

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05982

研究課題名（和文）根組織内エンドファイト群集理解と植物受容因子探索の融合による新しい育種戦略

研究課題名（英文）New breeding strategy using interaction between plants and endosphere bacteria

研究代表者

鈴木 剛（Suzuki, Go）

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10314444

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）：本研究では、次世代シーケンサーを利用して、イネやトマトの成育に影響する根組織内の細菌叢を理解した。また、注目したバクテリアの組織内局在をFISH法による可視化によって証明した。さらにエンドファイトを取り込む遺伝因子を同定するためのPCR分析基盤の構築を試みた。日本のイネ根組織内マイクロバイームデータは統計解析により包括的に分析し、マレーシアのデータと比較した結果を、研究協力者との国際共同研究成果として論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、本研究結果によって植物と共生菌の相互作用を包括的に理解することができ、イネにおいてはマレーシアと日本で地域が違うなかでの根組織内バクテリアの共通性などを明らかにしたことが意義深い。また、PCRを用いてバクテリア量を決定する手法を確立し、遺伝学的解析を行うための基礎を築くことができた。社会的意義としては、今後の次世代型持続的農業のためにエンドファイトを最大限利用できるイネの育成に向けて第一歩を踏み出すことができ、またトマト栽培におけるコンパニオンプランツの役割をエンドファイトの面から理解することで、新しい持続的農業へ寄与できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used next-generation sequencing to understand the microbiome in the root tissues that affect the growth of rice and tomato. We also visualized the localization of the bacteria in the root tissues by bacterial FISH analysis. Furthermore, we tried to establish a PCR analysis platform to identify genetic factors that incorporate endophytes into the plants. We comprehensively analyzed the Japanese rice endosphere microbiome data using statistical analysis and compared the results with the Malaysian data. This research paper has been published as the result of international collaborative research with Malaysian collaborators.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：マイクロバイーム エンドファイト イネ Endosphere

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 土壌微生物は、動植物との微生物叢形成・共生を通じて自然界の循環に貢献している。一方、実験室で扱える微生物種は 1%未満で、残された 99%は「微生物ダークマター」とも言われる未培養微生物であり、機能理解が困難である。次世代シーケンサーの発展により、土壌細菌や植物内外の共生菌を総体として捉えた研究が進展し、微生物側から作物成育に影響するエンドファイト群集の包括的な理解が始まっている。しかしながら、エンドファイト群集との相互作用を制御する作物側遺伝因子の解明という着眼点での研究は展開されておらず、これまでの育種戦略を革新できる可能性がある。

(2) 日本学術会議農学委員会育種学分科会は、平成 29 年 9 月に「気候変動に対応する育種学の課題と展開」と題した報告書を公表した。本報告書の p14~15 には「育種学と多分野を融合する新たな環境農学により生産を守る取り組み」として、土壌細菌や植物内外の共生菌の状態を理解し応用へつなげていく重要性が記述されている。次世代シーケンサーを簡便に利用できる現在、植物に共生する微生物を群集として理解し、気候変動に対応していく解決法が期待されている。これらの理解を基礎基盤として、次世代型持続的農業では、植物と共生菌の相互作用を利用することで、作物の生育状態を最大限に高めていく必要がある。

(3) ヒト腸内細菌叢(腸内フローラ)の理解が人間の健康維持・増進に重要であるように (Nature 特集号 2016, 518: ppS1-S52)、植物においても生育に影響を及ぼすマイクロバイオームの理解が必須である。植物は土壌中に根を伸ばし水・栄養を吸収しているが、根の周りの根圏 (Rhizosphere) 土壌領域では、微生物活性が高く、多様なバクテリア群が存在し、植物と微生物の相互作用の中心的空間である。根圏バクテリアには、病原菌として植物の生育を妨げるものもあれば、逆に成長を促進するものもあり、こうした細菌叢としての総体が植物組織との相互作用により、植物の生育に大きな影響を与えている (Venturi and Keel 2016)。

(4) 近年の次世代シーケンス技術の発展に伴い、16S rDNA 配列に基づく微生物分類によるマイクロバイオーム解析が可能になり、土壌微生物の世界規模でのメタゲノム解析 (Bahram et al. 2018) に加えて、植物根圏のマイクロバイオーム解析が展開されている (Berg et al. 2014, Edwards et al. 2015, Heijden and Schlaeppli 2015, Wagner et al. 2016)。これらのマイクロバイオーム解析結果を見ると、根圏マイクロバイオームは、植物種だけでなく、土壌やその他の環境要因に対する感受性が高く (Edwards et al. 2015)、その多様性とそれをもたらす因子の総理解には至っていない。また、植物に正の影響を与えるものとして、根圏より植物組織側の根内部 (Endosphere) に共生しているエンドファイトが注目されているが (Compant et al. 2010)、その群集理解は始まったばかりで多くは未解明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、様々な環境下で作物の根組織内バクテリアに注目し、マイクロバイオーム解析を行い、FISH 法による可視化で組織内局在を証明し、遺伝学的解析によりエンドファイト群集を取り込みやすい遺伝因子を同定・理解する。根圏ではなく、根組織内部のマイクロバイオーム解析に焦点を当て、「根組織内部のエンドファイトが群集としてどのような存在状態と動態を示すのか?」を明らかにし、「エンドファイト群集を受け入れる植物側遺伝因子の探索・同定」へ繋げていくことを目的とする。

