

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02887

研究課題名（和文）遺伝型・表現型が支配する水稻根圏の微生物食物連鎖構造と機能

研究課題名（英文）The structure and functions of the microbial food chain in the rice rhizosphere controlled by the plant genotype and phenotype

研究代表者

村瀬 潤（MURASE, Jun）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30285241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物根に生息する微生物群集のハイスループット分子分析のための核酸抽出および精製方法を開発した。施肥条件および無施肥条件で栽培した水稻120品種の根微生物群集の組成と微生物食物連鎖の構造を明らかにした。根微生物群集と、施肥条件によって支配されるイネの遺伝子型および表現型との関係を分析した。GWAS解析により根微生物群集を制御するイネ候補遺伝子を抽出した。根微生物群集の構成に及ぼすイネの遺伝子型、表現型、土壌型の重要性を比較解析した。根微生物の窒素固定活性と窒素固定遺伝子を定量し、施肥効率の高いイネ品種は施肥にともなう窒素固定活性や特定の窒素固定遺伝子の低下の程度が少ない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

本研究では、遺伝情報が明らかとなっているイネ120品種を対象に根に生息する微生物（細菌、古細菌、真核微生物）群集の網羅的解析を行い、イネの遺伝型、表現型との関係を初めて明らかにした。根微生物群集の構成は施肥の影響を大きく受けること、施肥の影響はイネの遺伝型によって異なること、さらに土壌タイプが根微生物群集を規定する重要な因子であることが示され、イネと根圏微生物の相互作用に関する基盤的な知見を提供することができた。また、本研究により得られた根に生息する窒素固定微生物の生態に関する知見は、将来のイネ育種を含め、土壌微生物の機能を活かした低施肥農業、持続的農業に資するものである。

研究成果の概要（英文）：We have developed a nucleic acid extraction and purification method for high-throughput molecular analysis of microbial communities inhabiting plant roots. We clarified the composition and structure of the root microbial communities of 120 paddy rice varieties cultivated under fertilized and non-fertilized conditions. We analyzed the relationship between the root microbiome and the rice genotypes and phenotypes governed by fertilization conditions. Genome-wide association analysis was used to extract candidate rice genes that regulate root microbial communities. The importance of rice genotype, phenotype, and soil type on the composition of root microbial communities was comparatively analyzed. We quantified the nitrogen-fixing activity and nitrogen-fixing genes of root microorganisms. We found that rice cultivars with high fertilization efficiency showed a less intensified decrease in nitrogen-fixing activity and specific nitrogen-fixing genes due to fertilization.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水稻 根圏マイクロバイオーーム アンプリコンシークエンス 窒素固定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 根圏は植物と土壤微生物の相互作用のホットスポットである。植物根が土壤微生物に特徴的な生育環境を提供する一方、植物の良好で健全な生長は根圏微生物群集の構成やはたらきと深い関係にある。「イネは土でとる」と言われるほど重要な水田土壤の地力発現には、土壤微生物のはたらきが不可欠であるが、水稲根圏微生物群集の形成に水稲自身の遺伝型、表現型、また土壤のタイプがどのように関与しているかは分かっていない。

(2) 根圏微生物の生態や機能に関する研究は、これまで細菌や糸状菌を中心に行われてきた。湛水水田土壤には糸状菌以外の多様な真核微生物が卓越することが明らかにされており、植物根圏も真核微生物の生息の場であることが推察されるが、水稲根圏に生息する真核微生物群集の実態や、植物および細菌・古細菌との相互作用に関する知見は極めて不足している。

2. 研究の目的

(1) 水稲根に生息する微生物群集の構造とその機能を明らかにする。野外栽培試験により、遺伝情報既知の水稲品種の根微生物(細菌、古細菌、真核生物)群集とイネの遺伝形質・表現形質との関係を明らかにする。

(2) 根微生物群集の形成に果たす土壤タイプの影響を明らかにする。

(3) 水稲の生育に資すると期待される窒素固定微生物の水稲根におけるはたらきとその特徴を明らかにする。

(1) 原生生物が水稲根圏の細菌群集に及ぼす影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) 水稲根からの高効率な DNA 抽出法の開発

従来の水稲根からの核酸抽出法は、標準化しにくく、作業時間もかかっていた。本研究では液体窒素を用いた根試料の凍結粉碎とビーズ破碎を組み合わせた核酸の抽出法と、通常 PCR 産物を精製するための磁気ビーズを活用した DNA 精製法について検討を行い、根試料からの高効率な DNA 抽出法の確立を目指した。

