

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05955

研究課題名（和文）植物のアルカリ土壌耐性に関わる根圏マイクロバイオータの機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis on the role of root-associated microbiota on plant growth under alkaline condition

研究代表者

橋本 将典（Hashimoto, Masayoshi）

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：20615273

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：全世界の陸地のうち、およそ3割がアルカリ不良土壌であり、鉄の不溶化などによる複合的なストレスが植物の生育を著しく妨げる。植物の根圏には、微生物群集「根圏マイクロバイオータ」が生息し、植物の栄養吸収や環境ストレス耐性等を向上させている。本研究では、根圏マイクロバイオータが植物のアルカリ土壌耐性に寄与するメカニズムの一端を明らかにすることを旨とした。その結果、植物の根から分泌される二次代謝産物であるクマリン類が、アルカリ土壌において根圏マイクロバイオータのコミュニティ形成に関わるとともに、鉄欠乏条件下において根圏マイクロバイオータに作用し植物の鉄吸収を促進す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

植物の鉄吸収メカニズムについてはこれまで多くの研究がなされ、関与する植物タンパク質やその働きが明らかにされてきた。しかし、植物の鉄吸収における根圏マイクロバイオータの役割についてはこれまで注目されていなかった。研究代表者らは、根圏マイクロバイオータの人工的再構成系を用いることで、根圏マイクロバイオータが鉄欠乏条件下で植物の鉄吸収を促進する働きを持つことを示した。また、その微生物群集の機能には、植物の根から分泌されるクマリン類が重要な役割を担うことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：It is known that about 30% of the land surface on the earth is alkaline soil, where the combined stresses including limited bioavailability of iron significantly inhibit plant growth. The plant root is colonized by a diverse community of microbes called the root microbiota, which is believed to improve plant nutrient uptake and tolerance to abiotic stresses. This study aimed to elucidate the mechanism how the root microbiota contributes to plant growth in alkaline soil. We found that coumarins, secondary metabolites secreted from plant roots, are involved in the root microbiota community assembly in alkaline soil, and that these compounds play important roles for the root microbiota to promote plant iron uptake under iron-limiting conditions.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根圏マイクロバイオータ アルカリ土壌 鉄欠乏 クマリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の陸地のうち、およそ 30%はアルカリ土壌である。アルカリ土壌では、鉄などの微量養分の不溶性・塩類集積・高 pH による複合的なストレスが、植物の健康な生育を妨げている。植物の根圏には、多様な微生物群集「根圏マイクロバイオータ」が生息しており、植物の栄養吸収や環境ストレス耐性等を向上させると考えられている[Cell Host Microbe, 2019. 26: 183]。最近の研究によって、根圏マイクロバイオータは、植物の根から分泌されるクマリン類等の二次代謝産物から影響を受けることにより、一定の種構成を持った集団を形成することが明らかにされつつある[Science, 2019.eaau6389; PNAS, 2018.115:E5213]。さらに、植物の根から分泌される有機化合物は光合成産物の 20%にも相当し、植物の生育における根圏マイクロバイオータの重要性を裏付けている[Annu Rev Plant Biol, 2013.64:807]。

### 2. 研究の目的

クマリン類は、モデル植物であるシロイヌナズナの根から分泌される二次代謝産物であり、根圏マイクロバイオータのコミュニティ形成に関わる [PNAS, 2018. 115:E5213]。クマリン類は鉄欠乏条件において合成量が増加することから、鉄が欠乏しやすいアルカリ土壌においてクマリン類が根圏マイクロバイオータに何らかの影響を与える可能性が考えられた。そこで本研究では、細菌 16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンスや根圏マイクロバイオータを人工的に再構成する合成コミュニティ法を用いて、アルカリ土壌におけるクマリン類と根圏マイクロバイオータの相互作用の一端を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鉄欠乏症状の評価

アルカリ土壌もしくは鉄欠乏培地で生育させたシロイヌナズナが示す鉄欠乏症状は、植物の地上部新鮮重および地上部のクロロフィル含量を測定することによって評価した。

#### (2) 細菌 16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンス

根圏マイクロバイオータのコミュニティ構造を調べるため、土壌で生育させたシロイヌナズナから根をサンプリングした。根および土壌から全 DNA を抽出し、細菌 16S rRNA 遺伝子の V5-V7 領域をターゲットとするユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。2 段階の PCR によりシーケンスライブラリーを構築した。ライブラリーのシーケンスには次世代シーケンサー Miseq を用いた。

#### (3) 合成コミュニティ法

鉄欠乏条件を再現するため、植物生育用の合成培地である 1/2MS 培地をもとに、FeEDTA に替えて FeCl<sub>3</sub> を加え、pH をアルカリ性に調整し、寒天を加えた 1/2MS 培地を作製した。根圏マイクロバイオータの接種には、健康なシロイヌナズナから確立した根圏細菌の培養コレクションを用いた[Nature, 2015. 528:364]。培養コレクションは、1/2MS 培地を冷やして固める直前に培地に混合することにより接種した。

