

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14470

研究課題名（和文）大気水素が紡ぐ植物と放線菌の未知の共生関係の解明と病害防除能力に与える影響

研究課題名（英文）Elucidation of the unknown relationship between plants and actinomycetes by atmospheric hydrogen uptake and its effect on disease control ability

研究代表者

菅野 学（KANNO, Manabu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10462847

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）：放線菌と植物や他微生物との間の生物間相互作用に大気水素の取り込みが関与する可能性を検証するため、生態・個体・生物種間の多面的なアプローチからなる解析を実施した。

野外調査の結果、優れた水素酸化活性を示した植物の全てから放線菌が検出され、大気水素からエネルギーを得ながら植物表面などの環境に適応していると推察された。菌株保存機関寄託株から系統的に異なる高親和性水素酸化放線菌を新たに見出し、この機能は放線菌系統に広く存在する可能性が示唆された。植物病原菌と放線菌の間の拮抗作用を明確に評価する試験系が確立できておらず、水素酸化が放線菌の病害防除能に与える影響を検証するために、さらなる解析が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放線菌は大気水素の取り込み時に特異的に誘導される未知の機能や生物間相互作用を有しているとの仮説の下に、放線菌の生態と潜在的な病害防除ポテンシャルを再評価することを目的とした。植物と微生物の相互作用の基盤には可溶性化合物や表面接触が知られるが、一方で、ガス分子の関与は大気窒素を除くとよく調べられていない。また、従来の微生物間の拮抗作用は、有機物を利用する従属栄養の代謝時の生理機能を評価したものに限られる。当該微生物群は、農作物を含む多様な植物に普遍的に棲息していることから、本研究の成果を足掛かりにその実態を解明することは、微生物機能を活用した植物生産産業を活性化する契機になるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to verify whether the uptake of atmospheric hydrogen is involved in biological interactions between actinomycetes and plants or other microorganisms, an extensive analysis consisting of ecological, individual, and interspecies approaches was performed.

In the field survey, actinomycetes were detected in all plants that exhibited high hydrogen-oxidizing activity, suggesting that actinomycetes adapt to their environments, such as plant surface, by obtaining energy through atmospheric hydrogen. A new phylogenetically distinct high-affinity hydrogen-oxidizing actinobacteria were found among the deposited strains, suggesting that this function might be widespread in phylum actinobacteria. Further analysis is required to verify the effect of hydrogen uptake on the disease control ability of the actinomycetes, since the assay conditions to clearly evaluate the antagonism between plant pathogens and high-affinity hydrogen-oxidizing bacteria have not yet been established.

研究分野：微生物学

キーワード：共生微生物 植物 生物間相互作用 水素 微生物生態

1. 研究開始当初の背景

近年になって、既知の酵素の下限からさらに 100 倍低濃度の水素を酸化可能な全く新しい水素酸化酵素を有する微生物群が土壌から発見された[1]。高親和性水素酸化酵素を持つ微生物株の約 9 割は放線菌 (*Streptomyces*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* など) に属し、大気中の超低濃度 (約 0.00005%) の水素を酸化する。このことから、放線菌は大気中の水素の約 80% に相当する量 (年間 0.4-0.9 億トン) が陸圏に取り込まれる過程に主要な役割を果たす鍵微生物群と推定されている。研究代表者は、大気中の水素を高親和に酸化する微生物群が広範な陸上植物種に普遍的に存在することを初めて明らかとした。さらに、当該機能を持つ植物共生放線菌の植物体内からの純粋分離に成功した[2]。

植物共生微生物が主な住処とする導管や細胞間隙や葉・茎の表面は、根圏土壌と比べて有機物が常に安定的に得られるとは考えにくく、植物との共生時に放線菌は主に大気水素からエネルギーを獲得していると推測される。実際に、イネの茎部体内から獲得した *Streptomyces* 属放線菌 OS2C 株の野生株と、その高親和性水素酸化酵素遺伝子を欠損させた組換え体 (以下、破壊株) を用いた過去の試験結果より、破壊株では植物体への長期定着や植物生育促進効果が低減することを見出している。さらに、高親和性水素酸化酵素遺伝子のプロモーター下流に緑色蛍光タンパク GFP 遺伝子を部位特異的に挿入した発現レポーター株を植物に接種した結果、この菌株は植物共生時にも当該遺伝子を発現させることが確認されている。

多種多様な二次代謝産物を生産する放線菌は、植物圏や土壌圏にて病害を抑止する有望な生物防除エージェントであり、二次代謝産物の主要な探索源としても知られる。これまでの放線菌研究は、人工培地上での従属栄養のふるまいを調べる方法を基盤としており、自然界において水素酸化のエネルギー獲得様式で生育する放線菌のふるまいを反映した研究アプローチは採られていなかった。そこで、研究代表者は、放線菌は大気水素の取り込み時に特異的に誘導される未知の生理機能を有しており、これが放線菌の高い植物定着能や病害防除能、植物生育促進効果に寄与しているのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

