

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25年6月25日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380183

研究課題名（和文）遺伝子発現解析技術・生物検定を用いた表生細菌・イネ相互作用の解明

研究課題名（英文）Analysis of epiphytic bacteria-rice interaction using transcriptome technology and bioassay.

研究代表者

対馬 誠也 (TSUSHIMA SEIYA)

独立行政法人農業環境技術研究所・農業環境インベントリーセンター長

研究者番号：50354080

研究成果の概要（和文）：

種子消毒法により、無菌イネ（以下、低表生菌密度イネ、RLEと呼称）の作出に取り組んだ。その結果、3年間の試験から、RLEは通常栽培イネより1/10000以下の菌密度であり、RLEの研究用素材としての実用化が可能と考えられた。本成果は、マイクロアレイでイネ遺伝子発現を調べるにあたり、従来考慮されなかった「植物生息微生物ノイズ」を大幅に除去した「高精度のイネ遺伝子発現解析」を可能にすると考えた。昨年引き続き、RLEと普通栽培イネのマイクロアレイ解析を実施した。発現の違いに関する解析では、昨年同様に各遺伝子発現レベルで2-fold upしたものを選抜して解析に供試した。その結果、低表生菌密度イネではDNAの複製と修復、たんぱく質の合成・加工・輸送に関与する遺伝子群がより多く発現していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

‘Rice with low epiphytic bacteria (RLE)’, which includes culturable and unculturable bacteria, was developed by sterilizing rice seed. The population of total epiphytic bacteria in RLE is significantly lower more than 1/1000 of that in wild rice. RLE is suggested to be useful for excluding genes’ expression by resident bacteria on plants, which we call it as ‘noise’ caused by epiphytic bacterial, from genes’ expression of rice plant itself. Transcriptome analyses of RLE and wild rice were conducted. The results showed the increase in genes’ expression associated with DNA replication, DNA repair, protein synthesis and transport in RLE as compared to in wild rice. The results suggest that ‘noises’ caused by bacteria inhabiting rice plant are included within the expressions of genes obtained by a microarray analysis of rice plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：葉面細菌、全細菌数計測、無菌イネ作出、イネ遺伝子発現解析、細菌・イネ相互作用

1. 研究開始当初の背景

作物における植物葉面細菌の網羅的な解析は国内では申請者らが中心となって取り組まれていたが、土壌細菌の研究に比べ著しく遅れていた。とくに、土壌では培養できない細菌の数が推定されていたが、葉面細菌では、申請者らの研究以外になかった。次に、それらの微生物がどのように植物の生理等（環境ストレス耐性など）に関与しているかについての研究は極めて少なかった。

2. 研究の目的

申請者らが開発した全表生細菌測定法（全葉面は技術的に無理）を基に、以下のことを行う。

1) 無菌イネの作出：

表生微生物のイネへの影響を調べるための実験系として「無菌イネ」を作出する。

2) トランスクリプトーム解析：

トランスクリプトーム解析等により「無菌イネ」と通常のイネの遺伝子発現を比較し表生微生物の有無が及ぼす影響を評価する。

3. 研究の方法

1) 無菌イネの作出：

種子消毒、組換え植物作成技術を基に、無菌イネ作出方法を開発する。

2) トランスクリプトーム解析：

農業生物資源研究所で開発されたイネマイクロアレイを用いて、無菌イネ、通常のイネの遺伝子発現内容を比較する。

4. 研究成果

1) 無菌イネの作出：

まず、イネ（品種コシヒカリ）の全表面細菌数と培養可能細菌数を調べた、その結果、供試したコシヒカリの全細菌数は約 7.5 (1g 当たり、LOG 値) であったのに対して、培養できる細菌は約 1/10 であることがわかった（図 1）。

次に、玄米のエタノールおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液による滅菌処理後、滅菌土壌を充填した無菌イネ栽培用ポット（図 2）で 1 週間栽培した。イネの全表生細菌数および培養菌数を測定した。

