

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：11301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21658015  
 研究課題名（和文）植物細胞間隙に生息する微生物群集のメタゲノム解析と病害防除への利用  
 研究課題名（英文）Metagenomic analysis of microbial population in intercellular fluid of rice and its application for disease control  
 研究代表者  
 高橋 英樹（TAKAHASHI HIDEKI）  
 東北大学・大学院農学研究科・教授  
 研究者番号：20197164

研究成果の概要（和文）：

植物の葉表面や葉組織には微生物が生息し、植物や病原微生物と相互作用することによって、植物の生育や様々な環境ストレス・病虫害に対する耐性に関わっているものと推察されている。本研究では、イネ植物体の細胞間隙に生息する微生物群集の多様性と、同微生物の植物への耐病性付与について研究を行なった。その結果、(1)イネの細胞間液から抽出した DNA を鋳型とした 16S と 18S rDNA 断片の PCR-DGGE 法によるバンドパターン解析と塩基配列を用いたデータベース解析から、微生物集団の多様性と微生物種の推定が可能である。(2)有機栽培イネの細胞間隙液に特徴的な内生菌として、*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Acinetobacter* sp.等を見出すことができた。(3)同分離菌の中には、イネいもち病菌の感染、増殖に抑制的な働きをもつものや、イネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症を抑制するものが存在していた。以上のことから、有機栽培イネの細胞間隙液に存在する内生菌集団の中には、病原菌の感染、増殖に抑制的な働きを持つものが存在している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Microorganisms inhabiting in intercellular spaces of plants may stimulate plant defense systems or promote plant growth, whereas they are likely to benefit from the exudates of plant cells. In this study, we analyzed the structure of overall community of endophytic microorganisms in plants and their disease suppressive activity. Intercellular fluid (IF) was collected from leaf blades and sheaths of rice. (1) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) pattern and nucleotide sequence analyses of 16S and 18S rDNA fragments amplified from IF DNA seemed to be available to understand global microbial ecology in plants. (2) *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp. and *Acinetobacter* sp. were preferentially isolated as endophytic bacteria from rice IF cultivated by organic farming system. (3) Some of those endophytic bacteria exhibited potential activity to suppress rice blast and rice bacterial rot seedling diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	210,000	3,310,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物、遺伝子、メタゲノム、内生菌、植物病理学

### 1. 研究開始当初の背景

植物の葉表面に生息する微生物や内生菌が存在することは以前から知られているが、これまでの研究対象は、培養できる微生物に限られていた。しかし、環境中に存在する微生物の中で、培養可能なものは約1割程度と考えられている。したがって、国内国外を問わず、これまでの知見から、植物体に生息する微生物群集の姿を正確に理解することはできないと考えられる。近年、難培養性微生物を含む環境中の微生物群集から直接 DNA の単離・解析を行なうメタゲノム的なアプローチが可能となってきた。すでに、海底下堆積物や温熱鉱床付近に生息する微生物群集の解析や、ヒト腸内細菌叢や口腔細菌叢をまるごと解析することにより、環境中における菌叢全体の代謝活動の把握と、有用遺伝子の獲得が進められている。

### 2. 研究の目的

植物の葉表面や葉組織には微生物が生息し、植物や病原微生物と相互作用することによって、植物の生育や様々な環境ストレス・病虫害に対する耐性に関わっているものと推察されている。しかし、実際の自然環境中において、難培養性微生物を含めてどのような微生物種が生息し、植物や病原微生物とどのように関わっているのかはほとんど明らかになっていない。本研究では、メタゲノム的手法により、植物体中の細胞間隙に生息する微生物群集（以下では内生菌という）をまるごと解析する。内生菌の多様性、同微生物の植物への耐病性付与について研究を行ない、植物組織内に生息する微生物群集の病害抑制における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) モデル植物としてイネを用い、イネ葉身、葉鞘の組織内に生息する内生菌集団から直接 DNA を抽出する。材料とするイネは、栽培法、品種、生育ステージなどを変化させる。得られた DNA を鋳型とし、細菌用として 16S rDNA 可変領域、糸状菌用として 18S rDNA 可変領域をそれぞれ PCR 増幅し、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)法により内生菌集団を構成する微生物の多様性をまるごと解析する。

