

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18432

研究課題名（和文）DNAビッグデータが開く作物-微生物共生型農業の展開

研究課題名（英文）DNA big data open up sustainable agriculture system based on plant-microbe association

研究代表者

杉山 修一（Sugiyama, Shuichi）

弘前大学・農学生命科学部・客員研究員

研究者番号：00154500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：宿主植物の進化系統が作物の根に生息する細菌と真菌群集組成に与える影響を調べるために、分類群の異なる20科の異なる作物の種子を同一の土壌を含むポットに播種し、8週間成長させた後に、根のDNAを抽出し、Illumina, Miseqで細菌および真菌の群集組成を調べた。作物の進化系統距離と細菌の群集組成の間に有意なマンテル相関が検出されたが、真菌には認められなかった。宿主植物の系統発生の影響は、ベータプロテオバクテリアやクロロフレクサスなどの特定の細菌系統によるものであった。この結果は、被子植物の進化が根の細菌群集の構成に重要な寄与をしていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は根に微生物群集を宿していることが知られているが、宿主植物がどのように根の微生物群集を確立するのか、そして根の微生物群集がどのように宿主植物の機能に影響を与えるのかは十分に解明されていない。本研究は、根の細菌群集が宿主植物の系統発生に準じて変化していること、その変化に寄与すると思われる特定の細菌系統を明らかにした。これらの結果は、根の細菌群集が被子植物の一次戦略の進化的分岐において重要な役割を果たしていることを示唆し、農業における作物-微生物の共生系を利用した新しい作物病害防除技術の開発につながる知見となる。

研究成果の概要（英文）：In this study we compared the assembly of bacterial and fungal root microbiomes among 20 plant families covering almost a full range of angiosperm to clarify (1) how host plant phylogeny influences its root microbiome assembly and (2) which microbial members are responsible for the differences in the assembly among host plants. Surface-sterilized seeds of each plant were sown in pots containing identical soil, root DNAs were extracted after the growth of 7-8 weeks and the compositions of bacterial and fungal DNAs were examined with Illumina Miseq. The significant mantel correlation was detected between dissimilarity of microbiome assembly and phylogenetic distance of host plants for bacterial microbiomes but not for fungal ones. The effect of host plant phylogeny was due to specific bacterial lineages such as Betaproteobacteria and Chloroflexi. The results suggest important contribution of bacterial root microbiomes in functional divergence at higher taxonomic level in angiosperm.

研究分野：農業生態学

キーワード：微生物叢 作物 輪作 土壌病害 作物-微生物 共生系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の遺伝子解析技術の飛躍的進歩は、ヒトの体内に棲息する微生物叢（マイクロバイーム）の研究を可能にし、腸内細菌叢がヒトの免疫や成人病などの健康機能に大きな影響を与えていることを明らかにした。マイクロバイームは植物の葉や根にも広く見られ、作物の病害抵抗性に大きな影響を与えている可能性が指摘され、世界的に注目を集めているが、農業における作物マイクロバイームの研究は著しく遅れている。

(2) 近年発達した次世代シーケンス技術は、環境に生息する多様な微生物叢の塩基配列の網羅的解析により、群集を構成する微生物種を特定し、宿主と微生物間の相互作用を解明することを可能にした。農地土壌の微生物叢の解析はこれまでの農薬を用いた病害防除から作物と微生物の共生関係を利用した防除への道を開き、無農薬で安心・安全な農産物を消費者に提供する可能性を開く。同時に、健全な腸内細菌叢と免疫機能の強化を通じて自己免疫疾患や食品アレルギーの増加を抑えるという現代社会のニーズにも適合する。このように微生物と宿主の共生系の研究は、化学物質から生物共生系という将来の人間社会における技術のあり方に関する新しい視点を提供するものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 野菜の大規模産地やハウス栽培では同一作物を同じ場所に継続して栽培するために土壌病害が発生しやすく、農薬の大量使用を前提とした栽培が行われている。他方、同じ畑に異なる作物を栽培すること（輪作）で、作物病害が抑制されることは経験的に知られている。輪作による病害抑制は病原菌を含む土壌のマイクロバイームの変化が関与していると推察されているが、その具体的メカニズムはほとんど分かっていない。土壌微生物はその9割以上が培養困難なため、これまで土壌微生物の網羅的解析は不可能であったが、近年の次世代シーケンス技術の発達により、土壌や作物から抽出した試料に含まれるDNAの膨大な配列情報を解読することで、微生物の包括的な解析を可能にした。

(2) 本研究は、宿主である作物種が根に異なるマイクロバイームを形成する能力を持つという仮説を検証する。さらに、作物種が特定の微生物を選ぶプロセスを明らかにすることで、土壌と作物根のマイクロバイームの構造変化による作物病害抑制を解明することが可能になり、作物-微生物間の共生関係を利用した新しい栽培技術の開発につなげることを最終の目的としている。

3. 研究の方法

(1) モクレン類を除く被子植物系統をほぼカバーする20種の花卉を含む作物種を実験に使用した（ハクサイ、トウモロコシ、トマト、ネギ、キュウリ、ミツバ、シュンギク、ハウレンソウ、シソ、ダイズ、オクラ、ヨウサイ、ツルムラサキ、ハウセンカ、キキョウ、エゾカワラナデシコ、ケイトウ、キンギョソウ、ヒナゲシ、ソバ）。

(2) 表面殺菌した20種の種子を同じ土壌を入れたポット（直径113mm、高さ184mm）に播種し、その後温室で育てた。播種後7～8週間の根と土壌サンプルからDNA抽出を行い、その後MiSeqで微生物の網羅的解析を行った。DNAの配列は、細菌では、16SリボソームRNA（rRNA）のV4領域を、真菌では、rRNAのITS2領域を用いた。

