

植物と微生物の共創による超個体の覚醒

領域番号:21B307

令和03年度～令和05年度
科学研究費助成事業(科学研究費補助金)
(学術変革領域研究(B))
研究成果報告書

令和06年05月

領域代表者 晝間 敬
東京大学・総合文化研究科・准教授

はしがき

植物は周囲の多種多様な微生物と相互作用しており、それら微生物の中には植物の第2の根のように働くことで植物に栄養を供給するものや、植物免疫を補完する形で植物を病原菌から保護するものなど、いわば植物と一体化し一つの生命体「超個体」として機能するものが存在する。本学術変革領域「植物超個体の覚醒」においては、陸上植物と根圏および葉圏の微生物とが一つの生命体として親密に相互作用することで覚醒する植物の環境適応能力を、植物生理学と植物微生物相互作用の分野を融合させることで暴き出すことを狙った。

計画研究は、**晝間、峯、宮島**が代表を務めた。**晝間班**は、分担者の大森、**宮島**および**宮島班**の**杉田**と共に、根圏糸状菌*Colletotrichum tofieldiae* (Ct)が発揮する共生から病原と対照的かつ連続的な感染様式を左右する植物および菌側の遺伝子基盤を明らかにした(Hiruma et al., Nat Commun 2023)。また、Ctがリン欠乏だけでなく窒素欠乏で菌糸を介して窒素を植物へと供給し植物成長を促すこと、および、Ctが植物根に細菌群を誘引し、それらと協調的に植物成長を促すことを発見した(投稿準備中)。**峯**は、**宮島班**の**戸田**とともに深層学習を用いた気孔開度の非破壊的な自動計測システムの開発し(Takagi, Hirata et al., PCP: Hirata, Takagi et al., J Vis Exp 2024)、葉圏細菌の中からこれまで病原菌の専売特許だと考えられてきた気孔開閉制御を行い、植物の成長を促すユニークな細菌を発見した(投稿準備中)。**宮島**は、分担者の**杉田**とともに、蛍光イメージングによる植物と微生物両者の時空間動態の可視化とRIイメージングによる元素動態の可視化を両立する新技術「超個体イメージャー」の開発に成功し、植物—微生物間の物質動態の解明への扉を開いた。

研究組織

領域代表者 晝間 敬 (東京大学・総合文化研究科・准教授)

(総括班)

研究代表者 晝間 敬 (東京大学・総合文化研究科・准教授)

研究分担者 宮島 俊介 (石川県立大学・生物資源環境学部・講師)

研究分担者 峯彰 (京都大学・農学研究科・准教授)

(計画研究班)

晝間班 (根圏微生物との超個体化が覚醒させる植物の貧栄養適応機構)

研究代表者 晝間 敬 (東京大学・総合文化研究科・准教授)

研究分担者 田畑 亮 (名古屋大学・生命農学研究科・特任講師)

研究分担者 大森 良弘 (東京大学・農学生命科学研究科・准教授)

宮島班(超個体化における植物全身応答とその動態を暴き出す超個体イメージャーの構築)

研究代表者 宮島 俊介 (石川県立大学・生物資源環境学部・講師)

研究分担者 戸田 陽介 (名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・招へい教員)

研究分担者 杉田 亮平 (名古屋大学・アイソトープ総合センター・講師)

峯班(葉圏細菌との超個体化による植物の気孔動態制御と環境適応)

研究代表者 峯彰 (東京大学・農学生命科学研究科・准教授)

交付決定額

領域全体

			単位 (千円)
	合計	直接経費	間接経費
21年度	45,500	35,000	10,500
22年度	45,500	35,000	10,500
23年度	45,500	35,000	10,500

総括班

			単位 (千円)
	合計	直接経費	間接経費
21年度	520	400	120
22年度	910	700	210
23年度	520	400	120

晝間班

			単位 (千円)
	合計	直接経費	間接経費
21年度	16,250	12,500	3,750
22年度	16,380	12,600	3,780
23年度	16,770	12,900	3,870

宮島班

			単位 (千円)
	合計	直接経費	間接経費
2 1 年度	17,810	13,700	4,110
2 2 年度	17,290	13,300	3,990
2 3 年度	17,290	13,300	3,990

峯班

			単位 (千円)
	合計	直接経費	間接経費
2 1 年度	10,920	8,400	2,520
2 2 年度	10,920	8,400	2,520
2 3 年度	10,920	8,400	2,520

研究発表

雑誌論文 (全て査読あり、太字は領域メンバー)

1. 杉田亮平 放射性トレーサーを用いた植物体内元素のライブイメージング装置の開発 3 巻 1 号 p. 9-13 <https://doi.org/10.5685/plmorphol.33.9>.
2. Utami, Y and **Hiruma, K** (2022). Genome Resource of *Colletotrichum spaethianum*, the Causal Agent of Leaf Anthracnose in *Polygonatum falcatum*. the Causal Agent of Leaf Anthracnose in *Polygonatum falcatum*. *PhytoFrontiers*. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-12-21-0082-A>, March, 2022.
3. **Tabata, R.**, Kamiya, T., Imoto, S., Tamura, H., Ikuta, K., Tabata, M., Hirayama, T., Tsukagoshi, H., Tanoi, K., Suzuki, T., Hachiya, T., and Sakakibara, H. (2022). Plant and Cell Physiology, Volume 63, Issue 6, Pages 842–854, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac049>
4. **Takagi, M.**, Hotamori, K., Matsukawa, S., Egusa, M., Nishizawa, Y., Kanno, Y., Seo, Mitsunori., Ifuku, Shinsuke., Mine, A., Kaminaka, H. Chitin-induced systemic disease resistance in rice requires both OsCERK1 and OsCEBiP and is mediated via perturbation of cell-wall biogenesis in leave (2022). *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2022.1064628
5. Mukai, M., **Hiruma, K.**, Nishigaki, T. et al (2022). Dysbiosis of the rhizosphere microbiome caused by γ -irradiation alters the composition of root exudates and reduces phosphorus uptake by rice in flooded soils. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05726-5>
6. Utami, Y.D., Nguyen, T.A.N. & **Hiruma, K** (2022). Investigating plant–microbe interactions within the root. *Arch Microbiol* 204, 639. <https://doi.org/10.1007/s00203-022->

