

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05990

研究課題名（和文）圃場におけるダイズ根粒菌集団管理法の開発

研究課題名（英文）Development of managing methods for the diversity of rhizobia in the field

研究代表者

原 新太郎（HARA, Shintaro）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・主任研究員

研究者番号：10647019

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）：ダイズ根粒菌Bradyrhizobium属細菌の識別が可能な遺伝子（rpoB）を整理してBradyrhizobium属細菌に特化したデータベースを作成し、rpoB遺伝子のアンプリコンシーケンスの解析手法の洗練化をした。続いて、ダイズ品種、土壌の種類、非マメ科植物に内生する根粒菌、に注目した解析を行い、Bradyrhizobium属細菌の群集構造が決定する要因を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズへの優良根粒菌接種の試みは古くから行われているが、それぞれの土壌に先住する土着根粒菌との競合が問題となり、接種菌の効果が安定しない。また、土壌に生息するBradyrhizobium属細菌はダイズ根粒菌としてよく研究されているが、「集団としての解析」はほとんど手つかずの状態であった。本研究で洗練化したBradyrhizobium属細菌の群集構造解析法は、ダイズに定着する根粒菌の種類を操作する技術を開発するための基礎技術となる。

研究成果の概要（英文）：A database specific to Bradyrhizobium spp. was created by organizing the genes (rpoB) that can identify Bradyrhizobium spp., and then the analysis method for amplicon sequencing of rpoB genes was refined. The pot and field experiments focused on soybean cultivars, soil types, rhizobia endophytic to non-leguminous plants were conducted, and the factors determining the community structure of Bradyrhizobium spp.

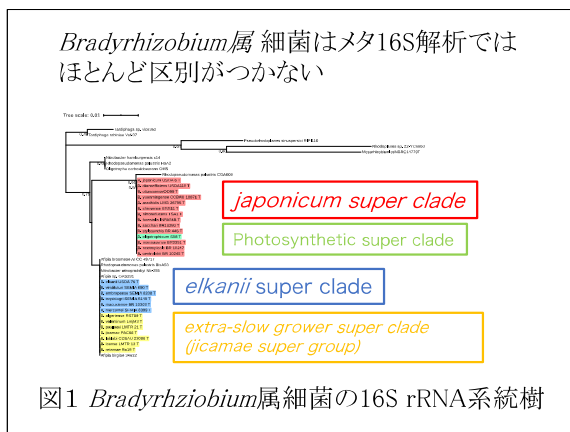
研究分野：微生物生態学

キーワード：ダイズ根粒菌 Bradyrhizoibum 緑肥 rpoB 土壌微生物 群集構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

ダイズへの優良根粒菌接種の試みは古くから行われているが、それぞれの土壌に先住する土着根粒菌との競合が問題となり、接種菌の効果が安定しない。これまで、ダイズが特定の根粒菌を排除するメカニズム（共生不和合性）については精力的に研究が進められてきたが、「和合性の根粒菌同士での優先順位がどのように決まるか」について焦点が当てられることは少なかった。

土壌中には多様な根粒菌が分布しており、1株のダイズ植物に複数の根粒菌由来の根粒が形成されるため、ダイズと根粒菌集団の関係を調べるためには「根粒菌組成の解析」が重要となる。しかしながら、次世代シーケンサーを用いた一般的なメタ 16S rRNA 解析では根粒菌内のバリエーションを区別できない(図1)。そのため、従来の解析対象は根粒から分離された菌株に制限され、対象土壌で栽培したダイズから数十粒の根粒を取得し、それぞれから分離した菌株の DNA を用いて、ITS 領域や RNA ポリメラーゼ B サブユニット遺伝子 (*rpoB*) を用いた解析が行われてきた。しかし、根粒取得過程で使用するダイズ品種や栽培条件によるバイアスが大きく、また、非常に手間のかかる方法であった。このように、根粒菌組成の解析は一筋縄ではいかず、ほとんど手つかずの状態であった。近年、根粒菌の DNA を次世代シーケンサーで *rpoB* (RNA ポリメラーゼ B サブユニット 遺伝子) を解析する方法が報告され (Zhang et al., J. Biogeogr. 2017) 根粒菌組成の効率的な解析が可能となったが、*Bradyrhizobium* 属細菌に関してはデータベースの質量ともに不十分であった。



### 2. 研究の目的

土壌のダイズ根粒菌組成を理解・制御し、ダイズ品種や緑肥作物と根粒菌の相性を利用することで、圃場におけるダイズ根粒菌集団管理のための基盤を確立することが本研究の目的である。それに先立って、*rpoB* の多様性解析に重要な *Bradyrhizobium* 属細菌のデータベースの拡充と精緻化を行う。ダイズ品種および土着根粒菌の多様性を踏まえた包括的な解析を行うことで、「圃場における根粒菌集団管理」に挑む。

