

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248052

研究課題名(和文)植物共生微生物のメタゲノム解析による物質循環機能の解明

研究課題名(英文)Material cycling in plant-associated bacteria by metagenome analysis

研究代表者

南澤 究 (Minamisawa, Kiwamu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,000,000円、(間接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物根圏の物質循環における植物共生菌の役割を知るために、メタゲノム解析によりそれらの物質代謝機能を明らかにすることを目的とした。窒素条件の異なる水田に栽培したイネ根に生息している細菌群集のメタゲノム解析の結果、メタン酸化遺伝子の相対存在比が低窒素環境で上昇していた。日本晴とイネ共生遺伝子CCaMK変異体は、低窒素区においてメタンフラックスが約2倍上昇した。種々の解析の結果、イネCCaMK遺伝子が低窒素環境でメタン酸化窒素固定細菌を受容し、水田環境に豊富なメタンをエネルギー源としてイネ根で窒素固定を行っていた。その他の環境変動に対してもイネ共生細菌群集や土壌RNAが敏感に応答していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated bacterial communities in paddy rice with low (LN), standard (SN) levels of N fertilizer application. Metagenome analysis suggested shifts of bacterial communities between LN and SN root microbiomes. The abundances of functional genes for methane oxidation were significantly increased in LN root microbiome. Plants have mutualistic symbiotic relationships with microorganisms by CCaMK. We examined the effect of an OsCCaMK mutant (NE1115). The CH₄ flux of NE1115 in the LN field was significantly higher than that of WT, although no difference was observed in the SN field. qPCR and 13C/15N isotopic determinations suggested that CH₄ oxidation and N₂ fixation were simultaneously activated in the root of WT rice in the LN field, and both processes are likely controlled by OsCCaMK. Metaproteome and CARD-FISH analyses demonstrated that both processes are mediated by type II methanotrophs inhabiting the vascular bundles and epidermal cells of the rice roots.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学;環境農学

キーワード：植物共生微生物 メタゲノム解析 物質代謝 植物マクロバイオーム メタン酸化 窒素施肥

1. 研究開始当初の背景

植物の葉、茎、根の表面や組織内には広義の共生微生物が群集として生息しているが、培養困難な微生物が多いため、その役割について不明な点が多く、学術的な役割の解明や利用は進んでいない。根と土壌の界面(根圏)では、植物根から分泌物の投入が積極的に行われており、これらの化合物は微生物を介して植物養分吸収に作用していると考えられるが、その機能的な役割もほとんど分かっていない。このような植物共生微生物の研究は、環境保全や食料問題解決につながる研究課題としての重要性は認識されているものの、これまでの技術では解析不可能であった。

根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定研究では、植物側にある根粒菌受容のためのシグナル伝達系(Common Symbiosis Pathway)や根粒数制御システム(Autoregulation)の分子機構が解明され、微生物と植物の相互作用のモデルとしての研究が推進されている。そこで、申請者らのグループでは、植物共生微生物(エンドファイト、エピファイト、根圏微生物)の16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物群集構造変化を追跡し、植物遺伝型や環境による共生微生物群集の制御や物質代謝などの機能について新規な知見を獲得しつつある。

手法的には、植物体から密度勾配遠心により共生微生物を抽出する新規手法を開発し、イネ地上部および根組織に生息している細菌群集構造を明らかにしつつある。特に興味深いのは、イネ根組織におけるメタン生成古細菌とII型メタン酸化細菌が極めて多いことなどである。また、イネ地上部のメタゲノム解析からメタノール資化性の*Methylobacterium*の特定株ゲノムが極端に多く観察されている。以上より、植物は共生微生物を群集レベルで制御しており、しかも多彩な物質循環機能(C1代謝、窒素固定など)を保有していると考えられる。

2. 研究の目的

植物の養分吸収、根圏における物質変換、温室効果ガスの揮散などの農耕地における物質循環には、植物共生菌(エンドファイト、エピファイト、根圏微生物)が宿主植物に制御されながら、微生物群集や集団として予想以上に深く関わっている事実が、申請者らの

研究で分かり始めてきた。本研究では、申請者らが開発した植物共生細菌の密度勾配濃縮法等を基盤として、植物共生微生物群集のメタゲノム解析とそれに基づく鍵微生物の分離を行い、今までアクセスが出来なかった植物共生微生物群集の炭素・窒素などの物質代謝機能を明らかにする。