(2) イネ・トマトを材料に根組織内部に入り込む『強共生度バクテリア』のマイクロバイオーム解析を行う。到達点として、植物生育へのエンドファイトの影響を群集として理解し、エンドファイトを受容しやすい植物側の遺伝因子を解析することで、新品種育成の基盤形成を目指す。

(3) 申請者の研究室では FISH 法による染色体可視化研究を行ってきた歴史があり、その設備と技術には高水準なものがある。その利点を生かし、植物組織内のエンドファイト群集の存在動態を、マイクロバイオーム解析に加え、FISH 法による細胞レベルでの可視化技術との融合により解明する。

(4) 本研究のもう一つの目的として、『アジア地域での国際共同研究』の展開がある。研究協力者のマレーシア・モナシュ大学 Rahman 教授とは長年共同研究を行い、多くの論文を共著で発表してきた (Nakano et al. 2005, Suzuki et al. 2011, Fujiwara et al. 2014)。この財産を技術協力・情報交換という研究推進力にできる。

(5) さらに本研究では『コンパニオンプランツ研究』を取り上げる。作物生育環境を考えた時、植物種間の相互作用とともに、作物・他植物と相互作用する微生物の理解は不可欠である。「エンドファイト群集」と「複数の作物種を含む多様な植物相」という「多」対「多」の相互作用

を理解し、コンパニオンプランツとマイクロバイームを融合した新分野創成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 根組織内マイクロバイーム解析・統計解析

サンプリングした根を洗浄・超音波処理した上で、根組織内細菌 DNA を DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてプロトコルを一部改変して単離した。細菌 16S rDNA を増幅する primer (335F/769R) を用いて増幅した PCR 産物を精製し、次世代シーケンス解析して、微生物群集解析プログラム「QIIME2」による群集解析後のマイクロバイームデータを獲得した。統計解析には「R」を用いた。

(2) 細菌 FISH 解析

FISH 検出用に 5' 端に FITC または Cy3 を蛍光標識した 16S rRNA 特異的オリゴヌクレオチドプローブを合成した。また、固定した根サンプルをプラスチック樹脂 (テクノビット 7100) に包埋し、切片標本を作成した。FISH 解析については、切片標本をリゾチーム処理後、プローブをハイブリダイゼーション・洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 細菌特異的 PCR

16S rDNA を増幅する細菌特異的 primer セットを「Primer-BLAST」を用いて設計し、TAKARA Taq HS Fast Detect Premix (TAKARA BIO) を用いて PCR を行った。増幅産物は電気泳動により確認し、一部は Direct sequencing によって塩基配列を確認した。

4. 研究成果

(1) 日本の水田育成イネの生育状況に関連するマイクロバイーム解析

2020 年度は、日本の水田で育成されているイネ (品種ヒノヒカリ) に関して、根組織内 (Endosphere) の細菌のマイクロバイーム解析結果を「R」を用いて統合的に分析・判断し、生育状況の差によって有意に存在量に違いが出た細菌 (1 科、2 属、1 種) をエンドファイト候補として選抜し、それらを特異的に検出できる 16S rDNA の特異的 primer を「Primer-BLAST」を用いて設計した。条件などの試行錯誤の結果、特異的な PCR 産物を得ることができ (図 1) PCR 産物の塩基配列の確認も行った。その後の解析から、これらの細菌がエンドファイトかどうかには再現性の面で疑問が残ったが、遺伝学的解析のための PCR 用 primer が設計可能であることが分かった。