(2) 水稲根圏微生物群集を規定する宿主遺伝型・表現型の探索

ゲノム情報が既知であるジャポニカ水稲 120 品種を選抜し、名古屋大学大学院生命農学研究科フィールド科学教育研究センター東郷フィールドの通常施肥水田および無施肥水田で移植栽培した。移植後 1 カ月目と出穂期に水稲株を掘り起こして根試料を採取し、(1) で開発した方法を用いて DNA を抽出し、*ssu rRNA* 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスを行った。

得られたシーケンスデータをもとに、水稲根の微生物群集形成に及ぼす水稲品種や施肥の影響、生育ステージによる群集の推移を解析した。また、品種の影響がみられた微生物群の相対存在量を説明変数としたゲノムワイド関連解析を行い、関連する遺伝形質を推定した。

(3) 施肥条件が水稲根圏窒素固定微生物に及ぼす影響とその品種間差

(2) で用いた各水稲品種の地上部形質の測定結果から、施肥条件と無施肥条件が同程度 (= 施肥効果が低い) の 2 品種と、施肥条件での生育が良い (= 施肥効果が高い) 2 品種を選抜し、施肥条件、無施肥条件でポット栽培した。定期的に地上部形質およびメタンフラックスを測定した。栽培 5~6 週間後に水稲根の窒素固定活性を測定するとともに、根試料から DNA, RNA を抽出し、*rRNA* を対象としたアンプリコンシーケンスおよび窒素固定遺伝子(*nifH*, *nifD*)の定量を行った。

(4) 土壤の違いが根圏微生物群集に及ぼす影響

東郷フィールド(東郷、赤黄色土大群)、新潟大学農学部附属フィールド科学教育研究センター(新潟、沖積土大群)、石川県立大学附属農場(石川、沖積土大群)から採取した水田土壤を用いて、施肥条件と無施肥条件が同程度 (= 施肥効果が低い) の水稲 2 品種、施肥条件での生育が良い (= 施肥効果が高い) 水稲 2 品種をポット栽培した。栽培期間中地上部形質を測定するとともに栽培 40 日目に水稲根を取り出し、根重を測定するとともに根の微生物群集をアンプリコンシーケンスにより解析し、土壤間の差や施肥の影響、水稲品種による差を検証した。

(5) 原生生物が根圏微生物に及ぼす影響

土壤を線殺菌した後に元の土壤から抽出し原生生物を含む真核生物をサイズ排除した微生物を添加した。この土壤にアメーバ、鞭毛虫を接種し、湛水状態として水稲幼苗を栽培し、根圏および非根圏土壤の原核微生物群集を比較した。

4. 研究成果

(1) 水稲根からの高効率な DNA 抽出法の開発

本研究で確立した手法は従来法と比べて同程度と DNA の抽出効率を有していた。また、PCR-

DGGE、アンプリコンシーケンスによって解析した微生物群集の構成も従来法と比べて違いは認められなかった。一方、DNAの抽出・精製にかかる時間は1サンプル当たりで従来法に比べて1/4~1/8に短縮された。本法はRNA抽出にも応用可能であることも確認され、水稻根試料から効率的な核酸抽出法を確立することができた。

(2) 水稻根圏微生物群集を規定する宿主遺伝型・表現型の探索

施肥条件および水稻品種が根微生物群集に及ぼす影響

根の原核微生物(細菌、古細菌)群集は土壌の微生物群集に比べて多様性が低く、根により選択的なリクルートが起こっていると推察された。施肥の有無は根の原核微生物群集に最も大きな影響を与えており(図1)、その影響は相対存在量が高い微生物群にも及んでいることが明らかとなった。すべての品種を通して無施肥条件で相対存在量が高かった科には