### 4. 研究成果

#### (1) アルカリ土壌における生育の評価

アルカリ土壌において、クマリン類の合成が植物の生育に与える影響を調べるため、シロイヌナズナのクマリン合成欠損変異体をアルカリ土壌および中性土壌で生育させた。その結果、中性土壌においてクマリン合成欠損変異体は野生型植物と同程度の生育を示したのに対して、アルカリ土壌においてクマリン合成欠損変異体は生育不良を示した。鉄欠乏症状を評価するために地上新鮮重およびクロロフィル含量を測定したところ、いずれの指標でもクマリン合成欠損変異体は野生型植物に比べて有意な低下がみられ、典型的な鉄欠乏症状であると考えられた。以上の結果から、クマリン類の合成はアルカリ土壌におけるシロイヌナズナの生育に重要であることが示唆された。

#### (2) 細菌 16S rRNA 遺伝子に基づく根圏マイクロバイオータのコミュニティ解析

クマリン類が根圏マイクロバイオータのコミュニティ形成に影響するかを調べるため、アルカリ土壌において生育させたクマリン合成欠損変異体および野生型植物の根圏マイクロバイオータのコミュニティ構造を調べることにした。中性土壌およびアルカリ土壌で生育させたそれぞれの植物から根および土壌を回収し、細菌 16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンスを行った。その結果、中性土壌ではクマリン合成欠損変異体と野生型植物で違いはほとんど見られなかったのに対して、アルカリ土壌ではクマリン合成欠損変異体は野生型植物と比較して異なるコミュニティ構造を有していた。また、いくつかの根圏細菌の分類群で変異体と野生型間で有意な存在量の差異が検出された。以上の結果から、変異体で欠損したクマリン類のうち、スコポレチンとフラキセチンが根圏マイクロバイオータのコミュニティ形成に関わることが示唆さ

れた。

### (3) 合成コミュニティ法による根圏マイクロバイオータの機能評価

ここまでの結果から、クマリン類がアルカリ土壌における根圏マイクロバイオータのコミュニティ形成に関わることが示唆されたことから、アルカリ土壌においてクマリン類と根圏マイクロバイオータは植物の鉄吸収に関わる可能性が想定された。そこで、根圏マイクロバイオータを人工的に再構成する合成コミュニティ法を用いて、植物用の合成培地で鉄欠乏条件を再現し、クマリン合成欠損変異体および野生型植物を生育させた。その結果、鉄欠乏条件において、クマリン合成欠損変異体は野生型植物と同様に鉄欠乏症状を示したのに対して、根圏マイクロバイオータを接種した場合には、野生型植物は鉄十分条件と同程度に健全に生育した。他方で、クマリン合成欠損変異体は、根圏マイクロバイオータを接種しても鉄欠乏症状を示したままだった。この結果から、根圏マイクロバイオータは鉄欠乏条件下で植物の鉄吸収を促進しており、その活性は植物のクマリン類に依存することが示唆された。

さらに、鉄欠乏条件で根圏マイクロバイオータを接種したクマリン合成欠損変異体に対して、スコポレチンもしくはフラキセチンを添加した場合、フラキセチンを添加した場合にのみ植物が健全に生育した。このことから、根圏マイクロバイオータによる植物の鉄吸収促進には、クマリン類のうちフラキセチンが重要な働きを持つと考えられた。

本研究により、アルカリ土壌における植物の鉄吸収において、根圏マイクロバイオータが重要な役割を担うことが示された。さらに、根圏マイクロバイオータによる植物の鉄吸収促進機能には、植物の根から分泌されるクマリン類のうち、フラキセチンが特に重要であると考えられた。本研究から、根圏マイクロバイオータを鉄吸収に利用するために植物はクマリン類をシグナルとして使っているというモデルが想定される。また、本研究は根圏マイクロバイオータの有益な機能を初めて実験的に示したものである。今後、さらにクマリン類の根圏マイクロバイオータへの作用メカニズムや、根圏マイクロバイオータによる鉄吸収促進の分子メカニズムの解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Paloma Duran, Anja Reinstaedler, Anna Lisa Rajakrut, Masayoshi Hashimoto, Ruben Garrido-Oter, Paul Schulze-Lefert, Ralph Panstruga	4. 巻 23
2. 論文標題 A fungal powdery mildew pathogen induces extensive local and marginal systemic changes in the Arabidopsis thaliana microbiota	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 6292-6308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1462-2920.15768	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 該当する

1. 著者名 Harbort Christopher J., Hashimoto Masayoshi, Inoue Haruhiko, Niu Yulong, Guan Rui, Rombola Adamo D., Kopriva Stanislav, Voges Mathias J.E.E.E., Sattely Elizabeth S., Garrido-Oter Ruben, Schulze-Lefert Paul	4. 巻 28
2. 論文標題 Root-Secreted Coumarins and the Microbiota Interact to Improve Iron Nutrition in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 825 ~ 837.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2020.09.006	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 該当する

1. 著者名 Harbort Christopher J., Hashimoto Masayoshi, Inoue Haruhiko, Schulze-Lefert Paul	4. 巻 1
2. 論文標題 A gnotobiotic growth assay for Arabidopsis root microbiota reconstitution under iron limitation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100226 ~ 100226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2020.100226	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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			
ドイツ	マックスプランク植物育種学研究所			
米国	スタンフォード大学			
イタリア	ボローニャ大学			