

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04620

研究課題名(和文) サツマイモ窒素固定共生系の分子生態学的解明

研究課題名(英文) Moleculuar ecological analysis of nitrogen fixation mechanism in the symbiotic microbial community of sweet potato

研究代表者

池田 成志 (Ikeda, Seishi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター 大規模畑作研究領域・上級研究員

研究者番号：20396609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモの茎、塊根の表面と内部の共生細菌群集について非培養法による多様性解析を行った結果、各組織に共通して他の作物種よりもアルファプロテオバクテリアの優占化が観察された。また、多様性指数は塊根表面、茎、塊根内部、の順番で小さくなることが明らかにされた。上記と対応する組織から共生細菌の網羅的な分離培養を実施した。約2000株の分離菌について16S rRNA遺伝子に基づくクラスタリング解析を行った結果、約320個のグループが得られた。これらのグループの代表的な菌株について培養法により空中窒素固定活性を測定した結果、塊根に共生するダイズ根粒菌に類似した1菌株について活性を検知した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial diversity in stem, surface and inner tissues of main root of sweet potato was examined by non-cultivation method. As a result, the domination of Alphaproteobacteria was observed in all tissues examined in comparison with bacterial diversities in other crops. As expected, the values of diversity indexes are decreased as following order, surface of main root, stem, and inner tissue of main root. Correspondingly, approximately 2000 bacterial colonies were isolated from stem, surface and inner tissues of main root of sweet potato by using a cultivation medium. Approximately 320 groups were obtained by the clustering analysis based on 16S rRNA gene. These isolates were examined for nitrogen fixation ability on a medium. Among the isolates, one isolate closely related to Bradyrhizobium sp. was found to have nitrogen fixation ability as a candidate of nitrogen fixation bacterium in sweet potato.

研究分野：植物共生科学

キーワード：窒素固定 サツマイモ 共生細菌 多様性 16S rRNA遺伝子 Alphaproteobacteria

1. 研究開始当初の背景

(1) 課題提案者のグループは植物組織から細菌細胞を抽出・精製する細菌細胞濃縮法を開発し、非培養法による植物共生細菌群集の分析法を確立した。当該手法を活用することにより、世界で初めて植物共生細菌について生態学的評価に耐え得る非培養法による多様性解析やメタゲノム解析が可能になった(1)。

(2) サツマイモは暖地において低窒素施肥でも高いバイオマス生産性を示し、共生細菌の空中窒素固定を通して全窒素量の約30%以上を取り込む能力があることが報告されている(2)。また、テンサイと同様にダイズ根粒菌に近縁な植物生育促進細菌が共生することが報告されている(3、4)。このようなサツマイモの共生系の解明は非マメ科作物における空中固定窒素を介した減肥栽培技術の開発のための重要な基盤的情報となると考えられる。

2. 研究の目的

サツマイモの共生系の解明は非マメ科作物での窒素固定による生産性向上機構のモデルとして非常に重要である。しかしながら、当該共生系は現在まで分離培養された若干の窒素固定細菌での研究の試みがあるのみで、その詳細はブラックボックス状態にある。本課題は最新の分子生態学的手法を活用し、サツマイモへの窒素寄与率が高いと思われる塊根と茎組織に共生する主要な窒素固定細菌群の多様性、機能性、組織分布等の網羅的解明を行う。同時に、メタボロミクスの活用により宿主と窒素固定細菌群の相互作用に関与する可能性のある糖・窒素代謝物の網羅的な探索も行う。これらの研究成果は、窒素固定細菌の資材化や共生促進剤の開発、宿主代謝マーカーによる共生育種等の次世代型農業技術の開発の基盤的情報としての活用が期待される。本提案課題では、上述したような最新の分子生態学的手法を駆使して、窒素固定細菌群を中心にしたサツマイモ共生系の系統的・機能的多様性の全容解明を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

