

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03948

研究課題名(和文)植物-エンドファイト-バクテリア共生系による新たな生物学的窒素固定技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of new biological nitrogen fixation technology by plant-endophyte-bacterial symbiotic system

研究代表者

成澤 才彦 (Narisawa, Kazuhiko)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90431650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、菌類が植物と共生関係を結ぶ上で、細菌が重要な役割を担っていることが示されている。根部エンドファイトである*V. simplex* Y34にも複数種の細菌が内生または外生していることが示唆されているが、詳しいことは不明である。そこで、まず*V. simplex* Y34から分離された*R. pusense* Y9を供試し、同細菌が*V. simplex* Y34のコロニー形態に変化を及ぼし、分生子形成を向上させることを明らかにした。次に野外における*V. simplex* Y34と菌糸圏の細菌群集を調べ、細菌叢の違いや多様性が、*V. simplex* Y34を通して植物生育に大きく影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、*V. simplex* Y34は異なる土壌条件下において土壌由来の細菌種から細菌を選抜し、菌糸圏細菌叢を構築していることが示唆された。この新しい知見は、自然界における植物-菌類生態の理解やその利用において、環境ごとに細菌-菌類間の相互作用を明らかにすることの必要性を示している。さらに、単独生物に注目するのではなく、植物-エンドファイト-細菌を1つの系としてとらえ、その相互作用や生態を学び、さらに植物根内の環境微生物叢制御技術を確立することで、これまでに実用化が困難であった共生微生物の利用技術に新たな方向性も示している。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been shown that bacteria play an important role in forming a symbiotic relationship between fungi and plants. It has been suggested that multiple types of bacteria interact with the root endophyte *V. simplex* Y34, but the details are unknown. Therefore, we first tested *R. pusense* Y9, which was isolated from *V. simplex* Y34, and found that the bacterium changed the colony morphology of *V. simplex* Y34 and improved the conidial formation rate. Next, we investigated the bacterial community on the hyphae of *V. simplex* Y34 in the field, and revealed that differences and diversity of bacterial community significantly affect plant growth through *V. simplex* Y34.

研究分野：農学

キーワード：根部エンドファイト 内外生バクテリア 共生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近代農業は、人工的な固定窒素の利用に頼り、生物的固定窒素の利用を軽んじてきた。近年、窒素肥料の過剰な施用に伴い、地球温暖化に代表される環境負荷が大きな問題となっている。この抜本的な問題解決には、根粒菌等による生物学的な窒素利用が有効であるが、生物学的な窒素固定は、一部の細菌類とマメ科など、植物種の組み合わせが限定されている。この根粒共生は、根粒菌の 1) 宿主への感染、2) 細胞への取り込み (細胞内共生)、そして 3) 共生的な窒素固定の 3 つの過程に分けられる。

2. 研究の目的

本研究では、植物-菌類-バクテリアを 1 つの系としてとらえ、新たな生物学的な窒素固定の可能性を検討し、21 世紀型 新・緑の革命を起こすことを目指す。1) 獲得に成功した *V. simplex* Y34-*Rhizobium* sp. 共生系を供試して、DSE-バクテリア間相互作用を解明し、特に DSE と親和性の高い窒素固定能を有するバクテリアを選抜する。2) 同共生系を処理した植物の生育調査と環境微生物叢制御技術を確認し、人工的な固定窒素の利用に依存しない植物生産技術の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DSE-バクテリア間相互作用の解明とその利用

V. simplex Y34 と親和性の高い有用バクテリアを選抜する。最終的に窒素固定能が高く、植物のバイオマス増加効果が高い DSE-内生バクテリア共生系を作出する。また、この選抜した *V. simplex* Y34-*Rhizobium* sp. 共生系を供試して、内 (外) 生バクテリアの役割を明らかにする。さらには、同共生系の宿主植物内での行動を把握し、定着様式を明らかにする。

(2) DSE-バクテリア共生系処理植物による実証試験

近年、共生菌類が、植物と共生関係を結ぶ上で、バクテリアが重要な役割を担っていることが示されている。根部エンドファイトである *V. simplex* Y34 も自然条件からの分離時に複数種の細菌が内生または外生していることが示唆されており、この菌系内外の細菌を除去することで、宿主菌類の植物への生育促進効果が減少することが報告されている。現在までに、*V. simplex* Y34 からは *R. pusense* Y9 が分離され、この細菌が *V. simplex* Y34 に内外生することで、*V. simplex* Y34 の植物根に対する感染率を向上させることが明らかとなっている。しかし、*V. simplex* Y34 が圃場条件下において上記のように細菌との関係を結ぶのかについてはいまだ明らかになっていない。そこで、3 つの圃場条件下 (ダイズ栽培圃場 (Soy)、有機栽培圃場 (Org) および水田 (Pad)) *V. simplex* 資材を埋設し、同菌を再分離した後、菌糸圏の細菌群集を解析することにより圃場条件下における *V. simplex* Y34 と細菌の関係について検討した。また、回収した資材を用いた植物接種試験も行った。

