

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24658037

研究課題名(和文)植物内生菌のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析と病害防除への展開

研究課題名(英文) Analysis of metagenome and metatranscriptome of endophytic microorganisms in plants and its application for disease control

研究代表者

高橋 英樹 (Takahashi, Hideki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20197164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネ有機栽培の育苗培土には、苗病害の発生を抑制する効果が存在する。有機育苗培土に含まれる微生物と、苗病害抑制効果との関連を解析するため、複数のイネ有機栽培農家の育苗培土懸濁液から培養法により細菌を単離した。個々の単離菌株培養液を施用した市販の慣行培土には、もみ枯細菌病などを抑制する菌株が存在した。さらに、培土中には難培養性微生物も存在することから、有機培土に含まれる微生物相の解析したところ、有機培土では、微生物種の豊富さと均等性が慣行培土に比べ、有機培土に共通して、明らかに高い傾向が認められた。したがって、有機培土に共通の特徴として、慣行培土よりも高い微生物多様性をもつ可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Organic rice farming system has been successfully established in a number of local regions in Japan. The outbreak of plant diseases is effectively suppressed in the organic farming system. The features common to nine organic farmed soils used for rice nursery cultivation, which were supplied by nine independent organic rice farmers, were analyzed. The emergence of bacterial seedling diseases was equally suppressed in nine organic farmed soils, but not two conventional soils. On physicochemical analysis of those soils, there was not either any component common to nine organic soils or difference between organic soils and control conventional soils. On the other hands, bacterial and fungal microbiome analysis indicated that their populations in nine organic soils were more diverse than those in conventional soils. The diverse of microbiome may play an indispensable role for suppressing rice seedling diseases in organic agriculture.

研究分野：植物病理学

キーワード：内生菌 根圏微生物 植物 メタゲノム 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

植物の葉表面には葉面微生物、組織内には内生菌、根圏には根圏微生物が生息していることは、以前から知られている。しかし、それらの微生物相に関する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おり、植物体や根圏に生息する微生物相の姿を正確に理解することはできていない。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 や RNA の単離・解析を行なうアプローチが可能となってきた。すでに、農耕地土壌、海底下堆積物、温熱鉱床などに生息する微生物集団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。また、本申請者も、近年、植物体の細胞間隙に生息する微生物集団をまるごと解析する手法を確立している (Takahashi *et al.*, JGPP, 77, 121, 2011)。本研究では、植物体内や根圏に生息する微生物集団から培養を介さずに直接 DNA や RNA を単離し、集団を構成する微生物種の多様性解析および代謝活性状態にある微生物種の同定を予定した (植物内生菌のメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析)。さらに、同微生物集団のメタライブラリーから、フラジェリン遺伝子をスクリーニングし、植物に病害抵抗性を誘導する活性評価 (内生菌の病害防除への利用) を計画した。

## 2. 研究の目的

植物の葉表面、細胞間隙、根圏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、自然環境中の植物組織において、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・メタトランスクリプトーム的手法により、植物体中の細胞間隙や根圏に生息する微生物群集をまるごと解析する。さらに、それら微生物群集の病害抑制における役割を明らかにし、病害防除への応用についての具体的

な方法を見いだす。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物組織からの内生菌の単離

有機栽培および慣行栽培のイネ苗とトマト葉の細胞間隙液を、既報の方法 (Takahashi *et al.*, 77, 121, 2011) により単離する。

細胞間隙液を NB 寒天培地に塗布し、25、24 時間培養した。

得られたコロニーを単離し、NB 液体培地で培養後、最終濃度 20% になるようにグリセリンを加え、-80 で保存した。

単離菌の病害抑制活性は、「主な発表論文」リスト中の Ando, S. *et al.*, (2014) *Organic Agriculture* 4: 187-196. に記載した方法に従った。