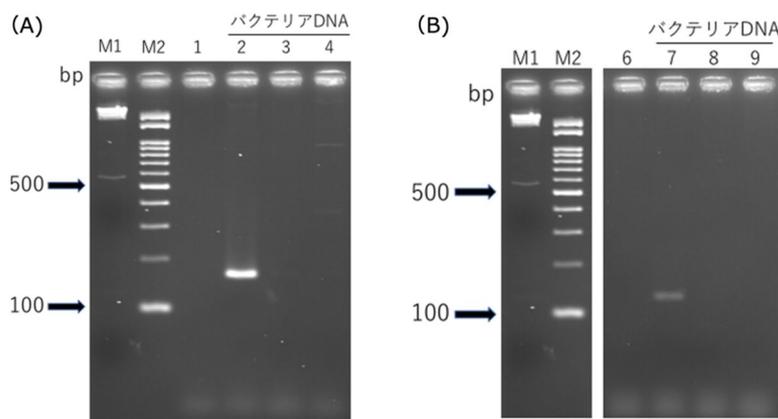


図 1 細菌特異的 PCR によるイネ根組織内細菌存在比較結果

(A) *Chitinophaga* 属と (B) *Legionella* 属で作成した Primer セットを使用
根組織内細菌 DNA (2, 7: 生育良好イネ、3, 4, 8, 9: 生育不良イネ)

2021 年度も、引き続き水田育成イネ個体の根組織内の細菌のマイクロバイーム解析結果を「R」を用いて統合的に判断し、昨年に引き続き、生育状況の差によって有意に存在量に違いが出た細菌をエンドファイト候補として選抜した。

さらに信頼度を上げるために、2022 年度にサンプル数を多くして再度統計解析を詳細に行った。マイクロバイームデータを各分類群レベルに分けたうえで、細菌のデータ数を変化させて、関数 metaMDS を使用し NMDS による 菌叢比較を行ったところ、生育具合の違いによって相違が見られ、PCA を実施することで 2 科の細菌 (*Comamonadaceae*・*Oxalobacteraceae*) が生育不良になる方向へ寄与していることが明らかになった。しかしながら、本研究では生育にプラスの方向で影響を与えるエンドファイトを探索しているため、一旦アプローチを変更することにした。

2023 年度は、植物側の多様性からアプローチすることにして、イネコアコレクション (農業生物資源ゾーンバンク) を含めた 29 品種を用いて、水田育成のイネ根組織内のマイクロバイーム解析を行い、根組織内細菌の品種間差がどれだけあるかを調査するとともに、主座標

分析などを行い、多様性を視覚化した。現在、得られたデータから特定のバクテリアを受け入れやすい品種をピックアップして検証している。

(2) 日本の水田育成イネのバクテリア FISH 解析

2020 年度に新たに 1 属のプロープを作成し、2021 年度に新たに 1 科のプロープを作成し、イネ根組織内での局在をバクテリア FISH 解析によって明らかにした。例えば、*Legionella* 属の観察を行い、根の表皮や皮層での局在を確認した（図 2）。

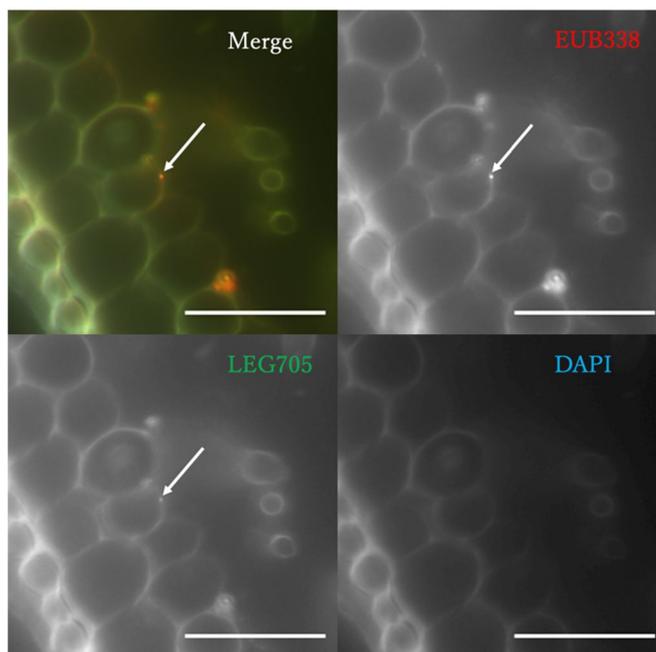


図 2 バクテリア FISH によるイネ根横断面の表皮組織付近のバクテリア局在
合成画像(Merge)では、広範囲のバクテリアを検出する EUB338 プロープのシグナルを赤色で、*Legionella* 属を検出する LEG705 プロープのシグナルを緑色で、DAPI 染色を青色で示し、白い矢印はシグナルの密集している場所を示す (Bar=30 μm)

(3) マレーシアと日本のイネマイクロバイオーム比較

本研究の開始当初、研究協力者(マレーシア・Rahman 教授)との連携方法として、新型コロナウイルスの影響により、出張による相互の往来は断念し、Zoom などを用いてオンラインで議論を重ねた。2021 年度には、本学で調整した日本の水田育成イネ由来の DNA16 サンプルをマレーシアに送付し、マレーシア側でマイクロバイオーム解析を行ったところ、マレーシアと日本のイネ根組織内マイクロバイオームの特徴に大きな差異が認められた。また、そのような菌叢の多様性のなかでも、共通して見出されるコアな根組織内バクテリアを明らかにし、FISH 法による局在解析結果と合わせて、国際共同研究成果として学術誌 Scientific Reports に投稿し、2024 年に掲載された (<https://www.nature.com/articles/s41598-024-60384-0>)

