

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20568

研究課題名（和文）細菌のバイオフィルムによる植物生長促進機能と環境ストレス緩和機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of plant growth promoting effects and improving environmental stress tolerance by bacterial biofilms

研究代表者

安掛 真一郎 (Agake, Shin-ichiro)

東京農工大学・学内共同利用施設等・特任助教

研究者番号：30963251

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：バイオスティミュラントは、化学肥料の持続可能な代替手段として注目されている。植物成長促進微生物が分泌するEPSは、植物内の非生物ストレスを軽減する効果が期待されており、本研究では精製されたEPSがイネに与える影響とそのメカニズムを調査した。細菌性EPS処理により、熱ストレス条件下で植物成長促進が観察され、RNA-seq解析では種々の上方調節遺伝子と下方調節遺伝子が同定された。GO解析では、ROS除去プロセスや解毒経路に関連する遺伝子が見られ、特に非生物ストレス下での抗酸化物質として機能する遺伝子の発現が増加した。これらの結果から、EPSがバイオスティミュラントとして有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、微生物由来の細胞外高分子化合物（EPS）が植物の非生物ストレスに対する応答に与える影響を調査した。熱や塩、乾燥ストレス条件下で、EPSが植物の成長に大きく貢献し得ることが明らかとなった。精製したEPSを用いた植物試験としては初めての報告となる。またそれに伴う植物のトランスクリプトーム解析により、植物の応答が遺伝子レベルで発現していることを詳細に解析した。これらの研究成果によって、微生物が産生するEPSがバイオスティミュラントとして有望であることが明確となり、持続可能な農業や食糧安全保障に向けた技術開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Biostimulants have attention as sustainable alternatives to chemical fertilizers. Extracellular polymeric substances (EPS) secreted by plant growth-promoting microorganisms are expected to alleviate abiotic stress on plants. This study investigated the effects and mechanisms of purified EPS on rice. Treatment with bacterial EPS resulted in observed plant growth promotion under heat stress conditions. RNA-seq analysis identified various up-regulated and down-regulated genes, with GO analysis revealing genes associated with ROS removal processes and detoxification pathways, particularly those functioning as antioxidants under abiotic stress. These findings suggest the potential of EPS as a biostimulant.

研究分野：植物微生物相互作用学

キーワード：バイオスティミュラント バイオフィルム 非生物ストレス 環境ストレス 植物成長促進微生物

### 1. 研究開始当初の背景

地球規模の気候変動による環境ストレスの変化は、作物の生産性を制限し世界規模の食料安全保障を脅かしている。2050年までに世界人口が約100億人に達すると予測されているが、作物の収量を増やすための化学肥料依存および長期使用は、土壌環境に悪い影響を与え、持続可能な農業を蝕む。そこで近年バイオスティミュラント資材が注目されており、2022年にはヨーロッパが最大市場になって、2030年には市場規模が79.7億ドルに達すると予測されている。バイオスティミュラントは天然物質性のものと微生物性のものに分類され、後者には植物成長促進根圏細菌(PGPR)が含まれている。PGPRは作物の成長促進と環境ストレスを軽減するとの報告があるが、その中で微生物が産生するバイオフィルムの主成分である細胞外多糖類(EPS)がどのようなメカニズムで植物に効果を及ぼしているのかは、科学的知見が乏しい。

### 2. 研究の目的

EPSは微生物が分泌し、バイオフィルムの形成を助け、植物のストレス耐性を向上させる。既存の研究は、EPSを産生する細菌自体の効果に焦点を当てているが、精製された純EPSによる具体的な植物応答遺伝子メカニズムについては不明である。本研究では、精製されたEPSが植物成長に与える影響と、RNA-seqを用いたイネ種子における成長促進とストレス耐性に関する遺伝子の特定を目的とした。