3. 研究の方法

東北大学鹿島台野外湛水実験施設の水田圃場に日本晴およびその *tos17* 変異体を栽培し、移植後約3ヶ月目の出穂期のイネの根を採取した。イネ根を水道水で土壌を丁寧に洗浄後、イネ根組織を摩砕し、密度勾配遠心による細菌細胞抽出法により、細菌細胞を得た。植物由来のDNA除去した後に、細菌細胞を破碎し、DNAを抽出し、ショットガンライブラリーを作成し、454パイロシークエンサーによりメタゲノム解析を行い、MG-RASTにより機能遺伝子の同源性検索を行った。また、細菌細胞からタンパク質を抽出し、一次元SDS-PAGEに分離後、MLDI-TOF-MASS解析を行った。メタン酸化活性は $^{13}\text{CH}_4$ ガスを投与しイネ根に取り込まれた ^{13}C で測定した。定量PCRによりイネ根のメタン酸化細菌の *pmoA* 遺伝子コピーを測定した。

4. 研究成果

(1) 水稲根共生微生物のメタゲノム解析

肥料削減は持続的農業の一つの目標である。申請者らは窒素肥料に注目し、長年窒素肥料のみを施肥していない水田圃場(低窒素区)と慣行施肥区のイネ植物体の細菌群集構造およびメタゲノム解析の比較を行ってきた。その結果、窒素肥料を施肥していない低窒素区のイネ根表面および内部の細菌群集構造が、慣行区と大きく異なっていることが分かった。特に、低窒素環境でイネ根に *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Methylosinus* 属等の特定の窒素固定やメタン酸化に関わる細菌群の相対存在比が上昇した(図1)。機能遺伝子として、メタン酸化や植物ホルモン関連遺伝子の相対存在比が低窒素環境で上昇した。また、低窒素区のイネ根では、イオウ、鉄、芳香族化合物の細菌代謝関連遺伝子が増加した。これらの結果は、低窒素環境がイネ根の共生細菌群集を形作る鍵因子であり、その結果、水田生態系の地球化学的過程に影響することが示唆され

た (Ikeda *et al.*, 2014)。

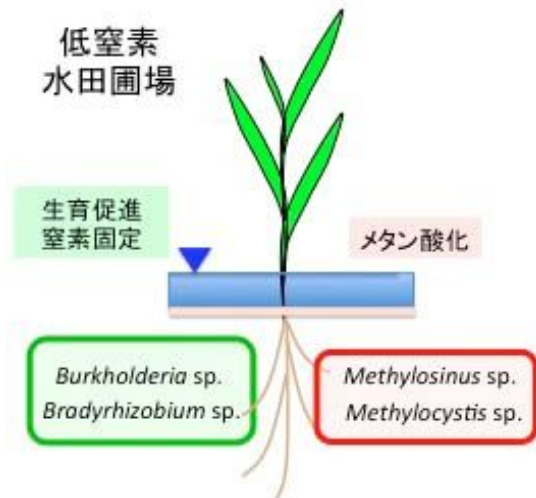


図1 メタゲノム解析の結果の概要

植物は微生物との共生を通じて窒素やリン等の栄養を獲得し栄養が貧弱な土壌でも生育できることが古くから知られている。最近の 10 年間、植物と微生物の共生のゲノムレベルの解明が飛躍的に進んでいる。例えば、マメ科植物は共通共生シグナル伝達系 (Common symbiosis pathway: CSP) を通じて根粒菌や菌根菌と共生することがモデル植物であるミヤコグサを用いた最近の研究で分かってきた (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005) (図 2)。しかも、CSP の *CCaMK* 遺伝子が微生物との共生に中心的な役割を果たしていることが明らかになってきた。さらに、マメ科植物だけではなく、非マメ科植物のイネ等にもこの CSP のホモログが保存されており、*CCaMK* 遺伝子がマメ科だけでなく、イネのような非マメ科植物にも菌根形成に必須であることが示唆されている (Banba *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2010)。しかし、*CCaMK* 遺伝子は非マメ科の共生細菌との関連については不明であった。申請者らは、*CCaMK* 遺伝子変異イネを用いて、圃場レベルでこれらの共生遺伝子とイネ根共生微生物との関連について調べてきた。その結果、*CCaMK* 遺伝子変異イネで *Rhizobiales* 目を含むいくつかの共生細菌が減少した (Ikeda *et al.*, 2011)。*Rhizobiales* 目細菌には窒素固定細菌やメタン酸化細菌が多く存在するため *CCaMK* 遺伝子の存在がメタン酸化細菌にも影響を及ぼし、イネからのメタン発生も変化することが予測された。そこで、植物共生に関わる *CCaMK* 遺伝子が窒素レベル