その結果、無菌イネでは、全細菌数および培養可能細菌数が、通常栽培イネの 1/10000 以下であった（図 3）。

本試験の結果から、完全無菌イネではないが、通常栽培イネより明らかに菌密度の低いイネ（以下、低葉面菌密度イネと称す）の開発は可能であることがわかった。

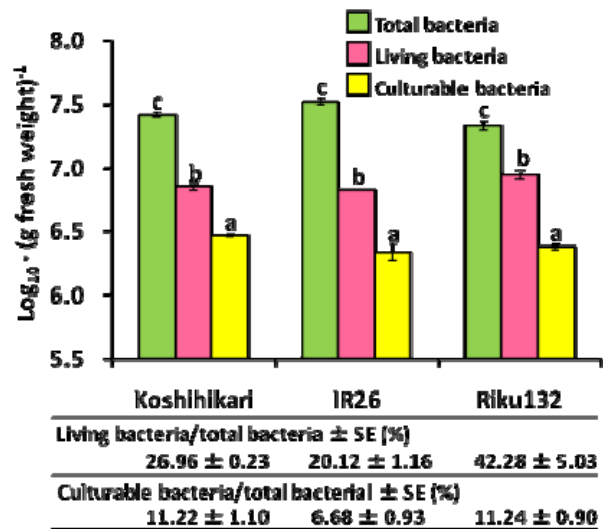


図 1. イネの全表生細菌数と培養できる細菌数の比較（緑：全表生細菌数、赤：生きている表生細菌数、黄：培養できる細菌数）

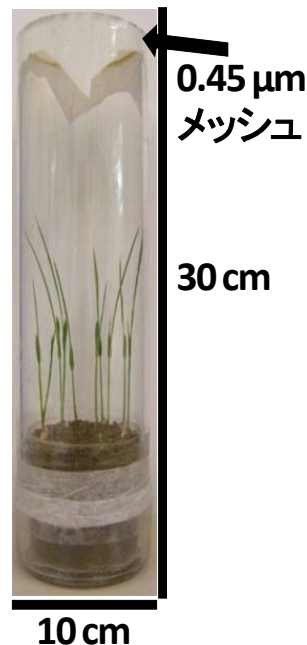


図 2. 栽培中の低葉面菌密度イネ

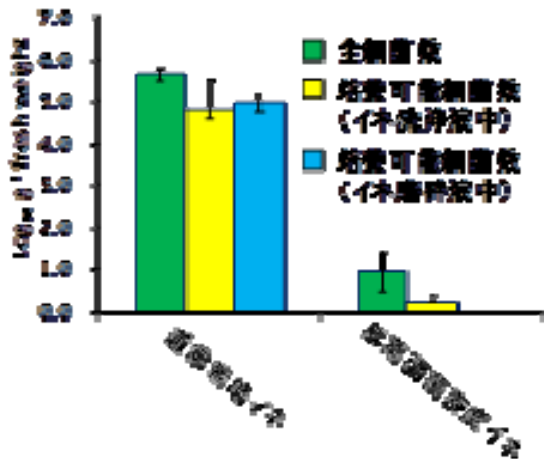


図3. 通常栽培イネ及び低葉面菌密度イネの表生細菌数

3) 低葉面菌密度イネと通常栽培イネの遺伝子発現解析を行った。

その結果、シグナル強度の倍率で、(低葉面菌密度イネ) / (通常栽培イネ)、(通常栽培イネ) / (低葉面菌密度イネ) が2以上であった遺伝子数は、それぞれ 1357 及び 1016 であった。

倍率変化が2以上であった遺伝子のうち、低葉面菌密度イネでは、DNA複製、DNA修復、タンパク合成遺伝子などの発現が多いことが明らかになった。この結果から、遺伝子の発現の違いには微生物の存在が関与している可能性が示唆された(表1、表2)。