4. 研究成果

(1) DSE-バクテリア間相互作用の解明とその利用

ニトロゲナーゼは反応特異性が低く、様々な窒素あるいは有機化合物を触媒できる。主要なものとしては、一酸化二窒素、シアン、アセトニトリル、アジド、およびアセチレンなどがある。アセチレン還元反応はニトロゲナーゼの簡易測定法として有効であり、生じたエチレンをガスクロマトグラフィーによって検出することによってニトロゲナーゼ活性を間接的に検出することができる。アセチレン還元活性法を用いたニトロゲナーゼ活性測定の 3 日間におけるそれぞれの細菌株ごとの結果は表 2-7 のようになった。今回の試験において *Rhizobium pusense* Y9 およ

び *Rhizobium sp.* AR70D におけるエチレンは、いずれの条件下においても検出されなかった。

供試菌株には *V. simplex* Y34 を用い、供試細菌には *R. pusense* Y9、*Rhizobium sp.*G-R および *Rhizobium sp.* AR70D を用いた。プラスチックシャーレ（直径 90 mm）内の MY 培地の中心に 1/2CM 培地で前培養した供試菌を静置した。菌接種部から片側 1 cm 離れた培地上に OD600 = 0.02 に調整した供試細菌を直線状に画線した。これを約 23 °C で菌糸が細菌接種部に触れるまで生育させ、さらにそこから 1 週間培養し、分生子を回収し測定した。その結果、分生子形成数は *R. pusense* Y9 および *Rhizobium sp.* AR70D 処理区において、対照区と比較して増加が見られた。

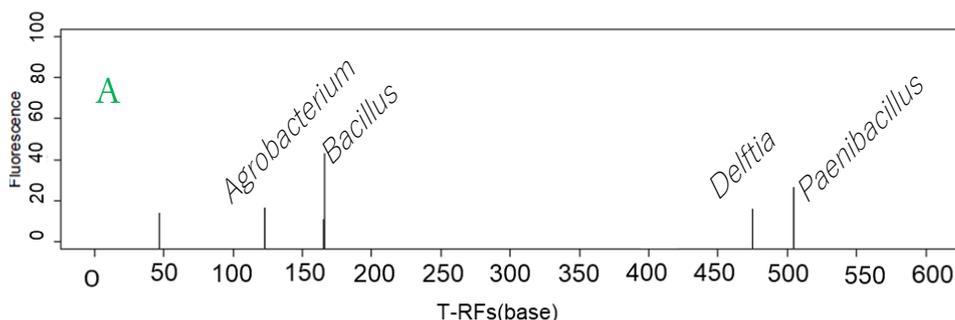
(2) DSE-バクテリア共生系処理植物による実証試験

それぞれの処理区から回収した資材パックから資材を滅菌培養土と 1 : 9 に混合し資材混合培養土を作製した。これをセルトレイに移し、無菌的に発根させたトマト種子（ハウス桃太郎タキイ種苗）をセルトレイに移植した。人工気象機内で 3 週間培養(23°C16 時間明期)し、植物体乾燥重量を測定したところ、Control、バクテリアを取り除いた *V. simplex*-Cured 区（、Soy 区、Pad 区、および Org 区でそれぞれ平均 2.37 mg、3.15 mg、4.07 mg、4.50 mg、および 6.18 mg であり、Org 区において最も高い植物体乾燥重量を得た。また、室内で同期間保存した資材を用いた実験区である *V. simplex* -Cured 区と比較して、一度野外へ埋設した後に回収した Soy 区、Pad 区および Org 区はいずれも植物体地上部乾燥重量が増加した。

再分離した *V. simplex* の菌糸を LIVE/DEAD 染色による蛍光顕微鏡観察を行ったところ、菌糸の側面に細菌が付着している様子が Soy 区、Pad 区および Org 区の全てで認められた。分離された菌株を 10F-907R の細菌ユニバーサルプライマーを用いた PCR 増幅でバンドの有無を確認したところ Soy 区では 12、Pad 区では 10、Org 区では 35 の菌株でバンドが確認された。バンドが確認された *V. simplex* の菌糸を LIVE/DEAD 染色で蛍光顕微鏡観察を行ったところ、すべての菌株において細菌の存在が確認された。菌糸に付着している細菌密度は、Soy 区および Pad 区に比べて、Org 区が高かった。

