

令和元年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0147

研究課題名(和文) 病害土壌診断バイオマーカーの開発に向けたメタゲノム解析

研究課題名(英文) 16S metagenomics analysis of microbiome communities in soils infected with root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and *Streptomyces ipomoea*

研究代表者

門田 有希 (Monden, Yuki)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：30646089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では16Sメタゲノム解析を行い、サツマイモの重要病害である立枯病や有害線虫の発生が土壌微生物構成に及ぼす影響を経時的かつ網羅的に調査した。土壌試料からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV1-V2、V3-V4領域を増幅するよう設計したPCRプライマーを用い、MiSeqシーケンス用ライブラリを作製した。QIIMEソフトウェアを用い、微生物構成や多様性解析等を行った結果、異なる処理区の微生物構成に違いが検出された一方、処理区内の微生物構成は類似していることが示された。また、発病土壌では非発病土壌よりも微生物の多様性が減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではサツマイモの重大病害である立枯病とネコブセンチュウを対象に、土壌微生物構成への影響を経時的かつ網羅的に調査した。その結果、土壌病害の発生している土壌では微生物の多様性が低下することが示唆された。また、同じ病害に感染していても砂質や粘土質など土壌の特性、あるいはマルチ被覆の有無などによって微生物の多様性やその構成は大きく異なっていた。以上のことから、土壌の微生物構成は病害感染の有無だけでなく、様々な環境要因に影響を受けることが示唆された。本研究ではこれまでに知見の無かったサツマイモ立枯病とネコブセンチュウに関して土壌微生物構成から新たな知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Several reports suggested soil microbiome affects the transmission and emergence of infectious disease. However, there have been no reports that investigated microbiome in soils infected with soil rot disease or root-knot nematode. Thus, in this study, 16S metagenomic analyses were conducted for investigating detailed microbiome communities using soils infected with root-knot nematode and *Streptomyces Ipomoeae*. The V1-V2 and V3-V4 regions of 16S rRNA gene were targeted for sequencing and taxonomic classification. PCR amplification of those regions were performed for constructing an Illumina MiSeq sequencing library. The MiSeq reads were analyzed using the QIIME software. Comparison analysis of microbiome in our study suggested that microbiome communities in the same area were very similar, in contrast, those among different area were totally different. Interestingly, our results indicated that microbiome diversity was much lower in soils with infection.

研究分野：植物遺伝育種

キーワード：16Sメタゲノム 土壌病害 有害線虫 サツマイモ 土壌微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、サツマイモの重要病害や有害線虫が土壌微生物構成に及ぼす影響を経時的かつ網羅的に調査することである。対象はサツマイモ立枯病とサツマイモネコブセンチュウとする。これらはサツマイモの収量や外観品質に大きな影響を及ぼす。しかし、抵抗性品種は極めて限られている。また、有害線虫および土壌病害の発生・抑制には土壌微生物構成が大きく影響することが示唆されているが、科学的な知見は少ない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、立枯病とネコブセンチュウ発病・非発病圃場における土壌サンプルを用い、微生物構成を明らかにする目的で 16S メタゲノム解析を行った。また、自然条件下のフィールドで得られたサンプルだけでは、様々な環境要因の影響を受ける可能性があった。そこで、より厳密に制御した環境条件下である温室においても線虫の発生が土壌微生物構成へ及ぼす影響を調査した。線虫の発生から時系列に複数回サンプリングを行うことで、土壌微生物構成や多様性の変化をリアルタイムで解析した。また、土壌サンプルからの核酸抽出に適した手法を検証するため複数の抽出キットを用いてその結果も比較した。

3. 研究の方法

ネコブセンチュウ発病圃場（茨城県つくば市）と隣接する非発病圃場、立枯病発病圃場（徳島県名西郡）とクロルピクリンで土壌消毒を行い立枯病の発生を抑制した非発病圃場から、土壌試料のサンプリングを行った。ネコブセンチュウ検定用土壌試料は ISOIL Beads Beating kit (ニッポンジーン社)、立枯病検定用土壌試料は PowerSoil DNA Isolation kit (MO-BIO) を使用し、DNA 抽出を行った。得られた DNA を用い、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域と V3-V4 領域を増幅するよう設計したプライマーにより PCR 増幅し、MiSeq シーケンス用ライブラリーを作成した。シーケンスで得られた 300bp のペアリードについては以下の手順で解析した。まずは、得られたリードに対して前処理を行い、信頼性の高いリードを確保した。その後、これらリードを用いてメタゲノム解析専用ソフトウェア QIIME により微生物構成を解析した。各サンプルのリードを SILVA の 16S rRNA データベースで検索し、微生物種を特定した。さらに、アルファレアフラクション解析や PCoA 解析等を行い、サンプルに含まれる微生物種の多様性、サンプル間の微生物構成の類似性等も調査した。