表1. 低密度菌密度イネ、通常イネで発現が上昇した全代謝系に關与する遺伝子数

Kegg Pathway	遺伝子数	
	低葉面菌密度イネで上昇	通常栽培イネで上昇
Metabolism		
Carbohydrate Metabolism	50	32
Energy Metabolism	14	11
Lipid Metabolism	26	12
Nucleotide Metabolism	8	1
Amino Acid Metabolism	40	28
Metabolism of Other Amino Acids	8	8
Glycan Biosynthesis and Metabolism	5	2
Metabolism of Cofactors and Vitamins	5	6
Metabolism of Terpenoids and Polyketides	6	7
Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	19	10
Total	181	117
Genetic information processing		
Transcription	1	1
Translation	34	5
Folding, Sorting and Degradation	32	2
Replication and Repair	7	1
Total	74	9
Enviornmental information processing		
Signal Transduction	9	3
Transport and Catabolism	6	4
Total	15	7

表2. 低葉面菌密度イネ、通常イネで発現が上昇した RNA 移送、RNA 分解、DNA 複製、DNA 修復に關与する遺伝子数

Kegg Pathway	遺伝子数	
	低葉面菌密度イネで上昇	通常栽培イネで上昇
Translation		
Ribosome	24	1
RNA transport	5	2
mRNA surveillance pathway	3	2
Ribosome biogenesis in eukaryotes	2	-
Total	34	5
Folding, Sorting and Degradation		
Protein export	6	-
Protein processing in endoplasmic reticulum	21	1
Ubiquitin mediated proteolysis	1	1
RNA degradation	4	-
Total	32	2
Replication and Repair		
DNA replication	2	-
Base excision repair	1	-
Nucleotide excision repair	1	-
Mismatch repair	1	-
Homologous recombination	2	1
Total	7	1

以上の結果、表生細菌の生存は、イネの遺伝子発現および代謝に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

現在も多くの研究目的で、イネでの遺伝子発現解析が行われているが、本成果は、それらの解析の際に、植物生息微生物の生存によって発現している遺伝子を充分考慮して解析する必要があることを示唆している。

また、一方で、本成果は、この成果を進展させて、各種の環境ストレス下で、「葉面微生物が植物の生存戦略にどのように関与しているか」を解明するために、「低葉面菌密度イネ」が強力なツールになることを示唆しており、植物・生息微生物の関係解明に新しい視点を取り入れた点で本研究は意義があったと考える。

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2件)

1. Rieko Niwa, Shigenobu Yoshida, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya and Seiya Tsushima. Method for simply and rapidly enumerating total epiphytic bacteria in the washing solution of rice plants. *Can. J. Microbiology* 57: 62-67 2011
2. Hirosuke Shinohara, Shigenobu Yoshida, Junichiro Enya, Yukiko Watanabe, Takao Tsukiboshim, Hiromitsu Negishi, Seiya Tsushima. Culturable bacterial communities on leaf sheaths and panicles of rice plants in Japan. *Folia Microbiol* 505-517, 2011.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Rieko Niwa, Shigenobu Yoshida, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya, Seiya Tsushima. Dynamics of bacterial population on the surface of rice and wheat plant during the growing seasons. IUMS2011. 166. 2011.
2. 丹羽理恵子・南 栄一・大竹裕子・木村麻美子・對馬誠也. 植物表生細菌とイネの相互作用解明のための低葉面菌密度イネ作出法. 日植病報 77 : 258. 2011.
3. 丹羽理恵子・南 栄一・大竹祐子・木村麻美子・對馬誠也. イネゲノムマイクロアレイを用いた植物表生細菌とイネの相互作用の解明. 日本微生物生態学会. 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

對馬 誠也 (TSUSHIMA SEIYA)

独立行政法人農業環境技術研究所・農業環境インベントリーセンター長

研究者番号 : 50354080

(2) 研究分担者

南 栄一 (MINAMI EICHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・耐病性作物研究開発ユニット・上席研究員

研究者番号 : 7037256