

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660207

研究課題名(和文)植物共生微生物群集構造解析のための光センシング技術の開発

研究課題名(英文)Development of photo-sensing technologies for plant microbiome analysis

研究代表者

平藤 雅之(Hirafuji, Masayuki)

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大規模畑作研究領域・領域長

研究者番号：00370495

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)：植物の生育及び形質発現には植物体内外に棲息する共生微生物群集が影響している。本研究ではこの共生系のモデル化及びセンシング手法の研究として、センサネットワークによる環境時系列データ、メタゲノム解析によるバレイショ葉内共生微生物相の時系列データとハイパースペクトルカメラによる葉面画像時系列データの同時収集、さらに半導体レーザー照射による蛍光画像測定に挑戦した。共生微生物相の時系列データからは、いわゆる「善玉菌」と「悪玉菌」が競争しながら大きく変動する現象が見られ、この複雑な変化は生態系の一般モデルでほぼ記述できた。また環境に依存する可能性が見られ、環境データ同時収集の重要性が裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：Growth and phenotypic expression of plants are affected by Microbiome in plant tissues. We challenged to modeling of the symbiotic systems and optical sensing methods. Environment data by a sensor network, microbiome abundances by meta-genomics and hyper-spectrum images are collected as time series data successfully. Moreover fluorescence imaging induced by semiconductor Laser devices was tried. The time series data of microbiome shows a competitive phenomenon between so-called "good bacteria" and "bad bacteria". The most dynamics in the competitive phenomenon could be modeled by the general ecosystem model, and partially it seems affected by environmental factor. This result means importance of simultaneous collection of environmental data.

研究分野：農業環境・情報工学

キーワード：共生微生物 植物 適応複雑系 一般化Lotka-Volterra方程式 センサネットワーク 光環境 ハイパースペクトルイメージング レーザー蛍光

1. 研究開始当初の背景

ルーメンや土壌等における **Microbiome** 研究の初期段階では「多様性」を指標とした研究がなされ、種々の知見が得られた。その後、次世代シーケンサの登場によって微生物群集の網羅的測定が可能となり、微生物群集と植物個体との強い相互作用は「共生関係」として理解されつつある。今後は、環境と共生系の関係性の解明が **Plant Phenomics** 研究及び革新的な植物生育環境制御技術の開発に重要と考えられ、そのための簡便な計測手法が必須である。

近年、植物共生微生物の分析手法が開発され[1]、共生微生物群集が植物の遺伝子型や肥料等の環境因子等の影響を強く受けることが明らかにされている[2]。同時に、野外における環境情報をリアルタイムで収集することを可能にするフィールドサーバ等が活用され始めており[3]、共生微生物分析法と合わせた統合的解析が可能となりつつある。さらに、多波長で撮影できるカメラの超小型・低コスト化が進み、UAV (小型無人航空機) や超小型衛星に搭載して利用できるようになった。そのため、光と共生微生物群の関係の解明がもたらす学術的意義及び農業技術開発等への波及効果は極めて大きい。

2. 研究の目的

光が光合成系のエネルギーとしてだけでなく、信号として植物の生理反応と有用共生微生物系に大きな影響を与えるという最近の研究報告[4]に注目し、光と共生微生物群集の関係性の解明の観点から光センシング手法の萌芽的な研究を行う。

例えば、植物の生育及び形質発現には植物体内外に棲息する共生微生物群集 (**Microbiome**) が影響している。この共生微生物群集は **DNA** による同定が進み、その主要種は特定色素を有することが分かった。この色情報から共生系及び植物の栄養状態等に関する光計測ができる可能性がある。また、色素は一般に光受容体として機能するため生育制御に活用できる可能性があり、光質を他の環境因子と同時に計測制御することで、この共生系の計測制御ができると考えられる。

3. 研究の方法

(1) センシング手法の開発

北農研芽室研究拠点圃場の土壌水分等のデータをフィールドサーバ (図1) で構成したセンサネットワークによって収集すると同時に、UAV (ドローン) による撮影を一定間隔で行った (図2)。ハイパースペクトルカメラはサイズ及び重量が大きいので、フィールドサーバへの内蔵及び UAV への搭載は難しい。そこで MEMS による超小型分光センサ (浜松ホトニクス、C11708MA、測定範囲: 640 ~ 1050 nm) とハイパースペクトルカメラを用いた圃場実験を行い、比較した (図3)。