[03257-2](#)

7. Noda, Y., **Sugita, R.**, Hirose, A., Kawachi, N., Tanoi, K., Furukawa, J., Naito, K. (2022). Diversity of Na⁺ allocation in salt-tolerant species of the genus *Vigna*. *Breeding Science* Vol. 72 (2022), No. 4. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.22012>.
8. Kurita, Y., Kanno, S., **Sugita, R.** et al (2022). Visualization of phosphorus re-translocation and phosphate transporter expression profiles in a shortened annual cycle system of poplar. *Plant, Cell and Environment* 45 6 1749-1764. <https://doi.org/10.1111/pce.14319>.
9. **Hiruma, K.**, Aoki, S., Takino, J., **Higa, T.**, Utami, Y. D., Shiina, A., Okamoto, M., Nakamura, M., Kawamura, N., **Ohmori, Y.**, **Sugita, R.**, Tanoi, K., Sato, T., Oikawa, H., Minami, A., Iwasaki, W., Saijo, Y. (2023). A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in *Colletotrichum tofieldiae*. *Nat Commun* 14, 5288. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40867-w>
10. Suetsugu Kenji, **Sugita Ryohei**, Yoshihara Akiko, Okada Hidehito, Akita Kae, Nagata Noriko, Tanoi Keitaro, Kobayashi Koichi (2023). Aerial roots of the leafless epiphytic orchid *Taeniophyllum* are specialized for performing crassulacean acid metabolism photosynthesis. *New Phytology* 238 3 932-937. <https://doi.org/10.1111/nph.18812>.
11. Huang, C., Kurotani, K., **Tabata, R.**, Nobutaka, M., **Sugita, R.** et al. (2023). *Nicotiana benthamiana* XYLEM CYSTEINE PROTEASE genes facilitate tracheary element formation in interfamily grafting. *Horticulture Research* Volume 10, Issue 6. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad072>.
12. Nagatoshi, Y., Ikazaki, K., Kobayashi, Y., Mizuno, N., **Sugita, R.** et al. (2023). Phosphate starvation response precedes abscisic acid response under progressive mild drought in plants. *Nat Commun* 14, 5047 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40773-1>
13. **Tabata, R.** (2023). Regulation of the iron-deficiency response by IMA/FEP peptide. *Frontiers in Plant Science* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1107405>
14. Nguyen, T. A., **Higa, T.**, Shiina, A., Utami, Y. D., **Hiruma, K.** (2023). Exploring the roles of fungal-derived secondary metabolites in plant-fungal interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, in press. Special issue: The 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology
15. **Takagi, M.**, **Hirata, R.**, Aihara, Yusuke, Hayashi, Y., Mizutani-Aihara, M., Ando, E., Yoshimura-Kono, M., Tomiyama, M., Kinoshita, T., **Mine, A.**, **Toda, Y.** Image-Based Quantification of *Arabidopsis thaliana* Stomatal Aperture from Leaf Images (2023). *Plant and Cell Physiology* 64-11. 1301-1310. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad018>.

16. Fujiwara, M., Imamura, M., Matsushita, K., Roszak, P., Yamashino, T., Hosokawa, Y., Nakajima, K., Fujimoto, K and **Miyashima, S** (2023). Patterned proliferation orients tissue-wide stress to control root vascular symmetry in Arabidopsis. *Current Biology* 33,5 886-898.
17. **Hirata, R., Takagi, M., Toda, Y., Mine, A** (2024). Direct Observation and Automated Measurement of Stomatal Responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Visualized Experiments*. DOI: 10.3791/66112.
18. Entila, F., Han, X., **Mine, A.** et al (2024). Commensal lifestyle regulated by a negative feedback loop between Arabidopsis ROS and the bacterial T2SS. *Nat Commun* 15, 456. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44724-2>
19. Yamada, K and **Mine, A.** Sugar coordinates plant defense signaling (2024). *Science Advances* 10-4 DOI: 10.1126/sciadv.adk4131.

学会発表 (太字は領域メンバー)

1. 比嘉毅、中村雅美、**晝間敬** 糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* における病原/共生型株の宿主根植物の侵入様式の比較 植物病理学会全国大会 (2023)
2. 椎名昭斗、瀧野純矢、中村雅未、及川英秋、南篤志、**晝間敬** 寄生型の *Colletotrichum tofieldiae* における二次代謝物産生クラスター ABA-Botrydial の機能解析 植物病理学会全国大会 (2023)
3. Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, **Kei Hiruma** Plant tryptophan metabolism pathway is crucial for plant growth promotion by *Colletotrichum tofieldiae* under nitrogen deficiency 植物病理学会全国大会 (2023)
4. **晝間敬** 栄養をめぐる植物と微生物の超個体化現象を紐解く 日本植物学会第86回大会 (2022)
5. **Kei Hiruma** A comparative functional analysis of closely-related plant mutualistic and parasitic fungi 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology(招待講演)(国際学会) (2022)
6. Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, **Kei Hiruma** Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* promotes brassica plant growth and recruits beneficial bacteria to roots under nitrogen-limiting conditions 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology(招待講演)(国際学会) (2022)
7. 岩附利英、橋本将、Yuniar Devi Utami, 田中健太、**晝間敬** リン欠乏土壌に自生するアブラナ科植物から単離された *Colletotrichum* 属菌によるシロイヌナズナの生長促進作用

