

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05150

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Adaptation of plants to nutrient deficiencies through the establishment of a plant-microbe holobiont

研究代表者

晝間 敬 (Hiruma, Kei)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20714504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 38,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、窒素が枯渇した圃場環境でアブラナ科の植物の成長を顕著に促す内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) による植物成長促進機構を探索した。Ct の菌糸を介した窒素栄養の植物への供給に加えて、Ct が植物の硝酸吸収経路を高める中で植物成長を促すことを分子遺伝学的解析を駆使することで明らかにした。さらに、Ct は植物根圏に有用細菌を誘引して、共同で植物成長を促すことを発見した。以上から、圃場環境で認められた顕著な植物成長促進効果は Ct 単独による植物成長促進効果に加えて根圏細菌との共同の植物成長促進効果もが複合的に合わさった結果であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境が変動し周囲の微生物集団が存在する圃場環境で植物の成長を安定的に促す微生物を同定しそのメカニズムを解明し活用することは環境に負荷をかけない農業を達成するためには重要である。本研究においては、植物の成長を複数のメカニズムを駆使して複数の異なる圃場環境で促す共生糸状菌を発見した。また、本研究は特定の有用微生物だけでなくそれに誘引されるパートナー微生物を併せて活用することで植物の成長をさらに増強させられることを示唆しており、これまでの植物と微生物の1対1相互作用を超えた3者関係を分子遺伝学的に紐解く新たな学問領域の創出にもつながる成果となる。

研究成果の概要（英文）：This study investigates the mechanisms by which the root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) promotes plant growth under nitrogen-limiting conditions across various fields. We demonstrate that Ct enhances host fitness under these conditions by transferring nitrogen to the host via hyphae and inducing host nitrate uptake pathways during root colonization, which leads to significant plant growth promotion, including increased seed production. Furthermore, we show that Ct recruits beneficial bacteria to the roots and promotes plant growth in conjunction with one of the tested bacteria attracted by Ct. These findings suggest that the robust plant growth promotion observed in the field may be attributed to the multifaceted beneficial activities mediated by Ct.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：植物超個体 根圏内生糸状菌 植物成長促進 窒素欠乏 フィールド シロイヌナズナ 根圏細菌 トリプトファン由来の二次代謝物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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、その際の土壤栄養については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を目的とした。

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 (図1左)。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。



図1. 窒素枯渇時におけるCtによる植物成長促進効果

左：圃場におけるCtによるコマツナの植物成長促進

右：窒素枯渇土壌におけるCtによるシロイヌナズナの植物成長促進

2. Ct は窒素枯渇環境下で植物の成長を促し種数を増加させる

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(図1右)。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 が植物地上部にて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(図2)。その

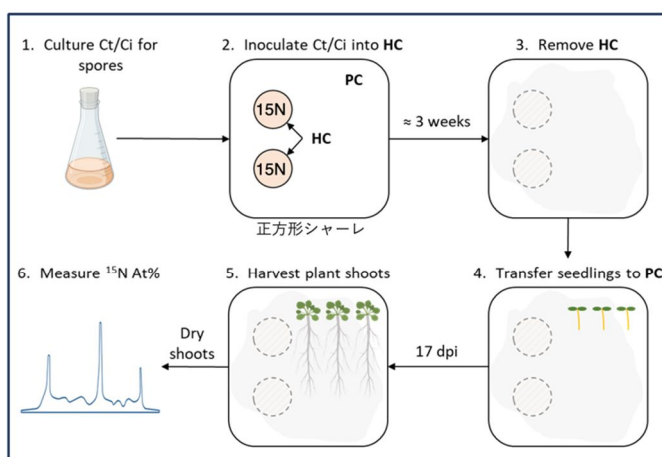


図2. 菌糸から植物への ^{15}N の移行の有無を調査する実験系

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細菌については窒素が枯渇した土壌条件において Ct と共接種した際に Ct 単独と比較してさらに植物成長を促すことが判明した。

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若干低下するものの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では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示唆され、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。

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。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。

代表的な研究成果(原著論文)

1. Hiruma, K*, Aoki, S., Takino, J., Higa, T., Utami, YD., 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 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40867-w>
(下線は、本学術領域 B の研究者)