(3) 得られたデータから、宿主作物の系統進化とそれらの微生物叢の関係を 宿主植物の進化距離と根の微生物叢の非類似性との間の相関、 宿主植物の系統樹とそれらの根の微生物叢の非類似性、 微生物叢構造の階層的な分類学的レベルへの変動分割の 3 つの方法から解析した。

(4) 植物種間の系統関係は、葉緑体に存在するリブソーム RNA 遺伝子 (rbcL) に基づく進化距離から計算した。樹状図は、R パッケージの関数「hclust」による階層的クラスタ分析を用いた。微生物叢の解析は出現した OTU の相対割合を基にブレイ・カーチス距離を計算し、主座標分析 (PCoA) から各作物間のマイクロバイオーーム構造を特徴付けた。分散分析を PCoA スコアに適用し、平方和 (SS) を分類群の網間、目間、および目内に分割した。

4. 研究成果

(1) この研究で検出された根の微生物の平均 OTU 数は、細菌で 6,241、真菌で 1,009、土壌では細菌で 8,989、真菌で 1,242 と、細菌の微生物叢は、根と土壌の両方で真菌の微生物叢よりも多様性が高かった。ただし、これらの OTU のほとんどが、1 サンプルで 5 回未満の低頻度の出現確率のため、OTU の再現性を高めるために、相対存在量の 0.5% を下回る OTU は分析から除外した。得られた OTU は、細菌で 161、真菌で 130 であり、これらの OTU は、細菌の総量の 68.1%、真菌の 92.05% を占めていた。

(2) 根のマイクロバイオーームと植物の進化系統との関係

宿主植物間の相対割合の有意差は、細菌 OTU の 94% と真菌 OTU の 48% で見られ、真菌よりも細菌の組成に対する宿主植物のより顕著な効果を示していた。葉緑体 rbcL 遺伝子から推定された宿主植物間の進化距離は、細菌群集の類似度と ($r = 0.44$; $p = 0.004$ **; 図 1) 有意な相関があり、根の細菌群集は作物種の進化に準じて変化することを示した。しかし真菌 ($r = -0.03$) では有意な相関は認められなかった。細菌の 18 の双子葉植物科間でも有意な相関が見られ ($r = 0.27$, $p = 0.041$ *)、双子葉植物内

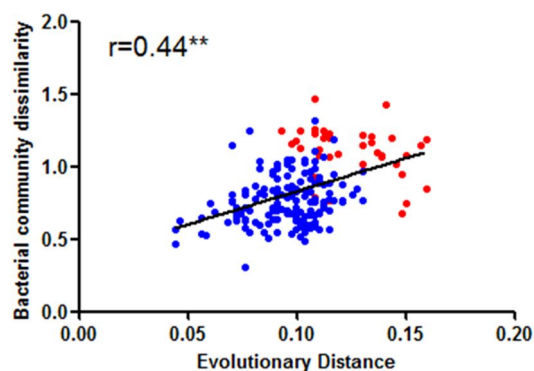


図 1. 宿主植物の進化距離と根の細菌群集の非類似性との相関。青い円は双子葉植物間の、赤い円は単子葉植物間のペア。

でも進化系統の影響が依然として存在すること

を示していた。宿主植物の系統樹と根の細菌群集の非類似性の系統樹のトポロジーは、有意な相関関係を示し、宿主植物の進化の歴史が根の細菌群集に強く影響していることを示している。主要座標分析 (PCoA) で得られた第一軸のスコアの変動のうち宿主植物の網間、目間、目内で説明された割合は、それぞれ 52.5%、33.9%、10.5% をしめた。単子葉植物と双子葉植物の違いは、細菌の根の微生物叢の全変動の半分を説明した (右図) 。

(3) 進化系統シグナルの原因となる主要な微生物

次に、宿主植物の系統効果の原因となる細菌のメンバーを特定した。根の細菌は、20 の宿主植物の間で門レベル (プロテオバクテリアのクラス) で大きな組成の違いを示した。宿主植物の進化距離は、ベータプロテオバクテリア ($r = 0.433$, $p = 0.013$) とガンマプロテオバクテリア ($r = 0.404$, $p = 0.045$) の非類似性と有意な相関を示した。これらの結果は、細菌の特定のグルー

ブ、特にプロテオバクテリアに植物の進化に沿った選好性が発達していることが明らかとなった。

(4)本研究から、作物はその植物分類に沿って根において特定の細菌を選好していることが裏付けられ、輪作を通じた作物の土壌病害防除のメカニズムを明らかにする基礎ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang B. and Sugiyama S.	4. 巻 104
2. 論文標題 (2020) Phylogenetic signal of host plants in the bacterial and fungal root microbiomes of cultivated angiosperms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 525-531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14943	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Boxi Wang, Yoichi Adachi, Shuichi Sugiyama	4. 巻 13
2. 論文標題 Soil productivity and structure of bacterial and fungal communities in unfertilized arable soil	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wang, B., S. Sugiyama.
2. 発表標題 Diversity of root microbiome among 20 plant families: are there any assemble rules in root microbiome.
3. 学会等名 International Society of microbial ecology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang Boxi, Shuichi Sugiyama
2. 発表標題 Root Endophytic Microbiome among 20 Plant Families: Are There Any Assembling Rules in Root Microbiome?
3. 学会等名 Meeting of International Society of Microbial Ecology. Leipzig (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------