### (2) 植物組織からの DNA・RNA の単離と微生物相の解析

イネ苗およびトマト葉の細胞間隙液から Water RNA/DNA Purification Kit (NORGEN 社) を用いて、内生菌集団の DNA と RNA をまるごと単離した。

得られた DNA を鋳型とし、細菌用として 16SrDNA 可変領域、糸状菌用として 18SrDNA 可変領域をそれぞれ PCR 増幅した。

得られた DNA を鋳型として oligo(dT) をプライマーとして逆転写反応で cDNA を合成し、ランダムプライマーを用いて PCR 増幅を行った。

PCR 産物を DGGE 法により解析し、バンドパターンから多様性指数 (Evenness と Richness) を算出し、微生物相の多様性を評価した。

### (3) 土壌からの DNA の単離と微生物相の解析

有機育苗培土および慣行育苗培土から、Soil DNA Purification Kit (NORGEN 社) を用いて、内生菌集団の DNA をまるごと単離した。

得られた DNA を鋳型とし、細菌用として 16SrDNA 可変領域、糸状菌用として 18SrDNA 可変領域をそれぞれ PCR 増幅した。

PCR 産物を DGGE 法により解析し、バンドパターンから多様性指数 (Evenness と Richness) を算出し、微生物

物相の多様性を評価した。

PCR 産物を次世代シーケンサー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し(メタゲノム解析)、有機育苗培土および慣行育苗培土の間で、微生物相を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 有機栽培植物組織における内生菌相の解析

有機栽培イネ苗から培養法により単離された細菌の中には、イネ籾枯細菌病やイネ立枯細菌病を抑制する活性をもつものが存在した。

しかし、有機栽培および慣行栽培のイネ苗とトマト葉の細胞間隙液からまるごと単離されたDNAとRNAを用いた微生物相の解析では、有機・慣行培土間で、微生物相に明瞭な差異は認められなかった。

##### (2) 有機育苗培土における微生物相の解析

イネの有機栽培に用いられる育苗培土には、イネもみ枯細菌病などの苗病害の発生を抑制する効果が存在した。有機育苗培土に含まれる微生物と、苗病害抑制効果との関連を明らかにするため、複数のイネ有機栽培農家より分譲された育苗培土の懸濁液から培養法により細菌を単離した。個々の単離菌株培養液を施用した市販の慣行育苗培土に、イネもみ枯細菌病またはイネ苗立枯病菌を接種した種子を播種し、発病抑制効果を解析した結果、単離された細菌の中には、単独施用により苗病害を抑制する菌株が存在した。さらに、複数の単離菌株を混合して施用することにより、苗病害抑制効果が増強されることが明らかになった。

次に、培土中には難培養性微生物も存在することから、有機育苗培土に含まれる微生物相について解析を行った。独立にイネ有機栽培を行っている農家から分譲された育苗培土9点とコントロールとして慣行育苗培土2点から、まるごとDNAを抽出し、16Sおよび18S rDNA断片を利用した微生物相の比較をPCR-DGGE法および次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって行った。また、同時に各培土の土壤理化学性についても分析した。その結果、由来の異なる有機育苗培土の間で、土壌の理化学的性状に共通性は認められず、イネ苗病害抑制効果との相関関係は見出されなかった。一方、PCR-DGGE法におけるバンドパターンの解析では、有機育苗

