

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14902

研究課題名(和文) エンドファイト - 内生バクテリア共生系利用による植物への空中窒素固定能の付与

研究課題名(英文) Assignment of the nitrogen fixed ability to a plant by use of the endophyte-bacteria symbiosis 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Veronaepsis simplex Y34と相互作用の関係にあるRhizobium sp. Y9の特性解明を目的とし、同細菌の比較ゲノム解析および植物への接種試験を行った。Rhizobium sp. Y9の環状プラスミドには、窒素固定や根粒形成に関わる遺伝子群が存在しなかった。トマトを用いた接種試験により、Rhizobium sp. Y9は植物根に感染能があること、および窒素固定による植物への生育促進効果は示さないことが確認された。一方、Rhizobium sp. Y9は、V. simplex Y34の植物根への感染率を向上させることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the study is to clarify the interaction of Veronaepsis simplex Y34 and Rhizobium sp. Y9. Therefore, we did the bacterial comparative genome analysis and the inoculation experiment to tomato plant. The gene cluster in regard of a nitrogen fixation or a root nodule formation did not exist in the circle plasmid of Rhizobium sp. Y9. Rhizobium sp. Y9 did not show the growth promoting effect to the plant by a nitrogen fixation. However, Rhizobium sp. Y9 improved the infection rate to the plant with V. simplex Y34.

研究分野：農学

キーワード：エンドファイト 内生バクテリア 共生 窒素固定

1. 研究開始当初の背景

亜熱帯地域では、亜寒帯地域とは異なる種のエンドファイト DSE が植物の生育を助け、異なる種の植物間でネットワークを形成するなど、自然生態系で重要な位置を占めていると推定される。そこで、今までほとんど研究が行われていなかった温暖な地域における DSE の探索を開始した。その結果、エンドファイトとしての報告がなかった *Veronaeopsis simplex* の獲得に成功した。この *V. simplex* Y34 は、45 で生育できる高温耐性や、細菌との相互作用も報告されているユニークな種であり、温暖な気候下での作物栽培への利用や環境浄化などが期待されている。

2. 研究の目的

近代農業は、人工的な固定窒素の利用に偏り、生物的固定窒素の利用を軽んじてきた。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に限定されている。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、糸状菌類、特に DSE *Veronaeopsis simplex* にバクテリアが共存している可能性を検証し、根粒菌が宿主としない植物種にも生物学的な窒素固定の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Veronaeopsis simplex* からのバクテリアの検出および検出されたバクテリアの系統解析

16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行うことで、*V. simplex* から菌類内生バクテリアの検出・同定を試みる。さらに、同定されたバクテリアの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析を行うことで、現在まで報告されているバクテリアとの系統

的な比較を行う。

(2) *Rhizobium* sp. Y9 のゲノム解読および比較ゲノム解析

V. simplex から分離された *Rhizobium* sp. Y9 のゲノム解読およびゲノム既知の *Rhizobium* 属細菌や菌類内生バクテリアと比較することで、ゲノム情報から *Rhizobium* sp. Y9 の植物および菌類との関係性について検討する。

(3) *Rhizobium* sp. Y9 単独および *V. simplex* Y34 との共接種による植物への接種試験

Rhizobium sp. Y9 を植物に接種することで、根部への内生能、単独での生育促進効果、および宿主である *V. simplex* Y34 と植物の共生にどのような影響を与えるのか明らかにするため、*Rhizobium* sp. Y9 単独および *V. simplex* Y34 共生系での植物への接種試験を行なう。

4. 研究成果

(1) *Veronaeopsis simplex* からのバクテリアの検出および検出されたバクテリアの系統解析

Veronaeopsis simplex から *Rhizobium* 属細菌が検出された。同バクテリアを *Rhizobium* sp. Y9 とした。同バクテリアは、系統解析により、担子菌 *Sebacinales* 目に属し、エンドファイトとして報告がある *Piriformospora indica* に内生する *R. radiobacter* PABac-DSM に近縁であることが明らかとなった。さらに、*V. simplex* 菌糸表面にバクテリアが付着していることが確認された。表面に付着しているバクテリアに局在性は認められず、菌糸表面に一様に付着しているのが確認された (図 1)。

