

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21267

研究課題名（和文）バイオ肥料の効果に影響する植物内生微生物叢やそれを制御する植物側遺伝因子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the endophytic microflora that affects the effect of biofertilizer and the genetic factors on the plant side that control it

研究代表者

山田 哲也（Yamada, Tetsuya）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：20422511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イネ11品種を対象として吸水後の種子の胚についてメタゲノム解析を行い、胚に定着する内生細菌の種類や存在量を推定するとともに、それらの品種間差を確認した。また、それら11品種の実生で確認されている吸水種子へのバイオ肥料原体微生物（*Bacillus pumilus* TUAT1株）の接種による成長促進効果と胚に定着する特定の内生細菌の存在量との間に高い正の相関があることを明らかにした。さらに、イネ70品種を対象として内生細菌の存在量と*Bacillus pumilus* TUAT1株の接種効果についてゲノムワイド関連解析を行い、両形質への関与が示唆される遺伝子が存在する染色体領域を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、植物に定着する内生細菌の存在量と*Bacillus pumilus* TUAT1株のような植物成長促進根圏細菌（PGPR）の接種効果との間に関連性があることを明らかにした。また、植物には内生細菌の存在量を制御し、PGPRの接種効果に影響を及ぼす遺伝子が存在することが示唆された。これらの知見は、PGPRを原料としたバイオ肥料の施用効果が作物の品種や栽培地域の違いによって異なることの原因を明らかにし、より安定的かつ高い効果が現れる品種や施用技術を開発するための研究に役立つと考えられる。また、そのような品種や技術の開発は、農業の脱炭素化による持続性向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the types and abundance of endophytic bacteria colonized in seed embryos after imbibition of 11 rice cultivars were estimated and those differences between cultivars were detected by using metagenomic analysis (microbiota analysis of 16S rRNA region). In addition, among the 11 rice cultivars, a high positive correlation was observed between the growth-promoting effect of seedlings by inoculation of the biofertilizer microorganism (*Bacillus pumilus* TUAT1 strain) to the imbibed seeds and the abundance of specific endophytic bacteria colonized in the embryo. Furthermore, the chromosomal regions containing genes that may be involved in both the abundance of endophytic bacteria and the effect of inoculation of the *Bacillus pumilus* TUAT1 strain were detected by genome-wide association analysis on 70 rice cultivars.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：バイオ肥料 バチルス属プミルス種 接種効果 イネ 内生微生物叢 メタゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ肥料は、植物の生育促進機能を持った根圏微生物を主な原体とした生物資材である。作物の収量を維持しながら、化学肥料の使用量を削減できることから、持続可能な農業の確立につながる技術として期待されている。また、ある種の根圏微生物は、生育促進に加え、病害抵抗性やストレス耐性の強化といった多面的機能を持ち、化学農薬の削減や気候変動による減収を抑制する効果も期待されている。これらの期待から、バイオ肥料の世界市場は 14%以上の年平均成長率で成長が続くと予測されている。しかし、日本の肥料市場におけるバイオ肥料のシェアは 1%に満たない。そこで、JST 研究開発戦略センターは 2016 年に提出した戦略プロポーザルにおいて、「バイオ肥料」を革新的な栽培関連技術として取り上げ、今後国として重点的に取り組むべき研究分野として提案した。

バイオ肥料として実用化されている根圏細菌のうち *Bacillus pumilus* TUAT1 株 (以下、TUAT1 株) については、イネの初期生育を促進し、最大 30%の収量増加をもたらす機構の解明が進められている。これまで、イネ品種「ひとめぼれ」の吸水種子に TUAT1 株の芽胞を接種すると、茎基部で一酸化窒素 (NO) の産生量が増加し、根系発達が促進され、水分や養分の吸収能力が高まることが明らかにされた。一方、TUAT1 株芽胞にはそのような効果の他に、耐塩性や低温出芽性の向上など、多様な接種効果が現れることも確認されている。また、イネ・コアコレクション 119 品種を用いた解析により、それらの接種効果の現れ方には顕著な品種間差があることも見出された。しかし、TUAT1 株芽胞の多様な接種効果およびその品種間差が生じるメカニズムは明らかにされていない。

