

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02986

研究課題名(和文) 共生糸状菌による根圏細菌叢との協調的な植物生長促進およびその寄生性抑制機構

研究課題名(英文) Control of root-associated microbiome by a beneficial fungus for plant growth promotion

研究代表者

晝間 敬 (Hiruma, Kei)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20714504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) は貧栄養環境で植物成長促進効果を示すだけでなく、根における細菌群の構成を変化させる。本研究では、Ct感染時に存在比が増大した病原型細菌に着目したところ、病原型細菌の未知の揮発性物質が病原性発現に重要であることが示唆された。この病原性発現はCtによって弱められることが判明した。一方で、貧栄養条件下で病原型細菌が育った場合に放出される揮発性物質はリン欠乏下で植物の成長を著しく促進した。本病原細菌は栄養環境に応じて放出する揮発性物質の量もしくは質を変化させ、それにより植物成長にプラスからマイナスと対照的な影響を与えることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の成長に有益な共生糸状菌を理解することは、共生糸状菌を活用した農業技術を開発していくためにも重要です。本研究では、共生糸状菌による病原菌抑制機構を理解する一歩として、共生糸状菌が根に誘引する病原細菌に着目して進めたところ、病原細菌由来の揮発性物質が病原性発現に重要であること、および、その病原性は共生糸状菌によって弱められることが判明しました。さらには、病原細菌を貧栄養環境下で生育させた際には、細菌から放出される揮発性物質が植物成長を促すことも発見しました。したがって、本病原細菌は栄養環境に応じて植物成長にプラスからマイナスと対照的な影響を与える揮発性物質を放出していることが考えられました。

研究成果の概要(英文)：The root endophytic fungus *Colletotrichum tofieldia* (Ct) promotes plant growth under low phosphorus (Pi) conditions and induces alterations in the root bacterial community composition. In this investigation, we specifically examine a pathogenic bacterium whose relative abundance is enhanced in the presence of Ct. Our findings reveal that unidentified volatile compounds emitted by the bacteria are responsible for inhibiting plant growth. Notably, the presence of Ct substantially mitigates this growth inhibition. Moreover, we observe that bacterial-derived volatiles even stimulate plant growth under low Pi conditions when the bacteria are cultivated in nutrient-depleted environments. Hence, we ascertain that the production of these bacteria-derived volatiles is significantly influenced by the nutrient status, thereby exerting a context-dependent effect on plant growth, transitioning from negative to positive.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：内生糸状菌 病原菌 シロイヌナズナ 貧栄養応答 病原細菌 揮発性物質

## 1. 研究開始当初の背景

植物は無数の内生型の微生物と相互作用している。研究者は、野外で健康に生育するシロイヌナズナから単離された糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) がシロイヌナズナの根に感染し、リンが枯渇した環境下ではリンを植物へと供給し、植物成長を促すことを発見している。興味深いことに、本菌は病原菌とも非常に近縁であることから、シロイヌナズナは菌根菌などの共生菌との関係が失われた代わりに病原菌とも近縁な内生菌との共生関係を樹立することで、栄養枯渇環境下で適応してきたことが想定された (Hiruma et al., Cell 2016)。本菌 Ct は、実験室環境だけでなく圃場環境でもコマツナ等の植物成長を促すことが明らかになっている (論文準備中)。興味深いことに Ct が定着した根においては Ct が存在しない根と比較すると細菌叢の構成が大きく変化することが 16S メタ解析や細菌の根からの単離実験から明らかになっている。その中でも頻りに単離された細菌について植物成長に与える影響を個別で調査したところ、植物成長にプラスの影響を与える細菌が同定されただけでなく、植物の成長を阻害する細菌群も複数同定された。一方で、細菌を根から単離する際に Ct と共に存在している際には植物は健康であったことから、なんらかの仕組みで細菌の病原性が抑制されていることが示唆されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、共生糸状菌 Ct が根に定着した際に誘引される細菌群が植物の成長を阻害するという病原性を発揮することに着目して、第一に、病原細菌がどのように病原性を植物に発揮するのかを調査する。その上で、Ct がどのように病原性を抑止しているかに迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、植物としてモデル植物であるシロイヌナズナを用い、微生物としては共生糸状菌 Ct、病原菌としては *Pseudomonas* 属の株を用いた。第一に、病原型の *Pseudomonas* 属細菌による病原性発現の仕組みの探索のためにゲノム情報を取得してゲノム解析を行なった。次に、リン十分条件とリン枯渇条件での接種試験などを通じて病原菌が病原性を発現する条件や仕組みを探索した。最後に、Ct が病原性発現を抑制するのかどうかを調査した。

## 4. 研究成果

### 1. *Pseudomonas* 属の全ゲノム情報を取得しゲノム解析から病原性発現に関連する因子の候補を探索した

該当の *Pseudomonas* 属菌の全ゲノム情報を Pacbio のプラットフォームを用いて調査した。その結果、本 *Pseudomonas* 属菌は約 6.5 Mb の円形状のゲノムを有し、6251 の遺伝子が予測された。また、系統解析の結果から *Pseudomonas aeruginosa* (Pso) であることが想定された。Pso は植物の成長を阻害する性質が認められていたことから、植物成長阻害につながる要因をゲノムから探索した。その結果、Pso は植物成長阻害効果が報告されている揮発性物質 hydrogen cyanide や L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid (AMB) の合成のためのオペロンを有していることが判明した。現在は、該当オペロン遺伝子の破壊株作成を行っており、これらの揮発性物質が植物成長阻害を引き起こす要因であるかについて検証する。

### 2. *Pseudomonas* 属細菌由来の揮発性物質が植物に病害を引き起こしていることが示唆された

Pso は直接根に接種することで植物成長阻害を引き起こす。一方で、項目 1 のゲノム解析からは、さまざまな植物成長を阻害する揮発性物質を合成しうる遺伝子群を有していることがあきらかになった。そこで、Pso による植物成長阻害効果に揮発性物質が関与しているかどうかを調査するために、Pso を植物とは直接触れ合わない小コンパートメントの LB 培地内で生育させ、揮発性の物質のみが植物へ作用する実験系を作成した。その実験系で植物と Pso を共培養したところ植物成長を著しく阻害することが判明した (図)。また、Pso の培養シャーレと植物の位置を離れた場合には植物成長阻害効果が低減した。これらの結果から、Pso が放出するなんらかの揮発性物質が植物成長を阻害しているようであることが考えられた。

次に、揮発性物質が植物成長を阻害する仕組みを植物側のホルモンや抗菌代謝物が欠損した変異体を活用して調査した。その結果、エチレン・サリチル酸・ジャスモン酸・および PAD4 経路が欠損した *ein2 pad4 sid2 dde2* 植物変異体においても Pso が放出するなんらかの揮発性物質が植物成長を野生型と同等レベルで阻害したことから、これらのホルモン系の過剰活性化が植物成長阻害につながっているわけではないことが示唆された。同様に、トリプトファン由来の各種抗菌物質が欠損した *cyp79b2 cyp79b3* 変異体においても野生型植物と同等レベルの植物成長阻害効果が認められたことからトリプトファン由来の化合物経路の活性化も揮発性物質による植物成長阻害には直接関与していないことが示唆された。その他にもリン枯渇適応反応を司る転写因

子 PHR1/PHL1 の欠損変異体 *phr1 phl1* においても同様であったことから、リン枯渇応答の過剰活性が原因ではないことが考えられた。以上の逆遺伝学的アプローチから、未知の経路に依存していることが想定されたことから、植物成長阻害に関わる変異体の同定のために野生型 Col-0 に対して EMS 処理を行い、その変異体集団に対するスクリーニングを行なった。現時点で 6250 個体を調査した結果、揮発性物質による植物成長阻害が認められない変異体候補を 8 個体同定した。現在は、変異体の原因遺伝子の同定を目指し研究を継続している。

### 3. Pso が貧栄養環境で生育した場合は、Pso 由来の揮発性物質がリン欠乏条件下で生育するシロイヌナズナの成長を著しく促すことを明らかにした

興味深いことに、Pso を上記と同様の実験系で LB 培地の代わりに 1/3LB 培地で育てて同様の実験を行ったところ、Pso の揮発性物質が植物成長を阻害しないことが判明した。このことから、Pso の揮発性物質の量もしくは種類は Pso が育つ栄養条件で変化することが示唆された。さらに、驚くべきことに、植物がリン欠乏環境で培養された際には Pso の揮発性物質が植物の成長を阻害しないだけでなく、著しく植物成長を促進することが判明した(図)。この事実は、Pso は植物の成長に負の影響を与えるものだけでなく正の影響を与える揮発性物質を放出していることが示唆された。現在は、GC-MS を用いた揮発性物質の同定のための実験を進めている。

### 4. Ct や他の細菌群が存在する際には Pso による病原性発現が抑制された

Ct の根への感染が Pso の病原性を抑止するかどうかを調査した。その結果、Ct の感染が Pso による病原性を抑止すること、しかも、それは、周囲のリン栄養環境に依存しないことが示唆された。興味深いことに、Pso 存在下において Ct の根感染量が低下した環境下においても Ct による病原性抑止効果は認められた。以上からも、Ct はリン欠乏環境でリンを植物へと供給することで植物成長を促すという共生効果に加えて、周囲のリン環境には依存しない形で病原細菌の揮発性物質を介した病原性発現を抑制する機能があること、そしてその機能は必ずしも Ct の根における感染量と比例するわけではないことが示唆された。一方で、1/3LB で Pso が培養された際に認められる植物成長促進効果が Ct の存在下で増強されるかを調査したところ、Pso 単独接種と大きな違いは認められなかったことから、この条件下で互いが相補的に植物成長を促しているわけではないことが示唆された。さらには、Ct と Pso と共に Ct が定着した根から単離された 7 種類の細菌群を同時にシロイヌナズナに感染させた場合は、Ct と細菌群の処理区と比べて植物成長がさらに促されることが判明した。このことは、他の細菌群が共存している条件下では、Pso による病原性がキャンセルされるだけでなく、植物の成長がさらに増強される結果にもつながりうることを示しており、その背景には植物根における Ct と細菌群の相互作用が背景にあることが示唆された。実際に、RNAseq 解析の結果から、細菌群の存在下においては植物根における遺伝子応答が細菌群の有無で大きく変動していないタイミングにおいても Ct の遺伝子発現が大きく変化するなど判明しており、現在、Ct の遺伝子発現が大きく変化した候補遺伝子群に対する逆遺伝学的解析を行なっている。

