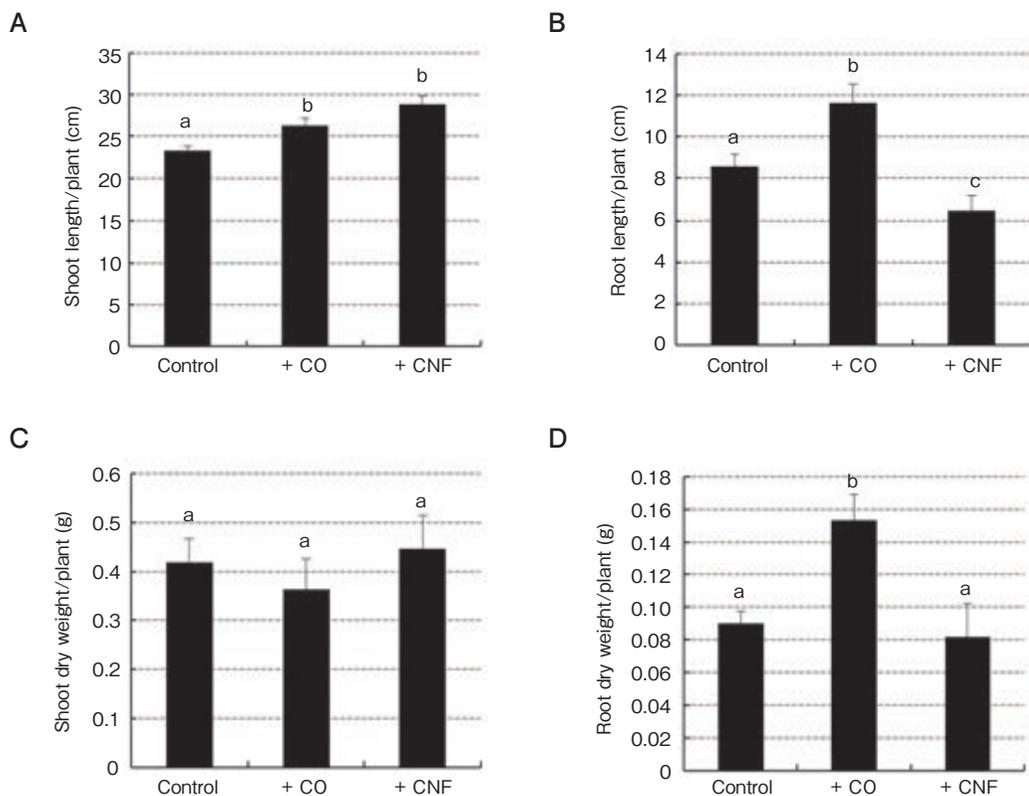


Fig. 1. Effects of chitin oligomers (CO) and chitin nanofibers (CNF) on the growth of soybean inoculated with rhizobia. The seedlings of soybean grown in non-nutrient soils with 0.01% (w/v) CO or CNF for 1 week were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Shoot length (A), root length (B), shoot dry weight (C), and root dry weight (D) were measured 4 weeks after inoculation. Vertical bars represent mean \pm SE (n > 6). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, two-tailed t -tests).

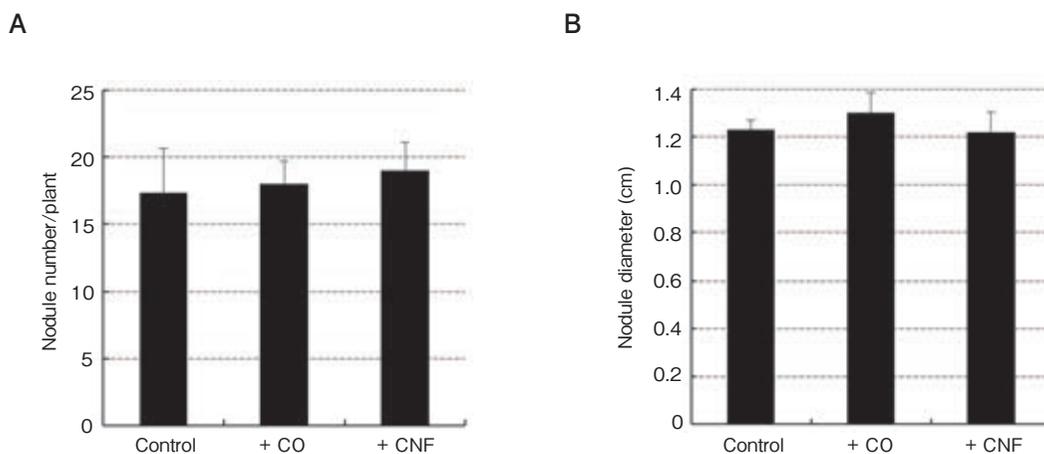


Fig. 2. Effects of chitin oligomers (CO) and chitin nanofibers (CNF) on the nodulation in soybean inoculated with rhizobia. Rhizobia inoculation and chitin treatments were performed as described in Fig. 1. Nodules number (A) and diameter (B) were measured 4 weeks after inoculation. Vertical bars represent mean \pm SE (A: n \geq 25, B: n = 3).