植物に定着する微生物を同定し、両者の相互作用を理解することで、作物の生産性向上につながる知見を得るための研究が行われている。その中で、TUAT1 株などの根圏微生物は、植物に無害な内生微生物として根系内部に定着し、植物の生長や発生を変化させる機能を持つことが分かってきた。また、先に定着した微生物により、後から来た微生物の定着が阻害される「先住効果」の存在も示唆されている。しかし、バイオ肥料として多量の微生物を接種した場合に、接種前の植物の内生微生物叢構造の違いが、接種した微生物の定着性や接種効果にどのような影響を及ぼすのかは不明であった。また、植物の生育環境や品種の違いによる内生微生物叢構造の違いや、それらの違いに関わる植物側の遺伝因子に関する研究も行われていなかった。

2. 研究の目的

(1) 「TUAT1 株芽胞の接種直前のイネ種子における内生微生物叢構造の品種間差が接種効果に品種間差を生じる原因となっている」という仮説を立て、その証明を試みた。複数のイネ品種の吸水種子に TUAT1 株の芽胞を接種し、発芽後の実生の成長に対する接種効果の品種間差を検出した。接種効果に顕著な差異のある品種を対象として、吸水種子の胚についてメタゲノム解析を行い、内生細菌の種類や存在量の推定および品種間差を確認し、接種効果との関連性が示唆される内生細菌を特定した。ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により内生細菌の存在量と TUAT1 株の接種効果とに関わる遺伝子が存在する染色体領域の推定も行った。以上より、TUAT1 株の接種効果が高いレベルで現れる内生微生物叢構造を明らかにし、その構造の決定に関わるイネ側の原因遺伝子群を特定することで、ゲノム編集等でバイオ肥料の効果が安定的かつ高いレベルで現れる新品種を効率的に育成することを可能にする知見の獲得を目的とした。

(2) 「TUAT1 株芽胞の接種によるイネ実生の冠根数増加は、TUAT1 株の細胞壁構成成分であるペプチドグリカン (PGN) がイネに認識されることで生じる」という仮説を立て、その証明を試みた。TUAT1 株から精製した PGN を播種直後のイネ種子および実生に処理し、芽胞接種と同様に冠根数の増加が見られるのかを確認した。また、TUAT1 株芽胞を接種したイネ実生の茎基部における PGN 応答関連遺伝子の発現変動を調査した。以上より、イネによる TUAT1 株の認識・応答に関わる分子種を同定し、それらが接種効果の発現にどのように関わっているのかを明らかにすることで、植物と微生物の相互作用機構の理解につながる知見の獲得を目的とした。

(3) 「TUAT1 株芽胞の接種によるイネの低温出芽性の向上にも冠根数の増加と同様に NO 産生量の増加が関わる」という仮説を立て、その証明を試みた。低温条件下で播種し、芽胞を接種したイネ種子における NO 産生量の変化を調査した。また、NO スカベンジャーである cPTIO の処理が芽胞接種による低温出芽性の向上に及ぼす影響を評価した。さらに、芽胞接種による NO 産生量の変化が確認されたイネの胚でトランスクリプトーム解析を行った。以上より、低温下で芽胞接種したイネ種子での NO 産生量の変化や実生の初期成長促進に関わる分子機構の解明につながる知見の獲得を目的とした。

(4) 「遺伝子型の異なるイネ品種間で認められた TUAT1 株芽胞の接種による実生の生育促進効果の違いは他の植物種の品種・系統間でも認められる」という仮説を立て、その証明を試みた。シロイヌナズナの 4 種類のナチュラルアクセッションの実生に芽胞を接種し、生育促進効果の現れ方の違いを評価した。

