

令和元年6月14日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17966

研究課題名(和文) 作物共生細菌情報を利用して獲得したBradyrhizobium属細菌の性状解析

研究課題名(英文) Characterization of Bradyrhizobium bacteria isolated from sugar beet

研究代表者

鶴丸 博人 (TSURUMARU, Hirohito)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：60545226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「テンサイ由来Bradyrhizobium属細菌の分類学的特徴と生態学的特徴」を明らかにすることである。テンサイ共生細菌のメタゲノム解析等によって、「テンサイ由来Bradyrhizobium属細菌は、テンサイへの高い定着能と複数の作物生育促進因子を保有していること」が示された。テンサイから分離したBradyrhizobium属細菌の種の同定、ゲノム解析、生育促進能調査などの研究を通して、「Bradyrhizobium属細菌がどのようにしてテンサイ生育を支えているのか」を理解する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共生細菌のメタゲノム情報を元にした、作物生育促進細菌の分離は、これまでほとんど行われていない。こうした情報を考慮せず、実験室で選抜された生育促進細菌は、過酷な圃場環境ではほとんど機能しない。その証拠に、作物生育促進細菌として商業ベースで成功している例はほとんどない。メタゲノム情報を元にした作物生育促進細菌の分離は、こうした困難な状況を打破し、効率的な作物生産に貢献できる生育促進細菌を選抜できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Our research objective is to reveal taxonomic and ecological features of Bradyrhizobium bacteria isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet suggested that Bradyrhizobium bacteria had high affinity to the sugar beet, and that possessed multiple plant growth promoting factors. Taxonomic classification at species level of, genome analysis of, and inoculation experiment with Bradyrhizobium bacteria isolated from sugar beet were conducted to understand how Bradyrhizobium bacteria support growth of sugar beet.

研究分野：環境微生物学

キーワード：作物生育促進微生物 共生微生物 環境微生物 テンサイ Bradyrhizobium

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

1. 研究開始当初の背景

世界の砂糖生産の約40%がテンサイ (*Beta vulgaris* L.) を原料としていることと、他の温帯作物に比べてとびぬけて高い収量を誇ることなどから、テンサイは重要作物として知られている。しかし、テンサイ収量がとびぬけて高い理由は、明らかとなっていない。Steingrobeらは、「テンサイ生育が有益な微生物に支えられている可能性があること」を報告している (Steingrobe et al. 2005. J. Plant Nutr. Soil Sci. 168:496–502)。しかし、テンサイに生息する微生物の大規模な解析は(テンサイ共生微生物のメタゲノム解析は)最近まで行われてこなかったため、「どんな微生物が作物生育に有益なのか?」は不明であった。これは、大量に混入する作物由来のDNA等が、解析の障壁となっていたからである。しかし、2009年に、共生微生物を作物から培養を経ずに直接抽出する手法が相次いで開発された (Ikeda et al. 2009. Microbial Ecol. 58:703–714, Delmotte et al. 2009. PNAS. 106:16428–16433)。これにより、作物由来のゲノムDNA等の混入が少ない、高品質な作物共生微生物のメタゲノム解析が行えるようになった。今後、これらの技術は、植物微生物共生科学を、飛躍的に発展させるだろう。

上述した最新の技術を用いて、近年、我々が行ったテンサイ共生細菌のメタゲノム解析結果は、「テンサイ生育に有益な機能遺伝子を複数保有する *Bradyrhizobium* 属細菌が、テンサイには高い割合 (約11%) で生息している可能性」を明らかにした (Tsurumaru et al. 2015. Microbes Environ. 30: 63–69)。メタゲノム情報を元に選抜した作物生育促進細菌は (テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌の中から選抜したテンサイ生育促進株は) 有用な微生物資材となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、テンサイから分離した約100株の *Bradyrhizobium* 属近縁細菌の中から (テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌ライブラリーの中から) テンサイ生育促進株を選抜することである。