- 日本植物病理学会大会 (2022)
8. **晝間敬** 寄生型の*Colletotrichum tofieldiae*は高温条件ではシロイヌナズナの植物生長を促す 日本植物病理学会大会 (2022)
 9. **Kei Hiruma** Activation of fungal ABA biosynthetic cluster genes switches a beneficial plant fungus to a pathogen IPSR International Plant Web Forum 2021(招待講演)(国際学会) (2021)
 10. **晝間敬** 根圏糸状菌・細菌との超個体化により覚醒するアブラナ科植物の貧栄養適応能 日本植物学会第87回大会 (2023)
 11. Tan Anh Nhi Nguyen, Yuniar Devi Utami, Masami Nakamura, **Kei Hiruma**. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* promotes plant growth and recruits beneficial bacteria to roots under laboratory and field conditions with nitrogen deficiency. International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023). Chiba, Japan. (2023)
 12. Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, Koji Tokunaga, **Kei Hiruma** Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Recruits Beneficial Bacteria to Roots and Promotes Plant Growth By Facilitating Plant Nitrogen Uptake Under Nitrogen-Limiting Conditions 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
 13. **比嘉毅**, 中村雅未, **晝間敬** 糸状菌*Colletotrichum tofieldiae*の病原/共生型株による宿主シロイヌナズナ根への侵入様式の比較 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
 14. 渡邊大祐, 杉田亮平, 奥村将樹, 相馬愛, 田野井慶太郎, **晝間敬** 植物免疫および栄養交換に着目したリン濃度依存的な共生関係制御メカニズムの探索 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
 15. 徳永光治, Utami Yuniar Devi, Nhi Nguyen Tan Anh, **晝間敬** 植物-糸状菌-細菌の三者間共生関係の様態理解にむけて 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
 16. 岡崎 まなみ, **晝間敬** 共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* とシロイヌナズナのリン濃度依存的共生樹立基盤の探索 日本植物学会第87回大会 (2023)
 17. **宮島 俊介** 蛍光寿命イメージングによる根の対微生物応答の時空間ダイナミクスの解明 第63回 日本植物生理学会年会 (2022)
 18. 杉田亮平, 小林奈通子, 中西友子, 田野井慶太郎 放射線イメージングによる根の養分ダイナミクスの解明 第63回 日本植物生理学会年会 (2022)
 19. **戸田陽介** リモートでもオンサイトでも:植物の生理応答を定量化する技術の開発と適用 第63回 日本植物生理学会年会 (2022)
 20. 岩井雅斗, **宮島俊介**, 中島敬二 シロイヌナズナの根におけるキチン応答の組織特異性とその病害抵抗性における機能 第85回 日本植物学会年会 (2021)

21. 杉田 亮平, 小林 奈通子, 廣瀬 農, 岩田 錬, 鈴木 寿, 田野井 慶太郎, 中西 友子 リアルタイムRIイメージングを用いた光の変化がイネの元素動態に与える影響の解析 アイソトープ研究発表会 (2021)
22. 高木桃子, 平田梨佳子, 相原悠介, 林優紀, 水谷未耶, 安藤英伍, 河野(吉村)恵実, 富山将和, 木下俊則, 峯彰, 戸田陽介 ディープラーニングを用いたシロイヌナズナの気孔開度自動定量技術の開発 第64回 日本植物生理学会年会 (2023)
23. 高木桃子, 岡崎まなみ, Xinpeng Liu, 晝間敬, 大倉史生, 戸田陽介 機械学習を用いた画像解析によるシロイヌナズナ根の表現型定量技術の開発 第65回 日本植物生理学会年会 (2024)
24. 戸田陽介 Recent Methods in Stomatal Trait Phenotyping 第65回 日本植物生理学会年会 (2024)
25. 杉田亮平 植物体内における元素動態の非破壊RIイメージング技術の開発 第60回アイソトープ放射線研究発表会 (2023)
26. 宮島俊介 根冠が駆動する対土壤微生物応答とその動態 日本植物学会 第87回大会 (2023)
27. 宮島俊介 根冠の組織形成が創発する根の防御応答の時空間制御とその動態 第65回 日本植物生理学会年会 (2024)
28. 峯彰 病原型・共生型の葉圏細菌による植物の気孔動態制御 日本植物学会第87回大会 (2023)
29. 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、峯彰 共生細菌 *Pseudomonas paralactis* による気孔開口と植物の生育促進の関係性について 日本植物学会第87回大会 (2023)
30. 高木 桃子、平田 梨佳子、相原 悠介、林 優紀、水谷 未耶、安藤 英伍、河野(吉村) 恵実、富山 将和、岡崎まなみ、Liu Xinpeng、晝間 敬、大倉 史生、木下 俊則、峯 彰、戸田 陽介 画像解析によるシロイヌナズナ気孔・根の表現型定量技術 の実装と運用 日本植物学会第87回大会 (2023)
31. 山田(山下)美鈴、峯彰、山田晃嗣 糖シグナルを介した新規防御因子の同定 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
32. 坂田悠夏、三瀬和之、高野義孝、峯彰 高湿度による植物免疫の抑制におけるTrihelix 転写因子の役割 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
33. 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、峯彰 葉に棲息し気孔動態を制御する細菌が植物に与える有益な影響 第65回日本植物生理学会年会 (2024)
34. 坂田悠夏、三瀬和之、高野義孝、峯彰 高湿度による植物免疫の抑制におけるTrihelix

- 転写因子の役割 令和6年度日本植物病理学会大会 (2024)
35. 山田晃嗣、**峯彰** 糖は植物免疫シグナルを増強させる 令和4年度日本植物病理学会関西西部会 (2022)
 36. **峯彰** 時系列RNA-seqデータのネットワーク解析から紐解く変動環境下の植物-病原細菌相互作用 第35回微生物生態学会(招待講演) (2022)
 37. 山田晃嗣、**峯彰** 糖はプロテインキナーゼの活性化を介して防御応答を活性化させる 第64回日本植物生理学会年会 (2023)
 38. 平田梨佳子、高木桃子、Yuniar Devi Utami、晝間敬、戸田陽介、**峯彰** 共生細菌 *Pseudomonas paralactis*による気孔動態制御メカニズムの解明に向けて 第64回日本植物生理学会年会 (2023)
 39. 山田晃嗣、**峯彰** 糖吸収は防御応答を増強させる 第63回日本植物生理学会年会 (2022)
 40. **峯彰**、松本歩、石川真太郎、竹田篤史、三瀬和之、高野義孝 高温と高湿度は細菌の栄養獲得に関わる遺伝子発現に影響を与え病原性を高める 令和4年度日本植物病理学会全国大会 (2022)

