

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0115

研究課題名(和文) 低投入栽培下でのイネ共生細菌群集の動態とその制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of bacterial community associated with rice cultivated under low input condition

研究代表者

佐々木 和浩 (Kazuhiro, Sasaki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：70513688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数の品種を化成肥料を投入しない圃場で栽培した。イネに共生する細菌は、イネの生育ステージ進むにつれて安定し、幼穂形成期、出穂期、完熟期では、プロファイルが安定し、収束していく傾向が認められた。また、それぞれのステージに置いて品種比較を行ったところ、品種の影響に比べて、生育ステージの影響が大きいことも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bacterial community associated with rice shoot became stable accompanied with rice growing stage. Profiles of bacterial communities tended to convergence at late growing stage. At each growing stage, there are no significant difference in profiles of bacterial communities between varieties. Therefore, growing stage in rice could influence bacterial communities.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 共生細菌

### 1. 研究開始当初の背景

先進国では、農業からの環境負荷を軽減するために、肥料や農薬を使わない低投入持続型農業が提唱されている。しかし、これらの栽培方法では、単位面積当たりの穀物生産量を現在以上に増大させることは、不可能である。一方で、世界人口は依然として、年間 0.8 億人ずつ増加し、今世紀半ばには 100 億人にも達するといわれる。耕作地面積の減少もあり、今後、単位面積当たりの穀物生産量を飛躍的に増大させる必要がある。したがって、近未来に予想される地球規模での食糧危機と環境負荷の軽減を両立させる、これまでにない食糧生産システムの開発が求められる。

低投入持続型農業での増収の実現に向けて、植物共生微生物の力を利用する試みがなされている。すでに商品開発されている製品の中には、「イネファイター（前川製作所）」という、*Azospirillum* 属細菌を含む微生物資材がある。イネファイターを施用した圃場の水稲は穂数が多くなり、多収となった例が報告されている (Isawa et al. 2010)。さらには、植物の免疫力も高め、いもち病等に対する抵抗性も向上している (Yasuda et al. 2009)。しかし、こうした微生物資材の効果は、化成肥料に比べて不安定であり、効果を発揮する条件 (土壌や気象等) が限られる傾向にある。さらに、穂数を増やす接種効果には、品種間差異も認められている (Sasaki et al. 2010)。植物共生微生物の力を利用するには、植物を含めた環境と微生物の相互作用を解明する必要がある。

申請者は、イネの植物共生細菌に着目し、共生細菌群集に影響を与える環境因子を明らかにしてきた。共生細菌群集の評価には、細菌の DNA 多型を検出できる ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) 法を用いた。この方法は、植物体とともに共生細菌を粉砕し、抽出した DNA をテンプレートに用いる方法である。分離培養を経ずに、共生細菌群集のプロファイルの評価できるので、分離培養のバイアスを避けられる手法として、広く使われている。ARISA の結果、イネの葉や茎に共生する細菌群集は、品種の影響を強く受けることが分かった (Sasaki et al. 2013)。一方で、イネの根に共生する細菌群集は、窒素施肥の影響を多く受けることが分かった (Sasaki et al. 2013)。これを基に、近年開発された次世代シーケンシングを用いて、共生細菌のゲノムシーケンシングを網羅的に解析した。この解析は、メタゲノム解析と呼ばれており、共生細菌のゲノムを培養のバイアスをかけることなく、遺伝子レベルまで解析できる手法である。メタゲノム解析の結果、低窒素条件のイネの根には *Burkholderia* 属細菌が標準窒素条件に比べて増加していた (Ikeda et al. 2014)。個々の遺伝子を解析すると、当初予想した窒素固定での窒素供給はなく、植物ホルモンの生産を通して、植物の影響を与えていること

が示唆された (Ikeda et al. 2014)。*Burkholderia* 属細菌のように、植物と親和性の高い細菌は、植物生育促進効果がある可能性が高い。実際に、存在比率が高かった *Burkholderia* 属細菌を分離し、接種した結果、イネの生育を促進させる効果が確認できた (未発表)。

次の課題は、イネの葉や茎に共生している細菌群集を制御する、宿主側の機構を明らかにすることである。申請者は、ARISA 解析で見いだされた品種間差異の原因となる遺伝子を同定することで、この機構を解明しようと着想に至った。

### 2. 研究の目的

これまでの成果から、水田栽培でのイネ共生細菌群集が、施肥や品種に影響を受けることが分かった。しかし、共生細菌群集を制御する植物の遺伝子は、明らかとなっていない。そこで、本研究では、まず、イネ共生細菌群集の品種間差異が見られる植物ステージを明らかにすることを目的とした。植物の地上部に存在割合の高い *Methylobacterium* 属細菌に着目した。次に、共生細菌群集に宿主植物の生育ステージの変化と環境の相互作用の有無を検証するため、出穂期の異なる栽培した。