3. 研究の方法

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌ライブラリー

Okazakiらは、培養法を用いてテンサイ共生細菌の多様性解析を行った (Okazaki et al. 2014. Microbes Environ. 29:220–223)。これらの分離株は、16S rRNA 遺伝子の部分配列を元に、近縁細菌を決定している。本研究では、Okazakiらが構築した、テンサイ共生細菌ライブラリー中の *Bradyrhizobium* 属近縁細菌 (約100株) を、実験に使用させていただいた。

16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を用いた系統解析

ほぼ全長を決定した *Bradyrhizobium* 属近縁細菌の16S rRNA 遺伝子配列を、EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) の16S-based ID サービスを用いて解析した。これにより、*Bradyrhizobium* 属細菌の基準株 (type strain) の16S rRNA 遺伝子と、高い類似性を持つ細菌を選抜した。16S rRNA 遺伝子配列の系統樹は、MEGA (<http://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/>) (Neighbor-joining 法) を用いて作成した。ブートストラップ値は、1000回に設定し、*Bradyrhizobium* 属細菌の最新の分類論文 (Grönemeyer et al., Int J Syst Evol Microbiol 2017. 67:4884–4891) に載っている配列を、参照配列として使用した。

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌のゲノム解析

Miseq (Illumina K.K., Tokyo, Japan) と CLC genomics workbench (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) を用いて決定した、7株のテンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌 (管理番号1、7、12、15、66株と *B. betae* NBRC 103048^T) のドラフトゲノムを、DFAST (<https://dfast.nig.ac.jp/>) を用いて解析した。16S rRNA 遺伝子に割り当てられた領域の配列を抽出し、EZBioCloudの16S-based ID サービスを用いて再度解析した。系統解析は、上述の方法を用いた。

テンサイ共生細菌のメタゲノム解析結果 (Tsurumaru et al. Microbes Environ. 2015. 30: 63–69) は、「ほぼ全ての *Bradyrhizobium* 属細菌が保有している、マメ科植物に根粒を形成する遺伝子 (*nod* 遺伝子) や、窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) を、テンサイに共生する *Bradyrhizobium* 属細菌は持っていない可能性」を示した。メタゲノム解析結果と、分離株の (ゲノム解析結果から見た) 性状を照合するため、*B. diazoefficiens* USDA 110 (BA000040.2 1928567-1929451) の *nifH* 遺伝子配列 (885 bp) の blast 解析を、テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌のドラフトゲノムに対して行った。

16S rRNA 遺伝子の類似性が、98.7%以上の既知種がない場合は、ほぼ間違いなく新種である (Stackebrandt and Goebel. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1994. 44:846, Stackebrandt and Ebers. Microbiol Today. 2006. 33:152–155, 浜田と鈴木. 生物工学会誌. 2011. 89:744-747)。 *Bradyrhizobium* 属近縁細菌の中で、基準株の16S rRNA 遺伝子と、97%以下の類似性を持つ細菌のドラフトゲノムを、Average Nucleotide Identity (ANI) calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) を用いて、その近縁種のゲノムと比較解析した。

テンサイへの接種実験

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属 (近縁) 細菌を、テンサイに接種し、約1ヵ月栽培後、地上

部の新鮮重と乾燥重をそれぞれ測定した。無接種区を対照区として用い、接種区の生育促進能を調査した。

4. 研究成果

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属細菌の選抜と、それらの系統解析

16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列を用いて、blast 検索 (表 1) と系統解析 (図 1) を行い、約 100 株の *Bradyrhizobium* 属近縁細菌ライブラリーから、29 株を *Bradyrhizobium* 属細菌として簡易同定した。しかし、これらの株の中には、*Bradyrhizobium* 属細菌として同定することが適切かどうか判断に迷う株が複数含まれていた。これは、pairwise similarity (%) の値が低いことと、*Bradyrhizobium* 属細菌の基準株でさえも、データベースに登録されている 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列が、1262 bp と短い場合があることが、原因であった (表 1)。本研究の結果は、「テンサイには複数の種の多様な *Bradyrhizobium* 属細菌が存在していること」を示している。