九州沖縄農業研究センター・都城研究拠点において、高バイオマス品種(コガネセンガン)と低バイオマス品種(農林2号)を同一圃場内で慣行的に栽培し、生育中期に各品種から窒素固定への寄与が大きいと思われる茎と塊根の各組織を採取した。圃場内における環境変動による試料の質的・量的なバラツキを抑えるために、各品種について、3反復の試験区を設け、各反復から3個体、1品種あたり合計9個体からのサンプリングを行った。窒素固定細菌群の多様性や組織特性を明らかにするため、上記の試料について細菌細胞濃縮法を活用して共生細菌群集のDNAを抽出し、得られたDNAを用いて16S rRNA 遺伝子

を標的としたパイロシーケンシングによる多様性解析を実施した。

また、上述の組織と対応する形で、異なる反復区から得られた3個体の高収量性品種の茎、塊根表面、塊根内部の各試料をリン酸バッファー中でホモジナイズし、2重ガーゼでろ過した。得られたろ液を分離培養試験用試料として10%グリセロール溶液になるように調製し、-80℃に保存した。これらの各試料のグリセロールストックからR2A培地やメタノール培地等の低栄養性培地を用いて、サツマイモの共生細菌の大量分離培養を行った。培地の種類、培養日数、培養条件等について予備実験を行った結果、試料の種類によりR2A培地で1週間、メタノール培地で10日間の培養条件で共生細菌の大規模分離培養を行うこととした。得られた全分離菌についてゲノムDNAの抽出を行い、16S rRNA 遺伝子前半領域を標的としたワンパスによるダイレクトシーケンスを行った。これら分離株について、16S rRNA 遺伝子の前半領域の約600塩基の配列情報に基づいて類似度99%でクラスタリングを行い、その結果に基づいて、各菌群の系統的・機能的多様性解析、各組織における検出頻度、多様性指数等を解析した。また、各グループの代表配列の最近縁種をBlast検索により特定した。これらの情報を活用して、過去の文献情報を参考にし、系統情報に基づいて空中窒素固定活性を持つ可能性の高い菌群、組織特異性の目安として植物試料の反復間で安定して検出される菌群、既知種に対する類似度が97%未満の系統的な新規性の高い菌群等をサツマイモ共生系の窒素固定細菌の候補株として選抜した。さらに、上記の微生物多様性解析の試料と対応する形でNMR分析用の植物組織(茎、塊根)と土壌のサンプリングを行い、NMR分析のための前処理と予備実験を行った。

4. 研究成果

都市で栽培された収量性の大きく異なる2品種のサツマイモの茎、塊根表面、塊根内部について、パイロシーケンスによる共生細菌の多様性解析を行った結果、各組織ともにサツマイモの共生系はProteobacteria、特に既知の他の作物種の共生系との比較において、全多様性に対するAlpha-proteobacteriaのグループの割合が非常に高く、本菌群が優占化した群集構造を持つことが明らかとなった(表1)。これらの結果から、サツマイモの茎や塊根の

表1. サツマイモ共生細菌の多様性(網レベル)

組織 品種	茎		塊根表面		塊根内部	
	N	K	N	K	N	K
Alphaproteobacteria	70.4	63.9	87.7	56	37.4	28.2
Gamma-proteobacteria	9.5	9.5	3.5	13.8	32.5	12.8
Actinobacteria	11.8	15.9	2	4.8	2.9	12.7
Betaproteobacteria	2.8	2.7	0.4	2	8.5	13.5
Others	5.5	8	6.4	23.4	18.7	32.8

共生系はAlphaproteobacteriaが特に優占しやすい宿主環境であることが示唆された。

Alphaproteobacteria は窒素固定能を持つ植物有用細菌が多く含まれることから、本菌群にサツマイモへの窒素供給に寄与する細菌が属している可能性が示唆された。加えて、塊根内部では、Alphaproteobacteria に加えて Gammaproteobacteria も優占的な菌群であることが明らかとなった。塊根内部も細菌による窒素固定として適した環境と思われること、Gammaproteobacteria にも多くの窒素固定を行う細菌種が知られていること等の理由から、宿主であるサツマイモへの窒素の提供を行う細菌群の候補として、塊根内部に共生する Gammaproteobacteria についても窒素固定活性や生育促進効果等の評価を進める必要があると考えられた。また、各種の多様性指数、OTU 数等については過去の他の作物種の分析結果からも予想されるように、塊根表面、茎、塊根内部の順番で小さくなることが明らかとなった。サツマイモと同様にバイオマス生産性の高いテンサイにおいても共生細菌群集中の Alphaproteobacteria の存在比が高いことから、本菌群は植物バイオマスの高生産性に貢献している可能性もあると考えられる。