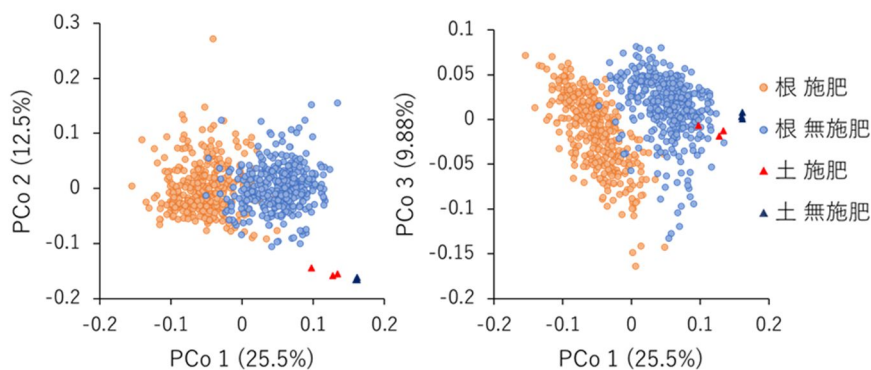


図1 水稻根および非根圏土壌微生物群集の Weighted UniFrac 距離に基づく主座標分析

Hungateiclostridiaceae 科や Anaeromyxobacteraceae 科、Geobacteraceae 科のような嫌気性菌が上位であった。また、Anaeromyxobacteraceae 科や Geobacteraceae 科の鉄還元菌、Gallionellaceae 科の好気性鉄酸化菌といった水田土壌の鉄動態に関与する科が上位であった。施肥条件で相対存在量が高かった科では、メタン酸化細菌である Methylophylaceae 科やメタノールなどを基質として利用する Methylophilaceae 科が上位であった。施肥条件ごとに比較すると、水稻品種による根の原核微生物群集の差が認められ、水稻の遺伝型が根圏微生物群集に影響を与えていることが示された。無施肥条件で相対存在量が高かった Anaeromyxobacteraceae 科や Geobacteraceae 科は窒素固定微生物として水田土壌で重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある (Masuda et al., 2017)。これらの微生物群が水稻根にも優占していることから、特に無施肥条件で窒素固定能を介して水稻生育に寄与している可能性が示唆された。

水稻の遺伝型および表現型と根微生物群集との関連

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、微生物群集に関連した候補遺伝子を検出することができた。また、遺伝型により特徴づけられる微生物群を特定し、根微生物群集の品種間差の一部を説明できた。

施肥条件と無施肥条件で、品種間での地上部形質順位相関を用いた相関解析によって、施肥条件と無施肥条件ともに水稻地上部形質と関連を示す微生物群を複数検出することができた。施肥条件に関わらず、出穂日および分けつが最も多くの微生物群と相関を示した。また、無施肥条件では地上部乾物重および草丈と関連する微生物群が見いだされ、特に未培養の微生物

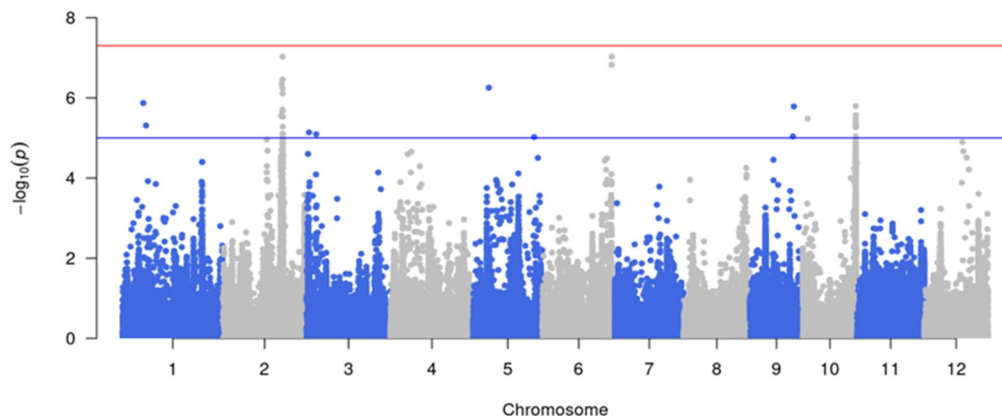


図2 FCPU_426 の相対存在量を形質とした GWAS のマンハッタンプロット

(FCPU_426) が乾物中と強い正の相関を示した。GWAS によって、FCPU_426 の相対存在量と関連を示す遺伝子座が複数確認された(図2)。以上の結果から、水稻の遺伝型、表現型は根の微生物群集と関連していることが明らかになった。今後有用微生物の探索とその微生物のリクルー

トに関わる水稻の遺伝子を明らかにすることが、土壤微生物の機能を活かした水稻栽培に資すると期待される。

根に生息する真核微生物群集の解析

施肥が根の真核微生物群集に与える影響も示されたが、施肥条件と無施肥条件との群集の差の程度には品種の影響もあることが推察された。施肥条件で最も優占したグループは線虫および卵菌類であり、これらは水稻根に寄生しているものと推察された。無施肥条件では、線虫の優占度が低下し、品種によっては環形動物の優占度が上昇した。織毛虫やアメーバなどの原生生物が品種によって無施肥条件で優占度が高まる傾向が示された。以上のことから、水稻根に生息する真核微生物群集には寄生者として水稻根と相互作用するグループと水稻根に生息する細菌と相互作用する（捕食-被捕食関係を示す）グループがあり、その構造は品種および施肥条件によって異なることが示唆された。