表 1. テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 近縁細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の blast 解析結果

菌株管理番号	配列長 (bp)	近縁種	Accession No.	Pairwise Similarity (%)	Completeness (%)
1	1,406	<i>B. centrosematis</i>	KC247115	99.9	100
2	1,412	<i>B. centrosematis</i>	KC247115	99.9	100
3	1,409	<i>B. centrosematis</i>	KC247115	99.9	100
4	1,423	<i>B. ottawaense</i>	NPNY01000075	99.9	100
5	1,424	<i>B. ganzhouense</i>	JQ796661	100	96.6
6	1,397	<i>B. ottawaense</i>	NPNY01000075	99.9	100
7	1,426	<i>B. cytisi</i>	EU561065	99.8	100
8	1,422	<i>B. ottawaense</i>	NPNY01000075	99.9	100
9	1,422	<i>B. ottawaense</i>	NPNY01000075	99.9	100
10	1,418	<i>B. ottawaense</i>	NPNY01000075	99.9	100
11	1,420	<i>B. shewense</i>	jgi.1052898	99.9	100
12	1,417	<i>B. betae</i>	AY372184	99.2	100
13	1,418	<i>B. shewense</i>	jgi.1052898	99.9	100
14	1,417	<i>B. canariense</i>	AJ558025	99.8	100
15	1,418	<i>B. erythrophlei</i>	KF114645	99.7	94.6
22	1,388	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.9	90
36	1,422	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
37	1,417	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
38	1,410	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
39	1,416	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
40	1,416	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
41	1,419	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
43	1,215	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.2	90
44	1,412	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
45	1,417	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
46	1,385	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
66	1,421	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
75	1,417	<i>B. guangdongense</i>	KC508867	97.1	90
83	1,238	<i>B. japonicum</i>	AP012206	98.3	100

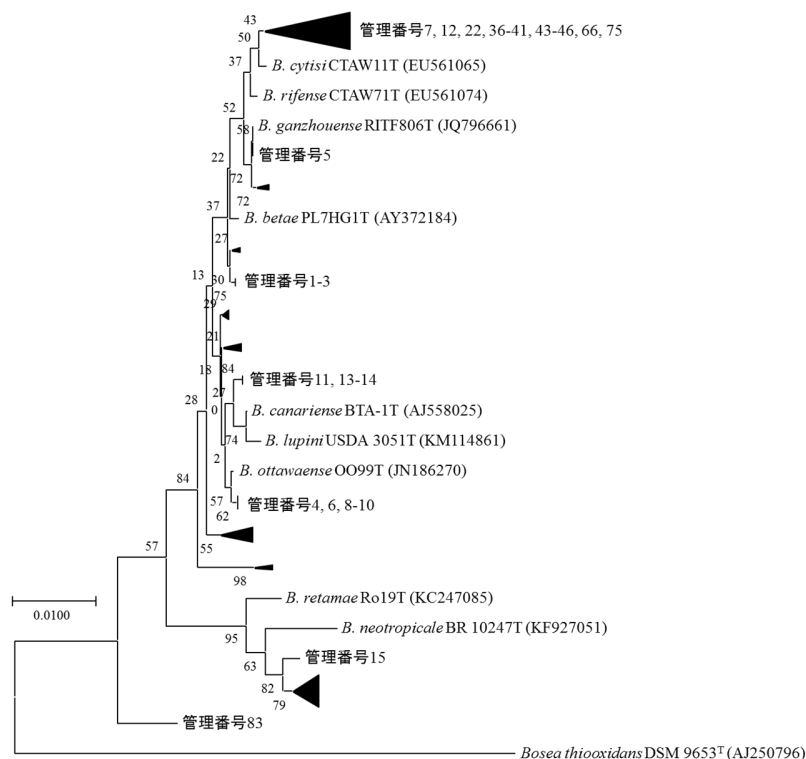


図 1. テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属 (近縁) 細菌の系統解析結果

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノム解析

テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属細菌 (6 株) のドラフトゲノムから取り出した、16S rRNA 遺伝子領域の全長配列を用いて、blast 検索と系統解析を行った。管理番号 1、7、12、15、66 株は、*Bradyrhizobium* 属細菌のそれぞれ別々な種の基準株に高い類似性 (99.2%-99.9%) を示した (data not shown)。これらの株の近縁種は、表 1 と変わりはなかった。しかし、管理番号 83 株の近縁細菌は、*Afipia felis* (Accession No. KB375270) で、pairwise similarity (%)は、98.4%であった。