図書

1. Yuniar Devi Utami, **晝間敬** 株式会社エヌ・ティー・エス メタオミクス解析を活用した植物有用微生物の単離同定 (2022)

受賞

1. 晝間 敬、日本植物生理学会奨励賞 (2024)
2. 峯 彰、日本農学進歩賞 (2021)

その他

領域ホームページ

<https://www.kakusei-plant.com>

研究成果のホームページ

https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z0109_00091.html

<https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2023/04/post-494.html>

<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2023-04-27-2>

研究成果

晝間班

1. 研究開始当初の背景

植物は野外環境で細菌や糸状菌といった多種多様な内生微生物と相互作用している。内生微生物の中には植物の根に定着して植物と一体化する過程で超個体化することで貧栄養などの植物にとってのストレス環境で植物の成長に寄与することが明らかになっている。これらの微生物を利活用することは環境に負荷をかけない形で植物成長を促す技術を開発する意味でも重要となってきた。しかしながら、特定の微生物が他の微生物も存在する環境下において植物成長を促す際に重要となる植物および微生物側の遺伝子基盤の詳細は明らかではない。

研究代表者は、これまでに、アブラナ科植物に内生する糸状菌の研究を行っている。その中で、モデル植物シロイヌナズナを宿主とする内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) が植物の根に感染し、リンが枯渇した環境下では菌糸を介してリンを植物へと供給し、植物成長を促すことを発見した (Hiruma et al., Cell 2016)。一方で、多様な微生物が存在する野外環境においてCtによる植物成長促進などの共生効果が認められるかについてはこれまで不明であった。予備的な研究により、Ctが実験室環境だけでなく野外環境でも植物成長促進を促し、その際の土壌栄養について、可溶性リンは十分量存在するものの、可溶性窒素が顕著に枯渇していたことが判明している。このことから、Ctはリン欠乏だけではなく窒素が欠乏した環境においても植物成長を促すことが推察された。

2. 研究の目的

本研究においては、圃場環境でも認められたCtによる窒素枯渇時の顕著な植物成長についてさらなる圃場試験により検証するとともに、その植物成長促進機構を制御空間内での実験系を構築する中で明らかにすることで、貧栄養環境で植物と糸状菌との超個体化が生み出す植物の環境適応機構を理解する。

3. 研究の方法

長野県の窒素が枯渇した実験圃場にてCtがコマツナの成長を促すかについて複数年度に渡る試験を行うことで検証した。次に、可溶性窒素が枯渇した土壌およびアガー条件を構築し

て、そこでCtがシロイヌナズナなどのアブラナ科植物の成長を促すかどうかを検証した。本実験系をベースにCtが菌糸を介して植物に窒素を供給するかどうかを調査した。植物の硝酸吸収に関わるトランスポーターの変異体を用いた遺伝学的解析を行い、硝酸トランスポーターがCtによる植物成長促進に必要であるかを検証した。Ctをあらかじめ根に定着させることで他の根圏微生物叢の構成に影響を与えるかどうかを16S/ITSメタ解析を用いて検証した。実際にCtの定着根から細菌を単離して、それらの細菌が単独およびCtとの共接種時に植物成長に与える影響を調査した。

4. 研究成果

1. Ctは可溶性窒素が枯渇した異なる圃場条件でコマツナの植物成長を促す

研究代表者は研究開始以前に奈良県生駒市の可溶性窒素が枯渇した実験圃場にてCtがコマツナの成長を促すことを複数年度の実験より明らかにしていた。今回、この発見が他の類似した栄養状況の圃場環境でも認められるかについて検証するために、長野県御代田町の窒素が枯渇した圃場にて同様の試験を複数年度に渡り実施した。その結果、Ctは窒素が枯渇した圃場環境においてコマツナの植物成長を促すことを明らかにした。奈良と長野の圃場は標高、日射量、降水量といった環境要因が大きく異なることから、Ctによる窒素枯渇条件での圃場における植物成長促進効果は安定的に認められる性質であることが示唆された。

2. Ctは窒素枯渇環境下で植物の成長を促し種の数を増加させる

次に、Ctによる窒素が枯渇した環境における植物成長促進のメカニズムを実験室条件で分子遺伝学的手法を用いて探索する目的で、可溶性窒素が枯渇した土壌およびアガー条件を構築して、それぞれの環境でCtがモデル植物シロイヌナズナの成長を促すかどうかを調査した。その結果、Ctは窒素が枯渇した環境では植物成長を促すものの、窒素十分条件においては促さないことが判明し、環境窒素濃度に依存した植物成長促進効果を示すことが明らかになった。さらに、窒素欠乏条件においてはCtによる地上部の成長促進の後に形成される種の量もCt接種時に非接種時と比較して有意に増加することが明らかになった。このことから、Ctは窒素枯渇環境での植物のフィットネスを向上させる共生効果を発揮することが判明した。

3. Ctによる植物成長促進は植物体内の硝酸濃度に依存する

Ctによる植物成長促進効果の仕組みを理解する目的のもと、シロイヌナズナの硝酸吸収に関わるトランスポーター*NRT1.1*に着目し、その欠損変異体におけるCtの植物成長促進効果の度合いを調査した。*NRT1.1*は特に硝酸が十分する環境下での硝酸吸収および植物成長に重要であるが、*nrt1.1*変異体においては野生型植物とは異なり、Ctは窒素が十分ある条件下に

