

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02329

研究課題名（和文）根圏ホロビオン代謝ネットワークの理解による植物生育促進効果の解明

研究課題名（英文）Elucidation of rhizosphere holobiont metabolic network to clarify plant growth promotion

研究代表者

杉山 暁史 (Sugiyama, Akifumi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：20598601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：根圏とは「植物根から影響を受ける領域」と定義される土壌領域であり、根圏微生物コミュニティは植物の健全な生長に関わることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。本研究では植物と微生物から構成されるホロビオンでの代謝遺伝子の解析から、ホロビオン構成する微生物がダイズ根から分泌されるイソフラボンを利用するための遺伝子群を持つことを明らかにした。これらの遺伝子を持つことでイソフラボンが多い環境での生育に有利になることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで未解明であったダイズ根圏でのイソフラボン代謝経路が明らかになった。イソフラボン代謝は腸内環境など嫌気条件では理解されていたが、土壌での好機能的な環境では初めて見出されたものである。新規代謝経路の解明により、植物がどのように根圏微生物とホロビオンを形成するのかについて、代謝ネットワークの視点から解明する手がかりとなるものである。実際に他の植物でも代謝物を介した同様の相互作用が示唆されている。また、これらの遺伝子を活用して植物の健全な生育を支える根圏微生物叢の解明や有用物質生産への活用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The rhizosphere is defined as "soil influenced by plant roots". It is known that rhizosphere microbial communities are important for the growth of plants and crop production. But the mechanism behind the establishment of rhizosphere microbiota remains largely unclear. In this study, we analyzed metabolic genes in the holobiont, which is composed of plants and microorganisms, and revealed that the microorganisms especially *Variovorax* spp. that are present in the holobiont possess a group of genes for utilizing isoflavones secreted from soybean roots. Our study also revealed that these genes contribute the adaptation of *Variovorax* sp. in the environment where isoflavones are rich.

研究分野：植物代謝生化学

キーワード：ホロビオン 根圏 イソフラボン 遺伝子クラスター *Variovorax*

1. 研究開始当初の背景

根圏とは「植物根から影響を受ける領域」と定義される土壌領域であり、土壌微生物の活性が高く、植物の生育に重要であることが広く知られている。根圏微生物叢が植物の健全な生長や作物収量に大きく影響することが明らかにされつつあり、根圏微生物叢の形成と機能について世界中で研究が進められてきた。根圏では植物と微生物が緊密に相互作用して機能することから、これらをホロビオント、すなわち超個体として捉え、ホロビオントの機能解析に基づいて植物生育や作物生産への影響を解明し、根圏機能を農業へ応用展開することが期待されていた。私たちのグループは、ダイズをモデルとし、根から分泌される主要な二次代謝産物であるイソフラボンとソヤサポニンがそれぞれ、コマモナス科、スフィンゴモナス科の細菌を増加させることでダイズ根圏微生物叢を形成することを明らかにした。しかし、植物が多数の土壌微生物の中からどのように特定の根圏微生物とホロビオントを形成するのか、ホロビオントを構成する微生物叢がどのように植物に影響するのかについて、その作用機構は分子レベルで十分に明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では植物と根圏微生物叢の相互作用をホロビオントとして一体的に捉え、根圏微生物叢の形成に重要な役割を担う二次代謝産物の根圏での動態と、それらを代謝する微生物の機能を時空間的に解析することにより、ホロビオント形成の分子機構と植物生育に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

代謝物の定量・同定

代謝物の定量は LC-MS により行った。代謝物は標品を用いてリテンションタイムと精密質量が一致することを確かめた。新規代謝物については、精製し、NMR 測定に供した。

遺伝子破壊株の作出

三者接合によって V35 株に遺伝子破壊用ベクターを導入後、相同組換えによって遺伝子を破壊した。single-crossover による標的遺伝子の分断では、相同組換えによってベクターを標的遺伝子に挿入した。double-crossover による標的遺伝子の欠失では、相同組換えによってベクターを標的遺伝子に挿入後、再び標的遺伝子の前後で相同組換えさせることにより遺伝子を欠失させた。

