

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15643

研究課題名（和文）細菌捕食性細菌を利用した植物生育促進微生物の定着性向上による実用化促進

研究課題名（英文）Promoting practical application of plant growth promoting microorganisms by improving their persistence using predatory bacteria

研究代表者

西岡 友樹（Nishioka, Tomoki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・産総研特別研究員

研究者番号：20869929

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物生育促進微生物株の実用化に資する細菌捕食性細菌を活用した技術の開発に向けた研究を実施した。具体的にはまず、植物生育促進微生物株の候補となる細菌株を、調製法を改変した固形培地を活用した分離培養法を駆使することで、セッコク根から多数獲得した。獲得したエンドファイト細菌株の中でも、植物生育促進効果が期待される菌株についてはゲノム解析を実施した。また、細菌捕食性細菌については、独自の分離培養法を考案、活用することで、新システムを含む多数の菌株の獲得に成功した。以上のよう

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物生育促進微生物に限らず、有用微生物株の農業現場での実用化を阻んでいる主原因の1つは、土壌の微生物叢の“抵抗力”により処理した有用微生物株が定着できないことにある。本研究は、細菌捕食性細菌を用いて在来微生物叢の平衡状態を打破し、土着微生物叢の抵抗力を弱体化させることを目的とした技術の開発に繋がるものである。そのため本研究は、環境調和型の農場生産体系の確立に資するものであり、社会的意義は大きいと考える。また本研究で考案、活用した分離培養法は、微生物分野の研究で幅広く活用可能な学術的に重要な技術である。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to develop a technology utilizing predatory bacteria that would contribute to the practical application of plant growth-promoting microbial strains. First, a number of candidate bacterial strains for plant growth-promoting microorganisms were obtained from the inside roots of Dendrobium plants using simply modified agar media. Among the isolated endophytic bacterial strains, genome analysis was conducted for the strains that were expected to have plant growth-promoting effects. In addition, by devising and utilizing an original isolation and culture method for predatory bacteria, we succeeded in isolating a large number of strains, including phylogenetically novel strains. As described above, this research has provided the groundwork for the development of the desired technology.

研究分野：環境農学

キーワード：土壌微生物叢 捕食性細菌 植物生育促進 微生物 分離培養

1. 研究開始当初の背景

持続可能な環境調和型農業体系の確立が求められている昨今では、環境負荷や資源枯渇の問題を抱える化学肥料の使用量削減は喫緊の課題である。化学肥料の使用量削減戦略の中核として、植物生育促進微生物に大きな期待が寄せられている。これまでに植物生育促進微生物の研究は精力的に行われており、様々な作物に対する高い活性ポテンシャルを持った菌株が数多く見出されてきた。しかしながら、これら植物生育促進微生物株を土壌に導入しても定着することが難しく、それらの能力を十分に発揮できないことがほとんどである。これが原因となり、植物生育促進微生物株が土壌環境下での実用化に至った例は極めて少ない。つまり、現状では室の持ち腐れとなっている植物生育促進微生物株の定着性問題を解決し、有効活用することが環境調和型の農業体系の確立への近道ではないかと研究実施者は考えた。また本問題の解決は、植物生育促進微生物に限らず、病害防除微生物など様々な有用微生物の実用化にも資するものであり、持続可能な環境調和型農業体系の確立に大きく貢献する社会的意義が大きい課題であると考えられた。

2. 研究の目的

土壌中には在来微生物群が安定して存在しており高い“抵抗力”があるため、強い攪乱を受けない限り、外部から微生物株を投入しても定着する可能性は低いことが知られている。そこで研究実施者は、植物生育促進微生物株の土壌定着性を向上させるためには、投入前に土壌微生物叢の平衡状態を攪乱し、土壌全体の抵抗力を低下させることが重要なのではないかと考えた。土壌微生物叢を攪乱するには、クローロピクリンなどの薬剤を利用した土壌くん蒸消毒が有効であるが、本方策は人体や環境への毒性が高く環境調和型の農業体系には適合していない。そのため、新奇の環境調和型の土壌微生物叢攪乱法の開発が必要となる。そこで研究実施者は、“生きた抗生物質”と呼ばれる“細菌を食べる細菌”(捕食性細菌)の捕食作用に着目し、捕食性細菌株による土壌微生物叢攪乱を基盤とした植物生育促進微生物株の土壌定着性を向上させる技術を開発できないかと考えた。本研究では、植物生育促進微生物や細菌捕食性細菌の分離培養や機能解析などを実施することで、上述した植物生育促進微生物株の土壌定着性を向上させる技術の開発基盤を整備することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 植物生育促進微生物株の発掘