においても植物の成長を促すことが判明した。このことから、Ctによる植物成長促進の有無は植物体内の硝酸の状況に依存して決定されることが示唆された。

4. Ctは菌糸を介して窒素を植物へと供給する

Ctはリンが欠乏した環境で菌糸を介して植物にリンを供給することが判明している。今回、Ctがリンと同様に菌糸を介して植物へと窒素を供給するかどうかを調査する目的で、菌糸に取り込ませた安定同位体 ^{15}N が植物地上部に検出されるかどうかを調査した。 ^{15}N でラベルした硝酸を菌糸だけが存在するコンパートメント(HC)に与えたのちに、HCを培地上から除き植物を移植した17日後のシロイヌナズナの地上部における ^{15}N の存在量を調査した。その結果、Ctを接種した植物は近縁の*C. incanum* (Ci)の場合と比較して有意に高い ^{15}N を植物へと供給することが明らかになった。一方で、硝酸枯渇時の植物による硝酸取り込みに重要な硝酸トランスポーターである*NRT2.1/NRT2.2/NRT2.4/NRT2.5*遺伝子が欠損した変異体においても、Ctを介した ^{15}N の取り込みは野生型植物同様に認められたことから、Ct菌糸からの ^{15}N 受け取りには植物の別の窒素関連のトランスポーターを介して行われていることが考えられた。

5. Ctは植物の硝酸吸収経路を活性化させることでも植物成長を促す

Ctがシロイヌナズナの根に感染中の窒素の吸収に関連するトランスポーター遺伝子の遺伝子発現レベルを調査した。その結果、*NRT2.5*遺伝子がCt感染時に顕著に誘導されていることが判明した。上述の4重変異体において、Ctの菌糸を介した ^{15}N の取り込み量に関しては野生型植物と比較して変化は認められなかったものの、Ct感染時の植物成長促進効果は変異体において有意に低下していたことから、Ctは菌糸を介して窒素を植物に供給することに加えて、何らかのメカニズムで植物の硝酸吸収力を高めることで植物の成長を促進していることが示唆された。

6. Ctは根圏に通常とは異なる細菌叢を誘引し共同で植物成長を促す

Ctが根に定着した際に他の微生物叢に与える影響を網羅的に調査する目的で、Ctが感染した根および非感染の根における細菌叢および糸状菌叢の構成をメタ解析により調査した。その結果、糸状菌叢の構成は有意に変化しなかったものの、細菌叢についてCtが感染した根において有意に変化することが判明した。このことから、Ct定着根においては通常とは異なる細菌集団が共棲していることが示唆された。

Ctが定着したコマツナおよびシロイヌナズナの根から実際に細菌の単離を行ったところ、単離した細菌の中で半数以上において窒素枯渇条件下においてシロイヌナズナの植物成長を促すことが判明した。興味深いことに、その中でもA10と呼ばれるCt菌糸の周囲を移動する能

力を有する細菌については窒素が枯渇した土壌条件においては単独条件では植物成長を示さないにも関わらず、Ctと共接種した際にCt単独区と比較してさらに植物成長が促すことが判明した。遺伝学的解析により、この相加的な植物成長促進効果は植物のNRT2.1/NRT2.2/NRT2.4/NRT2.5のいずれかもしくはいくつかに依存していることが判明した。

7. 窒素枯渇時におけるCtによる植物成長促進には植物のトリプトファン由来の二次代謝物は必須ではない

Ctとシロイヌナズナのリン欠乏環境での共生関係樹立のためには、アブラナ科植物に特異的な植物側のトリプトファン由来の二次代謝物経路が必要で、その経路が欠損したシロイヌナズナの*cyp79b2 cyp79b3*変異体においてはCtの感染量が激増した結果植物は枯死してしまう。本経路が窒素枯渇環境下においても必要であるかどうかを検証するため、窒素枯渇条件下で、*cyp79b2 cyp79b3*変異体にCtを接種して植物の成長を調査したところ、野生型植物と比較してその成長度合いは若干低下するものの、驚くべきことに植物の成長を促すことが明らかになった。さらに、A10の細菌と共接種することで*cyp79b2 cyp79b3*変異体においても野生型植物に対してと遜色ないレベルで植物成長を促すことが判明した。以上の結果は、窒素欠乏環境下かつ他の微生物集団が存在する環境下においては、Ctとシロイヌナズナとの共生関係構築にトリプトファン由来の二次代謝物は必須ではないことが考えられた。

8. Ctは窒素枯渇条件下においてキク科のレタスの植物成長を促した

最後に、Ctが窒素枯渇環境かつ他の微生物が存在する環境でアブラナ科には属さない植物の成長を促すかどうかを検証した。そのために、キク科のレタスにCtを接種して貧栄養環境で植物の成長を調査したところ、Ctはレタスの植物成長を顕著に促すことが判明した。このことから、Ctによる植物成長促進効果にアブラナ科特異的なトリプトファン由来の二次代謝物経路が必ずしも必須ではないことが考えられ、アブラナ科植物を超えた植物種の成長を促す微生物資材としてCtが有用であることが示唆された。スペインから単離されたCt株がメカニズムは不明なものの圃場環境で単子葉植物の成長を促す報告例もこのアイデアをサポートする。

最後に

圃場において認められたCtによる植物成長促進効果は制御環境での実験系と比べても顕著に認められた。圃場および実験室環境で進めてきた本研究により、圃場で認められた顕著な植物成長促進効果はCtが単独で複数の異なる機能を発揮することに加えて、A10のような有用細菌を根圏に誘引し共同で植物成長を促すことによって支えられているためであることが考えられた。このように植物は糸状菌と細菌との超個体化を通じて貧栄養環境での生存を可能と

していることが浮かび上がってきた。今後、この植物-Ct-細菌の3者関係を紐解いてそれを制御する仕組みを明らかにしていく中で、これら微生物を微生物資材として世に出す道筋を見出したい。