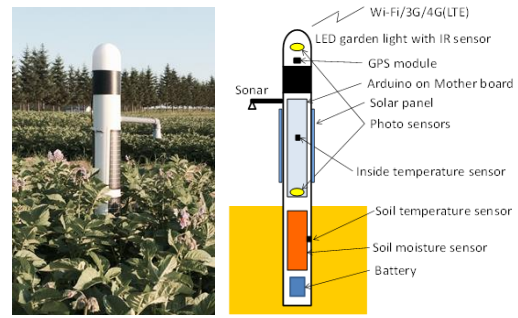


図1 ジャガイモ群落内に設置したフィールドサーバ



図2 UAVによる画像データ収集



図3 ハイパースペクトルカメラ (左図) と MEMS センサ (右図) によるスペクトラムデータの同時測定

スペクトラムデータだけでは植物共生微生物群集の計測のための情報量が十分得られない可能性がある。そのためには特定波長で励起したときの蛍光が追加的な情報源として考えられる。そこで、RGB 3波長のレーザーを内蔵する PC 用超レーザープロジェクタ及びレーザーポインタを小型・安価な光源として利用したとき、蛍光スペクトラムデータが得られるかどうかの評価実験を行った。ハンディタイプのレーザープロジェクタは RGB の半導体レーザーを光源としており、3波長で照射する領域をソフトウェア的に制御できることから、蛍光データが得られると様々な利用方法が可能になることが期待される。

さらに、群落内の光環境新たな光センシング技術の開発に向けて、多波長センサ (RGB+近赤外) の開発を行った。

(2) 時系列データの収集

対象サンプルはジャガイモとした。2013年、北海道農業研究センター芽室拠点圃場において、ジャガイモ品種「キタアカリ」を、畝間75cm、株間30cm、早期培土で栽培した。施肥設計は N:6.4, P2O₂:16.0, K2O:11.2, MgO:54.0 (kg/10a)とした。

葉のサンプリングは、塊茎の肥大が始まる着蕾期から地上部が枯れ始める黄変期まで毎週行った(図4)。また、同時に UAV で空撮を行った(図5)。

サンプリング日は、2013年6月28日、7月8日、7月16日、7月22日、8月2日、8月12日であった。いずれも降雨の無い午前中(11~12時)に圃場にてサンプリングした。サンプリングは生育の異なる畦端の株を避け、当日の圃場全体を見て平均的な生育をしている6株より異常の少ない1株を選び、サンプリング地点がランダムになるよう実施した。

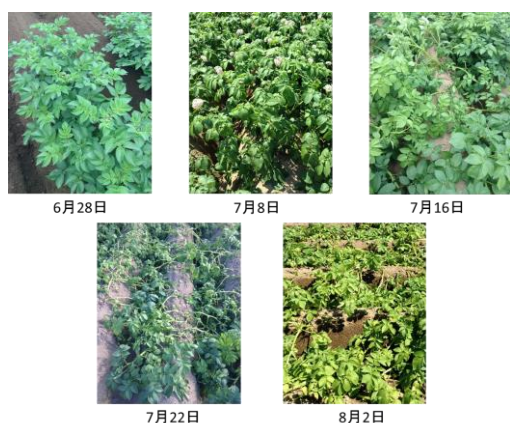


図4 ジャガイモ群落の経時的変化

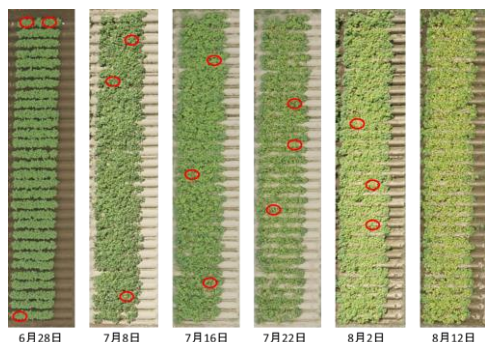


図5 UAVで撮影した画像(○はサンプリングした個体)

