

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05759

研究課題名(和文) 地上部光環境による植物根圏共生微生物群集の制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular ecological analysis on rhizosphere microbial community responding to above-ground light environment

研究代表者

池田 成志 (Ikeda, Seishi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・上級研究員

研究者番号：20396609

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)：イネの各種フィトクローム変異体と野生型の日本晴の根共生細菌類と糸状菌類の多様性解析を行った。細菌群については門レベルで5菌群(FCPU426、Fibrobacteres、Nitrospirae、Spirochaetes、WS2)、糸状菌類については綱レベルで4菌群(Dothideomycetes、Saccharomycetes、Sordariomycetes、Ustilaginomycetes)の存在比が野生型の日本晴と有意に異なる変異体を見出した。イネの葉共生糸状菌類についても、綱レベルにおいてMicrobotryomycetesの存在比が野生型の日本晴と有意に大きく異なる変異体を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光受容体に関する遺伝子変異がイネの根や葉の共生微生物群に大きな影響を与えることが明らかにされたことから、植物の光情報伝達関連の生理生態が植物共生微生物について高次の分類群レベルで動態や生態に強い影響を及ぼしていることが示唆された。それらの知見に基づいた光情報伝達系や光環境の制御を介した植物共生微生物の効果的な利用・制御、というような新規の農業微生物制御技術の開発としての可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bacterial and fungal community structures in roots of rice (cv. Nipponbare) were compared between the wild type and phytochrome-associated Tos17 mutants. As a result, the relative abundances of 5 bacterial groups at phylum level (FCPU426, Fibrobacteres, Nitrospirae, Spirochaetes, WS2) and 4 fungal groups at class level (Dothideomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes, Ustilaginomycetes) in roots of mutants were significantly different relative to those in wild type. In addition, community analysis of leaf-associated fungi at class level revealed that the relative abundance of Microbotryomycetes in a mutant was also significantly different relative to that in wild type rice.

研究分野：植物共生微生物学

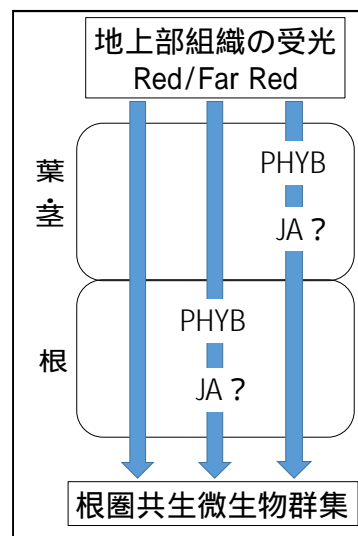
キーワード：イネ Tos17 共生微生物 光 フィトクローム 多様性解析 葉 根

1. 研究開始当初の背景

主に農業利用を目的として植物共生科学や土壌微生物学の分野では植物の生育促進や病害防除等の有用効果を持つ共生微生物の研究が長年にわたり進められてきた。しかしながら、それら有用微生物が実際の農業現場で積極的に利用される例は国内外を問わず非常に少ない。これは実験条件下で認められる多くの有用微生物の効果が農業現場では大変不安定であることに起因しており、研究と農業現場の間に有用微生物の挙動に強い影響を与える大きな環境的なギャップがあることを示唆している。

上記のような背景の中、光の質がフィトクローム B とジャスモン酸を介した情報伝達系を通して根粒菌や菌根菌等の有用微生物との共生を制御していることが明らかにされた (Suzuki et al., 2011; Nagata et al., 2015)。赤色光 (Red) と遠赤色光 (Far Red) の比 (R/FR) が高いと有用微生物の共生を促進し、R/FR 比が低いと有用微生物との共生を阻害するというものである。また、葉や茎等の地上部組織で受けた光の一部 (主に遠赤色光) が茎を經由して根系に移動すること (Sun et al., 2005) そのような光を感知するための土壌中の根組織において植物フィトクローム B が発現・機能していること (Lee et al., 2016) 等から、地上部の光環境が根系の生理生態的反応を制御していることが示唆されている (Ko and Helariutta, 2017)。これらの知見から、地上部の光環境は根粒菌や菌根菌だけでなく根圏共生微生物群集全体にも強い影響を与えている可能性が高いと考えられる。また、近年の微生物ゲノム解析の結果から、多くの土壌細菌や共生細菌が遠赤色光領域で活性化されるタイプのフィトクローム遺伝子を持つことも知られていることから (Rottwinkel et al., 2010) 根圏共生微生物が葉から茎を經由して根系へ伝えられる光を宿主との相互作用のための情報として利用している可能性も考えられる。