宮島班

1. 研究開始当初の背景

植物は葉・根でそれぞれ異なる微生物叢と共生関係を結び、「拡張された超個体」を構築することで、環境適応能力の飛躍的な向上を達成する。この超個体の構築において、植物は葉圏・根圏での局所的に多発する微生物情報を個体全体で統合し、地上部-地下部の器官機能を連動させると考えられる。しかしながら、細胞レベルの解像度で、地上-地下に展開する植物体全体で生じる微生物相互作用や、それにより引き起こされる遺伝子発現変動および植物生理応答の変化を非破壊的に可視化する実験手法は未だ確立されていない。研究代表者は、これまでモデル植物シロイヌナズナを研究材料に、蛍光を用いた生体イメージング技法による遺伝子発現や細胞動態を可視化により、植物の個体発生の分子機構の解明を行ってきた(Miyashima et al., Nature 2019)。本研究では、研究代表者に加え、生体内での分子移動を可視化する RI イメージング技法を有する杉田、さらには、自動学習による画像解析技術を有する戸田とともに研究グループを構成し、植物超個体化現象を可視化・定量化するイメージング技術の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、グループ内の研究者が有する独自の生体イメージング技術および画像解析技術を集結し、植物-微生物相互作用、地上-地下物質輸送、器官成長といった「植物と微生物の超個体化」を読み解く鍵となる現象を、時系列を追って包括的かつ高解像度で可視化する研究プラットフォーム「超個体イメージャー」を構築する事を目標とする。この技術革新から、葉圏・根圏に分断されていた植物微生物相互作用研究を統一し、本研究領域の掲げる「植物超個体機能学」の推進に貢献する。

3. 研究の方法

宿主としてモデル植物シロイヌナズナを用い、地下器官である根に寄生・共生するコレトリカム糸状菌を実験材料として用いた。土壌環境での根やそれと相互作用する糸状菌を細胞レベル可視化するために、第一に、植物体および糸状菌をGFPおよび RFPの異なる蛍光タンパク質によりラベルされた形質転換体を作成した。さらに、土壌環境を再現しつつ非破壊的に可

視化するための専用の観察デバイスを構築し、これらシロイヌナズナおよびコレトリカム糸状菌をデバイス内で数週間共培養した後、蛍光タイリングイメージングにより、根全体に展開する糸状菌の様子を可視化した。続けて、放射線同位体 ^{14}C 炭素からなる二酸化炭素ガス ($^{14}\text{CO}_2$) を与えることで、植物体の光合成により固定された炭素元素が土壤中への移動実体を見出すとともに、蛍光タイリングイメージとの比較から、地上から地下の根および糸状菌菌糸への転流を調査した。さらに、土壤中でのコレトリカム糸状菌との相互作用におけるシロイヌナズナ根の防御二次代謝産物合成に関して、その代謝酵素発現の時空間動態の可視化および制御系の解明を行った。

4. 研究成果

(1) 土壤環境のシロイヌナズナ根系および糸状菌の可視化技術の開発

可視光を透過しない土壤空間での根や微生物を非破壊的に観察するため、透明プラスチックの前面にセロファンシートを張り、内部に土壤を封入した Plant Box を作成した。細胞膜局在型赤色蛍光タンパク質を発現するシロイヌナズナ (*Lti6b_tdTOMATO*) を Plant Box 内で生育させ、セロファンシート越しに根系を約1000枚の蛍光画像に分割し取得、その後、個々の画像をタイリングすることで根系の全体像を可視化することに成功した。次に、GFPを発現するコレトリカム糸状菌 *Colletotrichum incanum* (Ci-GFP) を用い、土壤空間でシロイヌナズナ根に感染した糸状菌の成長を調査した。上記の画像タイリングを用いた手法を用い根系全体のCi-GFP菌糸を細胞レベルで可視化し、さらにはその経時変化を観察した。その結果、シロイヌナズナ根への感染初期に局所的に存在していたCi-GFP菌糸は、菌糸を土壤空間に均一に展開するのではなく、シロイヌナズナ根の成長に沿って菌糸展開することを見出した(図3)。さらに1週間後の感染後期においては、初期の段階で感染が確認された領域において、シロイヌナズナ根の内部組織からCiの分生子が発生する様子も確認された。以上、本研究では、土壤中の根とそれに感染する糸状菌を可視化する技術の構築に成功した。さらには、培養から観察までシームレスに行うことができる Plant Box を用いることで、根や糸状菌の生命活動を長期的な時間単位で経時的に観察することが可能となった。

(2) RIイメージングと蛍光イメージングの統合による根と微生物の介する根圏空間への炭素転流の動態解析

根圏での超個体化においては、ホストとなる植物由来の固定炭素が寄生・共生微生物に栄養源として供給されていると考えられる。炭素元素の空間的移動の可視化には、放射性同位元素を用いた RIイメージングが有効である。糸状菌菌糸のような微細構造を可視化しつつ、固定炭素の移動を可視化するために、上記の蛍光タイリングイメージングと RIイメージングの統合を行った。上記の蛍光タイリングイメージによる根系および糸状菌菌糸の展開を可視化

したのち、放射性同位体 ^{14}C を二酸化炭素ガスの形状で添加することで、根圏への炭素元素の移動を調査した。その結果、植物の地上組織での炭素固定とその後の維管束を通じた地下組織である根への炭素転流は、 ^{14}C 添加後数時間以内に起こることが観察された。また、一方、根から土壌空間に展開する糸状菌への炭素移動の検出には、 ^{14}C 添加後7日程度必要であり、さらに、時間経過と共に、土壌中に展開する菌糸に ^{14}C が移動する様子が観察された。植物の地上部から地下部への炭素元素移動は、光合成の産物としているスクロースなど糖の形状で師部輸送により生じることが知られている。本研究では、根から菌糸への ^{14}C の移動は、地上-地下の輸送に比べ、はるかに時間の要するプロセスであること見出しており、スクロース等の糖以外の形状での炭素移動が推察される。また、本研究が構築した観察技術により、今後、根圏超個体化における土壌空間への炭素移動の実体に迫ると共に、他の植物-微生物相互作用への応用展開も期待される。