また、より厳密な環境制御条件下におけるサンプリングは九州沖縄農業研究センター（宮崎県都城市）の温室で行った。サツマイモ品種「関東 14 号」を用いてポット栽培を行い、線虫の接種・非接種区を設けた。接種前 (T=0)、接種 60 日後 (T=1)、接種 120 日後 (T=2) と合計 3 回サンプリングを行い、16S メタゲノム解析用の試料とした。サンプリング時の土壌中における線虫密度はベルマン法により調査した。土壌試料からの DNA 抽出には、ISOIL Beads Beating kit (ニッポンジーン社) と Powersoil DNA Isolation kit (MO-BIO) を用いた。得られた DNA を用い、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象とする PCR 増幅により MiSeq シーケンス用ライブラリーを作成した。シーケンスで得られた 300bp のペアリードについては上記同様 QIIME ソフトウェアにより解析した。

4. 研究成果

フィールドで収集した土壌サンプルを用いてシーケンスを行った結果、V1-V2 については合計 13,132,254 ペアリード、V3-V4 については合計 20,744,156 ペアリードを得た。各サンプルに

ついて 20 万 (V1-V2) あるいは 15 万 (V3-V4) リードを抽出し、微生物構成を解析した。その結果、異なる試験区間ではその土壌中の微生物構成に違いが見られた一方、試験区内の土壌試料における微生物構成は類似していた。PCoA 解析でも試験区内のサンプルの類似性は高く、試験区間では低いことが示された。線虫接種・非接種土壌サンプルを属レベルで比較したところ、土壌中に存在する 46%の微生物種についてその存在比が異なるという結果が得られた。また、どちらの検定土壌でも発病土壌では非発病土壌よりも微生物の多様性が減少していることが示された。これは病害の発生している土壌では微生物の多様性が低下する、という既存の報告と一致していた。また、同じ病害に感染していても砂質や粘土質など土壌の特性、あるいはマルチ被覆の有無などによって微生物の多様性やその構成は大きく異なっていた。以上のことから、土壌の微生物構成は病害感染の有無だけでなく、様々な環境要因に影響を受けることが示唆された。

また、環境制御条件下(温室)で収集した土壌サンプルを用いてシーケンスを行った結果、合計 13,555,308 ペアリードを得た(各サンプルにおけるリード数の範囲: 96,324 ~ 906,978)。QIIME を用い、ペアエンドリードの連結、クオリティチェック、キメラ配列の除去等の処理を行った結果、合計 10,762,952 リードを得た。各サンプルについて 80,000 リードを抽出し、微生物構成や多様性を調査した。その結果、線虫接種後である T=1 の土壌サンプルの微生物多様性が他のサンプルと比較し最も低いことが示された。その後、T=2 のサンプルでは多様性が回復しており、線虫発病から経過時間に伴い微生物多様性が変動することが示唆された。また興味深いことに同じ土壌サンプルを試料としたにも関わらず、異なる核酸抽出キットを使用したサンプル間では、土壌微生物構成に大きな違いが確認された。よって、用いる核酸抽出キットの選択は菌叢解析結果に重要な影響にもたらすと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1 . 中島陽佳、石毛太一郎、藏之内利和、百田洋二、米本謙吾、田原誠、門田有希、サツマイモネコブセンチュウおよびサツマイモ立枯病感染土壌における 16S メタゲノム解析、日本育種学会第 130 回講演会、2016

2 . Nakashima Haruka, Ishige Taichirou, Kuranouchi Toshikazu, Momota Youji, Yonemoto Kengo, Tahara Makoto, Monden Yuki, 16S metagenomics analysis of microbiome communities in soils infected with root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and *Streptomyces ipomoea*, 7th China-Japan-Korea International Sweetpotato Workshop, 2016

3 . 中島陽佳・石毛太一郎・藏之内利和・百田洋二・米本謙吾・田原誠・門田有希、サツマイモネコブセンチュウおよびサツマイモ立枯病感染土壌における 16S メタゲノム解析、第 8 回中国地域育種談話会、2016

4 . 門田有希、中島陽佳、藏之内利和、田原誠、16S メタゲノム解析を利用したサツマイモネコブセンチュウ発病土壌における微生物相の網羅的解析、日本育種学会第 129 回講演会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：横田 健治
ローマ字氏名：Yokota Kenji
所属研究機関名：東京農業大学
部局名：応用生物科学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80349810

研究分担者氏名：田淵宏朗
ローマ字氏名：Tabuchi Hiroaki
所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・
部局名：九州沖縄農業研究センター
職名：上級研究員
研究者番号（8桁）：10355571

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。