植物生育促進微生物の発掘に際しては、ラン科植物であるセッコクの根に優占して内生するエンドファイト細菌に注目し、これら細菌を幅広く獲得することを目指した。しかし、ラン科植物に限らず植物のエンドファイト細菌を効率的に分離培養する方法は確立されていなかった。研究実施者が所属する研究グループでは、これまで、寒天をゲル化剤とする固形培地を再考、改良することで細菌の分離培養効率が大幅に向上することを見出している。寒天とリン酸塩を別々にオートクレーブ滅菌する方法(以下、PS法)や、ゲル化剤である寒天の代わりにゲランガムを使用する方法(以下、GG法)で調製した固形培地を活用することで、様々な環境サンプル(土壌、淡水、および底質)から高い効率で多様な細菌種を分離培養できること明らかになっている。このことから、PS法やGG法で調製した固形培地は、植物のエンドファイト細菌の幅広い分離培養にも活用できると考えた。本実験では、基礎栄養培地として100倍希釈したTSA(以下、DTS)培地、および10倍希釈したR2A(以下、DR2A)培地を選定した。これら2種類の培地を簡易改変した方法PS法とGG法)と従来法(リン酸塩と寒天を同時滅菌する方法[以下、PT法])により調整した合計6種類の培地(PS-DTS、GG-DTS、PT-DTS、PS-DR2A、GG-DR2A、およびPT-DR2A)を分離用培地として供試し、セッコクの根からのエンドファイト細菌を分離した。獲得した全てのエンドファイト細菌株について、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた種同定を実施した。また、Illumina MiSeqを活用した16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析を実施することにより、セッコク根のエンドファイト細菌叢の解明に取り組んだ。アンプリコンシーケンス解析で明らかになった優占細菌種と獲得したエンドファイト細菌株の16S rRNA 遺伝子配列相同性を算出し、高い相同性(98%以上)を示したエンドファイト細菌株を優占細菌種に属するものとして選出した。さらに、一部のエンドファイト細菌株のシロイヌナズナやトマトに対する生育促進効果を評価した。また、植物生育促進効果が期待されるエンドファイト細菌株については、GridION X5とIllumina MiSeqを活用することで全ゲノム解析を実施した。

(2) 細菌捕食性細菌株の発掘

細菌捕食性細菌の分離培養法はこれまでに提案されてはいたが、本分離培養法では多様な細菌捕食性細菌の分離培養には成功していなかった。まず研究実施者は、既存の分離培養法に対して複数個の改変を加えることで、細菌捕食性細菌の独自分離培養法の確立に成功した。本分離培養法を活用することで、土壌から多様な細菌捕食性細菌の獲得を目指した。獲得した捕食性細菌株は16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析を実施すると共に、捕食範囲などの機能検定を実施した。