管理番号 66 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、*B. guangdongense* のそれと 97.1%の類似性を持つ。これは、上述した新種判定基準の 98.7%未満の値である。近縁種 (*B. guangdongense*) のドラフトゲノム配列 (Accession No. CP030051.1) に対する、管理番号 66 株の ANI 解析結果は、78.61%であった。これは、ANI 解析による新種判定基準の 95%よりも低い値を示しており、この株が *Bradyrhizobium* 属細菌の (*Bradyrhizobiaceae* 科) 新種候補であることを示した (図 2A)。しかし、データベースに登録されている近縁種 (*B. guangdongense*) の 16S rRNA 遺伝子配列長は、1262 bp と短い。管理番号 66 株の blast 解析結果で、第 2 位の類似性を示したのは、pairwise similarity が 97.1%の *Tardiphaga robiniae* であった (Accession No. FR753034) (data not shown)。*B. guangdongense* のドラフトゲノム配列 (Accession No. CP030051.1) から、DFAST (<https://dfast.nig.ac.jp/>) を用いて、16S rRNA 遺伝子全長を取出した。この配列と *Tardiphaga* 属細菌の基準菌株の配列を加えて、系統解析を行った (図 3)。この解析結果は、管理番号 66 株が *Tardiphaga* 属細菌であることを示している。*Tardiphaga* 属細菌は、現在、1 属 1 種が報告されている。上述したように、管理番号 66 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、*T. robiniae* のそれ (Accession No. FR753034) と、「新種判定基準の 98.7%未満の類似性」を持つ。データベースを調査した結果、*Tardiphaga* 属細菌の基準菌株のゲノム配列は登録されていなかった。基準菌株ではない *T. robiniae* Vaf-07 のドラフトゲノム配列 (Accession No. LVYV01000001.1) に対する、管理番号 66 株の ANI 解析結果は、81.5%であった。これは、ANI 解析による新種判定基準の 95%よりも低い値を示しており、この株が *Tardiphaga* 属細菌新種候補であることを示した (図 1B)。

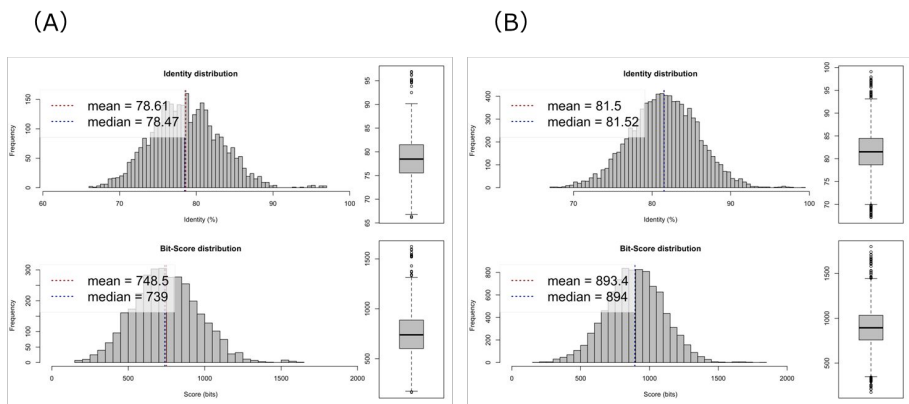


図2. 管理番号66株のaverage nucleotide identity (ANI) 解析結果
 (A) *B. guangdongense*のドラフトゲノム配列 (Accession No. CP030051.1) に対する解析
 (B) *T. robiniae* のドラフトゲノム配列 (Accession No. LVYV01000001.1) に対する解析