室内に持ち帰った枝から複葉を取り外し、異常部分があればトリミングを行いハイパースペクトルカメラで撮影した。撮影は複葉毎に行い、撮影終了後株毎にまとめて-25℃にて凍結保存し植物共生微生物群集の解析に用いた。スペクトルデータの取得および微生物多様性解析には小葉部分のみを使用した(葉柄部分は廃棄した)。

植物共生微生物群集の解析のため、株別に

上位から下位までの葉を1つにまとめて液体窒素で粉碎処理し、細菌細胞濃縮法により粉状になった葉粉砕物から細菌細胞の抽出精製を行った。得られた細胞画分から全DNAを抽出し、これを鋳型DNAとして16S rRNA遺伝子のライブラリーの構築と次世代シーケンズを行った。得られた配列データについて配列解析用ソフト Qiime を用いて編集及び解析作業を行い、葉共生細菌群集の多様性を評価した。

4. 研究成果

ハイパースペクトルカメラ等による新たな測定手法、共生微生物の非線形ダイナミクスの解析、メタボロミクス研究との連携などに挑戦し、以下のような可能性と方向性を見いだした。これを踏まえて、科研費や JST CREST 等へ応募することができた(科研費は採択)。

(1) スペクトラム測定

6月28日の撮影終了後データを確認したところ光量不足によると考えられるデータの欠落が生じていたことから、7月8日の撮影より、光量を増やして撮影した(図6、図7)。撮影条件が同じ7月8日から8月12日のデータを比較すると、波長620nm 当たりをピークに波長530~740nm 付近の割合が経時的に減少していた。

また、株内でも下位葉から上位葉にかけて連続的に変化していた。サンプリング時期が遅くなる程、株内の複葉間では連続的な変化が乱れ、同日サンプリングの株間ではばらつきが大きくなる傾向にあった。これは生育前期では光合成産物が用いられ地上部の生育が旺盛で生育段階が比較的そろっていたのに対し、生育中期以降では光合成産物の塊茎への移行が活発となり、塊茎着個数等の内的要因や病害等の外的要因の影響により地上部の生育状態の差が大きくなったためと考えられた。

ハイパースペクトルデータと葉共生細菌の多様性、植物代謝産物との詳細な解析を実施するための解析手法について検討中であるが、時間的変化が大きく見られた。このことから、直接、共生細菌を検出できなくても代謝産物等の変化から評価できる可能性が考えられた。

そのため、他のメタボロミクス研究グループとの連携を図り、同一サンプルで NMR 及び質量分析によるメタボロミクス解析を行った。その結果、スペクトラムと同様、大きな変化が見られた。これらの知見については新たな研究課題として科研費、JST CREST 等に応募した。

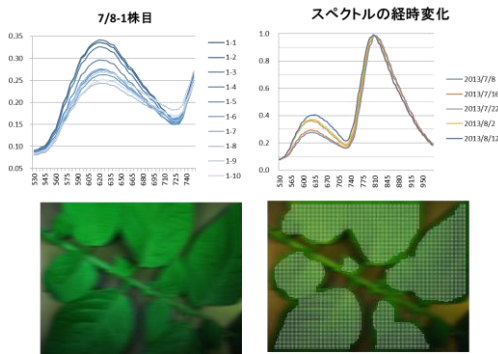


図6 スペクトラムの測定例

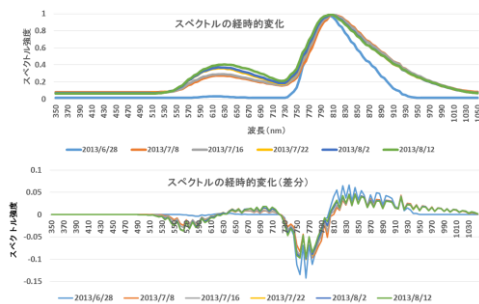


図7 一次微分したスペクトラムの例

(2) 植物共生微生物群集の解析

各週あたり6株の微生物多様性の平均としては、ライブラリーの充実度を示す指標である Coverage (新たにシーケンスを解析した場合に同一配列が出現する可能性を示す指数) は、全てのライブラリーについて約95%以上が得られ、実験データ量としては十分であると考えられた。