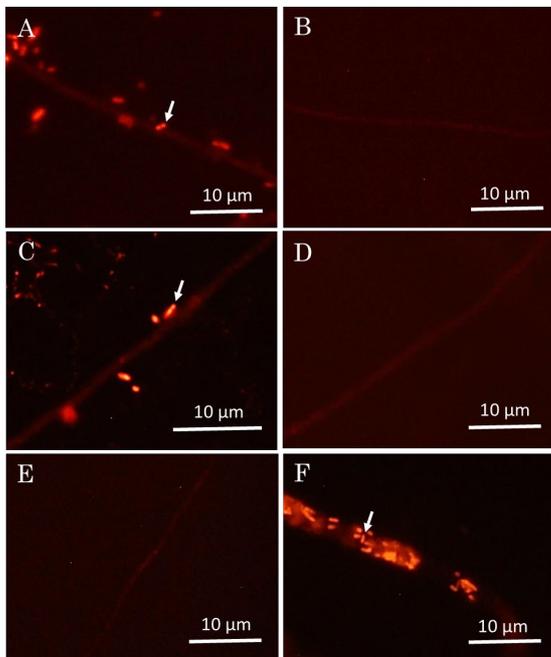


図1 . FISH 法による菌糸表面および菌糸内のバクテリア物の蛍光顕微鏡観察

A : *V. simplex* Y34 野生株、 B : *V. simplex* Y34 除去株、 C : *V. simplex* IBA K45 野生株、 D : *V. simplex* IBA K45 除去株、 E : *V. simplex* CBS588.66、 F : *M. elongate* -31 (矢印はバクテリアを示す。)

(2) *Rhizobium* sp. Y9 のゲノム解読および比較ゲノム解析

ゲノム解読の結果、*Rhizobium* sp. Y9 は環状染色体、線状染色体およびプラスミドを持つことが明らかとなった。

比較ゲノム解析では、水生マメ科植物 *Sesbania cannabina* と共生する *Rhizobium* sp. IRBG74 のゲノム配列と最も高い相同性が得られた。環状染色体および線状染色体において相同性は高かったが、プラスミドの相同性は低かった。*Rhizobium* sp. IRBG74 のプラスミドは、共生プラスミドと呼ばれ、根粒形成や窒素固定に関わる遺伝子が存在し、植物との共生において重要な役割を担っている。一方、*Rhizobium* sp. Y9 のプラスミドには窒素固定や植物病原性に関わる遺伝子は確認されず、型分泌機構に関わる遺伝子が多く確認された。型分泌機構は、植物病原

性 *Rhizobium* 属細菌やヒト病原細菌が保持し、いずれも接合線毛をプロトタイプとして進化してきたと考えられている。

(3) *Rhizobium* sp. Y9 単独および *V. simplex* Y34 との共接種による植物への接種試験 *Rhizobium* sp. Y9 を植物に接種した結果、外観上、植物に対して明らかな病徴を示さなかった。*Rhizobium* sp. Y9 は、植物病原性に関わる Ti プラスミドを持たないことが確認されている。以上より、*Rhizobium* sp. Y9 は植物に対して病原性を示さないことが確認された。

Rhizobium sp. Y9 および *V. simplex* Y34 バクテリア除去株は、植物に共接種することで、*V. simplex* Y34 バクテリア除去株を単独で接種した場合と比較して、植物体バイオマスを増加させた。*Rhizobium* sp. Y9 単独では、植物に対する生育促進効果は確認されなかったことから、同バクテリアおよび *V. simplex* Y34 間における何らかの相互作用により、植物の生育が促進されることが示唆された。

以上をまとめると、*Rhizobium* sp. Y9 は *V. simplex* Y34 の主に菌糸表面に付着しており、そのような生活様式を獲得するために進化した種であることがゲノム情報からも示唆された。本実験では、*Rhizobium* sp. Y9 のゲノム解析を行ったが、今後、*V. simplex* Y34 のゲノム解析を行い、バクテリアおよび菌類の単独および共培養時におけるトランスクリプトーム解析を行っていくことで、両者の相互作用についての理解が可能となる。また、*Rhizobium* sp. Y9 は菌根菌ヘルパーバクテリアのように *V. simplex* Y34 の植物への感染を促進し、植物の生育を促進すること、さらに、*V. simplex* Y34 以外と利用できる可能性も示唆された。*Rhizobium* sp. Y9 の DSE

との利用法を検討することで、今後、DSEの農業利用における実用性を高めることができると期待される。今後、*Rhizobium* sp. Y9が、宿主菌類および植物との共生に与える影響のメカニズムについてをより詳細に理解することで、バクテリア-菌類-植物間の3者共生系の確立することが可能であると考えられる。

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5件)

Ohshima S, Sato Y, Fujimura R, Takashima Y, Hamada M, Nishizawa T, Narisawa K, Ohta H. *Mycoavidus cysteinexigens* gen. nov., sp. nov., an endohyphal bacterium isolated from a soil isolate of the fungus *Mortierella elongata*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(5), 2052-2057, 2016. DOI:

10.1099/ijsem.0.000990 (査読有り)

Usui E, Takashima Y, Narisawa K. *Cladophialophora inabaensis* sp. nov., a New Species among the Dark Septate Endophytes from a Secondary Forest in Tottori, Japan. *Microbes and Environments* 31:357-360, 2016. DOI:

10.1264/jsme2.ME16016 (査読有り)

太田寛行・西澤智康・松岡勇人・高島勇介・成澤才彦. 土壌微生物が創る共生の世界 - その先端的研究事例と農業への応用的研究展開, 4. 糸状菌に共生する細菌その機能と生態 - 日本土壌肥料学雑誌 87(4), 254-259, 2016 (査読有り)
高島勇介, 太田寛行, 成澤才彦. 糸状菌, 特にエンドファイトの諸形質を内生細菌がコントロールするのか? 土と微生物 69 16-24: 2015. (査読有り)

Nishizawa, T., Miura, T., Harada, C., Guo,

Y., Narisawa, K., Ohta, H., ... & Shirai, M. (2016). Complete genome sequence of *Streptomyces parvulus* 2297, integrating site-specifically with actinophage R4. *Genome Announcements*, 4(4), e00875-16. DOI:10.1371/journal.pone.0109233, 2014. (査読有り)

[学会発表](計13件)

Guo Y., Matsuoka Y., Nishizawa T., Ohta H. and Narisawa K., Genome analysis of a DSE-commensal bacterium *Rhizobium* sp. Y9 associated with *Veronaeopsis simplex* Y34. 日本土壌微生物学会 2016 年度大会 岐阜大学(岐阜県・岐阜市) 6月11日-12日 2016年

Guo Y., Nishizawa T., Ohta H. and Narisawa K., A dark septate endophyte *Veronaeopsis simplex* Y34 alters the root-endospheric community and suppresses Fusarium crown and root rot disease of tomato. 日本微生物生態学会 第31回大会 横須賀文化会館(神奈川県・横須賀市) 10月22日-25日 2016年

生田目光, 高島勇介, 佐藤嘉則, 西澤智康, 成澤才彦, 太田寛行 *Mortierella*属糸状菌に内生する細菌の多様性解析 日本土壌微生物学会2016年度大会 岐阜大学(岐阜県・岐阜市) 6月11日-12日 2016年

高島勇介, 太田寛行, 成澤才彦 *Mortierella parvispora* に内生する *Mycoavidus* 属細菌による宿主の接合胞子形成の阻害 日本菌学会第60回大会 京都大学(京都府・京都市) 9月16-18日 2016年

高島勇介, 太田寛行, 成澤才彦 *Mortierella* 属菌に内生する細菌 *Mycoavidus* spp.が宿主の胞子嚢形成に与える影響について 日本微生物生態

学会第31回大会 横須賀文化会館(神奈川県・横須賀市) 10月22日-25日
2016年

中西布実子, 高島勇介, 菊池義智, 出川洋介, 成澤才彦 真菌類菌糸圏から分離した *Burkholderia* 属細菌のキチン分解活性について 日本微生物生態学会第31回大会 横須賀文化会館(神奈川県・横須賀市) 10月22日-25日 2016年

Takashima, Y., K. Yamamoto, K. Seto, Y. Degawa and K. Narisawa Detection of Mollicutes-related endobacteria from putative saprotrophic *Endogone* spp. and *Sphaerocreas pubescens* The 8th International Conference on Mycorrhiza (ICOM8), Flagstaff, Arizona, USA August 3-7, 2015

高島勇介, 山本航平, 瀬戸健介, 出川洋介, 成澤才彦 *Endogone* 属菌および *Sphaerocreas pubescens* における Mollicutes-related endobacteria の検出 日本菌学会第59回大会(沖縄県・那覇市) 5月15-18日 2015年

松岡勇人, Rida Khastini, 成澤才彦 根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* に内生するバクテリアについて 日本菌学会第59回大会(沖縄県・那覇市) 5月15-18日 2015年

中西布実子, 成澤才彦 菌類子実体内部から分離された *Burkholderia* 属菌について 日本菌学会第59回大会(沖縄県・那覇市) 5月15-18日 2015年

松岡勇人, Rida Khastini, 西澤智康, 成澤才彦 根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* から分離された *Rhizobium* sp. Y9株の全ゲノム解析 日本微生物生態学会第30回大会(茨城県・土浦市) 10月17-20日 2015年

中西布実子, 成澤才彦 ラン菌根菌は内生バクテリアを保持するのか 日本微生物生態学会第30回大会(茨城県・土浦市) 10月17-20日 2015年

高島勇介, 成澤才彦 グロムス門およびケカビ亜門菌類に内生するバクテリアの多様性 日本微生物生態学会第30回大会(茨城県・土浦市) 10月17-20日 2015年

〔図書〕(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse/arch/index.htm>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

西澤 智康 (NISHIZAWA TOMOYASU)
茨城大学・農学部・准教授
研究者番号: 40722111