3. 研究の方法

(1) 農業生物資源ジーンバンクが収集したイネ・コアコレクションのうち、一塩基多型 (SNP) の公開情報が利用可能な 70 品種の種子を供試した。各品種の種子を 2% 次亜塩素酸で 10 分間表面殺菌した後、25 °C で 5 日間吸水させた。吸水種子を粒状培土に播種し、 1×10^7 CFU/mL の濃度に調整した TUAT1 株芽胞の懸濁液を培土表面に散布した。1 週間おきに同濃度の芽胞懸濁液を実生の株元に追加散布した。実生を 25 °C、相対湿度 70%、12 時間日長に設定した恒温室内で栽培し、播種後 3 週目に芽胞接種による冠根数や茎葉新鮮重などの増加率を評価した。次に、冠根数の増加率に差異が見られたコアコレクション 11 品種および異なる地域 (山形および富山) で採種されたイネ品種「ひとめぼれ」の種子を前述の方法で殺菌し、吸水させた。吸水種子から胚を採取し、滅菌水中で破碎・懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清を滅菌水で希釈した。希釈液を R2A 固形培地に塗布し、25 °C で 5 日間培養した後、培地上に形成された細菌のコロニーを収集した。収集した細菌からゲノム DNA を抽出し、16S-rRNA 遺伝子の系統的シーケンシングによるメタゲノム解析を実施した。11 品種の胚での存在量が冠根数の増加率と相関を示した内生細菌について、種特異的プライマーを用いた定量 PCR を行い、70 品種の吸水種子の胚における存在量を推定した。推定した内生細菌の存在量と冠根数の増加率について GWAS を行い、いずれの形質とも高い関連性を示す SNP が存在する染色体領域を特定した。

(2) TUAT1 株から既報に従って PGN を精製した。「ひとめぼれ」種子を前述の方法で殺菌し、吸水させた。吸水種子を粒状培土に播種し、50、100 または 300 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調整した PGN 溶液を培土表面に散布した。1 週間おきに同濃度の PGN 溶液を実生の株元に追加散布した。実生を 25 °C、相対湿度 70%、12 時間日長に設定した恒温室内で栽培し、播種後 15 日目に冠根数や茎葉新鮮重などを測定した。また、TUAT1 株芽胞を接種した実生における PGN シグナル関連遺伝子の発現変動を調査するため、 1×10^7 CFU/mL の芽胞懸濁液を播種後の土壌表面に散布した。1 週間おきに同濃度の芽胞懸濁液を実生の株元に追加散布した。実生を前述の恒温室内で栽培し、播種後 2 週間目の芽胞懸濁液散布後 0、0.5 および 1 時間目に茎基部を採取し、RNA 抽出と cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型とし、既知の PGN 応答関連遺伝子 (*LYP4*, *LYP6*, *OsCERK1*, *OsRLCK185* および *OsRLCK176*) について設計した特異的プライマーを用い、定量 RT-PCR を行った。

(3) 「ひとめぼれ」種子を前述の方法で殺菌し、15 °C で 8 日間吸水させ、28 °C で 18 時間催芽処理した。催芽種子を粒状培土に播種し、 1×10^7 CFU/mL の濃度に調整した TUAT1 株芽胞の懸濁液および 0.1 mM の cPT10 溶液を土壌表面に散布した。実生を 15 °C、相対湿度 70%、12 時間日長に設定したインキュベーター内で栽培し、播種後 10~20 日目に土中出芽率、20 日目に草丈や根部新鮮重などを調査した。また、NO 蛍光プローブ (DAF-FM DA) を用いて、芽胞懸濁液散布後 0、3、6 および 12 時間目の種子の NO 産生量を推定した。さらに、芽胞懸濁液散布後 0、1 および 6 時間目の種子から採取した胚より total RNA を抽出し、RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。

(4) シロイヌナズナの 4 種類のアクセッション (Col-0、Uk-1、Uk-3 および Bla-1 株) の種子を 70% エタノールで 10 分間、1% 次亜塩素酸で 10 分間表面殺菌した後、発芽用培地に播種した。種子を 4 °C、暗条件下で 4 日間培養して春化し、22 °C、16 時間日長に設定したインキュベーター内に移して発芽させた。春化後 2 週間目の発芽実生を粒状培土に移植し、 1×10^7 CFU/mL の濃度に調整した TUAT1 株芽胞の懸濁液を株元に散布した。実生を 22 °C、相対湿度 60%、12 時間日長に設定した恒温室内で栽培し、移植後 12 日目 (播種後 30 日目) に茎葉や根部の新鮮重を測定した。また、Col-0 株の実生については、草丈、葉面積および葉数の測定やルーツキャナーを用いた根系構造の解析を行い、芽胞接種が茎葉や根系の発達に及ぼす影響を調査した。