平成 27 年度に分離培養株数として、各個体の各試料あたり 200 株以上の細菌分離を目安として、合計約 1000 株、平成 28 年度には約 1000 株の合計約 2000 株のサツマイモ共生細菌の分離株を R2A 培地を使って得た。平成 28 年度はメタノール培地を使い、約 600 株の分離菌を得た。サツマイモ共生系の窒素固定の役割を担う菌群を特定するため、これらの分離株のクラスタリング解析により Alphaproteobacteria のグループを中心に、種レベルでの多様性解析を行った。

その結果、約 320 個のグループに別けられた。各グループの代表配列の Blast 検索の結果から、約 50 個のグループの最近縁種については過去の文献において空中窒素の固定活性が測定されている菌群であった。さらに、組織特異性が期待される菌株、系統的な新規性が高い菌株等について選抜した。これら 2 つの条件から、約 20 個のグループが選抜され、それらのグループの代表株について培地条件下での窒素固定活性を測定した結果、系統的にダイズ根粒菌に類似した 1 菌株が活性を示した。この菌株については窒素固定細菌候補株として今後詳細な検討を行う予定である。

また、R2A 培地で分離したサツマイモ共生細菌のうち、16S rRNA 遺伝子の配列情報から有用細菌として有望候補として選抜された 35 菌株について、サツマイモに対する生育促進効果をポットサイズでの栽培試験において検討した結果、6 菌株について生育促進効果を検出した。

さらに、平成 28 年度にメタノール培地を用いてサツマイモの茎や塊根から分離培養された菌株について平成 29 年度に多様性解析を行った結果、R2A 培地では得られなかつ

た非常に系統的に新規性の高い菌群をメタノール培地の利用により多数得られることが明らかとなった。R2A 培地とメタノール培地の併用により、より多様な植物共生細菌群の効率的な分離が可能であることが示唆された。特に、サツマイモの塊根からは、Rhizobiales 目に属する非常に新規性の高い科レベルの未知の菌株が分離され、窒素固定活性や生育促進効果等について現在検討中である。

生産性の異なる 2 品種のサツマイモ（農林 2 号とコガネセンガン）の茎、塊根表皮、塊根内部の共生細菌群集について共生細菌群の比較解析をした結果、多様性の目安となる各種の指数値ほぼ全てにおいて低収量性の農林 2 号よりも高収量性のコガネセンガンで高い傾向を示した。特に、コガネセンガンの塊根において共生微生物の多様性が高いことが明らかとなった。2 品種間の系統的な多様性の差異について検討した結果、門レベルでは、茎、塊根のいずれの組織においても Proteobacteria の割合がコガネセンガンで小さいこと、特に塊根組織における割合が非常に小さいことが明らかとなった。対照的に、Actinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes、Verrucomicrobia、Planctomycetes、Chlamydiae 等の比較的マイナーな菌群の割合がコガネセンガンの地上部と地下部の両方の組織において増加していることが明らかとなった。今後、より下位の分類単位で詳細な解析を進め、植物代謝物との相関や接種試験で有用性を示した菌群との系統的関係を明らかにしていく予定である。

#### <引用文献>

- 1) Ikeda, S., (他 9 名) (2009) Microb. Ecol., 58: 703-714.
- 2) Yoneyama, T., Terakado, J., and Masuda, T. (1998) Biol. Fertil. Soils, 26:152-154.
- 3) Terakado-Tonooka, J., Ando, S., Ohwaki, Y., and Yoneyama, T. (2013) In: Molecular Microbial Ecology of the rhizosphere. Edited by Frans J. de Bruijn, Wiley-Blackwell, Volumes II, 437-444.
- 4) Terakado-Tonooka, J., Fujihara, S., Ohwaki, Y. (2013) Plant Soil, 367: 639-650.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