(2) (1)において PCR 増幅した 16S および 18S rDNA 可変領域の塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて決定し、データベース解析から、集団を構成する微生物種の推定を行う。

(3) 慣行栽培イネの種子および有機栽培イネより自家採種した種子を、それぞれ慣行・有機栽培の水田より採取した土壌に播種し、ポット栽培する。7-10 葉期の植物体から細胞間

隙液を、NA 培地(細菌用)および 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む PDA 培地(糸状菌用)で培養し、菌叢の比較を行う。

(4) また、有機および慣行栽培用のイネ苗(6-7 葉期)および田植え後約 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月のイネ葉身と葉鞘から細胞間隙液を採取し、NA 培地での菌叢の比較から、有機栽培に特徴的な内生細菌コロニーを採取する。得られたコロニーより、PCR で 16S rDNA 断片を増幅し、塩基配列決定とデータベース検索から、微生物の種類を推定する。

(5) (4)で得られた「有機栽培に特徴的な内生細菌」の懸濁液に、イネ種子を浸漬後、滅菌培土で栽培する。5 葉期の植物体を用いて、葉鞘接種法によるいもち菌侵入率の影響から、同細菌のいもち病抑制活性を評価する。

(6) また、有機栽培に特徴的な内生細菌をイネ種子に施用後、イネもみ枯細菌病菌を接種し、同内生細菌を施用した培土に播種する。イネ苗腐敗症の発病度を評価する。

### 4. 研究成果

(1)品種・生育時期・地域の異なるイネにおける細胞間隙の内生菌集団の多様性解析:

①慣行栽培されたイネ 3 品種、宮城県内 3 地域の慣行栽培水田のイネ、および生育段階の異なるイネ(いずれも品種ひとめぼれ)より、細胞間隙液由来 DNA を採取した。同 DNA を鋳型として 16S と 18S rDNA 断片を PCR 増幅し、DGGE 法により解析したところ、両断片とも、品種および地域間で明瞭な差はなかったが、生育時期が異なると 18S rDNA 断片の

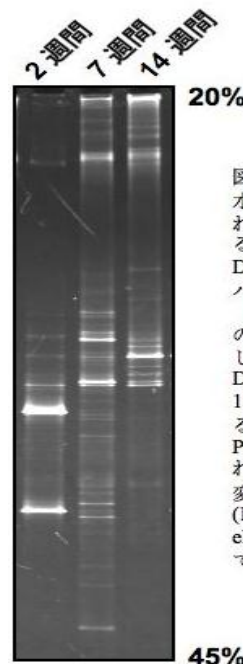


図1 生育時期の異なる水稲(品種ひとめぼれ)の内生菌に由来する18SrDNA断片のDGGEによるバンドパターン。

播種後2, 7, 14週間目の葉身と葉鞘から採取した細胞間隙液からDNAを精製し、18SrDNA断片を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。増幅されたPCR産物を20-45%変性勾配ゲル電気泳動(Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE)で解析した。

泳動パターンが顕著に変化したことから(図1)、有機・慣行栽培のイネで細胞間隙の微生物叢を比較解析する場合には、生育時期を複数選ぶことが必要であることが明らかになった。

②さらに、播種 4 週間後のイネにおける細胞間隙液 DNA から PCR 増幅した 16S と 18S rDNA 断片の次世代シーケンサーによる塩基配列の決定と、データベース解析により、内生菌集団を構成する微生物種の推定が可能であることが示された(図 2)。

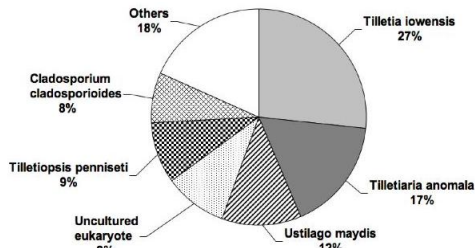


図2 水稲 (品種ひとめぼれ) の細胞間隙液由来の 18S rDNA断片の塩基配列に基づく内生菌種の推定。葉身と葉鞘から採取した細胞間隙液からDNAを精製し、18SrDNA断片を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。高速シーケンサーにより2,593リードの塩基配列(150bp以上)を決定し、BLASTによるデータベース解析による同源性解析を行った。