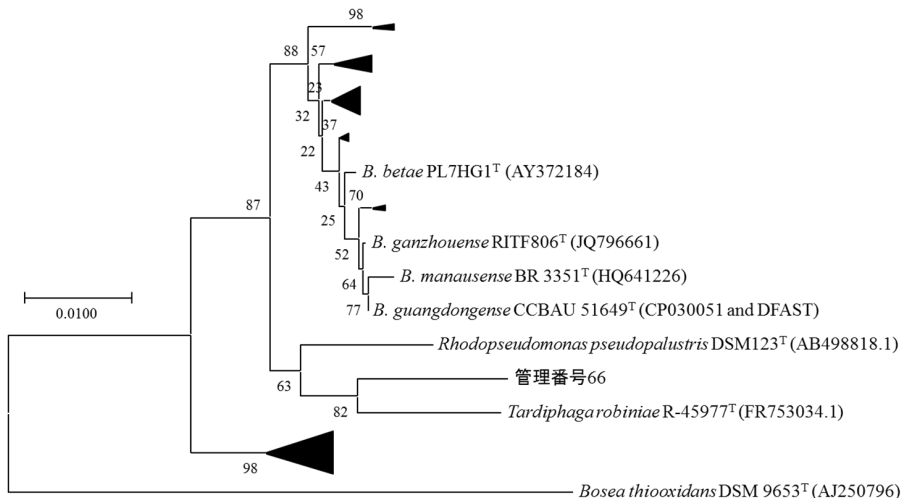


図3. 管理番号66株の系統解析結果

管理番号 12 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、テンサイから分離され、窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) を持たないことで知られる *B. betae* PL7HG1^T (Rivas et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. 54:1271–1275) のそれと高い類似性を持つ (表 1)。PL7HG1^T 株以外の *Bradyrhizobium* 属細菌の基準株は、窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) を保有していることが知られている。これらの基準株は、主にマメ科の根粒由来 *Bradyrhizobium* 属細菌である。*B. diazoefficiens* USDA 110 の窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) 配列の blast 解析結果は、テンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属細菌 (5 株) が、窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) を保有していないことを示した (data not shown)。これらの結果は、「メタゲノム解析結果と、分離株の(ゲノム解析結果から見た)性状が一致したこと」を示している。

Bradyrhizobium 属細菌の分類学では、窒素固定遺伝子 (*nifH* 遺伝子) 配列や根粒形成遺伝子 (*nod* 遺伝子) 配列の系統解析結果も重要視されている。マメ科の根粒由来 *Bradyrhizobium* 属細菌とテンサイ由来 *Bradyrhizobium* 属細菌との間に見られる、窒素固定遺伝子等の有無に関する特徴の違いを明らかにすることは、今後の *Bradyrhizobium* 属細菌の分類学に大きな影響を与えるかもしれない。

テンサイ生育促進株の選抜

Bradyrhizobium 属 (近縁) 細菌を、テンサイに接種し、栽培後、新鮮重量・乾燥重量を測定することで、テンサイ生育促進株の選抜を行った。

現在の農業では、「作物に、どのような共生細菌が存在しているのか?」や「作物生育は、共生細菌によってどのように支えられているのか?」などを考慮した作物栽培はほとんど行われていない。近年、「core microbiome」と呼ばれる作物に共生能の高い細菌から、トウモロコシ生育促進細菌を選抜したことが報告された (Armanhi et al. 2018. Front. Plant Sci. 8:2191)。こうした研究成果と本研究成果を比較解析することは、様々な作物に対する有用な微生物資材の開発に役立つかもしれない。

5. 主な発表論文等

[学会発表]

- (1) 鶴丸博人、作物共生細菌の解析、第 10 回土壌肥料学会九州支部若手討論会 (依頼講演)、2017 年。

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし