

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19193

研究課題名（和文）シスト・ネコブ・ネモグリの寄生環を支える線虫共生コアマイクロバイオームの実態解明

研究課題名（英文）Elucidation of symbiosis between plant-parasitic nematodes and symbiotic core microbiome

研究代表者

黒田 恭平（Kuroda, Kyohei）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50783213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物寄生性線虫と共生するコアマイクロバイオームを同定しその機能を微生物培養・線虫操作・遺伝子レベルで解明することで、生物農薬及び土壌微生物機能を活用した植物寄生性線虫防除技術開発の新たな礎を築くことを目的とした。レンコンやカンショなどに寄生する植物寄生性線虫を採取し、様々な前処理を施したものについてマイクロバイオーム解析やゲノム解析を行うことで、植物寄生性線虫と共生・感染するマイクロバイオームの存在を推定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗性微生物を利用した植物寄生性線虫の病害抑制の歴史は既に50年以上に及んでおり、様々な拮抗性微生物が報告されているが、実圃場で再現性良く病害抑制可能な方法は未だ開発されていない。本研究では、線虫共生マイクロバイオームの実態解明という萌芽期にある研究分野に参入し、生物農薬及び土壌微生物機能を活用した植物寄生性線虫防除技術開発の新たな礎を築くことで、停滞する日本国内・世界の生物防除研究にブレークスルーを起こすことができると考え、本研究を実施した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop next-generation biological control technologies for plant-parasitic nematodes by elucidating the ecology and functions of the symbiotic core microbiome in the nematodes using biological and molecular techniques. We could estimate the putative symbiotic and/or infecting microbiome through microbiome and metagenomic analysis of the potato- and lotus-parasitic nematodes with different treatment conditions (wash treatment, in vitro agar plate chemotaxis assay, and different race condition).

研究分野：環境微生物生態工学

キーワード：植物寄生性線虫 共生 マイクロバイオーム 生物防除

1. 研究開始当初の背景

植物寄生性線虫による被害総額は世界で年間 16 兆円 (Abad et al., Nat Biotechnol, 26(8), 2008) とも報告されており喫緊の課題となっている。一方で、低リスク農業への転換に向けて化学農薬使用量の削減が世界的に求められている (農林水産省, みどりの食料システム戦略, 2021)。そのため近年では生物農薬や土壌微生物機能をフル活用することによる生物防除の試みが行われているが、化学農薬と比べるとその防除効果は低く、生物農薬出荷量も横ばいの状況が続いている (日本植物防衛協会, 農薬要覧-2020-, 2021)。こうした中、植物寄生性線虫のうち、トマトに寄生するサツマイモネコブセンチュウの体表に存在するコアマイクロバイオーム 25 種 (*Acidovorax* 属や *Agrobacterium* 属等の *Proteobacteria* 門が殆どを占める) が同定され、これらが線虫と共生的な役割を果たしていることが示唆された (Cao et al., J Basic Microbiol, 55(8), 2015)。特に近年では、これらコアマイクロバイオームが植物への寄生を促し、農薬等の線虫にとって有害な物質を分解することが示唆されており、未解明な研究分野として注目を浴びてきている (Topalović and Vestergård, Trends Parasitol, 37(11), 2021)。しかしながら、本研究分野は萌芽的であるため、研究対象の殆どがネコブセンチュウに限られていること、日本国内での研究も土壤中の拮抗性微生物に偏っていることから、対象線虫種や国内での研究例を拡大する必要がある。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ我々は、強みである“マイクロバイオーム解析技術”、“植物寄生性線虫・微生物分離操作技術”、“酵素発現・解析技術”を活かして以下の目的を設定し、研究を行った。「異なる生活環を持つ植物寄生性線虫共生コアマイクロバイオームの同定とその実態解明」

3. 研究の方法

(1) 植物寄生性線虫の分離とその共生コアマイクロバイオームの遺伝子学的解析

本研究で対象とする植物寄生性線虫は、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*)、レンコンネモグリセンチュウ (*Hirschmanniella diversa*)、ヨモギシストセンチュウ (*Globodera artemisiae*) とし、それぞれカンショ栽培圃場・ポット、レンコン栽培土壌、ヨモギ栽培ポットからベルマン法を用いて分離した。分離したサツマイモネコブセンチュウについては、6 種類の異なるレースを対象とし、各レースから 6 頭ずつを採取した。採取したサツマイモネコブセンチュウについて、無洗浄の個体 (無処理区)、超純水を用いて 3 回洗浄処理を行った個体 (滅菌水処理区)、次亜塩素酸ナトリウムと Tween 20 を混合した表面殺菌液に 10 秒間浸漬処理を行った後に、超純水で 3 回洗浄処理を行った個体 (表面殺菌処理区) を用意した。さらに各レースを栽培している栽培土壌についても採取し DNA 抽出まで -20°C で冷凍保管を行った。

レンコンネモグリセンチュウについては、はじめに、国内の複数の地域のレンコン栽培圃場から採取したレンコンネモグリセンチュウ 1 頭について、無洗浄で DNA 抽出を行い、共生コアマイクロバイオームの同定を試みた。さらに、茨城県のレンコン栽培圃場から採取したレンコンネモグリセンチュウについて、超純水を用いて 3 回洗浄処理を行った個体 (滅菌水処理区) と無処理区の個体も用意した。また、ヨモギシストセンチュウについては、ヨモギを用いた栽培系の確立を中心に行った。

採取および処理したセンチュウおよび土壌について、DNA 抽出を行った。1 頭ずつのセンチュウ個体については、ISOHAIR による DNA 抽出方法 (Takana et al., Appl Entomol Zool, 47, 2012) に従い、0.2 mL マイクロチューブの蓋裏に線虫溶解液 20 μ L とセンチュウ 1 頭を分注し、蓋をしたうえで遠心分離を行ったのち、60°C で 20 分間インキュベートすることで DNA 抽出物を得た。土壌試料については、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて DNA 抽出を行った。

DNA 抽出物は原核生物の 16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマーセット 515F-909R を用いて 1st PCR を行った。2nd PCR は、サンプルを識別するインデックスを含む 2nd PCR プライマーセットを用いて行った。PCR 増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製を行った。DNA シークエンス解析には、MiSeq (Illumina) を用いた。得られた DNA シークエンスデータは、QIIME2 を用いて解析を行った。

(2) 植物寄生性線虫の行動特性評価

植物寄生性線虫の体表面に存在するマイクロバイオームの違いが、行動特性に与える影響を評価するため、すでに行動特性評価の手法が確立されているレンコンネモグリセンチュウを用いて Takagi らの方法に従い (Takagi et al., Agronomy, 10(3), 2020)、走化性試験を行った。具体的には、超純水で洗浄した 15 頭について、寒天培地上の中心に放飼し、24 時間後に中心からレンコンネモグリセンチュウが移動した場所について、Zone を 4 つに区切ることで (Zone1~4) 行動特性評価を行った。走化性試験後の線虫個体を採取し、3. 1 と同様の方法で DNA 抽出および DNA シークエンス解析を行った。

(3) 共生コアマイクロバイオーム及び植物寄生性線虫のドラフトゲノム構築

植物寄生性線虫のコアマイクロバイオーム及び植物寄生性線虫の相互作用を解明するための

メタトランスクリプトームの前段階として、これら微生物群およびセンチュウのドラフトゲノムの構築を試みた。DNA シークエンス解析のための DNA 量を確保するため、レンコネモグリセンチュウの寄生箇所であるレンコンの細根を採取し、ベルマン法を用いて高密度のレンコネモグリセンチュウ集積溶液を獲得した。その後、Kurashita らの方法に従い (Kurashita et al., Crop Prot, 139, 2021)、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 抽出物について、Sequel IIc (PacBio)を用いたロングリードメタゲノム解析へ供した。

4. 研究成果

(1) 植物寄生性線虫の共生コアマイクロバイオームの同定および走化性試験結果

レンコネモグリセンチュウの共生コアマイクロバイオームの同定を目的として、9 県 11 箇所から合計 13 頭のレンコネモグリセンチュウを採取・DNA 抽出を行い、全バクテリア・アーキアの 16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス解析を行った。16S rRNA 遺伝子配列情報を基にした主成分分析 (PCA) の結果、13 頭の共生微生物群集構造は大きく分けて 3 種類の微生物グループに大別され、これらのマイクロバイオームの違いは採取地点に依らないことが分かった (図 1)。最も多く検出されたグループには、*Staphylococcus* 属、*Cutibacterium* 属、*Methylobacterium* 属細菌が優占して存在していた (図 2)。一部の *Staphylococcus* 属や *Cutibacterium* 属細菌は、モデル線虫として知られている *Caenorhabditis elegans* の消化管などに対して致死的な感染を引き起こすことが知られており (Sifri et al., Infect Immun, 71(4), 2003; Huang et al., Cell Microbiol, 22(10), 2020)、今回採取した個体群の多くはこれらの細菌種に感染している可能性が示唆された。2 頭のレンコネモグリセンチュウについては、*Diplorickettsiaceae*

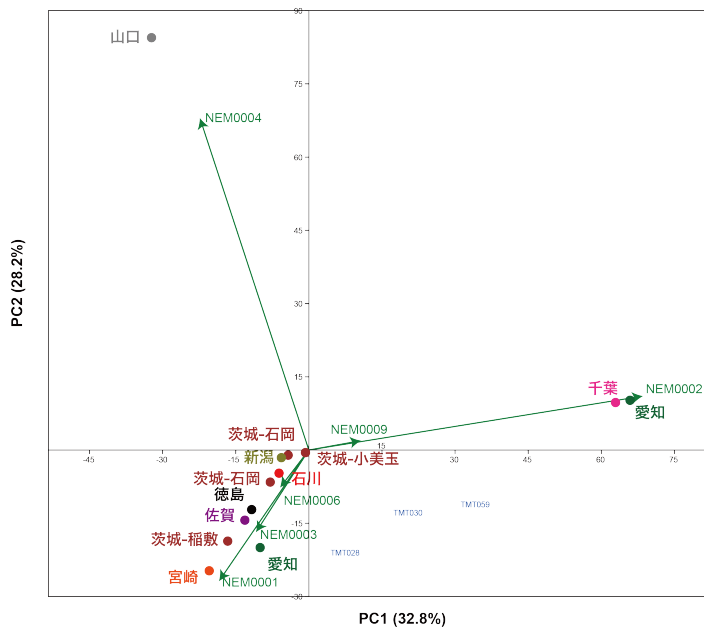


図 1. 9 県 11 箇所から採取したレンコネモグリセンチュウ 13 頭の DNA 抽出物から同定された 16S rRNA 遺伝子配列情報に基づく主成分分析結果

などに対して致死的な感染を引き起こすことが知られており (Sifri et al., Infect Immun, 71(4), 2003; Huang et al., Cell Microbiol, 22(10), 2020)、今回採取した個体群の多くはこれらの細菌種に感染している可能性が示唆された。2 頭のレンコネモグリセンチュウについては、*Diplorickettsiaceae*

Phylum	Family/Genus	OTUs	茨城				徳島	佐賀	愛知	石川	千葉	新潟	山口	宮崎	
			石岡	小美玉	稲敷	稲敷									
p_Firmicutes	g_Staphylococcus	NEM0001	0.0	12.8	0.0	30.7	12.0	14.9	30.6	0.0	9.0	0.4	0.0	62.2	
p_Proteobacteria	f_Diplorickettsiaceae	NEM0002	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	8.2	77.5	0.0	71.3	0.0	0.0	
p_Actinobacteriota	g_Cutibacterium	NEM0003	0.0	4.6	0.7	8.6	28.4	34.3	41.6	0.0	0.0	0.4	0.0	6.9	
p_Bacteroidota	g_Candidatus Cardinium	NEM0004	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	96.0	
p_Proteobacteria	g_Sphingomonas	NEM0005	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	53.9	0.0	
p_Proteobacteria	g_Methylobacterium	NEM0006	0.0	0.0	0.0	49.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Curvibacter	NEM0007	0.8	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	7.1	7.0	22.4	0.4	2.6	0.1	
p_Proteobacteria	g_Pseudomonas	NEM0008	9.7	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	1.5	0.8	11.1	0.4	
p_Bacteroidota	g_Chryseobacterium	NEM0009	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	23.6	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Zoogloea	NEM0010	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.5	0.0	0.0	0.0	
p_Firmicutes	g_Streptococcus	NEM0011	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	
p_Proteobacteria	g_Comamonas	NEM0012	0.2	0.0	0.0	0.0	11.2	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.2	0.0	
p_Proteobacteria	g_Aquabacterium	NEM0013	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Paracoccus	NEM0014	0.0	0.0	0.0	0.0	10.2	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Sphingomonas	NEM0015	0.0	0.0	0.0	0.0	10.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Actinobacteriota	f_Cellulomonadaceae	NEM0016	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.7	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Dechloromonas	NEM0017	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.1	0.0	1.4	0.7	
p_Cyanobacteria	g_Scytonema_UTEX_2349	NEM0018	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Firmicutes	g_Anaerococcus	NEM0019	0.0	0.0	0.0	1.9	6.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	
p_Bacteroidota	g_Ferruginibacter	NEM0020	9.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Bacteroidota	f_Saprosiraceae	NEM0021	8.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Bacteroidota	g_Ferruginibacter	NEM0022	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Noviherspirillum	NEM0023	0.0	1.5	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	
p_Actinobacteriota	g_Rothia	NEM0024	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.9	
p_Bacteroidota	g_Arcicella	NEM0025	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8	0.1	0.0	0.0	
p_Verrucomicrobiota	f_Parachlamydiaceae	NEM0026	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Bacteroidota	g_Flavobacterium	NEM0027	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	1.3	0.0	
p_Proteobacteria	f_Comamonadaceae	NEM0028	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Enhydrobacter	NEM0029	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p_Proteobacteria	g_Brevundimonas	NEM0030	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Others			44.7	76.0	94.9	7.0	11.1	29.4	0.0	4.9	29.6	2.9	11.1	2.6	18.7

図 2. 16S rRNA 遺伝子配列情報に基づくネモグリセンチュウ 13 頭の DNA 抽出物から同定された優占微生物群の存在割合

科および *Chryseobacterium* 属に近年な細菌が優占していた。Diplorickettsiaceae 科の近縁種としてダニなどに寄生する偏性細胞内共生細菌 *Rickettsiella massiliensis* (相同性 87%) が存在しており、この細菌はレンコンネモグリセンチュウの共生細菌である可能性が示唆された (Mediannikov et al., PLOS ONE, 5(7), 2010)。さらに *Chryseobacterium* 属については、*Chryseobacterium wanjuese* と相同性 100%を示した。同属には、動物寄生性線虫に感染し、体内を分解し死滅させる *Chr. nematophagum* が存在しており (Page et al., BMC Biol, 17(1), 2019)、この *Chr. wanjuese* はレンコンネモグリセンチュウに感染可能な細菌種である可能性が考えられた。残りの 1 頭については、*Candidatus Cardinium* 属に属する細菌が全体の 96%を占めていた。本系統群はハチ、ダニ、クモなどに感染し、生殖異常を誘発する細菌 *Ca. Cardinium hertigii* 及び *Ca. Paenicardinium endonii* と相同性 96%を示した (Noel and Atibalentja, Int J Syst Evol Microbiol, 56(7), 2006; Nakamura et al., Appl Environ Microbiol, 75, 2009)。*Ca. Paenicardinium* はシストセンチュウである *Globodera* と *Heterodera* の精巣・卵巣などからも発見されており、レンコンネモグリセンチュウの体内における空間的分布を今後調査する必要があると考えられた。

加えて、15 頭の滅菌水処理後のレンコンネモグリセンチュウについて走化性試験を行った結果、Zone 1~4 に移動したレンコンネモグリセンチュウを得ることに成功した。マイクロバイーム解析の結果、Zone 1 (放飼直後から動かない個体) では、*Moraxellaceae* 科、*Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属などが優占していた一方で、Zone 4 (シャーレの端付近まで移動した個体) については、*Methylobacterium* 属や *Sphingomonas* 属が優占していた。今後、レンコンネモグリセンチュウの運動性と検出されたマイクロバイームの機能を比較解析することで、センチュウの行動特性に影響を与える微生物種を特定していく予定である。