Org 区、Soy 区、および Pad 区からそれぞれ分離された *V. simplex* Y34 菌糸圏の細菌群集は、Org 区は最大で 6 本のピークが確認された。Soy 区では最大で 3 本のピークが検出され、Pad 区では 2 本のピークが検出された。それぞれのピークを、クローンライブラリー法を用いた同定を行った。また、それぞれの断片位置をまとめて図 1 に示した。

Org 区で 120 bp 付近に見られたピークは *Agrobacterium* 属細菌であった。また、160 bp 付近に確認された高いピークは *Bacillus* 属細菌であり、このピークは Soy 区でも同位置において確認された。470 bp 付近のピークは *Delftia* 属細菌であり、510 bp 付近のピークは *Paenibacillus* 属細菌であった。また、Soy 区で認められた 560 bp 付近のピークは *Ensifer* 属細菌であった。一方、Pad 区で 570 bp 付近に見られたピークはいずれも *Uncultured bacterium* であり、同定には至らなかった。



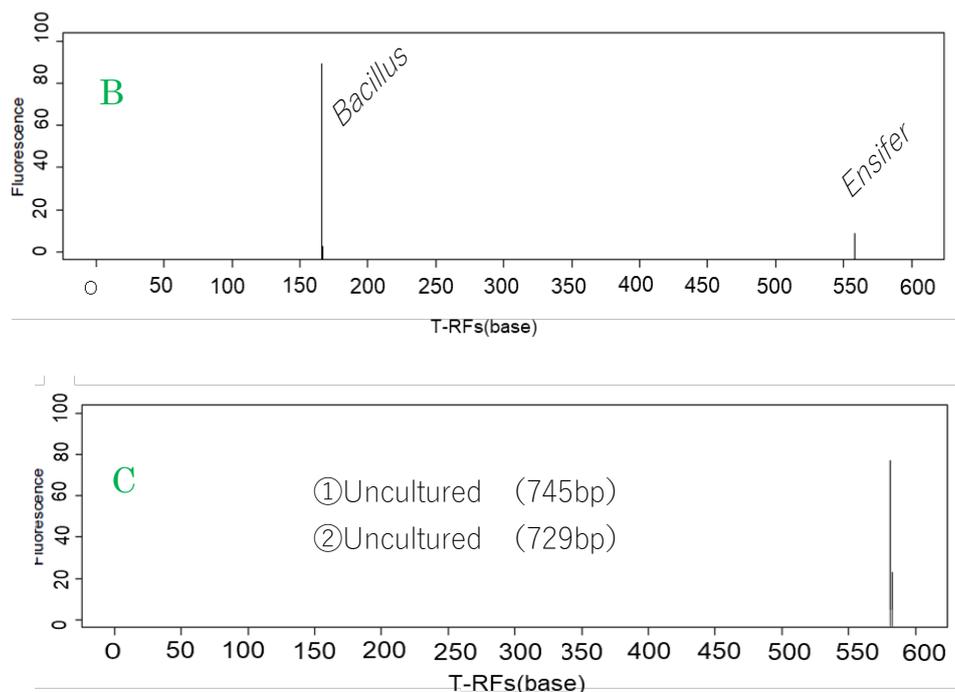


図1. Org、Soy、および Pad 区から分離された *V. simplex* Y34 菌糸圏の細菌群集構造解析結果

今回再分離された *V. simplex* Y34 の菌糸圏からはいずれの処理区も複数の細菌のピークが確認された。Org で *Agrobacterium* 属細菌として検出された細菌は *Agrobacterium salinitolerans* に最も相関性が高かった。*Agrobacterium salinitolerans* はセスバニアの根粒から分離報告がある (Yan *et al.*, 2017)。また、この細菌は *V. simplex* オリジナル株から分離された *Agrobacterium pusense* との相関性も 99.55% であった。

Org および Soy 区で確認された *Bacillus* 属の中で最も相関性が高かった *Bacillus aryabhatai* は植物ホルモンの産生を調節し、大豆の成長を促進する PGPR (植物生育促進性根圏細菌) として報告されており (Park, Y. G *et al.*, 2017)、過去に *V. simplex* Y34 を接種した植物根圏からも検出されている (野口, 2019)。Org 区で検出された *Delftia* 属細菌の中で最も相関性の高かった *Delftia tsuruhatensis* はトマトの IAA 合成を促進する PGPR (Prasannakumar *et al.*, 2015) との報告がある。*Paenibacillus* 属細菌の中で最も相関性の高かった *Paenibacillus alginolyticus* はトマトからの分離報告があり、PGPR である報告もある (Holland, A., 2019)。このように Org 区において検出された細菌は植物の生育に影響を与える報告例がある細菌や *V. simplex* Y34 からの報告例のある細菌種など植物および菌類と特異的な関係性を結ぶ細菌であった。Org 区で見られたトマト植物体の地上部生育促進にはこのような細菌が相乗的に作用した結果であることが考えられる。