(2)有機・慣行栽培の水田土壌で育成したイネの細胞間隙内生菌集団の多様性解析:

① 慣行・有機栽培の水稲圃より採取した土壌を用いて栽培した 7-10 葉期の苗の細胞間隙液に由来する 18S rDNA 断片を、DGGE 分析したところ、慣行・有機栽培間で共通のバンドが多数認められたが、有機栽培区に特徴的なバンドも検出されたことから(図 3A 矢印)、この手法により慣行・有機栽培イネの細胞間隙における内生菌集団の比較解析ができる可能性が明らかになった。

② 慣行・有機栽培土壌を用いて育成したイネ苗の細胞間隙液由来 18S rDNA の解析(図 3A)において、慣行栽培よりも有機栽培でより明瞭に検出されたバンド(図 3 矢印)について、有機栽培水田の生育時期の異なる植物体を用いて同様に解析したところ、ほぼ同じ移動度を示すバンドが検出された(図 3B)。したがって、それらのバンドに由来する微生物(糸状菌)は、有機栽培区に特徴的な微生物である可能性が考えられた。また、有機栽培においても、生育段階による 18S rDNA 泳動パターンの

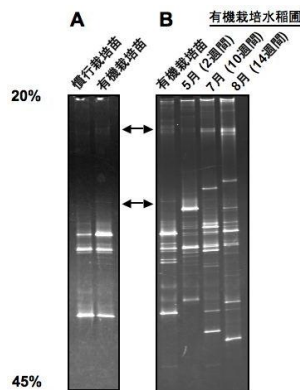


図3 有機栽培の苗および水稲圃 (福島県石川町) で育成した水稲より採取した細胞間隙液由来する 18S rDNA断片の DGGEによるバンドパターン。

変化が確認された。以上の結果より、有機栽培と慣行栽培における内生菌集団には、違いが存在することが示唆された。

③ 同細胞間隙液を NA および PDA 培地を用いて培養したところ、慣行・有機栽培イネ間で形態の異なるコロニーが観察された(図 4)。このことは、有機栽培に特徴的な微生物が細胞間隙に生息していることを示唆している。

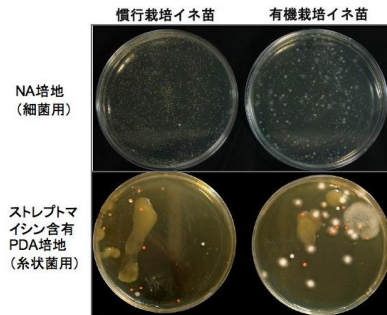


図4 水稲 (品種ひとめぼれ) より採取した細胞間隙液を、NA培地(細菌用)およびストレプトマイシンを含むPDA培地(糸状菌用)で培養した。

(3)有機および慣行栽培イネの細胞間隙液に由来する内生菌集団の培養による比較解析:

6-7 葉期の有機・慣行栽培イネ苗および田植え後約 1 ヶ月、2 ヶ月と 3 ヶ月の有機・慣行栽培水田より採取したイネの葉身と葉鞘から細胞間隙液を採取し、NA 培地に塗布して培養したところ、苗および田植え後 1,2 ヶ月のイネの細胞間隙液において、有機栽培に特徴的なコロニー(培地上に形成されるコロニー数が慣行栽培イネに比べて明らかに多い)が認められた(図 5)。同様に、ポット栽培イネの葉身と葉鞘から細胞間隙液を