サツマイモネコブセンチュウについても、合計 85 試料の 16S rRNA 遺伝子解析が完了し、無処理区、滅菌水処理区、表面殺菌処理区および元の栽培土壌についてマイクロバイーム解析データを得ている。今後、レンコンネモグリセンチュウと同様の解析を進めることで、レースごとや個体ごとの共生コアマイクロバイームを同定する。

(2) 植物寄生性線虫およびその共生マイクロバイームのロングリードメタゲノム解析

植物寄生性線虫とその矯正マイクロバイームの実態を評価するため、これらのドラフトゲノムの構築を試みた。Sequel IIe (PacBio)を用いたロングリードメタゲノム解析の結果、約 15.3 Gbp の DNA 配列情報を得た。得られた DNA 配列について、HiFi リードを作成し、lima を用いて HiFi リードから Ultra Low PCR アダプターの除去を行った。その後、pbmarkdup を用いて PCR 重複リードの除去を行った。その後、Filtlong を用いて、1,000 塩基以下のリードを削除し、Hifiasm Meta のデフォルト条件で、高品質の HiFi リードのアセンブルを行った。アセンブル後のコンティグについて、複数のセンチュウ種やバクテリア等の DNA 配列が混在しているため、Binning の検討を行った。バクテリアについては、複数の Binning software (Megahit, Metabat2, MaxBin2 など) と GTDBtk を用いた系統分類を行うことで、バクテリア由来のコンティグ配列を特定した。レンコンネモグリセンチュウについては、公共データベースに登録されている *Hirschmanniella* 属のマーカー遺伝子 (SSU/LSU rRNA 遺伝子や 5.8S/ITS 領域の遺伝子配列) および遺伝子発現解析が行われている *Hirs. oryzae* をリファレンスに用い (Bauters et al., Mol Plant Pathol, 15(4), 2014)、コンティグのカバレッジ情報などを用いて Binning を実施した。得られたドラフトゲノムについて、品質の評価や Coding sequence (CDS)の予測や酵素のモデリング解析などを進めている。今後、本研究で得られたドラフトゲノムを元にしてレンコンネモグリセンチュウの遺伝子発現解析を行い、レンコンネモグリセンチュウおよびその共生マイクロバイームの相互作用を予測していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Ryota, Ohike Tatsuya, Ebe Shohei, Noguchi Taro Q.P., Tomita Shun, Narihiro Takashi, Kuroda Kyohei	4. 巻 28
2. 論文標題 Green tuff supplementation improves plant growth and microbial interactions of soil aggregates and rhizosphere in cherry tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L. var. <i>cerasiforme</i>) cultivation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Rhizosphere	6. 最初と最後の頁 100801 ~ 100801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rhisph.2023.100801	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田恭平, 蔵下はづき, 高木素紀, 後藤万紀, 野口太郎, 富田駿, 成廣隆
2. 発表標題 レンコンネモグリセンチュウ <i>Hirschmanniella diversa</i> の共生微生物の同定
3. 学会等名 2022年度日本線虫学会第29回大会
4. 発表年 2022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
研究分担者	富田 駿 (Tomita Shun) (00909343)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	
研究分担者	田淵 宏朗 (Tabuchi Hiroaki) (10355571)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上級研究員 (82111)	

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
研究分担者	島 武男 (Shima Takeo) (20414427)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上級研究員 (82111)	
研究分担者	成廣 隆 (Narihiro Takashi) (20421844)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	
研究分担者	野口 太郎 (Noguchi Taro) (90615866)	都城工業高等専門学校・物質工学科・准教授 (57601)	
研究分担者	村田 岳 (Murata Gaku) (90760364)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・植物防疫研究部門・研究員 (82111)	

	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	高木 素紀 (Takagi Motonori)	茨城県農業総合センター	
研究協力者	後藤 万紀 (Goto Maki)	茨城県・産業戦略部技術振興局科学技術振興課・係長	

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