4. 研究成果

根圏微生物による植物特化代謝産物代謝経路の解明

これまでの研究でダイズ根の主要な特化代謝産物であるイソフラボンがダイズ根圏でのコマモナス科の細菌を増加させる役割を担うことを明らかにした。代謝経路の解明に向けて、まず、ダイズ根圏の主要なイソフラボンであるダイゼインを分解できるコマモナス科の細菌をダイズ根から単離した。ダイズ根から 100 菌株以上を分離培養し、それらの 16S rRNA 配列とイソフラボンに対する分解活性を解析した。その結果、コマモナス科に属する複数の菌株が得られ、イソフラボン（ダイゼイン）に対する分解活性を有する A79, V77, V35, V512, V118, V93, V213 株と、分解活性を有さない V112, V15, V116, V11 株が得られた。これらの中から、遺伝子破壊が可能である V35 株をモデルとして、代謝経路の解明に取り組んだ。

まず、V35 株によりダイゼイン分解を経時的に解析した。その結果、分解 2~4 時間にかけて中間代謝産物と推測されるピークが確認された。次いで、遺伝子同定に向けて、全ゲノム配列の解析と、ダイゼイン処理条件でのトランスクリプトーム解析を行った。V35 株は、ダイゼイン処理条件でダイゼイン分解活性が上昇することが認められており、ダイゼイン存在条件下で発現上昇する遺伝子がダイゼイン代謝経路の遺伝子であることが推測される。

ゲノム解析とトランスクリプトーム解析により、ダイゼイン処理条件下で発現上昇する遺伝子群が見出された。本研究ではこれを isoflavone catabolism (ifc) 遺伝子クラスターと名付けた (図 1)。

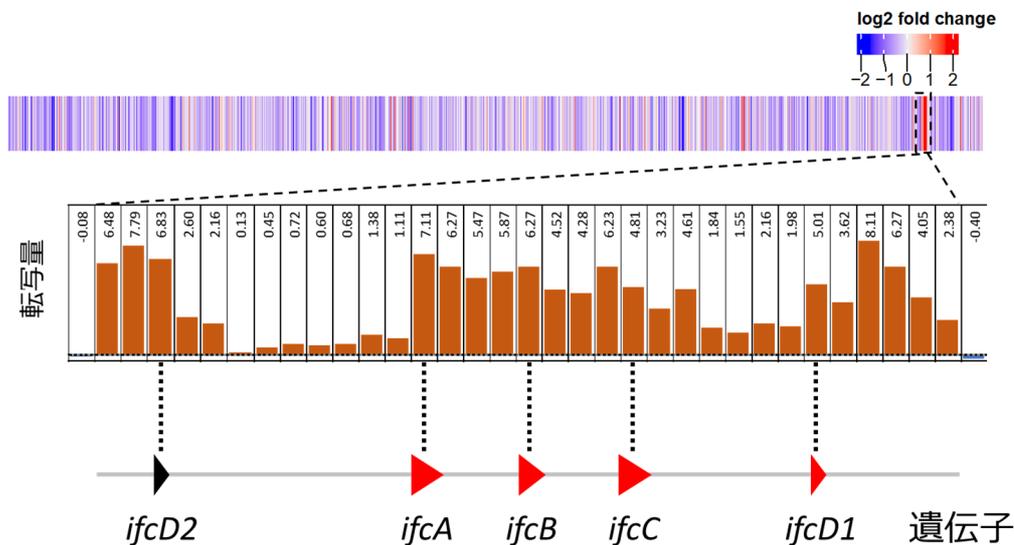


図1. V35 株のイソフラボン代謝遺伝子クラスター

次いで、これらの候補遺伝子の解析に着手した。候補遺伝子の遺伝子破壊株を作出し、ダイゼイン存在条件下での培養を行った。培養後の上清を LC-MS 分析に供し、各変異株で蓄積する代謝物の同定を行った。特に、ifcD1、ifcD2 遺伝子の欠損をした V35 株では蓄積するイソフラボン中間代謝産物が不明であったが、精製と NMR 解析により、2-hydroxy-5-(4-hydroxyphenyl)-4H-pyran-4-one と同定した。これは新規な代謝産物であった (図2)。