コグサで同様の試験をした結果では、キチンNF処理でのみ地上部の成長促進効果が観察されている（未発表）。キチンオリゴ糖処理では、ダイズ自身の成長が促進される傾向があったことから、キチンオリゴ糖による地上部の成長促進効果は根粒共生に非依存的である可能性が示唆された。

また、根粒数ならびに根粒の大きさの測定を行ったが、ミヤコグサでの試験結果と同様にキチン類の処理の有無で全く変化が見られなかった（Fig. 2）。そのため、キチンNFによる根粒共生の促進効果には、植物の根粒形成機構が関与していないと考えられた。そこで、アセチレン還元法を用いて根粒菌の窒素固定能を調査した（Fig. 3）。その結果、キチンNF処理のみにより劇的にアセチレン還元活性が増加した。つまり、キチンNFによる根粒共生の促進効果の要因が、根粒菌の共生窒素固定能の活性化であることが明らかになった。同様の結果がミヤコグサでも得られたことから（未発表）、キチンNFに特異的な根粒共生の促進効果は、マメ科植物に広く共通であるといえる。

キチンナノファイバーによる窒素固定能促進の分子メカニズムの解明

キチンNFが根粒菌の共生窒素固定に作用していることが明らかになったが、高分子キチンからなるキチンNFは植物に取り込まれないと考えられるため、植物の共生細胞内の根粒菌に直接作用しているとは考えにくい。そこで、キチンNFによる作用機構を明らかにするために、キチン類を処理したダイズに関してトランスクリプトーム解析を行った。その結果、キチンオリゴ糖処理と比較して、キチンNF処理により有意に発現量が変動する遺伝子の数が劇的に多いことが示された（Fig. 4）。キチンオリゴ糖処理のDEGの多くがキチンNF処理でも誘導されたことから、キチンNFにより特異的に誘導される遺伝子が多く存在するといえる。これらの中には、ジャスモン酸の合成に関わるLipoxygenaseや、ジャスモン酸のシグナル伝達に関わる転写制御因子MYC2とJAZをそれぞれコードする遺伝子が多く存在した（Table 1）。マメ科のゲンゲにおいてレグヘモグロビンと相互作用するJAZたん白質の発現抑制により、窒素固定能が低下すると報告されている⁸⁾。根粒菌の窒素固定を担うニトロゲナーゼは嫌気条件でのみ機能するため、マメ科植物は酸素と結合するレグヘモグロビンを根粒菌感染細胞内で大量に生産することで、ニトロゲナーゼの失活を防いでいる。ミヤコグサにおいてレグヘモグロビンの過剰発現により窒素固定能が高まるが⁹⁾、レグヘモグロビンをコー

ドする遺伝子（GLYMA14G20380）の発現量がキチンナノファイバー処理でのみ増加した。これらの結果から、マメ科植物はキチンNFを特異的に認識することでジャスモン酸の合成やシグナル伝達系が活性化され、それによりレグヘモグロビンの安定化や発現量の増加が起こることで、根粒菌のニトロゲナーゼの活性が維持され、結果として窒素固定能が促進されていることが示唆された。

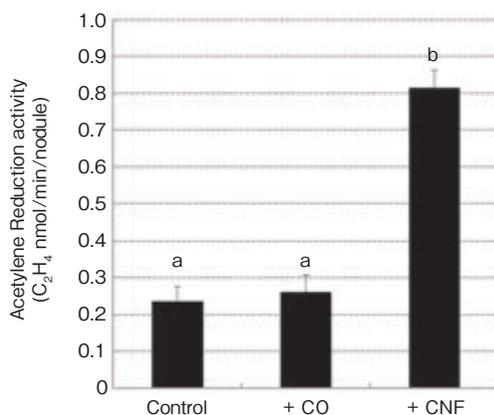


Fig. 3. Effects of chitin oligomers (CO) and chitin nanofibers (CNF) on nitrogen fixation in soybean inoculated with rhizobia. Rhizobia inoculation and chitin treatments were performed as described in Fig. 1. Nitrogen fixation ability was examined by acetylene reduction assay. Vertical bars represent mean \pm SE ($n \geq 5$). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, two-tailed t -tests).