Soy 区で特異的に見られた *Ensifer* 属細菌で最も相関性の高い種であった *Ensifer shofinae* はダイズ根粒からの分離報告があり、マメ科植物との共生遺伝子を保持していることが報告されている (Chen *et al.*, 2017)。Soy 区近辺ではダイズが栽培されていることから、ダイズ植物由来の根粒菌が Soy 区分離 *V. simplex* の菌糸圏に存在していたと考える。

Pad 区で検出されたピークに対応する細菌種は、Uncultured bacterium となった。この Uncultured bacterium はいずれも水田土壌由来であることも報告されている。

以上より、*V. simplex* Y34 は異なる土壌条件下において土壌由来の細菌種から細菌を選抜し、菌糸圏細菌叢を構築していることが示唆された。今後、これらの細菌種が宿主菌類を通して宿主植物へ作用している機作を明らかにすることで DSE の農業利用における実用化につながると期待

される。さらに、これらの新しい知見は、自然界における植物-菌類生態の理解やその利用において、環境ごとに相互作用する細菌叢や、細菌-菌類間の相互作用を明らかにすることの必要性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirokazu Toju, Kabir G. Peay, Masato Yamamichi, Kazuhiko Narisawa, Kei Hiruma, Ken Naito, Shinji Fukuda, Masayuki Ushio, Shinji Nakaoka, Yusuke Onoda, Kentaro Yoshida, Klaus Schlaeppli, Yang Bai, Ryo Sugiura, Yasunori Ichihashi, Kiwamu Minamisawa and E. Toby Kiers.	4. 巻 4
2. 論文標題 Core microbiomes for sustainable agroecosystems.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 247-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Guo, Y. Matsuoka, T. Miura, T. Nishizawa, H. Ohta, K. Narisawa.	4. 巻 284
2. 論文標題 Complete genome sequence of Agrobacterium pusense VsBac-Y9, a bacterial symbiont of the dark septate endophytic fungus Veroneaeopsis simplex Y34 with potential for improving fungal colonization in roots.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiotec.2018.07.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Guo, K. Narisawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Fungus-bacterium symbionts promote plant health and performance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 239-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME3303rh	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guo Y., Matsuoka Y., Nishizawa T., Ohta H., Narisawa K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of Rhizobium Species Living with the Dark Septate Endophytic Fungus Veroneaeopsis simplex on Organic Substrate Utilization by the Host.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 102-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME17144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Surono, Narisawa K.	4. 巻 121
2. 論文標題 The inhibitory role of dark septate endophytic fungus <i>Phialocephala fortinii</i> against <i>Fusarium</i> disease on the <i>Asparagus officinalis</i> growth in organic source conditions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological Control	6. 最初と最後の頁 159-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocontrol.2018.02.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Surono, Narisawa K.	4. 巻 28
2. 論文標題 The dark septate endophytic fungus <i>Phialocephala fortinii</i> is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of <i>Asparagus officinalis</i> growth.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fungal Ecology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.funeco.2017.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋本実佳、郭永、西澤智康、成澤才彦
2. 発表標題 根部エンドファイト <i>Veronaeopsis simplex</i> Y34 の内外生細菌 <i>Rhizobium pusense</i> Y9
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎亜耶乃、成澤才彦
2. 発表標題 ストレス条件下において根部エンドファイト <i>Veronaeopsis simplex</i> Y34 がエンドウ生育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口愛、高田圭太、坂上伸生、郭永、西澤智康、太田寛行、成澤才彦
2. 発表標題 Veronaeopsis simplex Y34資材を用いたハウス栽培におけるトマト根部微生物叢への影響
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本実佳、郭永、西澤智康、成澤才彦
2. 発表標題 根部エンドファイトVeronaeopsis simplex Y34 から分離された Rhizobium pusense Y9 株とその近縁種が宿主に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下田 宜司、成澤 才彦
2. 発表標題 マメ科植物における根部エンドファイトの接種効果の検証
3. 学会等名 植物微生物研究会 第28回研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高島勇介、成澤才彦
2. 発表標題 共に生きる菌類と細菌 内生細菌は宿主菌類をどう変えるのか?
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017 企画シンポジウムS06:共生微生物 我々の理解はどこまで進んだのか?(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西澤 智康 (Nishizawa Tomoyasu) (40722111)	茨城大学・農学部・准教授 (12101)	
研究分担者	太田 寛行 (Ohta HIroyuki) (80168947)	茨城大学・農学部・理事 (12101)	
研究分担者	下田 宜司 (Shimoda Yoshikazu) (80415455)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員 (82111)	