

令和元年6月16日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0029

研究課題名(和文) 根分泌物への走化性に基づく有用土壌細菌と植物相互作用成立機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms that determine plant-rhizobacterial interaction

研究代表者

小山 博之 (Koyama, Hiroyuki)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90234921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は土壌中の微生物とゆるい共生関係を結ぶことで様々な環境に適応している。菌根菌などは宿主との親和性が高いことが知られ、鉱山跡地の環境修復では周辺植生を土壌と同時に移植することが効果的であることが知られている。本研究では、根圏微生物が根からの分泌物に関する走化性を持つこと、主要な根分泌物である有機酸輸送に関わる分子機構が植物種を超えて保存されることなどを明らかにした。根圏微生物には様々な物質に対する走化性を示す種が混在する一方、複数の根分泌有機酸の放出が同じ分子モジュールで制御されることが分かった。根圏や内生共生微生物の中には、植物免疫を高める微生物が存在することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は微生物と相互作用(共生も含む)することで様々な環境変化に適応している。自然環境では、極めて特異的な組み合わせが成立している例が多く知られているが、それを決定する機構には解明されていない点が多い。この研究では、根から有機酸などの微生物誘引物質を分泌する植物の機構と、根圏に生育する微生物が持つ有用性(病害抑止性)の理解に取り組んだ。この成果は、今後の微生物農薬の開発に結びつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants adapt to various environments by establishing symbiotic relationship with microorganisms in the rhizosphere. Mycorrhizal fungi are known to have high affinity with the host, and thus it is known that transplanting with plants with soils together show better performance to restore the old mining site. In this study, we identified that rhizosphere microbes have chemotaxis with respect to secretory substances from roots. On the other hand, the molecular mechanism involved in excretion of organic acids from the roots, which is major root secretory substances, is conserved among wide-range of plant species. STOP1-regulating system controls the release of multiple root-secretory organic acids, while the rhizosphere microorganism is mixed with species showing chemotaxis to various substances. Finally, we identified several beneficial bacterias from the rhizo-bacteria and endosymbiotic microbes.

研究分野：植物栄養学

キーワード：根分泌物 STOP1システム 有用微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「植物と有用微生物の相互作用」(植物免疫の活性化、養分吸収の向上、生育促進等)を活用することは、食糧循環を成立させるための重要な要素であるが、生物農薬(資材)として積極的に活用できている状況ではない。この提案では、代表者の研究を発展させ、「植物と有用微生物の相性」を決める仕組みを分子レベルで解明し、有用菌を活用するための学術的な根拠を提供することを目的としている。これは、近年注目されている、プラントプロバイオティクスの分子基盤を明らかにするもので、有用菌の実効性の証明や重要な分子を同定することは、学術的なインパクトが大きいと考えられた。本研究を提案する端緒は、学術振興会事業である日米共同研究で(デラウェア大学との共同研究)根圏微生物誘引の一因が、根のリンゴ酸放出によることを見出したことであった。このような背景から、本研究を提案・採択され研究を進めた。

2. 研究の目的

背景に基づき、本研究では根圏有用微生物の探索とその作用の検証と植物の根分泌物放出機構の解明に主眼を置いて、特に有用根圏微生物の単離と根圏への微生物誘引の原因物質である有機酸などの分泌機構の分子的な理解を目的とした。根分泌機構に関してはSTOP1転写因子制御系の解析を、有用微生物に関しては植物病害抑制機構を示す菌について解析を進めることとした。この際、チャ樹根圏の微生物群の解析や根分泌現象の解析実験系の構築など、技術的要素に関する研究にも取り組むこととした。

3. 研究の方法

STOP1経路の解析に関しては、マメ科植物、ナス科植物やチャノキについて、逆遺伝学とトランスクリプトーム解析を組み合わせて評価することとした。根分泌物に関しては、有機酸類は酵素化学的手法を用い、その他の分泌物に関してはGC-MSなどを使用して解析した。有用微生物の単離・同定は、培養特性とゲノムシーケンスを組み合わせて実施し、さらに灰色カビ病、青枯れ病などのいくつかの植物病害に対する抑制効果を確認した。尚、チャノキで実施したRNseqとシロイヌナズナの転写因子についてはマメ科植物などの作物との共通性について、ゲノムDNA情報を用いて生物情報学的に解析した。