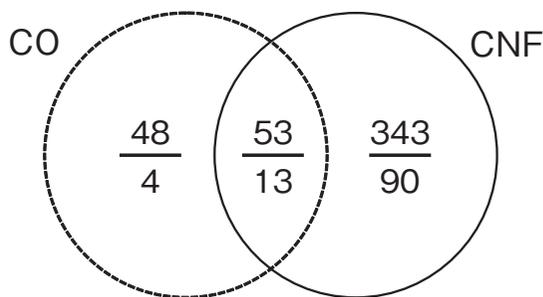


Fig. 4. Venn diagram showing numbers of unique and overlapping changes in upregulated (upper) and downregulated (lower) DEGs identified by pairwise comparisons between control and chitin treatments with chitin oligomers (CO) or chitin nanofibers (CNF).

Table 1. Genes for jasmonic acid biosynthesis and signaling upregulated by chitin treatments with chitin oligomers (CO) and chitin nanofibers (CNF)

Description	Gene ID	log2 (fold change)	
		CO/Control	CNF/Control
Lipoxygenase	GLYMA19G45280	1.28041	1.62391
	GLYMA02G26160	0.63915	1.20847
	GLYMA07G04480	0.66531	0.93335
Transcription factor MYC2	GLYMA09G07391	0.90168	1.89404
	GLYMA15G18580	1.22726	1.83397
	GLYMA17G06190	0.43925	1.75527
	GLYMA17G06610	0.77273	1.05697
Jasmonate ZIM (JAZ) domain-containing protein	GLYMA15G19840	0.35140	0.91639
	GLYMA09G08290	0.44574	0.91287
	GLYMA13G17180	0.32384	0.81402

本研究により、ダイズを含めたマメ科植物におけるキチンNFによる窒素固定能の促進効果に関して、その要因と作用機構に関する重要な知見を得ることができた。基礎研究としてはまだ詰めるべき部分もあるが、

本研究知見を基にキチンNFをダイズの栽培時に添加することで、減肥料農業が実現可能な本素材の利用技術が開発可能であると期待される。

要 約

マメ科植物は根粒菌との共生により大気中の窒素を効率的に利用できることから、本共生の促進により窒素肥料削減が実現可能であるといえる。本研究では、マメ科の主要作物であるダイズを対象に、キチンナノファイバー (NF) による根粒共生の促進効果に関する基礎研究を行うことで、ダイズの減肥料農業が実現可能な本素材の利用技術を開発するための基盤となる知見を得ることを目的とした。キチンNFの添加により、根粒菌を接種したダイズにおいてミヤコグサでの先行研究と同様に地上部の成長が促進されるとともに、窒素固定能が劇的に高まることが新たにわかった。キチンNF処理したダイズについてトランスクリプトーム解析を行った結果、キチンNFにより特異的に誘導される遺伝子が多く存在すること、および窒素固定能の維持に関わるジャスモン酸のシグナル伝達に関わる転写制御因子やレグヘモグロビンの遺伝子の発現量が増加することが示された。これらの結果から、キチンNFに特異的な根粒共生の促進効果がマメ科植物に広く共通であること、ならびにその効果の要因が根粒菌の共生窒素固定能の活性化であることが明らかになった。

文 献

- 1) 川崎努 (2013) : 植物における免疫誘導と病原微生物の感染戦略, 領域融合レビュー, **2**, e008.
- 2) 林誠 (2015) : 植物の窒素固定: 植物と窒素固定細菌との共生の進化, 領域融合レビュー, **4**, e010.
- 3) Ifuku S and Saimoto H (2012): Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications. *Nanoscale*, **4**, 3308-3318.
- 4) Egusa M, Matsui H, Urakami T, Okuda S, Ifuku S, Nakagami H and Kaminaka H (2015): Chitin nanofiber elucidates the elicitor activity of polymeric chitin in plants. *Front Plant Sci*, **6**, 1098.
- 5) 伊福伸介, 阿部賢太郎, 上中弘典 (2016) : キチンナノファイバーの製造と応用開発, キチン・キトサンの最新科学技術-機能性ファイバーと最先端医療材料-, キチン・キトサン学会編, 技報堂出版, 東京, pp. 125-139.
- 6) Ifuku S, Nogi M, Abe K, Yoshioka M, Morimoto M, Saimoto H and Yano H (2009): Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as α -chitin from crab shells. *Biomacromolecules*, **10**, 1584-1588.
- 7) 浅沼修一 (1992) : 窒素固定活性の測定と窒素固定菌の計数, 分離, 新編土壤微生物実験法, 日本土壤微生物学会編, 養賢堂, 東京, pp. 224-297.
- 8) Li Y, Xu M, Wang N and Li Y (2015): A JAZ protein in *Astragalus sinicus* interacts with a leghemoglobin through the TIFY domain and is involved in nodule development and nitrogen fixation. *PLoS One*, **10**, e0139964.
- 9) Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S and Uchiumi T. (2009): Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J*, **57**, 254-263.