培土の微生物種の豊富さおよび微生物種の均等性の両方が、慣行育苗培土よりも共通して高い値を示した(図1)。さらに、16S

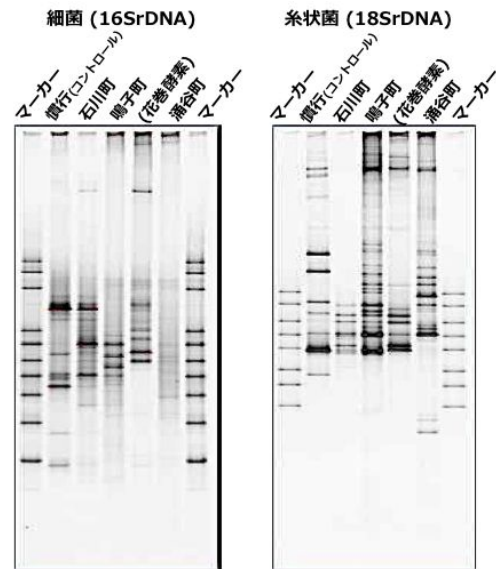


図1 PCR-DGGE法による有機・慣行育苗培土由来微生物DNAの解析 (一部の分譲された有機育苗培土を用いた)

rDNA 増幅断片の塩基配列に基づく細菌の多様性解析では、微生物種の豊富さと均等性が慣行育苗培土に比べ、有機育苗培土に共通して、明らかに高い傾向が認められた(表1)。したがって、有機育苗培土は由来に関わらず、共通の特徴として慣行育苗培土よりも高い微生物多様性を有している可能性が考えられた。

表1 PCR-DGGE解析のバンドパターンに基づく多様性指数  
リッチネス (Richness): 微生物種の豊富さ、イーブンネス(Evenness): 微生物個体数の均等性を示す。

	細菌				糸状菌			
	Richness	Shannon	Simpson	Evenness	Richness	Shannon	Simpson	Evenness
慣行(コントロール)	12	2.29	0.880	0.921	9	1.88	0.816	0.858
石川町	13	2.38	0.890	0.927	16	2.53	0.908	0.914
鴨子町	12	2.36	0.896	0.951	15	2.56	0.915	0.945
涌谷町	24	3.12	0.954	0.983	9	1.90	0.819	0.864

イネの育苗過程では、催芽処理した種子が、灌水された培土に播種され、育苗がなされる。培土中の微生物相に対し、灌水や、発芽後の種子から分泌される有機物は、微生物の生存環境に大きな影響を与える要因となると推察し、灌水前の培土、灌水後の培土、灌水・播種後5日目の培土から、それぞれDNAを単離し、16Sおよび18S rDNA断片のPCR-DGGE法および16S rDNA断片の塩基配列解析を行った。その結果、慣行育苗培土では、灌水や播種により微生物相が大きく変動したが、有機育苗培土では灌水や播種による影響は少なく、微生物相が安定しており、ロバストネス(堅牢性)が高い傾向が認められた。そこで、灌水後の有機育苗培土と慣行育苗培土に、それぞれイネもみ枯細菌病罹病種子を播種し、栽培5日後の発芽種子におけるも

み枯細菌病菌を検出したところ、有機育苗培土における病原菌の増殖抑制が認められた。したがって、有機育苗培土における病害抑制効果の原因のひとつとして、有機育苗培土に共通した微生物相の堅牢性による病原細菌の増殖抑制が考えられた。

#### 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7件)

1. Nakaho, K., Seo, S., Ookawa, K., Inoue, Y., Ando, S., Kanayama, Y., Miyashita, S. and Takahashi, H. (2016) Involvement of vascular hypersensitive response in quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum* on tomato rootstock cultivar 'LS-89'. Plant Pathology (in press). (査読あり)
2. Ando, S., Ito, T., Kanno, T., Kobayashi, T., Morikawa, T., Honda, K., Tsushima, S. and Takahashi, H. (2014) Impact of organic crop management on suppression of bacterial seedling diseases in rice. Organic Agriculture 4: 187-196. (査読あり)
3. Sato, I., Yoshida, S., Iwamoto, Y., Aino, M., Hyakumachi, M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ando, S. and Tsushima, S. (2014) Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato. Microbes and Environments 29: 168-177. (査読あり)
4. Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki K. and Hyakumachi, M. (2013) Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. Plant Pathology Journal 29: 193-200. (査読あり)
5. Hyakumachi, M., Nishimura, M., Arakawa, T., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S. and Takahashi, H. (2012) *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. Microbes and Environments 28: 128-134. (査読あり)
6. Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., Takahashi, H. and Hyakumachi, M. (2012) The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induce systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in cucumber plants. Plant and Soil 361: 397-409. (査読あり)
7. 高橋英樹・安藤杉尋 (2012) 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、有機農業研究者会議 2012 資料集 pp51-55. (査読あり)