### 3. 研究の方法

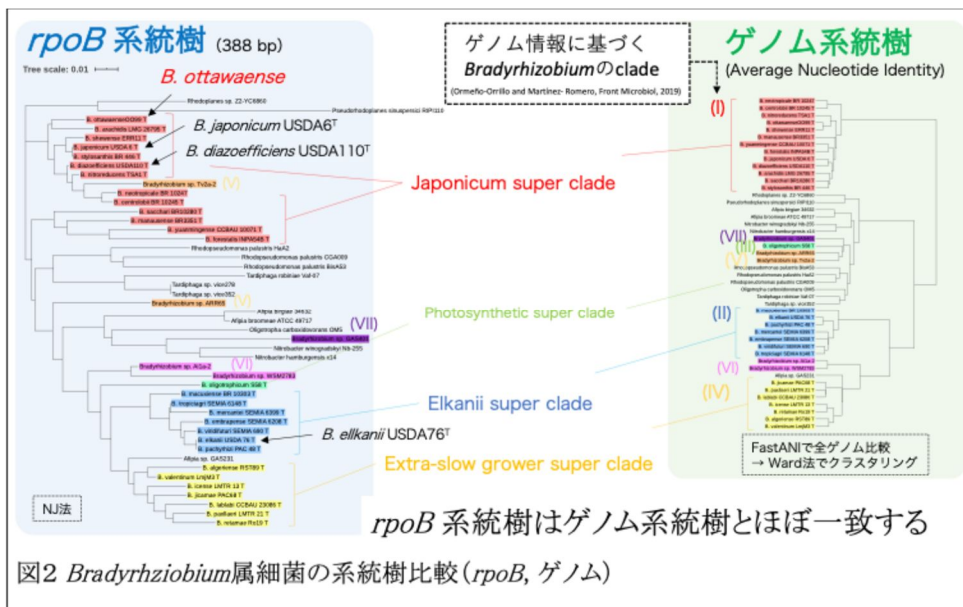
(1) ダイズ根粒菌の系統解析を次世代シーケンサーで行うために必要なデータベースの整理では、2021年3月の段階で公表されている300以上の *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノム情報を集め、*Bradyrhizobium* 属細菌全ての菌株が共通してもつシングルコピー遺伝子を抽出して系統樹を作成し、そこに窒素固定や根粒共生、硝化脱窒などの機能遺伝子の情報を付与して系統ごとの特徴を確認した。それに対して、各菌株のゲノムから *rpoB* 配列を抽出してそれぞれ系統樹を作成し、全ゲノム情報に基づく系統樹との比較を行った。なお、この *Bradyrhizobium* 属の *rpoB* データベースには、外群として *Afipia* 属や *Nitrobacter* 属、*Rhodopsudomonas* 属など、*Bradyrhizobiaceae* 科に属する他の細菌ゲノムデータを含めた。

(2) 10系統のダイズ品種を宮城県鹿島台圃場で3反復で栽培し、生育前半、開花期、子実肥大期の根粒を収穫し、*rpoB* をターゲットとした DNA 解析により組成を調べた。当初、複数年の栽培試験を行う予定であったが、代表者の所属の変更がありコロナ禍で県をまたいだ移動が困難であったため、初年度のみの実施となった。

(3) コロナ禍の影響で圃場での栽培試験を行うことが困難であったため、イネ科植物とダイズ根粒で定着する *Bradyrhizobium* 属細菌の比較を目的とするポット試験を行った。宮城県東北大学鹿島台圃場の水田-ダイズ輪作圃場と、福島県二本松市のソルガム連作圃場の土壌をポットに詰め、ソルガム(イネ科)とダイズそれぞれを栽培し、ソルガム根およびダイズ根粒から DNA を抽出した。続いて 16SrRNA および *rpoB* をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを行い、*Bradyrhizobium* 属細菌の群集構造解析を行った。得られた *rpoB* 配列については、既報の *rpoB* データベース (Zhang et al., J. Biogeogr. 2017) によって第一次スクリーニングを行い、*Bradyrhizobium* 属細菌が属する *Bradyrhizobiaceae* 科に分類された配列を抽出した。続いて 97.7%以上の相同性でクラスタリングを行って OTU (operational taxonomic unit, 塩基配列をコンピュータ上でその類似度を指標に分類したときに得られる単位) を形成し、それぞれの OTU を NCBI nr に対して Blastn 検索を行い、*Bradyrhizobium* 属にベストヒットする配列のみを抽出し、自作の *Bradyrhizobium* 属細菌の *rpoB* データベースに対して検索を行なった。