また、生育前期(6月下旬)、中期(7月)、後期(8月)の生育段階に応じて推定種数や多様性指数は大きく変動し、多様性指数については生育中期(7月下旬頃)に最大になる傾向が観察された。系統解析の結果、各週6株の平均値としては生育初期と後期はアルファプロテオバクテリアの割合が非常に高い(約80%以上)ことが明らかにされた。

イネやダイズなどの植物共生系において、低栄養状態ではアルファプロテオバクテリアが優占化することが知られている。本課題のジャガイモの場合、塊茎の栄養に依存している生育初期や光合成産物の大部分が塊茎に移行すると考えられる生育後期においては、ジャガイモの葉は低栄養状態だと考えられ、これらのことが生育初期と生育後期のアルファプロテオバクテリアの高い割合の原因として考えられた。

一方、生育中期は、アルファプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアがほぼ拮抗状態にあり、これら2綱で全多様性の約90%以上を占めていた。

さらに興味深いことに、株別の詳細な多様性解析の結果から、生育中期(7月頃)のジャガイモの葉の共生細菌の多様性は株単位

でアルファプロテオバクテリアあるいはガンマプロテオバクテリアのいずれかの綱が優占化していることが明らかとなった。

イネやダイズの共生細菌群集では低窒素と高窒素条件においてアルファプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアが拮抗関係を示すことが知られていることから、本研究におけるジャガイモの葉の共生細菌群集におけるアルファプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアの拮抗関係も葉の植物代謝成分の変動が反映されている可能性がある。

植物代謝成分の変動はハイパースペクトルカメラによる葉面の分光光度測定の結果にも反映される可能性がある。これらの可能性について検証するため、NMRなどによる植物代謝成分の網羅的な解析結果やハイパースペクトルカメラの測定結果について、葉共生細菌の多様性データとの間の相関性を株レベルにおける詳細な解析を検討中である。

(3) センシング手法の開発と評価

① スペクトラム測定

実圃場において、ハイパースペクトルカメラ(図3左)とMEMS分光センサによるスペクトラムデータの同時測定したデータを比較したところ、測定範囲(640~1050nm)において、両者のデータは良く一致した(図8)。個体群としてのセンシングであれば、MEMS分光センサで代替できることが分かった。

このMEMS分光センサは小型・軽量かつ安価であるため、UAVへの搭載及びセンサネットワークへの組み込みによって膨大なデータが収集できると考えられ、フィールドにおけるハイスループット・フェノタイピング手法として活用できる可能性がある。

② 超小型半導体レーザーによる励起

日中での測定を想定し、通常光下でレーザープロジェクタのレーザー光を照射したときの葉からの反射光のスペクトラムをMEMS分光センサで測定した(図9)。励起光(RGB)によってスペクトラムのパターンが異なり、半導体レーザーをUAV及びセンサネットワークに組み込むことで、新たな情報を取得できる可能性が見られた。

また、励起光の種類を増やすことでさらに多くの情報量が得られると考えられた。そこで、波長の異なる近赤外等のレーザーポイントを用いた測定実験を行ったところ、それぞれの波長で異なるパターンが見られた。

超小型半導体レーザーは10W程度の大出力のものが安価に入手可能となってきており(数万円程度)、フィールドにおいて収集可能な情報量を大幅に増やす手段として有用と考えられる。

③ 光環境モニタリング

群落内における光質モニタリングのため2波長光センサ（赤色と近赤外）とデータロガーをポリカーボネイトプラスチックケースに格納し設置した。ところが、農薬散布作業時にトラクタに踏まれ、隙間から水が入って測定できなくなっていた。野外に種々のセンシングデバイスを設置するとこの種の問題が多発することから、4波長（RGBと近赤外）の光センサを内蔵したフィールドサーバを開発した（図10）。