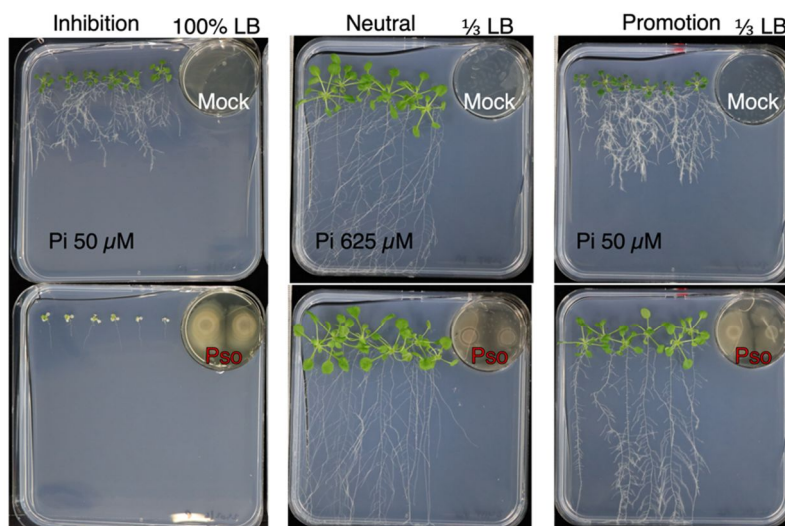


図. Psoの放出する揮発性物質が植物の成長に与える影響  
リン十分条件では、100%LBではPsoの揮発性物質は植物の成長を著しく阻害する(左下)。一方で、1/3LBの条件ではPsoの揮発性物質はリン欠乏条件下において植物成長を著しく促す。(右下)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Utami Yuniar Devi, Hiruma Kei	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome Resource of <i>Colletotrichum spaethianum</i> , the Causal Agent of Leaf Anthracnose in <i>Polygonatum falcatum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PhytoFrontiers	6. 最初と最後の頁 152 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTOFR-12-21-0082-A	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 Utami Yuniar Devi, Nguyen Tan Anh Nhi, Hiruma Kei	4. 巻 204
2. 論文標題 Investigating plant-microbe interactions within the root	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-022-03257-2	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 -
1. 著者名 Mukai Mana, Hiruma Kei, Nishigaki Tomohiro, Utami Yuniar Devi, Otaka Junnosuke, Yoshihashi Tadashi, Sarr Papa Saliou, Oo Aung Zaw, Takai Toshiyuki, Tujimoto Yasuhiro	4. 巻 .
2. 論文標題 Dysbiosis of the rhizosphere microbiome caused by $\gamma$ -irradiation alters the composition of root exudates and reduces phosphorus uptake by rice in flooded soils	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11104-022-05726-5	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 -
1. 著者名 Utami Yuniar Devi, Hiruma Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome Resource of <i>Colletotrichum spaethianum</i> , the Causal Agent of Leaf Anthracnose in <i>Polygonatum falcatum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PhytoFrontiers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTOFR-12-21-0082-A	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 Hiruma Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Continuous Spectrum of Lifestyles of Plant-Associated Fungi Under Fluctuating Environments: What Genetic Components Determine the Lifestyle Transition?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolutionary Biology A Transdisciplinary Approach. Springer, Cham.	6. 最初と最後の頁 117 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-57246-4_6	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Masami Nakamura, Kei Hiruma
2. 発表標題 Plant tryptophan metabolism pathway is crucial for plant growth promotion by Colletotrichum tofieldiae under nitrogen deficiency
3. 学会等名 5年度日本植物病理学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuniar Devi Utami, Kei Hiruma
2. 発表標題 Nutrient status determines Pseudomonas aeruginosa effect on Arabidopsis thaliana growth
3. 学会等名 5年度日本植物病理学会全国大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Yuniar Devi Utami, Masami Nakamura, Kei Hiruma
2. 発表標題 Root endophyte Colletotrichum tofieldiae promotes Arabidopsis thaliana growth under nitrogen limiting conditions
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tan Anh Nhi Nguyen, Yuniar Devi Utami, Masami Nakamura, Kei Hiruma
2. 発表標題 Root endophyte <i>Colletotrichum tofieldiae</i> promotes brassica plant growth and recruits beneficial bacteria to roots under nitrogen-limiting condit
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 植物共生糸状菌が秘める病原性の覚醒
3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuniar Devi Utami, Salvatore Cosentino, Anda Mizue, Iwasaki Wataru, Hiruma Kei
2. 発表標題 Suppression of bacterial root growth inhibition by <i>Colletotrichum tofieldiae</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 Roles of fungal secondary metabolism clusters during plant-microbe interactions
3. 学会等名 日本生化学学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 糸状菌・細菌共生集合体が栄養枯渇環境下での植物生長に果たす役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 晝間敬、青木誠志郎、川邑菜々美、内山朱美、岩崎渉、西條雄介
2. 発表標題 菌の植物ホルモン合成クラスターの活性化が植物共生糸状菌 <i>Colletotrichum tofieldiae</i> の寄生化を促す
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 Molecular basis that induce lifestyle transitions in plant-associated endophytic fungi
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuniar Devi Utami, 晝間敬	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 メタオミクス解析を活用した植物有用微生物の単離同定	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学書間研究室  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hiruma/>  
書間研究室ホームページ  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/hiruma/>

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