4. 研究成果

(1) 70 種類のイネ品種に TUAT1 株芽胞を接種したところ、冠根数が増加し、茎葉の発達が顕著に促進される品種だけでなく、冠根数が減少し、茎葉の発達が抑制される品種も含まれていることを確認した。それらの品種の中で、芽胞接種による冠根数の増加率に差異のあるコアコレクション 11 品種および異なる地域で採種された「ひとめぼれ」種子 (YH30、TH26) について、吸水種子の胚に存在する細菌の種類や存在量をメタゲノム解析により推定した (表 1)。その結果、冠根数が増加する品種群 A と増加しない品種群 B との間で、内生細菌叢の多様性に顕著な違いはなかったが、特定の属に含まれる内生細菌の存在頻度には有意な

表 1. メタゲノム解析に供試したイネ品種

品種群	品種ID	品種名	冠根数の増加率
A	WRC47	Jaguary	1.43
	YH30 ^a	Hitomebore	1.42
	WRC31	Shoni	1.40
	JRC31	Kameji	1.24
	WRC24	Pinulupot 1	1.13
	JRC32	Omachi	1.04
B	WRC03	Bei Khe	1.00
	WRC29	Kalo Dhan	0.98
	TH26 ^b	Hitomebore	0.97
	WRC32	Tupa 121-3	0.90
	WRC100	Vandaran	0.89
	WRC01	Nipponbare	0.85

^a 山形県で2018年に採種した種子を供試した。

^b 富山県で2014年の採種した種子を供試した。

差異が認められた。そこで、そのような差異が認められた内生細菌の存在量と冠根数の増加率との間で相関分析を行ったところ、高い正の相関 ($R = 0.92$, $P < 0.01$) が認められた。また、同じ品種(「ひとめぼれ」)でも、採種された地域が異なると、内生細菌の存在量が異なり、存在量が少ない種子 (TH26) に比べ、多い種子 (YH30) で高い冠根数の増加率が示された。以上から、イネの品種間で冠根数の増加率に差異が生じる現象には、接種直前の吸水種子の胚に存在する内生細菌の存在量の違いが関与していることが示唆された。また、バイオ肥料の効果が現れる機構の解明には、接種する微生物と宿主植物との相互作用を理解するだけでなく、内生微生物との相互作用も理解する必要のあることが示された。一方、冠根数の増加率との間で相関が認められた内生細菌の存在量について GWAS を行ったところ、内生細菌の存在量の品種間差と高い関連性を示す複数の SNP が検出された(図1)。これらの SNP の一部は、冠根数の増加率について行った GWAS で検出された SNP と同じ染色体領域に存在していた。また、その SNP の近傍には、成熟中のイネ種子で発現が見られる防御応答関連遺伝子が存在することを確認した。以上から、内生細菌の存在量と TUAT1 株の接種効果の両方に影響を及ぼすことが示唆されるイネ側の遺伝子を検出することができた。今後は、当該遺伝子の機能をゲノム編集等により改変し、内生細菌の存在量を増加させることで、TUAT1 株の接種効果を高めたイネ品種の育成が可能であることを証明していく予定である。