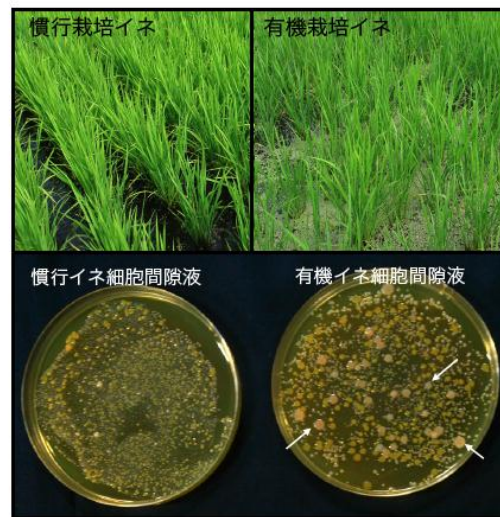


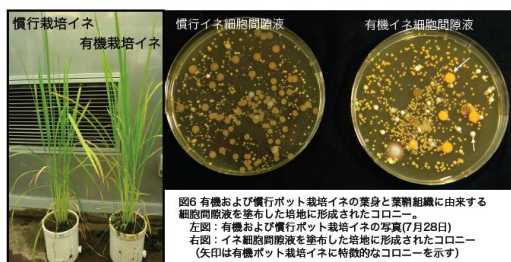
図5 有機および慣行栽培水田イネの葉身と葉鞘組織に由来する細胞間隙液を塗布した培地に形成されたコロニー。

上図: 有機および慣行栽培水田イネの写真(7月26日)

下図: イネ細胞間隙液を塗布した培地に形成されたコロニー(矢印は有機栽培イネに特徴的なコロニーを示す)

採取して培養したところ、有機栽培に特徴的なコロニーが認められた(図 6)。有機栽培イネ苗に特徴的な 3 コロニー、有機栽培水田のイネに

特徴的な7コロニー、有機栽培ポットのイネに特徴的な6コロニー(合計16菌株)を単離・培養し、以後の解析に用いた。

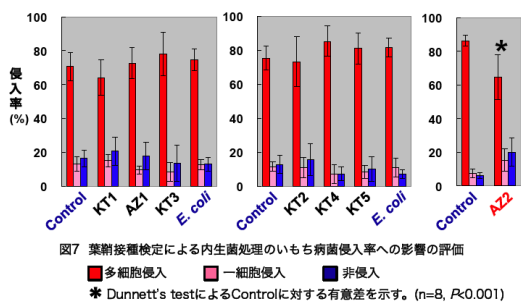


(4)有機栽培イネの細胞間隙液に特徴的な内生菌の推定:

有機栽培イネに特徴的なコロニーの形態および培養性状より、同コロニーは細菌である可能性が高いと判断されたため、16S rDNA 断片を特異的に増幅するプライマーセットを用いたPCRにより増幅し、クローニングを行った。得られたクローンの塩基配列を決定し、データベースによる相同性検索を行ったところ、16菌株中6菌株が *Pseudomonas sp.* であった。

(5)有機栽培イネに特徴的な微生物を施用したイネにおけるいもち病抑制活性の評価:

有機栽培に特徴的な7菌株をそれぞれ処理した5葉期のイネを用いて、葉鞘接種検定により、いもち病菌侵入率への影響を調べた。その結果、AZ2株(*Pseudomonas sp.*)処理によっていもち病



菌侵入率が有意に低下した(図7)。さらに、いもち病菌28S rDNA量からいもち病菌バイオマスを推定したところ、比較無処理区(Control)に対してAZ2株処理区ではいもち病菌のバイオマスが減少する傾向が認められた(図8)ことから、有機栽培イネの細胞間隙液に存在する内生菌株の中には、いもち病菌の感染、増殖に抑制的な働きをもつものが存在している可

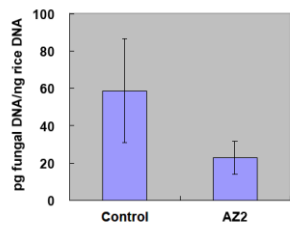


図8 28S rDNA量から推定したいもち病菌バイオマス

能性が考えられた。

(6)有機栽培イネに特徴的な内生菌のイネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症の抑制効果の解析

有機栽培に特徴的な内生細菌がイネの生育初期に比較的多く認められたことから、苗病害に対する効果を評価した。その結果、イネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症に対して、*Bacillus sp.*, *Curtobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.*と推定される内生菌を施用した場合に、苗腐敗症の発病が抑制されることが示唆された(図9)。

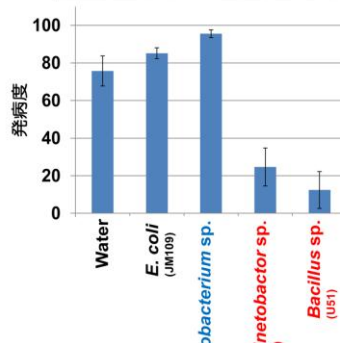
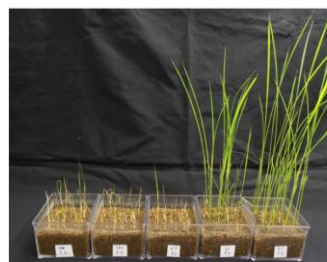