受賞

日本植物生理学会奨励賞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Utami Yuniar Devi, Hiruma Kei	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome Resource of <i>Colletotrichum spaethianum</i> , the Causal Agent of Leaf Anthracnose in <i>Polygonatum falcatum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PhytoFrontiers	6. 最初と最後の頁 152 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTOFR-12-21-0082-A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Utami Yuniar Devi, Nguyen Tan Anh Nhi, Hiruma Kei	4. 巻 204
2. 論文標題 Investigating plant-microbe interactions within the root	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-022-03257-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mukai Mana, Hiruma Kei, Nishigaki Tomohiro, Utami Yuniar Devi, Otaka Junnosuke, Yoshihashi Tadashi, Sarr Papa Saliou, Oo Aung Zaw, Takai Toshiyuki, Tujimoto Yasuhiro	4. 巻 .
2. 論文標題 Dysbiosis of the rhizosphere microbiome caused by γ -irradiation alters the composition of root exudates and reduces phosphorus uptake by rice in flooded soils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11104-022-05726-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Utami Yuniar Devi, Hiruma Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome Resource of <i>Colletotrichum spaethianum</i> , the Causal Agent of Leaf Anthracnose in <i>Polygonatum falcatum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PhytoFrontiers?	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTOFR-12-21-0082-A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiruma Kei, Aoki Seishiro, Takino Junya, Higa Takeshi, Utami Yuniar Devi, Shiina Akito, Okamoto Masanori, Nakamura Masami, Kawamura Nanami, Ohmori Yoshihiro, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Sato Toyozo, Oikawa Hideaki, Minami Atsushi, Iwasaki Wataru, Saijo Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in <i>Colletotrichum tofieldiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40867-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen Tan Anh Nhi, Higa Takeshi, Shiina Akito, Utami Yuniar Devi, Hiruma Kei	4. 巻 125
2. 論文標題 Exploring the roles of fungal-derived secondary metabolites in plant-fungal interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 102021 ~ 102021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmpp.2023.102021	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 比嘉毅、中村雅美、晝間敬
2. 発表標題 糸状菌 <i>Colletotrichum tofieldiae</i> における病原/共生型株の宿主根植物の侵入様式の比較
3. 学会等名 5年度植物病理学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 椎名昭斗、瀧野純矢、中村雅未、及川英秋、南篤志、晝間敬
2. 発表標題 寄生型の <i>Colletotrichum tofieldiae</i> における二次代謝物産生クラスターABA-Botrydialの機能解析
3. 学会等名 5年度植物病理学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, Kei Hiruma
2. 発表標題 Plant tryptophan metabolism pathway is crucial for plant growth promotion by Colletotrichum tofieldiae under nitrogen deficiency
3. 学会等名 5年度植物病理学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 栄養をめぐる植物と微生物の超個体化現象を紐解く
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Hiruma
2. 発表標題 A comparative functional analysis of closely-related plant mutualistic and parasitic fungi
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, Kei Hiruma
2. 発表標題 Root endophyte Colletotrichum tofieldiae promotes brassica plant growth and recruits beneficial bacteria to roots under nitrogen-limiting conditions
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩附利英、橋本将、Yuniar Devi Utami, 田中健太、晝間敬
2. 発表標題 リン欠乏土壤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
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 寄生型のColletotrichum tofieldiaeは高温条件下ではシロイヌナズナの植物生長を促す
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Hiruma
2. 発表標題 Activation of fungal ABA biosynthetic cluster genes switches a beneficial plant fungus to a pathogen
3. 学会等名 IPSR International Plant Web Forum 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 晝間 敬
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, Koji Tokunaga, Kei Hiruma
2. 発表標題 Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Recruits Beneficial Bacteria to Roots and Promotes Plant Growth By Facilitating Plant Nitrogen Uptake Under Nitrogen-Limiting Conditions
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高木桃子, 岡崎まなみ, Liu Xinpeng, 晝間敬, 大倉史生, 戸田陽介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 比嘉毅, 中村雅未, 晝間敬
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡邊大祐, 杉田亮平, 奥村将樹, 相馬愛, 田野井慶太郎, 晝間敬
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 徳永光治, Utami Yuniar Devi, Nhi Nguyen Tan Anh, 晝間敬
2. 発表標題 植物-糸状菌-細菌の三者間共生関係の様態理解にむけて
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡崎 まなみ, 晝間 敬
2. 発表標題 共生糸状菌 <i>Colletotrichum tofieldiae</i> 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
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuniar Devi Utami, 晝間敬	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

領域ホームページ
<https://www.kakusei-plant.com>
 研究室ホームページ
<https://www.kakusei-plant.com>
 書間研究室ホームページ
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hiruma/>
 植物超個体の覚醒
<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

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大森 良弘 (Ohmori Yoshihiro) (20398390)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	田畑 亮 (Tabata Ryo) (30712294)	名古屋大学・生命農学研究科・特任講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関