(3) シロイヌナズナ根冠は防御二次代謝経路を活性化する糸状菌の感染を抑制する

シロイヌナズナの根は、コレトリカム糸状菌を認識し、トリプトファン由来防御二次代謝経路を活性化することで、糸状菌の感染や増殖など生命動態を適切に制御することで、根圏超個体化を達成する。一方、この防御二次代謝経路の活性化が「いつ・どこで」発生しているか、その時空間動態およびその制御系に関しては不明であった。トリプトファン由来防御二次代謝経路の主要酵素の発現を可視化する蛍光レポーターシステムを作成し、糸状菌接種時の発現変動を調査した。その結果、これら酵素は、糸状菌に応答し、根の先端にある根冠組織で特異的に発現が誘導されることを見出した。さらに、トリプトファン由来防御二次代謝経路の初発酵素の機能欠損体 *cyp79b2 cyp79b3* 背景で、根冠特異的に CYP79B3 酵素の発現を回復させることで、コレトリカム糸状菌の感染を抑制することができることを発見した。これらの発見から、根の先端にある根冠組織が、糸状菌の認識さらにはそれに対する応答をする中枢機能を有し、根圏超個体化の鍵となる組織であることが示唆された。

峯班

1. 研究開始当初の背景

気孔は葉の表面に存在する2つの孔辺細胞に囲まれた自然開口部であり、植物の環境適応において中心的な役割を果たす。例えば、植物は気孔を開くことで光合成に必要な二酸化炭素を取り込むとともに、蒸散を介して全身的な物質転流の駆動力を生み出す。一方で、乾燥環境では気孔を閉じ、水分が失われるのを防ぐ。従来の研究では、環境に応じた気孔の開閉制御を植物の個の力として捉え、その分子機構を明らかにしてきた。次世代シーケンサーを基盤とした技術革新により、健全な植物の葉には多様な細菌が棲息していることが明らかになってきた。これらの葉圏細菌叢に関する研究から、宿主植物の健全な生育を助ける共生

細菌の存在が明らかにされ、農業応用への期待が高まってきた。しかし、これらは無数の共生細菌のごく一部であり、大部分については詳細な解析がなされていなかった。研究代表者は、野外に生育する健全な植物の葉から単離した細菌の中に、気孔の開閉を操作する細菌を複数見出した。この発見に着想を得て、植物は葉圏細菌を拡張された自己として取り込んだ超個体として、葉圏細菌と協働して気孔開閉を調節することで、個の力だけでは発揮できない環境適応能力を覚醒させるという仮説を立証するための研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、学術変革領域研究(B)「植物と微生物の共創による超個体の覚醒」における計画研究として実施した。多様な微生物との超個体化を通じて覚醒される植物の環境適応能の解明を目指す本領域において、本研究は、葉圏細菌との超個体化を介した気孔開閉の仕組みと意義の解明を目的とし、(1) 気孔開度自動測定技術の開発、(2) 葉圏細菌による気孔開閉制御機構の解明、および、(3) 気孔開閉を制御する葉圏細菌が宿主植物の環境適応に与える影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 異なる光条件や化合物を処理することで様々な開度を示すシロイヌナズナの気孔を準備し、その顕微鏡画像を独自に取得した。これらの画像に対して、気孔の位置、開閉および開口領域に関する情報を注釈として付与し、トレーニング用、バリデーション用、テスト用データセットに分けた。次に、シロイヌナズナの気孔開度自動測定を実現するために、物体検出と領域分割から構成される二段階の深層学習アルゴリズムを構築した。物体検出モジュールには、気孔の座標情報を取得するとともに、開いた気孔と閉じた気孔を分類させた。You Only Look Once X(YOLOX) の様々なモデルを上述のトレーニング用データセットを用いて学習させ、バリデーション用データセットに対して高い精度と処理速度を示すモデルYOLOX-sを選択した。領域分割モジュールには、YOLOX-sによって“開いている”と判定された気孔画像から、気孔の開口部位を検出・計測させた。ここでは、バリデーション用データセットに対して、気孔の検出と開口部位の抽出において最も高いパフォーマンスを示したU-Netに基づくモデルを選択した。また、シロイヌナズナの葉を挟み込むことで“非破壊的に”気孔を撮影することが可能なデバイスを開発した。さらに、このデバイスを用いて取得した画像を用いてモデルの再学習を行った。

(2) 研究計画開始以前から保有していた葉圏細菌は海外由来であり、日本国内で研究展開するには様々な制約が生じると考えられた。そこで、日本の野外に自生するシロイヌナズナやアブラナ科植物の葉から細菌の単離を試みた。様々な栄養条件の培地を用いて培養できたコ

ロニーからDNAを抽出し、16S リボソーム DNAの配列情報をもとに単離した細菌間の系統関係を整理した。構築した葉圏細菌コレクションから、シロイヌナズナに病気を引き起こさず共生する細菌を選抜した。その中から、シロイヌナズナの気孔開閉を操作する細菌を選抜した。さらに、気孔開口を誘導する葉圏共生細菌 *Pseudomonas paralactis* (Ppr)のゲノム配列を決定し、気孔開口を誘導することが知られている植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto)との比較解析を通じて、葉圏の病原細菌/共生細菌による気孔開口誘導に関与する細菌および植物の遺伝子の探索を行った。

(3) 緑色蛍光タンパク質を発現するように遺伝子操作したPpr(Ppr-GFP)をシロイヌナズナへ接種し、共焦点顕微鏡を用いて観察することで、Pprが葉のどこに生息するのかを調査した。また、恒常的に発光するように遺伝子操作したPpr(Ppr-lux)を用いて、Pprがどの程度植物に定着できるのかを調査した。Pprを接種した植物の生長と気孔動態を経時的に観察することにより、Pprとの共生が宿主植物に与える影響を調査した。