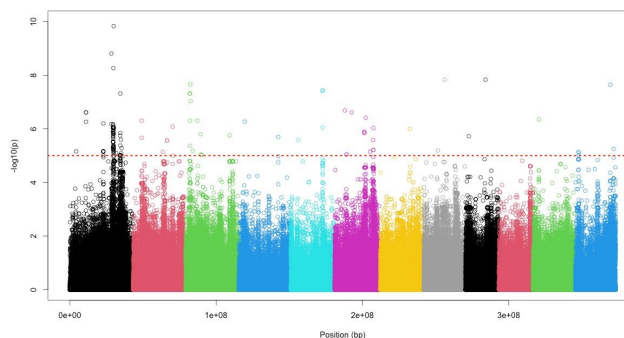


図1 . イネ胚における内生細菌の存在量に関するGWASの結果

(2) TUAT1 株から精製した PGN を処理した「ひとめぼれ」実生では、TUAT1 株芽胞を接種した実生と同様に、冠根数、草丈、茎葉新鮮重、根部新鮮重および茎葉乾燥重が有意に増加し、生育促進が認められた。また、芽胞を接種した実生では、接種後 0.5 時間の茎基部で、PGN のパターン認識受容体をコードした遺伝子 (*LYP4*, *LYP6* および *OsRLCK176*) やシグナル伝達に関わるキナーゼをコードした遺伝子 (*OsRLCK176*) の転写産物量が有意に増加することを確認した。以上から、TUAT1 株芽胞の接種によるイネ実生の冠根数増加は TUAT1 株の細胞壁構成成分である PGN がイネに認識されることで生じていることが示唆された。今後は、イネ品種間での PGN 応答関連遺伝子の機能の違いと TUAT1 株芽胞の接種効果の違いとの関連性や、採種地の違いにより内生細菌の存在量に差異が認められた「ひとめぼれ」の胚における PGN 応答関連遺伝子の発現量の違いなどを調査することで、バイオ肥料の施用効果に品種間差や地域間差が生じる機構の解明を進めていく予定である。

(3) 低温栽培条件下で TUAT1 株芽胞を接種した「ひとめぼれ」種子では、接種後 3 時間目に胚での NO 産生量の増加が示唆された。また、播種後 10 日目の実生では、子葉鞘の伸長促進や土中出芽率の上昇が認められた。さらに、播種後 20 日目の実生では、草丈、茎葉新鮮重、根部新鮮重および茎葉乾燥重が有意に増加し、初期生育の促進が確認された。一方、芽胞とともに cPT10 を処理した種子では、胚での NO 産生量の増加は起こらず、土中出芽率の上昇や生育促進も見られなかった。以上から、TUAT1 株芽胞の接種によるイネの低温出芽性の向上や初期生育の促進に胚での NO 産生量の増加が関与することが示唆された。また、トランスクリプトーム解析により検出された発現変動遺伝子より、芽胞を接種した種子の胚における NO 産生量の増加には免疫応答やシトクロム呼吸経路が関与することが示唆された。これらの知見を端緒とし、今後は、TUAT1 株芽胞の接種によりイネ種子の胚や実生の茎基部で NO 産生量が増加する分子機構の解明を進めていく予定である。

(4) TUAT1 株芽胞を接種した Col0 株の実生では、草丈、葉面積、茎葉および根部の新鮮重が有意に増加し、生育が促進されることを確認した。同様の接種効果が Bla1 株や UK1 株の実生でも確認されたが、UK3 株の実生では生育促進効果は確認されなかった。従って、シロイヌナズナでも、イネと同様に、遺伝子型の異なる系統間では TUAT1 株芽胞の接種による実生の生育促進効果に差異が生じることを確認した。また、Col0 株の実生では、芽胞接種により側根数が増加することで根系の発達が進められていることが確認され、生育促進のメカニズムがイネのそれと類似していることが示された。今後は、イネと同様の研究手法を用いて、TUAT1 株の PGN 認識による防御応答により NO 産生量が増加することでシロイヌナズナ実生の側根数が増加していることや、芽胞接種直前の実生における内生細菌の存在量の違いがアクセッション間での生育促進効果の現れ方の違いに関与することを明らかにしていく予定である。

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 肖莉而, 山田哲也, 大津直子, 篠崎良仁, 金勝一樹, 横山正
2. 発表標題 バイオ肥料微生物Bacillus pumilus TUAT1株を接種したイネ低温発芽種子の胚におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	肖 莉而 (Xiao Li-Er)		
研究協力者	中井 仁美 (Nakai Hitomi)		
研究協力者	トラガ ボルジギン (Tulaga Borjigin)		
研究協力者	呉 其格其 (Wu Qigeqi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	グオ フォングオック (Ngo Phuong Ngoc)		

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			
ベトナム	Cantho University			