[学会発表](計19件)

1. 高橋英樹・松下裕子・伊藤豊彰・小林隆・橋本知義・宮下脩平・守川俊幸・吉田重信・對馬誠也・安藤杉尋、次世代シーケンサーを用いたイネ有機栽培育苗培土の微生物多様性解析、平成27年度日本植物病理学会東北部会、平成27年9月28-29日、仙台市、日本
2. 安藤杉尋・鎗山純・小林隆・吉田重信・伊藤豊彰・宮下脩平・高橋英樹、異なる有機栽培育苗培土の微生物コミュニティによるイネもみ枯細菌病抑制効果の比較、平成27年度日本植物病理学会東北部会、平成27年9月28-29日、仙台市、日本
3. 笠原雅美・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋、イネ有機栽培育苗培土の苗いもち抑制効果の検討、平成27年度日本植物病理学会東北部会、平成27年9月28-29日、仙台市、日本
4. 石宮純・吉田重信・對馬誠也・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋、イネ種子由来細菌のイネもみ枯細菌病菌およびイネ苗枯細菌病菌に対する抗菌活性の解析、平成27年度日本植物病理学会東北部会、平成27年9月28-29日、仙台市、日本
5. 鎗山純・吉田重信・對馬誠也・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋、イネ有機栽培育苗培土から分離した *Pseudomonas* sp. 施用によるイネ幼苗における防御関連遺伝子の発現解析、平成27年度日本植物病理学会東北部会、平成27年9月28-29日、仙台市、日本
6. Takahashi, H., Hyakumachi, M., Shimizu, M., Iwamoto, Y., Aino, M., Matsuura, K., Goto, S., Nakano, K., Ando, S., Arie, T., Tsushima, S. and Yoshida, S. (2014) Molecular basis of a bioinsecticide-activated plant defense system to suppress bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. 248th American Chemical Society (ACS) National Meeting, 2014 August, 10-14 (平成26年8月10-14日), San Francisco, CA, USA.
7. Ando, S. Ochi, A., Tsushima, S., Konishi, H., Kaneko, T. and Takahashi, H. (2014) Seed-disinfection using plasma irradiation for suppression of rice diseases. 1st E-MRS/MRS-J Bilateral Symposia, 2014 December 10-12 (平成26年12月10-12日), Yokohama, Japan.
8. 高橋英樹・小林隆・伊藤豊彰・松下裕子・對馬誠也・橋本知義・本多健一郎・安藤杉尋、イネ有機栽培育苗培土におけ