以上から、R/FR 比を中心とした地上部の光環境を通じた植物による根圏共生微生物群集の制御機構の解明と、それら光環境に応答する微生物群の特定が、当該分野のブレークスルーにつながると考えた。



2. 研究の目的

地上部の光環境に応答した植物による根圏共生微生物群集の制御機構の分子生態学的な解明を試みる。

3. 研究の方法

2019年4月にTos17を利用したイネの各種フィトクローム変異体 (PhyA, PhyB, PhyC, PhyA/PhyB, PhyA/PhyC, PhyB/PhyC, PhyA/PhyB/PhyC) と野生型の日本晴を含む合計8系統について慣行条件下で育苗し、5月につくば市農研機構の農林団地内に設置された実験用の水田圃場に定植した。各系統について3反復の試験区を設置した。7月下旬に当該水田圃場から各系統の反復試験区から1株ずつ、合計24株について根を含む形で掘り起こし、水洗後に地上部 (葉身、葉鞘) と地下部 (根) の組織に分けて凍結保存した。

得られた各組織試料について、共生微生物群集のDNAを抽出した。根に共生する細菌群と糸状菌群の多様性解析を行うため、得られた共生微生物群集DNAを鋳型として細菌類のrRNA遺伝子配列と糸状菌類のrRNA遺伝子領域のITS配列を対象とした次世代シーケンス解析を行った。葉に共生する糸状菌群の多様性解析を行うため、得られた共生微生物群集DNAを鋳型として糸状菌類のrRNA遺伝子領域のITS配列を対象とした次世代シーケンス解析を行った。得られた配列データについて、プライマー配列や品質の低い配列、キメラ配列などの除去のための編集作業を行った。最終的に得られた配列データについてクラスタリングを行い、各クラスターに含まれる配列データ数に基づいて各種多様性指数の計算を行い、各サンプル中の各菌群の割合についての相対値を算出した。

野生型と変異体間の機能性遺伝子の存在比の差異を検討するため、以上の多様性解析の検討結果に基づいて、共生微生物群集のメタゲノム解析のためのサンプルを選定し、それら試料から植物DNAを除去した共生微生物群集DNAを調製し、ショットガンシーケンスに供試した。

また、予備実験として行った2018年度の8月中旬にサンプリングしたイネ根共生細菌群集についても同様に多様性解析を行った。

4. 研究成果

2019年7月下旬にサンプリングしたイネの各種フィトクローム変異体と野生型の日本晴のイネの根に共生する細菌類と糸状菌類の多様性解析を行った。その結果、細菌類については検討し

た各種多様性指数で変異体と野生型の日本晴の間で有意に異なるものは観察されなかった。

細菌群の存在比について検討したところ、5つの変異体(PhyA、PhyC、PhyA/PhyB、PhyA/PhyC、PhyA/PhyB/PhyC)について門レベルで5つの菌群(FCPU426、Fibrobacteres、Nitrospirae、Spirochaetes、WS2)の存在比が野生型の日本晴と有意に異なることが明らかとなった。変異体の中ではPhyA/PhyBの2重変異体については5つの門全てが日本晴に対して有意差を示した。Spirochaetes門は比較的存在比が大きく(約2.4~4.7%)、4つの変異体(PhyC、PhyA/PhyB、PhyA/PhyC、PhyA/PhyB/PhyC)で日本晴よりも大きく減少していた。特に、PhyAを共通に含む3つの多重変異体(PhyA/PhyB、PhyA/PhyC、PhyA/PhyB/PhyC)は日本晴の約半分に減少していた。