### 3. 研究の方法

日本型イネ (コシヒカリ) とインド型イネ (カサラス、IR64、タカナリ) を、東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構内水田圃場で栽培した。施肥量は、窒素無施肥区 (90 Pkg ha<sup>-1</sup>、80 Kkg ha<sup>-1</sup>) とした。播種前に、ばか苗病等の予防や、保菌している菌を除去する目的で、温湯消毒 (60 10 分) を行う。2 - 3 週間程ビニルハウスで育苗し、水田圃場に移植する。除草剤、殺虫剤、殺菌剤は適宜散布した。移植期、分けつ期、幼穂形成期、出穂期にサンプリングした。それぞれのサンプルから細胞液を作り、細胞破碎後、DNA を抽出した。*Methylobacterium* 属細菌特異的なプライマーを作成し、automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) 法により、共生細菌検出した。PCR サンプルをサイズマーカーと伴に、キャピラリーシーケンサーで泳動し、ピークパターンを得る。シーケンサー付属ソフト (GeneMapper) で、ピークのサイズとシグナル強度をデジタルデータに変換する。変換されたデータから R の RiboSort によって、各 OTU についての相対存在比を算出する。これらの相対存在比をサンプルにおける、細菌群集プロファイルとし、RiboSort に搭載されている多次元尺度構成法により、サンプル間のプロファイルと比較した。

材料には、コシヒカリ、SL527 (出穂期が 2 週間遅い)、SL526 (出穂期が 1 か月遅い) 系統を用いた (<http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp>)。出穂期の出穂期の異なる水田圃場で栽培し

たイネを、移植期、分けつ期、幼穂形成期、出穂期、完熟期にサンプリングした。葉、茎、葉、穂、根をサンプリングする。液体窒素で植物体を粉砕し、植物由来の DNA と共に、共生細菌由来の DNA を抽出した。

#### 4. 研究成果

ARISA 法により、各品種と部位に共生している *Methylobacterium* 属細菌を検出することができた。しかしながら、*Methylobacterium* 属細菌のプロファイルには、明確な品種間差異は、どの生育ステージにおいても認められなかった(図1)。逆に興味深いことに、生育ステージによって、細菌群集のプロファイルは変化しており、生育初期は反復ごとにばらつきのある大きなプロファイルが、生育段階が進むにしたがって安定したプロファイルに集約していくことが明らかとなった。

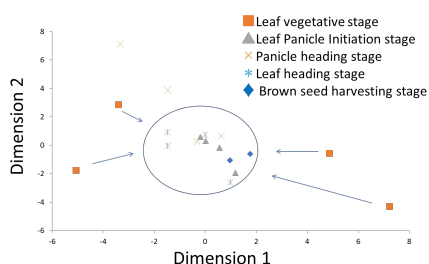


図1 多次元尺度構成法による *Methylobacterium* 属細菌のプロファイル比較

の成果により、植物の生育ステージによって、共生細菌の多様性に变化あることが明らかとなった。しかし、植物の状態と栽培環境のどちらの影響が強いのか、不明なままである。そこで、出穂期のみが異なる3系統(コシヒカリ、SL527、SL526)を用いることで、サンプリング時の植物の影響と環境要因のどちらの影響が大きいのかを検討している。

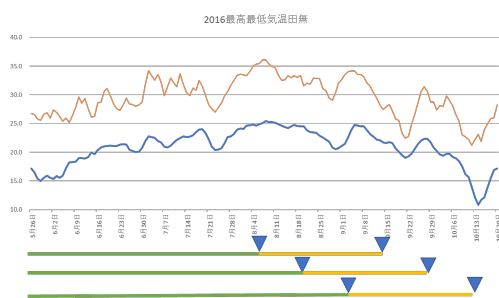


図2. 2016年の栽培期間における温度変化と栄養成長期間(緑)および生殖成長期間(黄)

イネを経時的にサンプリングすることによって、イネの各生育ステージに共生する細菌種の特定を目的としている。これらの系統を用いることで、イネの生育ステージが重要な

のか、それともサンプリングするまでの気象条件の影響が大きいのか、結論を得られると期待している。今後は、イネの生育ステージ特異的に共生している細菌種を特定することが期待される。次の課題は、植物の各生育ステージのメタゲノム解析を行い、細菌種の変動と相関のある物質を特定することができる。着目した細菌種を分離し、植物由来の物質を加えた培養試験により、植物がどのように共生細菌と相互作用しているのかを明らかにすることができる。こうした積み重ねによって、接種細菌の定着する方法を開発することができ、安定した微生物資材の開発につながると考えている。

#### <引用文献>

- Isawa et al. (2010) *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microb. Environ.* 25: 58-61
- Yasuda et al. (2009) Effects of Colonization of a Bacterial Endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on Disease Resistance in Rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2595-2599.
- Sasaki K. (2010) Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 56: 636-644
- Sasaki K. (2013) Effects of plant genotype and nitrogen level on bacterial communities in rice shoot and root. *Microb. Environ.* 28: 391-395
- Ikeda S. et al. (2014) Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microb. Environ.* 29: 50-59

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Masuda Sachiko, Kazuhiro Sasaki, Yuri Kazama, Chiharu Kisara, Shoko Takeda, Eiko Hanzawa, Kiwamu Minamisawa and Tadashi Sato. in submitting Mapping of quantitative trait loci related to primary rice root growth as a response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510

〔学会発表〕(計1件)

佐々木和浩, 増田幸子, 風間ゆり, 木皿千春, 竹田晶子, 半澤栄子, 佐藤雅志, & 南澤究. (2017). イネの根の生育を指標とした *Azospirillum* sp. strain B510 接種に応答する QTL の検出. 環境微生物学会合同大会 2017, 東北大学, 8月 29-31 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 和浩 (SASAKI, Kazuhiro)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科 (農  
学部)・助教  
研究者番号 : 70513688