の異なるイネにおいてメタンフラックスにどのような影響を及ぼすか、それはメタン酸化細菌を含む根圏微生物とどのような関連があるかを検討した。つまり、植物と微生物の共生に関わるイネ CSP が、イネ根共生微生物を通じて水田における物質循環にどのような役割を果たしているかという新たな視点での研究を行った。

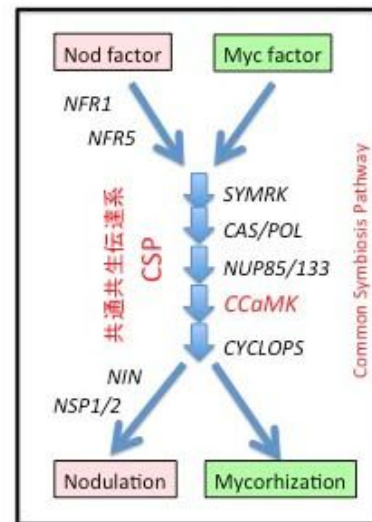


図2 植物の共通共生シグナル伝達系

(2) 水田メタン代謝とイネ共生遺伝子

メタン (CH_4) は温室効果ガスであり、大気中のメタン濃度の上昇は主にイネ栽培などの農業活動や化石燃料の使用が原因である (IPCC, 2007)。イネは世界中の 60% の人間がコメを主食としているため、今後もその生産量が増加し、大気中のメタン濃度上昇が懸念されている。イネ品種によってメタンフラックスとメタン酸化細菌相が変化することが知られている (Ma *et al.*, 2010) が、どのようなイネ遺伝子がメタン放出やメタン酸化に影響しているかについて良くわかっていない。申請者らは、日本晴 (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) とそのイネトランスポゾン *tos17* による *OsCCaMK* 遺伝子変異体 (NE1115) を低窒素区と慣行区に栽培し、メタンフラックスを測定した。その結果、低窒素区において、NE1115 の草丈と分けつ数が日本晴より有意に減少したにも関わらず、メタンフラックスは有意に約 2 倍上昇した。一方、慣行区では両者にほとんど差が観察されなかった。このように、窒素が制限された条件で、共生に関わる *OsCCaMK* 遺伝子がメタンフラックスに影響を及ぼすという意外な事実

が明らかになった。

メタンは嫌気条件で土壌中の有機物やイネ根からの分泌物を利用してメタン生成古細菌により生産され、土壌中のメタン濃度勾配によってイネ根に入り、通気組織を介して最終的に下位葉鞘から大気中に放出される(Nouchi *et al.*, 1990) (図3)。つまり、イネの通気組織の断面積が大きくなればメタンフラックスも上昇することになる。そこで、通気組織の断面積を測定した結果、NE1115 と日本晴ではほとんど変わらなかった。したがって、NE1115 と日本晴のメタン放出の相違は、メタンサイクルに関わる微生物の変化による起こる可能性が考えられた。

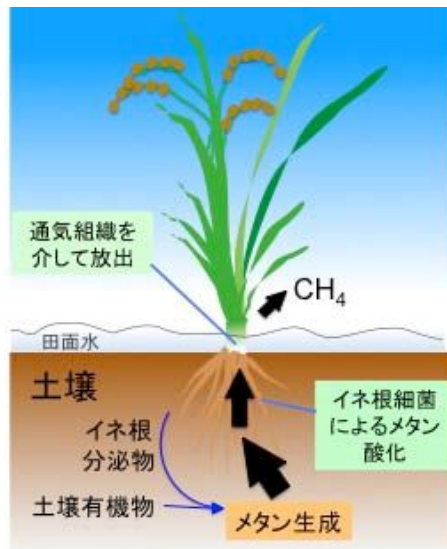


図3 水田のメタン発生とメタン酸化細菌

水稻栽培土壌で生成されたメタンの約90%がイネを介して大気中に放出され、その過程でメタン生成とメタン酸化が活性化されると言われている (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986)。メタン酸化細菌はメタンを唯一の炭素源とエネルギー源として利用するグラム陰性の細菌である。タイプ I とタイプ II のメタン酸化細菌が有するメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*pmoA*) の配列に基づいた定量 PCR 解析では、低窒素区で NE1115 イネ根圏のメタン酸化細菌が野性型より有意に減少した。一方、メタン生成細菌が有するメタン生成酵素遺伝子 (*mcrA*) を用いた定量 PCR の結果、NE1115 イネ根圏と日本晴で有意な差がなかった。したがって、低窒素区における NE1115 イネからのメタンフラックス上昇の主な原因はその根圏におけるメタン酸