糸状菌類についてはPhyAとPhyBの変異を共通に持つ2つの多重変異体(PhyA/PhyB、PhyA/PhyB/PhyC)の2つの多様性指数(Shannon、Simpson)で日本晴よりも有意に大きいことが明らかとなった。糸状菌群の存在比について検討したところ、3つの変異体(PhyA/PhyB、PhyA/PhyC、PhyA/PhyB/PhyC)について綱レベルで4つの菌群(Dothideomycetes、Saccharomycetes、Sordariomycetes、Ustilaginomycetes)の存在比が野生型の日本晴と有機に異なることが明らかとなった。

2019年7月下旬にサンプリングしたイネの各種フィトクローム変異体と野生型の日本晴のイネの葉に共生する糸状菌類の多様性解析を行った。その結果、検討した各種多様性指数(ASV数、Chao1、ACE、シャノン、シンプソン)で変異体と野生型の日本晴の間で有意に異なるものは観察されなかった。各菌群の存在比について検討したところ、検出された6門中、AscomycotaとBasidiomycotaがそれぞれ約40%から60%を占め、これら2つの菌群間で高い負の相関性を示した(相関係数-0.9898、決定係数0.9957)。しかしながら、門レベルではいずれの菌群の存在比についても変異体と野生型の日本晴の間に有意差は認められなかった。綱レベルにおいては、2つの変異体(PhyA/PhyB、PhyA/PhyB/PhyC)についてMicrobotryomycetesの存在比が野生型の日本晴と有意に大きく異なることが明らかとなった。目レベル科、レベルにおいても、2つの変異体(PhyA/PhyB、PhyA/PhyB/PhyC)についてSporidiobolales、Sporidiobolaceaeの存在比が野生型の日本晴と有意に大きく異なることが明らかとなった。

以上の葉共生糸状菌、根の共生糸状菌と共生細菌について低次の分類単位における野生型と変異体との系統的な菌群の割合の差異については現在検討中である。高次の分類単位についての一通りの多様性解析の結果から、メタゲノム解析は野生型の日本晴とPhyA/PhyCの変異体の根についてのみ検討することとした。メタゲノム解析用の根共生微生物群集DNAを調製し、ショットガンシーケンスによるメタゲノム配列データを無事に得た。それらの得られたデータの詳細(多様性と機能性)について現在検討中である。

また、2018年度の8月中旬にサンプリングしたイネ根共生細菌群集についても解析を行った。その結果、各種多様性指数について変異体において減少する傾向はあるが、一部の変異体は野生型と同程度の指数値を示し、特定のフィトクローム遺伝子の変異と多様性指数の間に明確な関係は見られなかった。さらに各菌群の存在比について2019年度のサンプルと比較したところ、2019年度のサンプルよりも野生型と変異体との差異は不明瞭であった。2018年度のサンプルのサンプリング時期が開花後だったため、根組織の老化などによりイネ変異体の遺伝子型の影響がマスクされている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okazaki Kazuyuki, Tsurumaru Hirohito, Hashimoto Megumi, Takahashi Hiroyuki, Okubo Takashi, Ohwada Takuji, Minamisawa Kiwamu, Ikeda Seishi	4. 巻 36
2. 論文標題 Community Analysis-based Screening of Plant Growth-promoting Bacteria for Sugar Beet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME20137	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 -

1. 著者名 池田成志	4. 巻 53
2. 論文標題 農業微生物研究の現状と今後の展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植調	6. 最初と最後の頁 11-21
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 Seishi Ikeda, Kazuyuki Okazaki, Hirohito Tsurumaru, Takanori Suzuki, and Masayuki Hirafuji	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of different types of additional fertilizers on root-associated microbes of napa cabbage grown in an Andosol field in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME22013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME22013	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池田成志（監修：澤登 早苗、小松崎 将一）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 コモンズ	5. 総ページ数 19/332
3. 書名 有機農業大全 第11部第4章 作物圏共生微生物による病虫害防除	

〔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
研究協力者	杉本 和彦 (Sugimoto Kazuhiko)		

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
---------	---------