放線菌と植物や他微生物との間の生物間相互作用に大気水素の取り込みが関与する可能性を検証し、植物保護の産業分野における放線菌のポテンシャルを正確に評価して活用することを最終目標に掲げる。農業応用の観点からは、多様な放線菌種の網羅的試験や実用植物種を用いた耐病性試験、拮抗放線菌資材の開発と現地圃場への施用試験が望まれるが、まず本研究では、放線菌の生態と潜在的な病害防除ポテンシャルに関する基盤的知見の獲得を目的とした。して将来の展開の足掛かりとすることを目指す。具体的には、生態 (分子生態解析)・個体 (ガス活性測定)・生物種間 (抗菌活性試験) の多面的なアプローチを組み合わせることで、将来の展開の足がかりとなる学術的知見の獲得を目指した。

3. 研究の方法

(1) 野外植物のガス分析による大気水素の消費能の検証
 広範な系統の植物 18 種 (農作物及び草本、樹木) の葉を採取し、採取後 3 時間以内に、極低濃度の水素を分析可能な高感度検出器 RGD を用いて、密閉環境における水素濃度の減少を分析することで、採取植物片の重量あたりの水素酸化活性を調べた (図 1)。

(2) 野外植物の共生細菌叢の多様性と群集構造の解析
 5 つの植物種 (草本 2 種、樹木 3 種) の葉と根圏土壌から抽出された DNA を対象として、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅し、イルミナ社製 MiSeq シークエンサーの取得データを用いた菌群組成解析や多様性解析を行った。データ解析には Qiime2 のパイプライン及び SILVA の 16S rRNA データベースを用いた。

(3) 高親和性水素酸化放線菌の寄託株からの探索
 高親和性水素酸化酵素の大サブユニットをコードする遺伝子 (*hhyL*) をマーカーとして公開ゲノム情報のマイニングを行い、ゲノム解読がなされており *hhyL* 遺伝子の類似配列が報告されている属で、かつ水素酸化活性が調べられていない 5 つの属を抽出した。選抜した *Amycolatopsis taiwanensis* (*Pseudonocardineae*, 胞子形成株)、*Streptosporangium roseum* (*Streptosporangineae*, 胞子形成株)、*Actinoplanes missouriensis* (*Micromonosporineae*, 胞子形成株)、*Smaragdicoscus niigatensis* (*Corynebacterineae*, 胞子形成株)、*Arthrobacter globiformis* (*Micrococcineae*, 胞子非形成株) の各標準株を国内の微

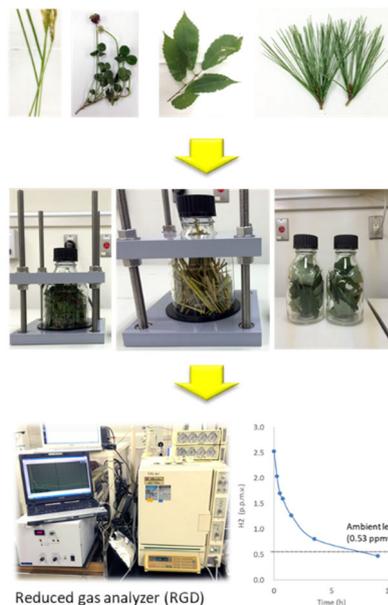


図 1 野生植物の水素酸化活性の分析の流れ

生物寄託機関からそれぞれ取り寄せた。これら 5 属は Suborder レベルで系統的に異なる。各株を既報の生育に至適な培地・条件で培養した平板プレートを用いてガス分析を行い、細胞あたりの水素酸化活性を調べた。また、既報の培地よりもさらに貧栄養な腐葉土壌懸濁液をベースとした土壌エキス培地を自作し、この平板プレート上における水素酸化活性も評価した。

(4) 放線菌と他微生物の拮抗作用の試験

キュウリつる割れ病菌として知られる糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に対する拮抗作用を平板プレート上の対峙培養により試験した。放線菌側は、*Streptomyces* 属放線菌 OS2C 株の野生株及びその高親和性水素酸化酵素遺伝子を欠損させた株、上記の探索により見出された他の高親和性水素酸化放線菌株を本試験に用いた。培養温度は糸状菌の至適条件にあわせて 25°C とした。

4. 研究成果

(1) 植物に存在する放線菌群の水素酸化活性と生態分布の解明

大気水素を利用する放線菌の生理生態の理解を深めることを目指し、野外植物のガス分析による大気水素の消費能の検証と 16S rRNA 遺伝子を対象としたコミュニティ解析を実施した。野外植物 18 種の葉圏の水素酸化活性の調査の結果、大気濃度よりもさらに低い濃度まで水素の減少を確認した。また、水素酸化能は植物種や植物部位により異なることが明らかとなった。さらに、植物重量あたりの水素酸化活性が比較的高い値を示した植物の葉及び根圏土壌の菌叢解析を実施した結果、菌群組成や多様性は植物種間よりも生息場所（葉と土壌）で大きく異なる傾向が見られた。放線菌群は全サンプルから検出され、ある樹木個体の葉では 40% もの高い占有率が確認された。植物に普遍的に存在するこれら放線菌群は、大気水素からエネルギーを得ながら植物表面などの生息環境に適応している可能性が推察された。共生放線菌群は、その高い占有率から、植物の微生物生態系に大きな影響を及ぼしている可能性が考えられる。