4. 研究成果

(1) 植物生育促進微生物株の発掘

分離培養実験に活用した6種類の培地(PS-DTS、GG-DTS、PT-DTS、PS-DR2A、GG-DR2A、およびPT-DR2A)の分離培養効率を比較するため、獲得したエンドファイト細菌株を16S rRNA 遺伝子配列の類似度(95%のカットオフ値;属レベルに相当)に基づいて97個のグループに分類し、各培地から分離された細菌株の多様性指数(shannon および simpson)を比較した。基礎栄養培地の種類に依らず、PS培地とGG培地由来の分離細菌株の多様性指数はPT培地より顕著に高かった。また、優占エンドファイト細菌種の回収率は、各培地(PT-DTS、PS-DTS、GG-DTS、PT-DR2A、PS-DR2A、およびGG-DR2A)により大きく異なり、それぞれ13.3%、46.7%、23.3%、13.3%、26.7%、および23.3%であり、PS培地やGG培地の回収率はPT培地を大幅に上回っていた。さらに驚くべきことに、PS培地とGG培地を併せて使用した場合、優占エンドファイト細菌種の回収率が50%を超えることが判明した。なお、PT培地で得られた優占エンドファイト細菌種はすべてPS培地とGG培地からも分離されたものであった。優占エンドファイト細菌種の過半数以上が分離可能となったという実績はこれまでに類のないものであり、PS培地やGG培地は幅広い優占エンドファイト細菌種の分離培養に有効であることが明らかとなった。さらに、PS培地やGG培地から分離された菌株の中には、Acidobacteriota門とVerrucomicrobiota門に属する細菌株が含まれていた。Acidobacteriota門とVerrucomicrobiota門の細菌種は一般的に難培養性として知られており、ラン科植物のエンドファイト細菌として分離された報告はこれまでになかった。また系統的に新規な細菌種(登録細菌種との16S rRNA 遺伝子配列相同性が95%未満)については、16S rRNA 遺伝子配列の類似度(98%のカットオフ値;種レベルに相当)に基づいて分類したところ、9つのグループに分かれた。本研究で分離に成功した上述の難培養性のエンドファイト細菌種株は全て、PS培地もしくはGG培地由来のものであり、PT培地からは全く分離されなかった。PS培地やGG培地のみで難培養エンドファイト細菌が分離された原因を解明するため、難培養性エンドファイト細菌株がPS/GG培地とPT培地上でコロニー形成に必要な時間を計測したところ、67%の細菌株がPSまたはGG培地上において短時間でコロニーを形成することが判明した。特に、Verrucomicrobiota門に属する分離株は、PS培地上で8倍以上早くコロニーを形成することが明らかとなった。これらのことから、PS培地およびGG培地は、難培養性細菌種のコロニー形成を促すことで、分離効率を格段に向上させたものと考えられた。以上のセッコク根エンドファイト細菌の分離培養に関する一連の成果については、国際誌で発表した(Nishioka and Tamaki, 2022, Microbiology Spectrum)。また、獲得したエンドファイト細菌株の中でも植物生育促進効果が期待される *Flavobacterium* sp. GSB-24 株や *Dyella* sp. GSA-30 株の全ゲノム解析を実施しており、それぞれ国際誌で発表した(Nishioka et al., 2023a,b, Microbiology Resource Announcements)。エンドファイト細菌株のシロイヌナズナやトマトに対する生育促進効果についても調査を進めているが、現在までに高い生育促進効果を示す菌株を見出すことはできていない。今後も継続的にエンドファイト細菌株の生育促進効果を検証していくことで、能力の高い植物生育促進細菌株の発掘に繋げてゆく予定である。

(2) 細菌捕食性細菌株の発掘

研究実施者が考案した細菌捕食性細菌の独自分離培養法を駆使して分離培養実験を実施したところ、これまでに多数の細菌捕食性細菌株を獲得した。これら細菌捕食性細菌株の16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析を実施したところ、新規系統を含む多様な細菌捕食性細菌株の獲得に成功したことが判明した。新規系統の細菌捕食性細菌株の中には、系統新規性が極めて高い菌株も含まれていた。また、細菌捕食性細菌株の捕食範囲を検定したところ、何れの菌株も Proteobacteria 門に属する一部の細菌群を捕食することが明らかとなった。この成果は、研究実施者が想定していた環境農学分野に対する研究インパクトだけでなく、微生物学分野においても大きなインパクトをもたらすものだと考える。

以上のように本研究課題では、目的とする技術(捕食性細菌株による土壌微生物叢攪乱を基盤とした植物生育促進微生物株の土壌定着性を向上させる技術)の開発基盤となる植物生育促進細菌候補株(セッコク根のエンドファイト細菌)と微生物叢を攪乱する細菌候補株(細菌捕食性細菌株)を整備することができた。目的とする技術の開発をするには解決すべき課題は多数残ってはいるが、今後は、高い生育促進効果を有するエンドファイト細菌株の発掘や、捕食性細菌株の活用によって土壌微生物叢を攪乱(平衡状態の打破)可能であるかの検証などを順次実施していくことで、目的技術の開発に繋げてゆきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishioka Tomoki、Tamaki Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Improved cultivation and isolation of diverse endophytic bacteria inhabiting Dendrobium roots by using simply modified agar media	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0223822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02238-22	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 Nishioka Tomoki、Morinaga Kana、Tamaki Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete genome sequence of Flavobacterium sp. strain GSB-24, isolated from inside Dendrobium roots	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01343-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01343-22	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 Nishioka Tomoki、Morinaga Kana、Tamaki Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete genome sequence of Dyella sp. strain GSA-30, a predominant endophytic bacterium of Dendrobium plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01338-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01338-22	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 西岡友樹、清水将文	4. 巻 60
2. 論文標題 土壌病害防除のための微生物叢改変技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 182-188
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西岡 友樹、玉木 秀幸
2. 発表標題 簡易改良固体培地によるラン科植物に優占する内生細菌の可培養化
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 頼永萌々佳、工藤凱門、西岡友樹、壽崎拓哉、玉木秀幸、竹下 典男
2. 発表標題 根圏合成コミュニティにおけるマイクロバイオータ形成機構
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 頼永萌々佳、工藤凱門、西岡友樹、壽崎拓哉、玉木秀幸、竹下 典男
2. 発表標題 根圏合成コミュニティにおけるマイクロバイオータ形成機構
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021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
---------	---------