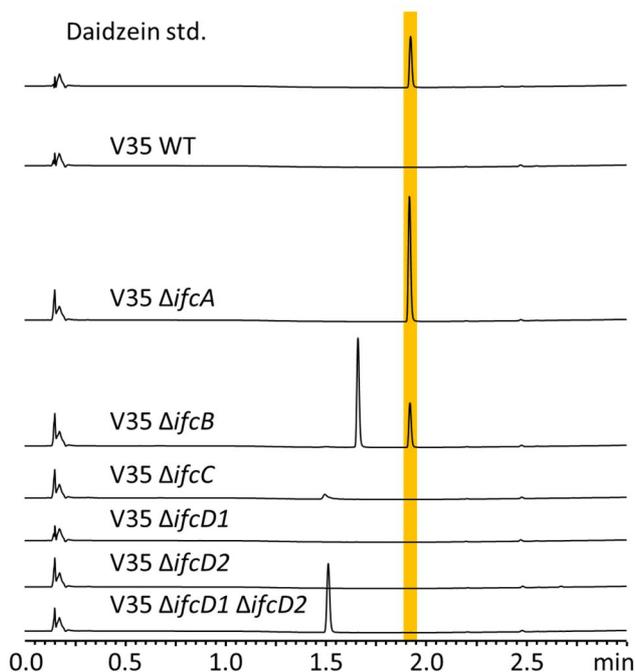


図2. 遺伝子破壊株での代謝物の蓄積

また、イソフラボン分解経路の初発酵素である IFCA に関する解析を行った。大腸菌で発現させた IFCA タンパク質を用いて、酵素活性測定を行い、反応産物は 8 - ヒドロキシダイゼインであることを同定した。また、ifcA はダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインに対する酵素活性は有していたが、構造の異なるフラボノイド類 (フラボン、フラボノール) や配糖体は基質としなかった (図3)。

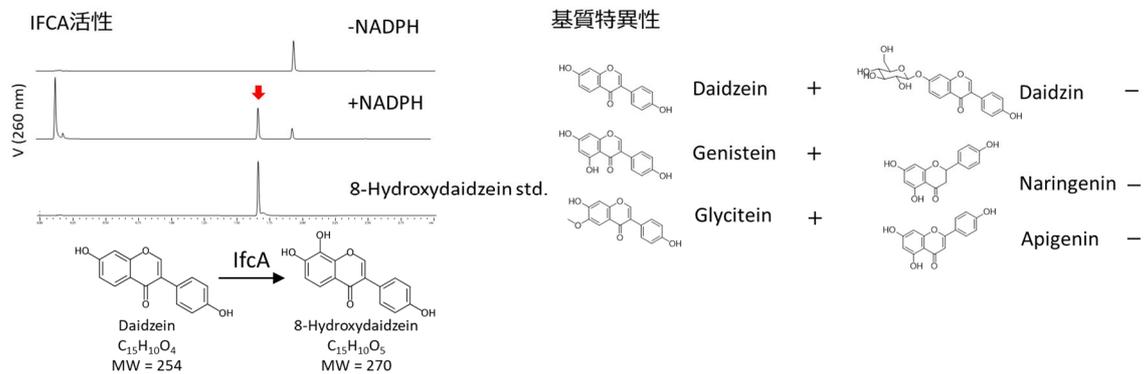


図3. IFCA 酵素の活性測定と基質特異性

イソフラボンは私たちが日常的に摂取する植物特化代謝産物であり、腸内細菌がイソフラボンを代謝する経路は明らかにされていたが、腸内は嫌気的な環境であり、イソフラボンは還元的に代謝されて体内に吸収される。ダイズの根圏環境は酸化的な環境のため、イソフラボンは腸内とは全く異なる経路で代謝されることが明らかになった。