化細菌が減少したことが示唆された (Bao *et al.*, 2014)。

それでは、なぜ無窒素区に限ってこのような現象が起こるのであるのか？ *CCaMK* 遺伝子 (図2) はそもそもマメ科植物が肥沃度の低い土壌で微生物との共生を通じて窒素やリン栄養を獲得するために機能するが、肥沃度の高い無機養分に富んだ環境では共生が成立しないことが知られている。そこで、 ^{15}N 自然存在比により NE1115 と日本晴の窒素固定能の差異を検討した。その結果、日本晴地上部における ^{15}N が NE1115 より有意に低く、空気中の軽い窒素で希釈されたため窒素固定が上昇したことが強く示唆された (Bao *et al.*, 2014)。さらに、イネ根のメタン酸化窒素固定活性を確かめるため、窒素を制限した水耕液にイネを栽培し、メタンと $^{15}\text{N}_2$ を同時に投与し、イネに固定された ^{15}N を測定することでメタンをエネルギー源にして窒素固定できるかどうかを検討した。その結果、メタン処理区のイネ根の ^{15}N 濃度はメタン無処理区より有意に増加したので、イネ根のメタン酸化に依存した窒素固定が強く示唆された。

(3) メタプロテオーム解析

低窒素区のイネ根共生細菌のなかで、メタン酸化と窒素固定を担っている微生物を同定するために、濃縮細菌細胞からタンパク質を抽出し、メタプロテオーム解析を行った。上記で得られたメタゲノムデータベースを参照とした結果、*Methylosinus* 属細菌の窒素固定酵素ニトロゲナーゼの *NifH*, *NifD*, *NifK* とメタンモノオキシゲナーゼ *PmoCBA*, *MmoXYZC* が多数検出された。したがって、イネ根で窒素固定を起こしているのは、*Methylosinus* 属のメタン酸化細菌であることが示唆された。CARD-FISH で当該メタン酸化細菌のイネ根の局在性を観察したところ、イネの表皮細胞と中心柱の維管束周辺に *Methylosinus* 属細菌が生息していることが分かった。

(4) 考察と今後の研究について

以上の結果は、イネ *CCaMK* 遺伝子がなんらかの機構を通じて低窒素環境でメタン酸化窒素固定細菌を積極的に受け入れていると考えられる。これは、低窒素環境で機能するマメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系に非常に似ている。イネとマメ科植物の相違は、イ

ネはメタンをエネルギー源とするが、マメ科植物は光合成産物を直接根粒菌に与える効率的な根粒という器官を形成するところである。本研究で群集構造解析やメタゲノム解析結果と一致するメタン酸化菌をイネ根より分離された。したがって、鍵となるメタン酸化窒素固定細菌の生理的特徴や *CCaMK* 遺伝子による制御については、それらの分離株も活用しながら今後研究展開が可能となった。紙面の都合上詳細な説明は省略するが、作物体地上部や根圏土壌の微生物群集やその機能が環境変化により変動することも、メタゲノム解析により明らかとなった。

本研究を通じて、メタゲノム解析は、課題発見型のデータを提供するばかりでなく、メタプロテオーム解析のデータベースとなり、また、当該環境の鍵微生物の分離をガイドできるという多面的な活用が可能であることが分かった。したがって、本研究成果は、メタゲノム解析を軸とした環境微生物研究としてもインパクトを与えることができたと自負している。

引用文献

Ikeda S et al. 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.* **29**, 50-59.

Imaizumi-Anraku H et al. 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, **433**, 527-531.

Banba M, et al. 2008. Divergence of evolutionary ways among common sym genes: *CASTOR* and *CCaMK* show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 1659-1671.

Chen C et al. 2007. Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.*, **145**, 1619-1628.

Hayashi T. et al. 2010. A dominant function of *CCaMK* in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant Journal*, **63**, 141-154.