関山恭代、池田成志、富田理、NMR による実践的な農業メタボロミクス研究に向けて 生産現場から生まれる成分多様性を見るために、化学と生物、査読有、Vol. 55、No. 6、2017、pp. 392-399、<https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.55.392>

池田成志、植物共生科学から考える土壌病害の発生しにくい土づくり、土づくりとエ

コ農業、査読無、Vol. 49、No. 540、2017、  
pp. 33 - 39

T. Tomihama, Y. Nishi, K. Mori, T. Shirao,  
T. Iida, S. Uzuhashi, M. Ohkuma, S. Ikeda,  
Rice bran amendment suppresses potato  
common scab by increasing antagonistic  
bacterial community levels in the  
rhizosphere, *Phytopathology*, 査読有 Vol.  
106, No. 7, 2016, pp. 719-728,  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0322-R>

池田成志、作物圏共生微生物の生態研究の  
現状と農業・食品産業への応用の可能性、  
日本土壌肥科学雑誌、査読有 Vol. 87、No.  
5、2016、pp. 373-382、

大久保卓、池田成志、南澤究、植物共生細菌  
群集を利用した持続的農業、土と微生物、  
査読有、Vol. 70、No. 1、2016、pp. 10-16、

A. Kobayashi, Y. O. Kobayashi, N. Someya,  
S. Ikeda, Community analysis of root-  
and tuber-associated bacteria in  
field-grown potato plants harboring  
different resistance levels against  
common scab, *Microbes and Environments*,  
査読有 Vol. 30, No. 4, 2015, pp. 301-309,  
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/j sme2>

〔学会発表〕(計2件)

池田成志、関山恭代、農業・食品分野にお  
ける微生物科学とメタボロミクスの連携の  
可能性について、第11回メタボロームシン  
ポジウム(招待講演) 2017、ホテル阪急エ  
キスポーク(大阪府吹田市)

池田成志、共生微生物学の視点から考える  
理想の土づくりと農業・食品産業の新展開、  
日本土壌肥科学会北海道支部会シンポジウ  
ム(招待講演) 2016、とかちプラザ(北海  
道帯広市)

〔図書〕(計1件)

池田成志、大久保卓、鶴丸博人、南澤究、  
分担執筆(監修:服部正平) 植物共生細菌  
群集のメタゲノム解析(書名:メタゲノム解  
析実験プロトコール) 羊土社、2016、pp.  
124-130、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田成志 (IKEDA, Seishi)  
農研機構北海道農業研究センター・上級研  
究員  
研究者番号: 20396609

### (2) 研究分担者

小林有紀 (KOBAYASHI, Yuki)  
農研機構九州沖縄農業研究センター・上級  
研究員  
研究者番号: 00729519

### (3) 研究分担者

小林晃 (KOBAYASHI, Akira)  
農研機構九州沖縄農業研究センター・上級  
研究員  
研究者番号: 90626954

### (4) 研究分担者

関山恭代 (SEKIYAMA, Yasuyo)  
農研機構食品研究部門・上級研究員  
研究者番号: 60342804

### (5) 研究分担者

菊地淳 (KIKUCHI, Jun)  
理化学研究所・環境資源科学研究センタ  
ー・チームリーダー  
研究者番号: 00321753

### (6) 研究分担者(平成27年度)

塔野岡純子 (TOUNOOKA, Junko)  
佐賀大学・農学部・研究員  
研究者番号: 00713314

### (7) 研究分担者(平成27年度)

鈴木章弘 (SUZUKI, Akihiro)  
佐賀大学・農学部・教授  
研究者番号: 50305108

### (8) 研究分担者(平成28年度~平成29年度)

鶴丸博人 (TSURUMARU, Hirohito)  
鹿児島大学・農水産獣医学域能楽系・助教  
研究者番号: 60545226

### (9) 連携研究者

平藤雅之 (HIRAFUJI, Masayuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特  
任教授  
研究者番号: 00370495