図9 有機栽培に特徴的な内生細菌を施用したイネにおけるイネもみ枯細菌病(苗腐敗症)の発病評価

以上より、有機栽培イネの細胞間隙液に存在する内生菌集団の中には、病原菌の感染、増殖に抑制的な働きを持つものが存在している可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Ikeda, S., Shimizu, A., Shimizu, M., Takahashi, H. and Takenaka, S. (2012) Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. *Biological Control* 60, 297-304 (査読有り)
- ② Takenaka, S., Yamaguchi, K., Masunaka, A., Hase, S., Inoue, T. and Takahashi, H. (2011) Implications of oligomeric forms of POD-1 and POD-2 proteins isolated from cell walls of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* in relation to their ability to induce defense reactions in tomato. *Journal of Plant Physiology* 168, 1972-1979. (査読有り)

- ③ Takahashi, H., Sekiguchi, H., Ito, T., Sasahara, M., Hatanaka, N. Ohba, A., Hase, S., Ando, S. and Takenaka, S. (2010) Microbial community profiles in intercellular fluid of rice. *Journal of General Plant Pathology* 77, 121-131. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 安藤杉尋・高橋英樹 (2011) 「有機栽培イネ細胞間隙に由来する微生物の解析と病害防除」平成 23 年度日本土壌微生物学会大会、2011 年 10 月 23 日 (宮城県鳴子町)
- ② 安藤杉尋・對馬誠也・吉田重信・長谷川浩・小林隆・伊藤豊彰・高橋英樹 (2011) 「有機栽培育苗土によるイネもみ枯細菌病抑制効果の解析」平成 23 年度日本植物病理学会東北部会、2011 年 11 月 3 日 (青森市)
- ③ 高橋英樹 「イネ内生菌のメタゲノム解析と病害防除への展望」第 17 回山形植物防疫懇談会、2010 年 12 月 4 日 (鶴岡市)
- ④ 安藤杉尋・伊藤豊彰・長谷川浩・竹中重仁・長谷修・生井恒雄・高橋英樹 (2010) 「有機栽培イネ地上部より単離された内生細菌のイネいもち病抵抗性への影響」平成 22 年度日本植物病理学会東北部会、2010 年 10 月 5 日 (秋田市)
- ⑤ 高橋英樹・安藤杉尋・伊藤豊彰・長谷川浩・竹中重仁 (2010) 「有機栽培イネからの内生細菌の分離と 16SrDNA 断片塩基配列による解析」平成 22 年度日本植物病理学会東北部会、2010 年 10 月 5 日 (秋田市)
- ⑥ 高橋英樹・関口博之・安藤杉尋・長谷川浩・竹中重仁 (2009) 「品種、地域、生育時期、栽培条件が異なるイネ地上部の内生菌集団から増幅された 16S rDNA-ITS 断片の PCR-DGGE 法による比較解析」平成 21 年度日本植物病理学会東北部会、2010 年 9 月 29 日 (仙台市)

[図書] (計 3 件)

- ① 竹中重仁・高橋英樹 (2012) 「日本発の抵抗性誘導微生物 *Pythium oligandrum* 研究の現状」植物防疫、日本植物防疫協会、(印刷中)
- ② 安藤杉尋・高橋英樹 (2011) 「有機栽培イネ細胞間隙に由来する微生物の解析と病害防除」 (Analysis of endophytes from intercellular fluid of organically-grown rice plants and its effect on disease tolerance) 土と微生物 (Soil Microorganisms) 日本土壌微生物学会 Vol. 65 No. 2, pp. 100~103 (2011)
- ③ 高橋英樹・竹中重仁 (2009) 「遺伝子発現からみた誘導抵抗の全体像」微生物と植物の相互作用 → 病害と生物防除 ← (百町満朗・對馬誠也 編) ソフトサイエンス社、第 2 章 2-1, 128-133

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 英樹 (TAKAHASHI HIDEKI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：20197164