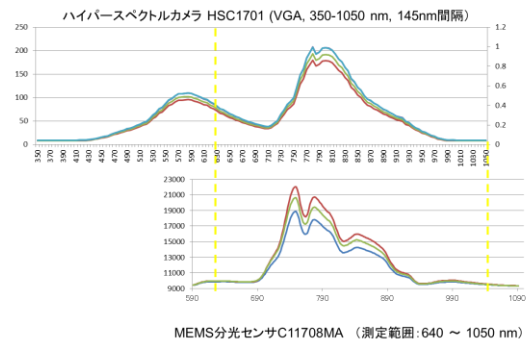


図8 ハイパースペクトルカメラ（上）とMEMSセンサ（右下）によるスペクトラムデータの比較（色の違いは反復を示す）

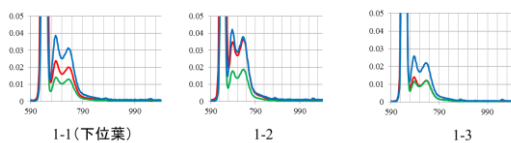


図9 RGBレーザー光で葉表面を照射したときのスペクトラムの測定例（グラフの色は励起光のRGBを示す）



(a)故障した測器 (b)光センサを内蔵
図10 故障した測器及び多波長光センサを内蔵したフィールドサーバ試作機

(4) 植物共生微生物群集のモデリング

本研究で得られた計測データは、土壌水分、地温等の環境データ、UAVで撮影した画像データ、ハイパースペクトルカメラによるスペクトラム画像データであり、さらに多波長レーザー光励起によるスペクトラム画像、生育環境中の光環境データなどが加わった。

これら説明変数の情報は膨大であるが、その一方、目的変数である共生微生物群集に関するデータは6回分であり、サンプル数は説明変数に比べて桁違いに少ない。そのため、主成分分析、LDAなど、次元を削減する解析

手法を適用するのが一般的である。しかし、本来、非線形なレスポンスやダイナミクスを有する生物現象において、線型モデルで次元を削減するのは好ましくない。ニューラルネットワークによって解析する方法を試みたが、サンプル数が不十分であった。少ないサンプルによる解析・予測を行う方法として、汎用非線形モデルの適用を試みた。

アルファプロテオバクテリアとガンマプロテオバクテリアはいわゆる「善玉菌」及び「悪玉菌」と呼ばれ、両群が競争しながら変動していた。そこで、善玉菌、悪玉菌、その他の3群からなるモデルを一般化Lotka-Volterra方程式で記述し、実測データを用いてデータ同化を行った。

一般化Lotka-Volterra方程式は個体群の競争（共生）、ロジスティック成長の一般モデルであり、本研究で扱う植物共生微生物群集との相性は良い。一般化Lotka-Volterra方程式はニューラルネットワークを特殊解として含み、十分に多くの隠れユニット（自由変数で記述される個体群）を持たせると任意の連続変数を近似できる。逆にユニット数を減らすと柔軟性が極めてなくなり、構造の抽出には有用である[5]。ただし、局所解に陥りやすくなるため計算量は膨大になる。

3群からなる非線形モデルの未知変数は各群間の相互作用係数（9変数）と各群の生長率（3変数）であり、このモデルでどこまで近似できるかを調べた。変数の数に比べてサンプル数が少ないが、このモデルは非線形モデルであり、変数の値が特定の値でないと発散するなど極端な挙動をするため、線型モデルに比べて実際の自由度は極めて小さい。

実測値とモデルの計算値の2条誤差が最小になる変数の組み合わせを遺伝的アルゴリズムで求めた結果、図11のようになった。

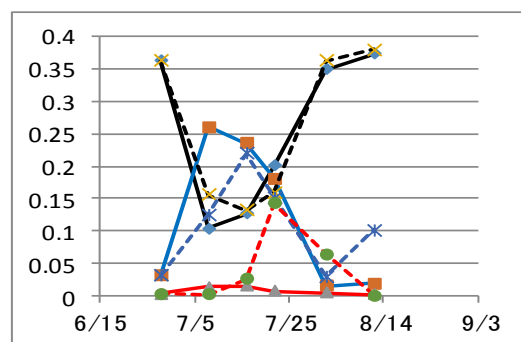


図11 3群微生物相動態の実測値とモデルによる計算値（実線：観測値、点線：計算値、黒：善玉菌、青：悪玉菌、赤：その他）

遺伝的アルゴリズムでは大域最適解を探索できるが、初期値等を変えながら長時間、最小化計算を行っても、どうしても一致しない部分が残った。このことは3群に固有する性質だけでは説明できない外的要因があることを示唆しており、外的要因としては環境変動あるいは宿主である植物体側の要因（植