(3) 施肥条件が水稻根圏窒素固定微生物に及ぼす影響とその品種間差

生育初期のメタンフラックスは施肥条件に比べて無施肥条件で高くなっており、生育の劣る無施肥条件で根圏の還元化が早く進行したと推察した。また、施肥がメタン発生に及ぼす影響は水稻品種により異なっていることが示された。すべての品種で施肥により根微生物の窒素固定活性は低下した。施肥効果が低い品種の施肥による窒素固定活性の低下の程度は、施肥効果が高い品種に比べて大きい傾向にあった。rRNA解析に基づく水稻根の微生物群集には施肥の影響が認められ、施肥条件では Gammaproteobacteria が、無施肥条件では Myxococcia の相対存在量が高かった。Anaeromyxobacter、Geobacter に由来する *nifD* 遺伝子のコピー数はARAと同様施肥により低下し、施肥効果が低いと想定した水稻品種で施肥による *nifD* 遺伝子コピー数の低下が大きい傾向を示した（図3）。*Anaeromyxobacter* 属に代表される Myxococcia の相対存在量は 20~30%以上と高かったことから、水稻根の窒素固定活性には *Anaeromyxobacter* 属が関与していること、施肥効果の高い品種では施肥条件でも根における窒素固定が相対的に高く保たれる可能性があることが示唆された。

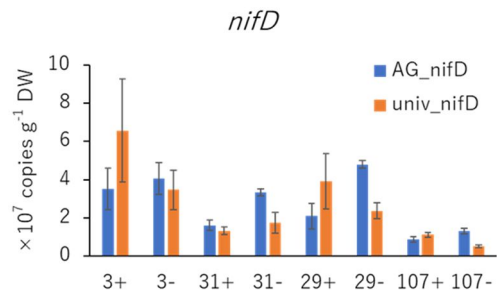


図3 水稻根に生息する微生物の *nifD* 遺伝子コピー数に及ぼす施肥、水稻品種の影響

(4) 土壌の違いが根圏微生物群集に及ぼす影響

根の微生物群集組成は水稻品種や施肥条件よりも土壌タイプの影響をより強く受けることが明らかとなった（図4）。同じ水稻品種であっても各土壌に共通して優占する微生物群の相対存在量は土壌タイプによって異なっており、水稻根による微生物のリクルートには土壌環境が重要な役割を果たすことが示された。*Anaeromyxobacter* 属に近縁を示す複数の微生物群は各土壌

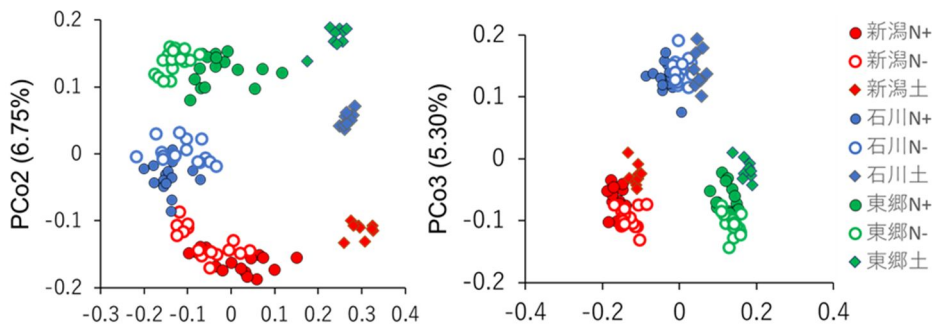


図4 水稻根および非根圏土壌微生物群集の Unweighted UniFrac 距離に基づく主座標分析

に共通した最優占グループであり、施肥による相対存在量の低下も各土壌、水稻品種で共通して観察された。一部の微生物群は施肥によって相対存在量が変化し、その応答は水稻品種によって異なっていた。水稻生育と相関を示す微生物群が抽出され、その数は無施肥条件のほうが多かった。以上の結果より、土壌タイプは根の微生物叢の強力な支配要因であり、水稻品種や施肥条件も複合的に微生物叢の形成に作用すると考えられた。

(5) 原生生物が根圏微生物に及ぼす影響

根圏土壌と非根圏土壌では微生物群集の構成が異なっており、水稻根による微生物群集の選択、リクルートが機能していることが確認された。根圏微生物群集は原生生物の接種の有無や接種した原生生物の種類によって異なっており、原生生物の捕食作用は水稻根の細菌群集の機能と構造を左右する生物因子であることが示唆された。