4. 研究成果

(1) チャ樹根圏の微生物相とチャ樹が放出する根圏物質の解析

チャ樹根圏の微生物相をNGS解析したところ栽培前歴(化成肥料、有機質肥料)によらず、Bacillus属などが優勢菌の一つであることが分かった。この菌群は、クエン酸、リンゴ酸及びシユウ酸などの有機酸に関する走化性が異なることが明らかとなった。また、チャ樹の根からは、Nicotineなどの多様な物質が分泌されていることが明らかとなった。これらのことは、根圏微生物が単独の物質に対する走化性を持つわけではなく、様々な物質に対応した走化性を示す集団であることと、想定するよりも多様な物質を植物根が放出することを示唆していた。

(2) 異種作物でのSTOP1制御システムの同定

有機酸類の放出は、転写因子STOP1に制御される有機酸トランスポーター遺伝子の発現と深くかかわる。本研究では、ワタ、タバコ、キマメなどのSTOP1制御系を同定することに成功すると共に、タバコやチャ樹で実施したトランスクリプトーム解析から、種により異なる有機酸輸送タンパク質遺伝子が転写制御されることを見出し、複数の植物のプロモーター上には活性を持つ

STOP1結合配列が存在することを明らかにした。尚、植物病害応答で知られるNAC転写因子群はROS（活性酸素）によっても転写制御を受けるが、作物における保存性（グループや、ROS応答）について明らかにした。

（3）根圏及び共生有用微生物の単離と病害抑制

植物病害のうち、青枯れ病などは化学農薬で十分に抑止できないことが知られている。また、灰色カビ病菌などの糸状菌病害も制御が難しいことが知られている。根圏及び内生寄生状態にある菌群から、これらの病害抑止力がある菌を新たに単離した。この中で注目される点は、混植による病害抑止効果をもつネギ類根圏から単離した菌群による上記病害の抑止作用が証明できたことと、植物病害に関与しない微生物との共同接種が相乗的に病害抑止作用することを見出したことである。この中で、トマト青枯れ病を抑止する菌の一部は、クエン酸に対する走化性を示したことから、根分泌物質に対する走化性を活用した生物農薬として活用できる可能性がある。