(2) 高親和性水素酸化放線菌の分布系統の拡大

Streptomyces 属放線菌 OS2C 株の他に、国内の微生物寄託機関の純粋分離株を対象に水素酸化活性の分析評価を実施した。その結果、*hhyL* 遺伝子の類似配列を保有する菌株が同属に存在するものの生理活性の確認はなされていなかった 5 属（5 つの Suborder）のうち、*Actinoplanes missouriensis* 株を除く試験した 4 株で高親和性水素酸化活性が新たに確認された。以上より、大気水素を利用する能力は放線菌系統に広く存在する可能性が示唆された。興味深いことに、4 株のうち、*Amycolatopsis taiwanensis* と *Arthrobacter globiformis* では生育に至適な培地組成よりも、貧栄養な土壌エキス培地で細胞あたりの高い活性が見られた。これら菌株は、*Streptomyces* 属放線菌 OS2C 株と同様に、有機物が制限されて非増殖となる定常条件下で大気水素の取り込み（水素酸化遺伝子の発現）が活性化している可能性が考えられる。

(3) 大気水素酸化が放線菌の他微生物に対する拮抗作用に与える影響の検討

Fusarium 属の植物病原糸状菌と各放線菌株の拮抗作用を平板プレート上の対峙培養により試験した結果、今回の試験条件では全ての株で明瞭な拮抗能の違いは確認されなかった。植物病原糸状菌と高親和性水素酸化放線菌の試験組み合わせをさらに増やすことが望まれる。それに加えて、水素酸化能が放線菌の病害防除能に与える影響を明らかとするためには、破壊株を用いる以外にも、実験系の大気水素濃度を増減させたり水素酸化反応の阻害剤を加えた際の拮抗の程度への影響を調べるなど、引き続き検証を進めることが望まれる。



図 2 高親和性水素酸化放線菌 OS2C 株と植物病原糸状菌 *Fusarium* 属株の対峙培養
左側プレートは野生株、右側プレートは破壊株

これまでに発見された微生物由来の生理活性物質の半分以上は放線菌から見つけられたものであるが、近年になって、長年研究された放線菌株であっても、ゲノム中の 50-75% の二次代謝合成遺伝子群は眠ったままであることが明らかとなり、人工培地上での従属栄養のふるまいを調べる従来の方法論の限界が指摘されている。本研究は、放線菌の特異な大気水素酸化のエネルギー獲得様式の観点から、放線菌の植物圏における頑健な生態分布や生物間相互作用について取り組んだ初めての研究である。放線菌と植物、放線菌と他微生物の関係の全容のさらなる理解は、当該微生物群のポテンシャルを活用した農業を展開していくうえで重要である。

<引用文献>

- [1] P Constant *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 17 (2011).
- [2] M Kanno *et al.*, *Environ. Microbiol.* 18, 8 (2016).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 菅野 学	4. 巻 52
2. 論文標題 農作物生産の未来を切り拓く植物微生物研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 土づくりとエコ農業	6. 最初と最後の頁 23-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 菅野 学、佐藤 匠、亀岡 啓	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 植物微生物学の培養技術の現状と展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 18-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野 学、玉木 秀幸
2. 発表標題 植物版プロバイオティクスの研究展開
3. 学会等名 第18回産総研・産技連LS-BT合同発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 学
2. 発表標題 植物微生物研究の現状と未来ビジョン
3. 学会等名 日本植物生理学会-日本微生物生態学会共催シンポジウム 「植物微生物研究で共創する未来」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 学
2. 発表標題 植物共生研究の現状と展望：微生物の生活様式の理解と活用
3. 学会等名 第3回土壌医の会全国交流大会 基調講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 学
2. 発表標題 趣旨説明&イントロ「植物微生物研究の潮流」
3. 学会等名 日本微生物生態学会大会 シンポジウム「土-植物-微生物<微生物叢の網羅的把握時代の次にくるもの>」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅野 学、玉木 秀幸
2. 発表標題 植物版プロバイオティクスの研究展開 ～共生微生物フロアの解析技術と単離培養・機能利用～
3. 学会等名 産総研北海道センターワークショップin帯広
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 学
2. 発表標題 植物微生物研究の現状と展望：微生物の生活様式の理解と活用
3. 学会等名 平成30年度 全国土壌改良資材協議会 講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 学、玉木 秀幸
2. 発表標題 植物版プロバイオティクスの研究展開
3. 学会等名 アグリビジネス創出フェア2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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