物代謝成分の変動)が考えられた。そこで、環境要素の追加したモデルによる解析を現在、実施中である。ただし、モデル中の変数を増やすとシステム同定に要するサンプル数は大幅に増加するため、本研究で検討した光センシング手法の実用化等によって、サンプル数のスケールアウトを図る必要がある。

<引用文献>

- ① Ikeda, S., T. Kaneko, T. Okubo, L. E. Rallos, S. Eda, H. Mitsui, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, and K. Minamisawa, 2009, Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microb. Ecol.*, 58: 703-714
- ② Ikeda, S., T. Okubo, M. Anda, H. Nakashita, M. Yasuda, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, S. Eda, A. Momiyama, K. Terasawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2010, Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: Plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51: 1398-1410
- ③ Lee, W.S., V. Alchanatis, C. Yang, M. Hirafuji, D. Moshou, C. Li, Sensing technologies for precision specialty crop production, 2010, *Computers and Electronics in Agriculture*, 74(1):2-33
- ④ Suzuki et al., 2011, Lotus japonicus nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *PNAS*, 108: 16837-16842
- ⑤ 平藤雅之, 1992, 器官間干渉を基礎とした植物生長モデルとその同定法, *農業気象*, (48) 3: 285-293

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4件)

- ① 池田成志, 鶴丸博人, 大久保卓, 岡崎和之, 南澤究, 植物共生科学の新展開と農学研究におけるパラダイムシフト, *化学と生物*, 査読有, 51, 2013, 462-470
- ② 池田成志, 環境微生物研究とリスク管理, *日本微生物生態学会誌*, 査読有, 28, 2013, 75-76

[学会発表] (計36件)

- ① Hirafuji, M., Agricultural Big Data and Applications, Big Data Workshop "Innovation is GREAT", NII (Tokyo), 2015.02.26.
- ② Hirafuji, M., Big Data for Agriculture, Big Data French-Japanese Workshop, The Embassy of France in Japan, The Embassy of France (Tokyo), 2014.11.18-19.

- ③ Ikeda, S. et al., Molecular community analysis for unraveling plant-microbes interactions in arable lands, the 6th EAFES International Congress, Hainan (China), 2014.4.9-11
- ④ 池田成志 他、圃場条件下でのダイズ根粒菌の多様性に対する Rj 遺伝子型の影響評価, 日本土壌肥料学会大会, 東京農工大小金井キャンパス, 2014.9.9-11

[図書] (計2件)

- ① 平藤雅之, S&T 出版, IoT/CPS/M2M ー応用市場とデバイス・材料技術 (第8章-2 大規模農業における ICT 化の現状と展望 ー電子デバイスへのニーズー), 2015, 256-263 (総ページ数 319)
- ② 平藤雅之, 養賢堂, シリーズ 21 世紀の農学「ここまで進んだ! 飛躍する農学 (スマート農業とフェノミクスー 農業・生物・環境の途方もない複雑性をビッグデータで読み解く ー), 2015, 145-165 (総ページ数 171)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ジャガイモ作物体の生育状態診断方法
発明者: 関山恭代、富田 理、小野裕嗣、池田成志、浅野賢治、小林 晃、小林有紀
権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2015-109720
出願年月日: 平成 27 年 5 月 29 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

平藤 雅之 (HIRAFUJI, Masayuki)
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大規模畑作研究領域・領域長
研究者番号: 370495

(2)研究分担者

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大規模畑作研究領域・主任研究員
研究者番号: 20396609

研究分担者

西中 未央 (NISHINAKA, Mio)
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畑作基盤研究領域・研究員
研究者番号: 90586158