- るもみ枯細菌病抑制と土壌理化学性および微生物多様性の関係、平成 26 年度日本植物病理学会東北部会、平成 26 年 9 月 24-25 日、盛岡市、日本
9. 鎗山純・對馬誠也・吉田重信・伊藤豊彰・高橋英樹・安藤杉尋、有機栽培育苗土由来土壌細菌の混合施用によるイネもみ枯細菌病抑制効果の検討、平成 26 年度日本植物病理学会東北部会、平成 26 年 9 月 24-25 日、盛岡市、日本
  10. 石宮純・對馬誠也・吉田重信・高橋英樹・安藤杉尋、イネ種子由来細菌によるイネもみ枯細菌病抑制効果の解析、平成 26 年度日本植物病理学会東北部会、平成 26 年 9 月 24-25 日、盛岡市、日本
  11. 高橋英樹・安藤杉尋・清水将文・百町満朗・岩本 豊・相野公孝・松浦克成・浅野峻介・平山喜彦・對馬誠也・吉田重信、微生物防除資材を用いたトマト青枯病抑制の分子基盤、日本植物病理学会第 26 回植物細菌病談話会、平成 26 年 10 月 9-10 日、岡山県岡山市、日本
  12. Yoshida, S., Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Kanayama, Y., Tsushima, S. and Hyakumachi, M. (2013) Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. International Organization for Biological and Integrated Control-West Palaearctic Regional Section (IOBC-WPRS), Working Group "Induced resistance in plants against insects and diseases", Bulletin 89: 73-77, 2013 June 10-13 (平成 25 年 6 月 10-13 日), Avignon, France.
  13. 高橋英樹・安藤杉尋・伊藤豊彰・松下裕子・對馬誠也・本多健一郎、有機栽培イネと育苗培土に由来する微生物の解析と病害防除、第 14 回日本有機農業学会(仙台)大会、平成 25 年 12 月 7-8 日、宮城県仙台市、日本
  14. 高橋英樹・安藤杉尋・清水将文・百町満朗・岩本 豊・相野公孝・松浦克成・浅野峻介・平山喜彦・對馬誠也・吉田重信、昆虫病原性糸状菌 *Paecilomyces tenuipes* および *Beauveria bassiana* の培養濾液を施用したトマトにおける青枯病抑制効果と防御応答遺伝子発現の解析、平成 25 年度日本植物病理学会東北部会、平成 25 年 9 月 24-25 日、秋田市、日本
  15. 菅野 剛・安藤杉尋・伊藤豊彰・對馬誠也・守川俊幸・本多健一郎・中井 裕・高橋英樹、イネ有機育苗培土およびコンポスト施用による苗病害抑制の解析、平成 25 年度日本植物病理学会東北部会、平成 25 年 9 月 24-25 日、秋田市、日本
  16. 和田拓己・安藤杉尋・吉田重信・對馬誠也・百町満朗・高橋英樹、*Bacillus thuringiensis* を施用したトマト主根と側根組織における青枯病細菌の分布と網羅的遺伝子発現解析、平成 25 年度日本植物病理学会東北部会、平成 25 年 9 月 24-25 日、秋田市、日本
  17. 高橋英樹・安藤杉尋、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、有機農業研究者会議 2012、文部科学省研究交流センター国際会議場、平成 24 年 10 月 24-25 日、茨城県つくば市、日本
  18. 高橋英樹・荒川竜行・西村光由・安藤杉尋・吉田重信・對馬誠也・百町満朗、*Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* を施用したトマトの各組織における PR-1 遺伝子発現の比較解析、平成 24 年度日本植物病理学会東北部会、平成 24 年 9 月 13-14 日、鶴岡、日本
  19. 安藤杉尋・對馬誠也・吉田重信・小林隆・伊藤豊彰・長谷修・生井恒雄・高橋英樹、イネ有機栽培育苗土の病害抑制効果の解析、平成 24 年度日本植物病理学会東北部会、平成 24 年 9 月 13-14 日、鶴岡、日本
- 〔図書〕(計 3 件)
1. 高橋英樹・百町満朗・清水将文・岩本豊・相野公孝・松浦克成・後藤新一・中保一浩・安藤杉尋・有江 力・對馬誠也・吉田重信 (2014) 「微生物防除資材を用いたトマト青枯病抑制の分子基盤」日本植物病理学会第 26 回植物細菌病談話会論文集 26: 54-62, 日本植物病理学会.
  2. Hyakumachi, M., Takahashi, H., Matsubara, Y., Someya, N., Shimizu, M., Kobayashi, K. and Nishiguchi, M. (2014) Recent study on biological control of plant diseases in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 80: 287-302.
  3. 百町満朗・高橋英樹・松原陽一・染谷信孝・清水将文・小林括平・西口正通 (2014) 「最近のわが国における植物病害の生物防除研究」日本植物病理学会報 80 別冊, pp1-9, 日本植物病理学会.
- 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