#### 4. 研究成果

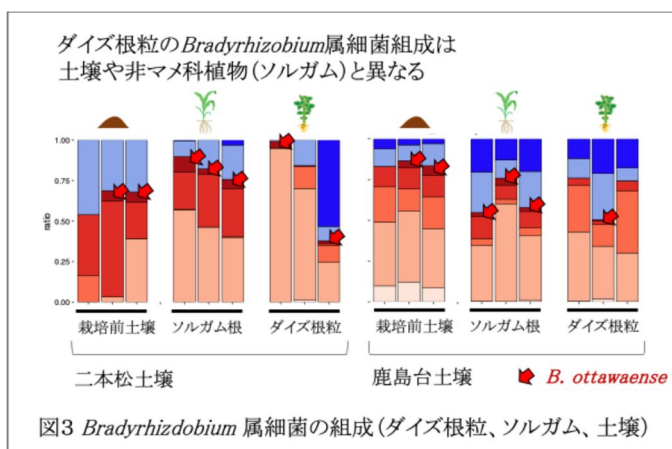
(1) *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノムに基づく系統樹に、窒素固定や根粒共生、脱窒などの機能遺伝子の情報を付与して系統ごとの特徴を確認し、グループ分けを行った。*rpoB* 配列を抽出して系統樹を作成し、ゲノムデータに基づく系統樹との対比を行ったところ、*rpoB* に基づく系統樹の形はゲノムに基づく系統樹のものとはほぼ一致し、16S rRNA に基づく系統樹と比較して解像度が高いことが確認された(図2)。また、*Afipia* 属や *Nitrobacter* 属、*Rhodospirillum rubrum* 属など、*Bradyrhizobiaceae* 科に属する他の細菌の配列は、*rpoB* 系統樹とゲノム系統樹といずれにおいても *Bradyrhizobium* 属のクレードの内側に含まれていた。そのため、*Bradyrhizobium* 属をターゲットとして系統分類をする場合は、*Bradyrhizobium* 属以外の *Bradyrhizobiaceae* 科の配列を含むデータベースを用いて、*Afipia* 属等の対象外の配列を除去する必要があることがわかった。このように、土壌や根粒に生息する *Bradyrhizobium* 属細菌を解析するために必要な、*rpoB* データベースが作成できた。



(2) 圃場で栽培したダイズ 10 系統について、採取した根粒を 1 株ずつまとめて DNA 抽出を行い、*rpoB* をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを行なった。いくつかのダイズ品種は他とは明らかに異なる菌叢であったが、それ以外の系統は反復内のばらつきに収まる程度の違いしか検出できなかった。ばらつきが大きかったことの原因として、使用した圃場の排水管理がうまくいかず、ダイズ品種の影響よりも圃場状況の影響が大きく影響したことが考えられる。

(3) ポットで栽培した栽培前の土壌、ダイズ根粒、ソルガム根それぞれから DNA を抽出し、16S rRNA および *rpoB* をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析を行なった。栽培前土壌やソルガム根の 16S rRNA の解析では、*Bradyrhizobium* 属細菌の相対存在比は 1% および 4% 程度であったのに対し、*rpoB* の解析ではそれぞれ 7% および 15% 程度であった。16S rRNA は全ての細菌を増幅するプライマーを用いた一方で、*rpoB* は根粒形成能が報告されている細菌系統をターゲットとしたプライマーであるため *Bradyrhizobium* 属細菌の割合が高まったと考えられる。したがって、細菌群集における *Bradyrhizobium* 属細菌の割合を評価する場合は 16S rRNA をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析が必要である。一方、*rpoB* の解析では *Bradyrhizobium* 属以外の配列も増幅されるため、それ以外の配列を除去して解析を行う必要がある。

ポット試験でダイズに根粒形成した *Bradyrhizobium* 属細菌は、いずれの土壌でも日本でダイズ根粒から頻りに検出される *B. japonicum* や *B. elkanii* と相同性の高い配列がほとんどを占めたが、*B. ottawaense* に相同性の高い配列はほとんど検出されなかった(図3)。一方、ソルガム根や栽培前土壌からは *B. ottawaense* と相同性の高い配列が 5% 程度検出された。*B. ottawaense* は強力な温室効果ガスである  $N_2O$  を還元する能力が高い系統として近年注目が高まっているが、日本で栽培したダイズの根粒からはほとんど分離された報告がない。本研究の結果から、ダイズ根粒菌 *B. ottawaense* は日本の土壌に一定密度で生息していて、非マメ科



植物であるソルガム根に内生するが、ダイズでの根粒形成における競争力が低く、同じ土壌でダイズを栽培してもほとんど根粒を形成しないことが示唆された。

今後、ソルガムを含む緑肥作物など非マメ科植物の中から *B. ottawaense* と相性の良い作物を選抜することや、ダイズ品種の中から *B. ottawaense* が根粒を形成する系統を選抜することで、作物残渣などから発生する N<sub>2</sub>O を削減する圃場管理法の開発が期待される。また、本研究で確立した *rpoB* をターゲットとしたアンプリコン解析および解析手法は、土壌や植物根に生息する *Bradyrhizobium* 属細菌の組成を 16S rRNA よりも高い解像度で効率よく調べることができるため、*Bradyrhizobium* 属細菌の環境中での群集構造の調査を行うにあたって有効であり、圃場において優良根粒菌を制御する方法を確立するために必要な解析手段となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原 新太郎, 和才(原) 沙和, 徳永 毅, 南澤 究                |
| 2. 発表標題<br>ダイズ根粒およびソルガム根のBradyrhizobium属細菌のrpoB群集構造解析 |
| 3. 学会等名<br>日本土壌肥料学会2020年度岡山大会                         |
| 4. 発表年<br>2020年                                       |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 佐藤 修正<br><br>(Sato Shusei)<br><br>(70370921) | 東北大学・生命科学研究科・教授<br><br><br><br>(11301) |    |

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 |
|---------|---------|