Variovox 属の細菌のゲノム配列は公共のデータベースにも登録されているため、これらのゲノム情報を用いたパンゲノム解析を行った。私たちが単離した Variovox 属細菌のゲノム配列と、公共データベース上のゲノム配列を比較したところ、ダイゼインの分解に関わる遺伝子 (ifc 遺伝子) はイソフラボンを生産するマメ科植物の根や根圏土壌から採取された Variovox 属細菌により多く見出された。このことは、イソフラボン代謝遺伝子クラスターを有することで、土壌細菌がイソフラボンの多く存在するマメ科植物根圏へ適応するのに有利であることが推測される。

IFC 遺伝子がイソフラボン存在条件下での生育に関与するかを調べるために、ifcA 遺伝子破壊株を用い、野生株との生育を比較した。その結果、ifcA 遺伝子破壊株はダイゼイン含有培地での生育が低下した。このことから、ifc 遺伝子クラスターが土壌細菌のダイズ等マメ科植物根圏環境への適応に貢献していると示唆される。

・ムライトセラミックチューブを用いた根圏環境の再現

植物根からの代謝物の分泌を多孔質のムライトセラミックチューブを用いて再現した。トマト根から分泌される主要な植物特化代謝産物であるトマチンをモデルとして、トマチンの濃度勾配とトマチンに応答するスフィンゴビウム属細菌の増加を再現することができた。

ムライトセラミックチューブを用いた疑似根圏系は代謝物の標品を注入することで様々な条件下での植物代謝産物を介した微生物コミュニティとの相互作用を解析することができる汎用的な実験系である。当グループではこの装置を用いて、相互作用解析を進めている。