<引用文献>

Masuda, Y., Itoh, H., Shiratori, Y., Isobe, K., Otsuka, S., & Senoo, K. (2017). Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics. *Microbes Environ*, 32, 180-183. doi:10.1264/jsme2.ME16179

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 Murase, J., and Asiloglu, R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Protists: the hidden ecosystem players in a wetland rice field soil	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology and Fertility of Soils	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00374-023-01705-9	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 Bascon, M. V., Nakata, T., Shibata, S., Takata, I., Kobayashi, N., Kato, Y., Inoue, S., Doi, K., Murase, J., and Nishiuchi, S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Estimating Yield-Related Traits Using UAV-Derived Multispectral Images to Improve Rice Grain Yield Prediction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Agriculture	6. 最初と最後の頁 1141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agriculture12081141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asiloglu, R., Sevilir, B., Samuel, S. O., Aycan, M., Akca, M. O., Suzuki, K., Murase, J., Turgay, O. C., and Harada, N.	4. 巻 57
2. 論文標題 Effect of protists on rhizobacterial community composition and rice plant growth in a biochar amended soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology and Fertility of Soils	6. 最初と最後の頁 293-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00374-020-01525-1	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 村瀬 潤	4. 巻 74
2. 論文標題 田んぼの中の原生物たちの暮らし	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18946/jssm.74.1_26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Murase Jun, Asiloglu Rasit	4. 巻 -
2. 論文標題 Protists: the hidden ecosystem players in a wetland rice field soil	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology and Fertility of Soils	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00374-023-01705-9	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 天野 真宏、長谷川 昂平、森 拓也、西内 俊策、土井 一行、吉田 英樹、松岡 信、高橋 宏和、中園 幹生、村瀬 潤
2. 発表標題 異なる水稻栽培品種の根圏微生物群集の施肥に対する応答(2)
3. 学会等名 日本土壤肥料学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野 真宏、長谷川 昂平、森 拓也、西内 俊策、土井 一行、勝見尚也、Rasit ASILOGLU、高橋 宏和、中園 幹生、村瀬 潤
2. 発表標題 水稻根圏微生物叢の形成に及ぼす水稻品種、土壌タイプ、施肥の影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野 真宏、長谷川 昂平、森 拓也、西内 俊策、土井 一行、吉田 英樹、松岡 信、高橋 宏和、中園 幹生、村瀬 潤
2. 発表標題 異なる水稻栽培品種の根圏微生物群集の施肥に対する応答
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野 真宏, 長谷川 昂平, 森 拓也, 西内 俊策, 土井 一行, 勝見尚也, Rasit ASILOGLU, 高橋 宏和, 中園 幹生, 村瀬 潤
2. 発表標題 水稻根圏微生物叢の形成に及ぼす水稻品種、土壌タイプ、施肥の影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野真宏、長谷川昂平、森拓也、西内俊策、土井一行、松岡信、高橋宏和、中園幹生、村瀬潤
2. 発表標題 異なる水稻栽培品種の根圏微生物群集の施肥に対する応答
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 拓也, 長谷川 昂平, 天野 真宏, 齊木 真紀, 西内 俊策, 村瀬 潤, 神谷 岳洋, 藤原 徹, 松岡 信, 高橋 宏和, 中園 幹生
2. 発表標題 無施肥水田圃場で栽培した日本のイネ栽培品種群の葉のイオノーム解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 矢崎 裕規、新倉 保、猪飼 桂、矢吹 彬憲、永宗 喜三郎、松崎 素道、白鳥 峻志、島野 智之、小林 富美恵	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 452
3. 書名 原生生物学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学農学部資源生物科学科「学科で学べること 異なる生物間の相互作用を解明する」
<https://shigen.agr.nagoya-u.ac.jp/department/list11/>
 名古屋大学 大学院生命農学研究科 耕地情報利用研究室HP研究紹介
<https://togokeysoku7.wixsite.com/infosciagri/lands/>
 名古屋大学農学部資源生物科学科「学科で学べること 異なる生物間の相互作用を解明する」
<https://shigen.agr.nagoya-u.ac.jp/department/list11/>

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	中園 幹生 (Nakazono Mikio) (70282697)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	土井 一行 (Doi Kazuyuki) (80315134)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	西内 俊策 (Nishiuchi Shunsaku) (30726980)	名古屋大学・生命農学研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関