上記の解析に加えて、STOP1システムによる有機酸輸送タンパク質遺伝子の転写制御がフォスファティジルイノシトールシグナルにより活性化されることや、有用微生物のいくつかがアミノ酸などに走化性を示すことが明らかとなった。これらは、極めて一般的なシグナル伝達経路で有機酸輸送などの根圏制御系が活性化されることと、微生物 - 植物の相互作用を担う物質が多様であることを意味している。今後は、ネギ類根圏などに根分泌物質を介して集積し、混植でも効果を示す特定の細菌群などでの解析を進めることが重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Marian, M., Morita, A., Koyama, H., Suga, H., Shimizu, M. Enhanced biocontrol of tomato bacterial wilt using the combined application of *Mitsuaria* sp. TWR114 and nonpathogenic *Ralstonia* sp. TCR112 Journal of General Plant Pathology 85,142-154 (2019) 査読有
2. Daspute, A.A, Xian Y, Gu, M, Kobayashi, Y., Wagh, S., Panche, A., Koyama, H. Agrobacterium rhizogenes-mediated hairy roots transformation as a tool for exploring aluminum-responsive genes function Volume 5, FSO364 (2019) 査読有
3. Ito Hiroki、Kobayashi Yuriko、Yamamoto Yoshiharu Y.、Koyama Hiroyuki Characterization of NtSTOP1-regulating genes in tobacco under aluminum stress Soil Science and Plant Nutrition 65 (2019) 印刷中 査読有
4. Wu Liujie, Kobayashi Yuriko, Wasaki Jun, Koyama Hiroyuki, Organic acid excretion from roots: a plant mechanism for enhancing phosphorus acquisition, enhancing aluminum tolerance, and recruiting beneficial rhizobacteria Soil Science and Plant Nutrition 64, 697-704 (2018) 査読有
5. Ikka Takashi, Yamashita Hiroto, Kurita Ikuya, Tanaka Yasuno, Taniguchi Fumiya, Ogino Akiko, Takeda Kazuya, Horie Nobuhiro, Hojo Hiroshi, Nanjo Fumio, Morita Akio Quantitative validation of nicotine production in tea (*Camellia sinensis* L.) PLOS ONE 0195422-0195422 (2018) 査読有
6. Kundu A., Das S., Basu S., Kobayashi Y., Kobayashi Y., Koyama H., Ganesan M. GhSTOP1, a C2H2 type zinc finger transcription factor is essential for aluminum and proton stress tolerance and lateral root initiation in cotton Plant Biology, 21 35 ~ 44 (2018) 査読有
7. Daspute, A.A. Kobayashi, Y. Panda, S.K, Fakrudin, B. Kobayashi, Y. Tokizawa, M. Iuchi, S. Choudhary, A.K. Yamamoto, Y.Y. Koyama, H. Characterization of CcSTOP1; a C2H2-type transcription factor regulates Al tolerance gene in pigeonpea Planta 247, 201-214 (2018,)
8. Marian, M., Nishioka, T., Koyama, H., Suga, H., Shimizu, M. Biocontrol potential of *Ralstonia* sp. TCR112 and *Mitsuaria* sp. TWR114 against tomato bacterial wilt Applied Soil Ecology 128, 71-80 (2018) 査読有
9. Srivastava Richa, Kumar Sanjeev, Kobayashi Yasufumi, Kusunoki Kazutaka, Tripathi

Prateek、Kobayashi Yuriko、Koyama Hiroyuki、Sahoo Lingaraj Comparative genome-wide analysis of WRKY transcription factors in two Asian legume crops: Adzuki bean and Mung bean. Scientific Report 8 (2018) 査読有

10. 小山 博之、清水 将文 根分泌物質とプラントプロバイオティクス アグリバイオ 1, 54-55 (2017) 査読無
11. 澤木克亘, 佐伯裕作, 清水将文, 小林佑理子, 小山博之 *Penicillium pinophilum* 接種によるイネおよびシロイヌナズナの病害抵抗誘導性の評価 無菌生物 46, 91-94 (2016) 査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1 Yunxuan Xian・Abhijit Arun Daspute・小林佑理子・小山博之 Functional analysis of legume-MATE for aluminum tolerance using the tobacco hairy root system 2016 年度日本土壤肥料学会大会 佐賀大学 2016 年 9 月
- 2 Abhijit Arun Daspute・小林安文・小林佑理子・小山博之 Isolation and characterization of CcSTOP1 and CcMATE1 in Arabidopsis and tobacco transgenic hairy roots approach 2016 年度日本土壤肥料学会大会 佐賀大学 2016 年 9 月

〔図書〕(計 1 件)

- 1 Sadhukahn Ayan, Hiroyuki Koyama Role of Reactive Oxygen Species Homeostasis in Root Development and Rhizotoxicity in Plants in REDOX HOMEOSTASIS IN PLANTS, SK Panda and Yamamoto YY ed. pp132-146 Springer 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.abios.gifu-u.ac.jp/koyama/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：須賀 晴久

ローマ字氏名：Suga, Haruhisa

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：科学研究基盤センター

職名：准教授

研究者番号(8桁)：2 0 2 8 3 3 1 9

研究分担者氏名：清水 将文

ローマ字氏名：Shimizu, Masafumi

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：応用生物科学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：6 0 3 7 8 3 2 0

研究分担者氏名：一家 崇志

ローマ字氏名：Ikka, Takashi

所属研究機関名：静岡大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 9 0 5 8 0 6 4 7

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

該当なし

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、研究者個人に帰属されます。