・植物生育への影響

以上の研究により、根圏微生物の有する植物特化代謝産物の資化能が根圏ホロピオント形成に重要であることが示唆されてきた。そこで、様々な代謝能を有する細菌を組み合わせ、ホロピオントが植物生育に与える影響についての解析を行った。細菌群を合成した SynCom を作成し、ダイズやトマトの生育に与える影響を解析したところ、生育を促進する根圏ホロピオントが見出された。トランスクリプトーム解析により植物体への影響を解析するとともに、現在、各種の解析を行っており、論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakayasu Masaru, Takamatsu Kyoko, Yazaki Kazufumi, Sugiyama Akifumi	4. 巻 87
2. 論文標題 Plant specialized metabolites in the rhizosphere of tomatoes: secretion and effects on microorganisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 13 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac181	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 Meeboon Jamjan, Ando Akinori, Ogawa Jun, Miyamoto Kenji, Kato Yasuo, Shinohara Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of Fusarium oxysporum-suppressive soil with non-soil carriers using a multiple-parallel-mineralization technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10667-1	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 Sugiyama Akifumi	4. 巻 85
2. 論文標題 Flavonoids and saponins in plant rhizospheres: roles, dynamics, and the potential for agriculture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1919 ~ 1931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab106	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 安藤 晃規、小川 順	4. 巻 99
2. 論文標題 複合微生物デザインによる硝化微生物コンソーシアの構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 526 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.10_526	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 Aoki Noritaka, Shimasaki Tomohisa, Yazaki Wataru, Sato Tomoaki, Nakayasu Masaru, Ando Akinori, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Masuda Sachiko, Shibata Arisa, Shirasu Ken, Yazaki Kazufumi, Sugiyama Akifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 An isoflavone catabolism gene cluster underlying interkingdom interactions in the soybean rhizosphere	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ISME Communications	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ismeco/ycae052	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 Nakayasu Masaru, Takamatsu Kyoko, Kanai Keiko, Masuda Sachiko, Yamazaki Shinichi, Aoki Yuichi, Shibata Arisa, Suda Wataru, Shirasu Ken, Yazaki Kazufumi, Sugiyama Akifumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Tomato root-associated Sphingobium harbors genes for catabolizing toxic steroidal glycoalkaloids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00599-23	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 Takamatsu Kyoko, Toyofuku Miwako, Okutani Fuki, Yamazaki Shinichi, Nakayasu Masaru, Aoki Yuichi, Kobayashi Masaru, Ifuku Kentaro, Yazaki Kazufumi, Sugiyama Akifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Tomatine gradient across artificial roots recreates the recruitment of tomato root associated Sphingobium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.550	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 Sugiyama Akifumi	4. 巻 40
2. 論文標題 Application of plant specialized metabolites to modulate soil microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.23.0227a	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 青木愛賢、島崎智久、矢崎渉、中安大、安藤晃規、岸野重信、小川順、増田幸子、柴田ありさ、須田互、白須賢、矢崎一史、杉山暁史
2. 発表標題 ダイズ根圏細菌 <i>Variovorax</i> sp. におけるイソフラボン分解に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 第31回植物微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 愛賢、島崎 智久、矢崎 渉、中安 大、安藤 晃規、岸野 重信、小川 順、増田 幸子、柴田 ありさ、須田 互、白須 賢、矢崎 一史、杉山 暁史
2. 発表標題 ダイズ根圏細菌のイソフラボン代謝遺伝子の同定と機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山 暁史
2. 発表標題 作物頑健性に寄与する 根圏ケミカルワールドの機能
3. 学会等名 日本学術会議農芸化学分科会・植物科学分科会シンポジウム「SDGs達成に向けた農芸化学の挑戦」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山 暁史
2. 発表標題 根圏での植物 - 微生物代謝ネットワーク
3. 学会等名 農薬バイオサイエンス研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akifumi Sugiyama
2. 発表標題 Rhizosphere metabolome for the robustness of crops
3. 学会等名 Unveiling the secret of underground: technologies for visualizing root and rhizosphere (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 陽菜子 山崎 由実 森吉 英子 中安 大 山崎 真一 青木 裕一 高瀬 尚文 岡崎 伸 永野 惇 加賀 秋人 矢崎 一史 杉山 暁史
2. 発表標題 ダイズ根圏のイソフラボン蓄積に関与する β -グルコシダーゼの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023広島大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○松田陽菜子、山崎由実、森吉英子、中安 大、山崎真一、青木裕一、高瀬尚文、永野 惇、岡崎 伸、加賀秋人、矢崎一史、杉山暁史
2. 発表標題 ダイズ根から根圏へのイソフラボン分泌を促進するアポプラスト局在の β -グルコシダーゼの解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akifumi Sugiyama
2. 発表標題 Metabolic capacities of rhizosphere bacteria that respond to plant specialized metabolites
3. 学会等名 NWO-JSPS seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山暁史
2. 発表標題 「植物微生物×オミクス」根圏メタボローム解析
3. 学会等名 第二回植物微生物シンバイオロジー協議会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akifumi Sugiyama
2. 発表標題 Dynamics and functions of plant specialized metabolites in shaping rhizosphere microbiota
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山暁史
2. 発表標題 作物生産を支える根圏ケミカルの 機能・動態・可視化
3. 学会等名 令和3年度 農業・工業原材料生産と光技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木愛賢、島崎智久、矢崎渉、中安大、安藤晃規、岸野重信、小川順、増田幸子、柴田ありさ、須田互、白須賢、矢崎一史、杉山暁史
2. 発表標題 ダイズ根圏でのイソフラボン分解に関与する遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松 恭子、豊福 美和子、奥谷 芙季、中安 大、矢崎 一史、杉山 暁史
2. 発表標題 根分泌モデル実験系を用いたトマチンによるトマト根圏微生物叢形成の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Huang Ying, Naito Kumiko, Kato Yasuo, Shinohara Makoto, Ando Akinori, Ogawa Jun, Miyamoto Kenji
2. 発表標題 Analysis of the effects of amino acids and derivatives on root growth
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田 亮也、鈴木 飛鳥、宮本 憲二、加藤 康夫、安藤 晃規、小川 順、篠原 信、高野 雅夫
2. 発表標題 創出土壌を対象とした X 線 CT による土壌物理性解析の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山 暁史
2. 発表標題 近畿作物育種研究会シンポジウム
3. 学会等名 根から分泌されるトマチンの機能とトマト栽培への応用 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田陽菜子、棟方涼介、中安大、山崎真一、青木裕一、永野惇、矢崎一史、杉山暁史
2. 発表標題 イソフラボンの根圏分泌に関与するダイズ輸送体遺伝子の探索と生化学的解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lpge/index.html

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	安藤 晃規 (Ando Akinori) (10537765)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	

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
---------	---------