4. 研究成果

(1) 葉の顕微鏡画像から気孔開度を自動測定する深層学習アルゴリズムの開発に成功した。開発した深層学習アルゴリズムは手動測定と比べて、わずか $0.2 \text{ m} \pm 0.2 \text{ m}$ の誤差で気孔開度の自動測定が可能であることを示した。さらに、テスト用データセットを用いた詳細な比較解析から、本研究で開発した深層学習アルゴリズムは、手動測定と同等の正確さで、光や化合物に対する気孔開度の変化を捉えられることを証明した。顕微鏡による気孔の観察は一般的に用いられる方法であるが、植物体から葉を切り取る際の傷害やそれに伴って産生される植物ホルモンがシグナルとなって、気孔開度に影響を与えうる。したがって、気孔応答を厳密に評価するためには、植物個体の葉をできる限り傷つけることなく気孔を観察する装置が必要になる。本研究では、シロイヌナズナの葉を挟み込むことで“非破壊的に”気孔を撮影することが可能なデバイスを開発した。本デバイスは、幅5cmx 奥行20cmx 高さ6cmと小型であり、その重量は310 gと、携帯性にも優れている。しかし、このポータブル気孔撮影装置を用いて取得した画像に対して、前述の深層学習アルゴリズムを用いた気孔開度の自動測定を試みたが、満足な結果が得られなかった。そこで、ポータブル気孔撮影装置を用いて取得した画像を用いて、モデルの再学習を行い、ポータブル気孔撮影装置の画像に対しても、高い精度で気孔を検出し、その開度を計測可能なモデルを構築した。ポータブル気孔撮影装置と深層学習アルゴリズムによる気孔開度自動推定を組み合わせ、植物個体から葉を切り離すことなく病原細菌 Pto に対する気孔応答を解析することに成功した。さらに、ポータブル気孔撮影装置と深層学習アルゴリズムを組み合わせ、ほぼリアルタイムで気孔開度の自動測定が可能な解析プラットフォームを構築した。

(2) 植物は微生物を感知して気孔を閉じることで、その侵入を制限する。これに対して、Ptoなどの病原細菌は、気孔を再開口させることが知られている。これまでに、Ptoが産生する植物毒素コロナチンによる気孔開口に必要なシロイヌナズナの遺伝子を同定していた。コロナチンはこの遺伝子の発現を誘導するが、この遺伝子の発現誘導と気孔開口の因果関係は不明であった。本研究では、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、この遺伝子のプロモーター上に存在するコロナチンによる発現誘導に必要な塩基配列を突き止めた。さらに、当該塩基配列をゲノム編集により改変し、コロナチンによる発現誘導が起こらないシロイヌナズナ変異体の作出を試みたが、形質転換体は多数得られたものの、変異導入個体は得られなかった。そこで、シロイヌナズナとその近縁種が示すコロナチンによる気孔開口に対する感受性の違いに着目した研究を進めた。コロナチンはシロイヌナズナの気孔を開くが、その近縁種である *Eutrema salsugineum* の気孔を開くことができない。これらの植物種のプロモーター配列を交換する実験から、コロナチンによる当該遺伝子の発現誘導が気孔開口に必要であることを示した。一方、気孔開閉操作能は病原細菌に限られたものであるのか、あるいは、葉圏細菌に広く存在するのかは不明であった。本研究では、日本に自生するシロイヌナズナやその他のアブラナ科植物から多数の葉圏細菌を単離し、シロイヌナズナに病原性を示さない75系統を選抜した。ポータブル気孔撮影装置や気孔開度自動測定アルゴリズムを利用しながら、気孔開閉操作能を有する13系統の葉圏細菌を発見した。その中で、シロイヌナズナに対して気孔開口を誘導するPprを中心に研究を進めた。Pprのゲノム配列を決定し、Ptoとの比較ゲノム解析を行ったところ、Pprは、Ptoによる気孔開口に必要なコロナチンの生合成遺伝子を持たないことが明らかとなった。さらに、コロナチンによる気孔開口に必要な遺伝子を欠損したシロイヌナズナ変異体においても、Pprは気孔開口を誘導することを突き止めた。また、病原細菌による気孔開口では、III型分泌装置によって分泌されるタンパク質が関与するという報告がある。比較ゲノム解析より、PprはIII型分泌装置の構成遺伝子の一部を有していることが明らかになった。しかし、III型分泌装置の構成に必須の遺伝子を破壊したPprは依然として気孔開口を誘導した。以上より、PprはPtoを含む病原細菌とは異なるメカニズムで気孔開口を誘導すると考えられた。

(3) 宿主植物に対するPprの作用を明らかにするために、まずPprが宿主植物葉のどこに生息するのかを調査した。Ppr-GFPをシロイヌナズナ葉面にスプレー接種すると、葉の表面に散在し、時間の経過とともに増殖する様子が観察された。しかし、葉の内部への侵入は観察されなかった。同時点において、Ptoの葉の内部への侵入が観察された。したがって、PprはPtoと同様に気孔を開くが、この気孔開口を通じて葉の内部へ侵入するわけではないことが明らかとなった。次に、Ppr-luxを利用して、シロイヌナズナ葉にどれくらいの期間定着できるのかを調査した。その結果、Pprはシロイヌナズナの葉面に3週間以上にわたって定着できることを突き止め

た。さらに、Pprを接種したシロイヌナズナは非接種の個体よりも生長が促進されることを発見した。光に対する気孔開口が速くなるシロイヌナズナ形質転換体は野生型よりも生長が促進されることが知られている。これに着想を得て、Pprが定着したシロイヌナズナでは、光に対する気孔開口が速くなるのではないかと仮説を立てた。興味深いことに、Pprによる生長促進が見られる栽培条件において、Pprが定着したシロイヌナズナは、非接种植物と比べて、光が当たり始める朝方に大きく気孔を開いていることを見出した。すなわち、Pprは植物の葉面に定着し、宿主植物の気孔開口を助け、生長を促進する共生細菌であると考えられた。