(4) トマトマイクロバイオームへのコンパニオンプランツの影響

2020 年度に、トマトのコンパニオンプランツとして、ラッカセイとの共植の影響を正確に判断するため、栽培と生育具合の再検討を行い、共植区のトマトの地上部新鮮重量と地上部乾燥重量が、コントロール区と比較して有意に増加している結果が得られた。ラッカセイの共植の影響を 2021 年度も引き続き調査し、共植区のトマトの地上部新鮮重量と地上部乾燥重量が、コントロール区と比較して有意に増加している結果を再確認できた。

2020 年度・2021 年度のサンプルの根組織内バクテリアのマイクロバイオーム解析を行い、ラッカセイに誘導されてトマト根へ侵入した可能性が考えられるバクテリア (*Asticcacaulis biprosthecum*) が見出された。また、FISH によるバクテリア局在可視化はトマト用にプロトコルを改善することで安定して検出できるようになった。

2022 年度は屋外の畑においてトマト栽培におけるラッカセイの共植の影響を調査することを試みたが、天候不良などの影響でサンプルが大規模に失われたため、2023 年度にあらためて屋外の畑においてトマト根組織内マイクロバイオームにおけるラッカセイ混植の影響を調査した。その結果、根組織内バクテリアの多様性について、混植のほうが単植のほうが有意に高いことが示された。これまでの結果を総合して、屋内外のトマト栽培において、生育具体や根組織内マイクロバイオームに対するラッカセイ混植の影響はプラスの方向に働いており、エンドファイト特定など今後のさらなる解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Juliyanti, V., Itakura, R., Kotani, K., Lim, S.Y., Suzuki, G., Chong, C.W., Song, B.K., Rahman, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparative analysis of root associated microbes in tropical cultivated and weedy rice (<i>Oryza</i> spp.) and temperate cultivated rice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-60384-0	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 該当する

1. 著者名 Fukushima Kazuki, Kanomata Toko, Kon Aoi, Masuko-Suzuki Hiromi, Ito Kana, Ogata Sadayoshi, Takada Yoshinobu, Komatsubara Yukihiro, Nakamura Tsuyoshi, Watanabe Takumi, Koizumi Saori, Sanuki Hitoshi, Park Jong-In, Niikura Satoshi, Suwabe Keita, Fujii Sota, Murase Kohji, Takayama Seiji, Suzuki Go, Watanabe Masao	4. 巻 96
2. 論文標題 Spatio-genetic characterization of S receptor kinase (SRK) alleles in naturalized populations of <i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>raphanistroides</i> on Yakushima island	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 129 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.20-00066	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 Takada Yoshinobu, Mihara Atsuki, He Yuhui, Xie Haolin, Ozaki Yusuke, Nishida Hikari, Hong Seongmin, Lim Yong-Pyo, Takayama Seiji, Suzuki Go, Watanabe Masao	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Diversity of Genes Controlling Unilateral Incompatibility in Japanese Cultivars of Chinese Cabbage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 2467 ~ 2467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10112467	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 Okamoto, T., Okamoto, M., Hikichi, E., Ogawa, M., Takada, Y., Suzuki, G., Takayama, S., and Watanabe, M.	4. 巻 95
2. 論文標題 Characterization of self-incompatible <i>Brassica napus</i> lines lacking SP11 expression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 111-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.19-00050	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 Suwabe, K., Nagasaka, K., Windari, E.A., Hoshiai, C., Ota, T., Takada, M., Kitazumi, A., Masuko-Suzuki, H., Kagaya, Y., Yano, K., Tsuchimatsu, T., Shimizu, K.K., Takayama, S., Suzuki, G. and Watanabe, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Double-locking mechanism of self-compatibility in Arabidopsis thaliana: the synergistic effect of transcriptional depression and disruption of coding region in the male specificity gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 576140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.576140	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 Murase, K., Moriwaki, Y., Mori, T., Liu, X., Masaka, C., Takada, Y., Maesaki, R., Mishima, M., Fujii, S., Hirano, Y., Kawabe, Z., Nagata, K., Terada, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Shimizu, K., Hakoshima, T. and Takayama, S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanism of self/nonself-discrimination in Brassica self-incompatibility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18698-w	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
研究協力者	ラーマン サディク (Rahman Sadequr)		

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			
マレーシア	モナシュ大学マレーシア			