Ikeda S et al. 2011. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (*CCaMK*) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 4399-4405.

Ma KE et al. 2010. Microbial mechanism for rice variety control on methane emission from rice field soil. *Global Change Biol.*, **16**, 3085-3095.

Nouchi I et al. 1990. Mechanism of methane transport from the rhizosphere to the atmosphere through rice plants. *Plant Physiol.*, **94**, 59-66.

Holzappel-Pschorn A et al. 1986. Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant Soil*, **92**, 223-233.

Bao et al. 2014. A rice gene for microbial symbiosis, *Oryza sativa CCaMK*, reduces CH₄ flux in a paddy field with low nitrogen input. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1995-2003.

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47件)

Bao Z, Watanabe A, Sasaki K, Okubo T, Tokida T, Liu D, Ikeda S, Imaizumi-Anraku H, Asakawa S, Sato T, Mitsui H, and Minamisawa K. 2014. A rice gene for microbial symbiosis, *Oryza sativa CCaMK*, reduces CH₄ flux in a paddy field with low nitrogen input. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1995-2003. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441161>

Ikeda, S., K. Sasaki, T. Okubo, A. Yamashita, K. Terasawa, Z. Bao, D. Liu, T. Watanabe, J. Murase, S. Asakawa, S. Eda, H. Mitsui, T. Sato, and K. Minamisawa. 2014. Low nitrogen fertilization adapts rice root microbiome to low nutrient environment by changing biogeochemical functions. *Microbes Environ.* **29**, 50-59. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463575>

Sasaki, K., S. Ikeda, T. Okubo, C. Kisara, T. Sato, and K. Minamisawa. 2013. Effects of plant genotype and nitrogen level on

bacterial communities. *Microbes Environ.* 28: 391-395. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979487>

Okubo, T., S. Fukushima, M. Itakura, K. Oshima, A. Longtonglang, N. Teaumroong, H. Mitsui, M. Hattori, R. Hattori, T. Hattori, and K. Minamisawa. 2013. Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 2542-2551.

(査読あり)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396330>

Okubo, T., S. Fukushima, and K. Minamisawa. 2012. Pyrosequence read length of 16S rRNA gene affects phylogenetic assignment of plant-associated bacteria. *Microbes Environ.* 27: 204-208. (査読あり)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791055>

Ikeda S., T. Okubo, N. Takeda, M. Banba, K. Sasaki, H. Imaizumi-Anraku, S. Fujihara, Y. Ohwaki, K. Ohshima, Y. Fukuta, S. Eda, H. Mitsui, M. Hattori, T. Sato, T. Shinano, and K. Minamisawa. 2011. The genotype of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene (*CCaMK*) determines bacterial community diversity in rice roots under paddy and upland field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 4399-4405. (査読あり)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551283>

〔学会発表〕(計 84 件)

南澤 究：作物根圏における窒素と微生物の相互作用、土壤微生物学会 2013 年度大会 (2013 年 6 月 20-21 日、東京、招待講演)

Kiwamu Minamisawa, Nitrogen and plant - associated microbes. The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. (Invited oral speaker in plenary Lecture; October 28 - November 1, 2012, Phuket, Thailand)

Zhihua Bao, Aya Watanabe, Takashi Okubo, Dongyan Liu, Seishi Ikeda, Kazuhiro Sasaki, Haruko Imaizumi-Anraku, Susumu Asagawa, Tadashi Sato, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa: Effects of rice genotype on

methane flux and root-associated methanotrophs in paddy rice. 第 28 回微生物生態学会 (2012 年 9 月 19 日 - 22 日、豊橋)

〔図書〕(計 4 件)

南澤 究、包智華、板倉学 (2013) 作物根圏における窒素と微生物の相互作用、土と微生物 67(2): 49-53.

南澤 究 (2013) 物質循環のミッシングリンクを解く微生物研究、遺伝、9 月号, 67(5): 544-546.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南澤 究 (MINAMISAWA, KIWAMU)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：70167667

(2) 研究分担者

信濃 卓郎 (SHINANO, TAKURO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター・農業放射線研究センター長
研究者番号：20235542

池田 成志 (IKEDA, SEISHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員
研究者番号：20396609

山下 明史 (YAMASHITA, AKIFUMI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：00573180

岡崎 圭毅 (IKEDA, SEISHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・研究員
研究者番号：40414750