### 3. 研究の方法

当研究室では、以前にイネから種々のPGPRを単離し、それらの菌株を独自に保管している。我々はこれらの植物成長促進物質(インドール-3-酢酸生成、アセチレン還元活性、リン溶解活性)の産性能を調査し報告してきた。本研究では、その30株のうち17株を選び、グルコースを添加した2種類の培地(TSBおよびYM)でEPS産性能を評価し、蛍光試薬を添加したYM培地にてEPSを観察した。選抜した細菌を純培養し、超遠心分離、冷エタノール処理、透析、フリーズドライを経てEPSを精製した。植物アッセイに関しては、イネ種子を表面殺菌し、発芽後、脱イオン水で濃度を調整したEPSを投与したイネを用いて、熱ストレス試験を行った。トランスクリプトーム解析については、同様に種子を表面殺菌し、EPS処理と対照処理を行った後、種子胚からRNAを抽出し、RNA-seq解析を行った。得られた発現変動遺伝子(DEGs)を用いて、GO解析およびKEGG解析を実施した。また、発現遺伝子量の定量については、抽出したRNAを逆転写し、リアルタイムPCRを実施した。

### 4. 研究成果

**PGPRのEPS産生能評価と精製:** グルコースを含むYM寒天培地では、JM160、JW191、JM187、JC20、J032、およびJM63株がEPSを多く産生し、蛍光を示した(図1)。他の株に関しては、TSBおよびYM培地のどちらにおいてもグルコースによるEPSの増加は観測されなかった。EPS産生能力に基づき、*Enterobacter*に属する上記6つの菌株が選抜された。EPS精製後の定量の結果、同じ属に分類される細菌内においても、EPS産生量が大きく異なり、JC20が最も多く、JW191が最も少なかった。

#### 熱ストレス環境におけるEPSによる植物への効果:

上記の菌株から精製されたEPSを用いて熱ストレス下での植物成長への影響を評価し、植物成長パラメータ(草丈、地上部と根部の新鮮量および乾重量、SPAD値)を計測した。実験結果によると、EPS投与は熱ストレス下で植物のバイオマスを増加させ、特に、JM160とJM63のEPSは、草丈を29%増加させた。また、JW191のEPSは、地上部の新鮮重と草丈を増加させた。JM187のEPSも同様に、根の乾重量を増加させた。加えて、SPAD値においても、顕著な増加が観測され、特にJW191とJC20のEPSからは、それぞれ40%と50%のSPAD値の増加が見られた。

**トランスクリプトーム解析:** 過去の研究ではJW191株は植物成長促進物質産性能がほとんど観測されなかったにもかかわらず、イネの成長を促進しており、EPSのような知見の乏しい植物成長促

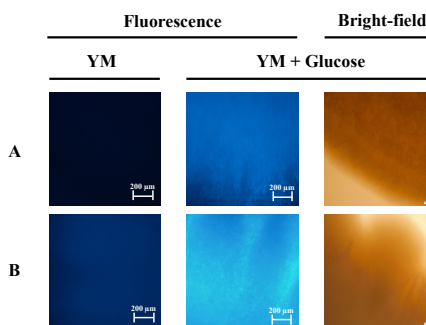


図1. バイオフィルム定性試験結果

左が蛍光試薬を含むYM培地で生育したコロニーの蛍光視野、中央が蛍光試薬とグルコースを含むYM培地で生育したコロニーの蛍光視野、右が蛍光試薬とグルコースを含むYM培地で生育したコロニーの明視野。AはJM160株、BはJW191株

進物質の関与が考えられた。発芽 24 時間後に EPS を投与したイネのトランスクリプトーム解析では、139 の遺伝子が発現上昇しており、76 の遺伝子が発現減少が確認された。特にアスコルビン酸酸化酵素の遺伝子発現は、EPS 処理によって最も高く上昇し、抗酸化作用の改善を示した。GO および KEGG 解析では、ROS 代謝や毒物応答、解毒に関連する重要な生物学的プロセスが同定された。

本研究によって、*Enterobacter* 属細菌から精製された EPS が植物成長促進効果を持ち、イネに向けたバイオスティミュラント開発への応用の可能性が示された。本研究成果は *Microorganisms* 誌に投稿された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Islam Md. Monirul, Agake Shin-ichiro, Ito Takehiro, Habibi Safiullah, Yasuda Michiko, Yamada Tetsuya, Stacey Gary, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 pcae016
2. 論文標題 Involvement of Peptidoglycan Receptor Proteins in Mediating the Growth-Promoting Effects of <i>Bacillus pumilus</i> TUAT1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcae016	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 Borjigin Tulaga, Ohtsu Naoko Ohkama, Agake Shin-ichiro, Ngo Ngoc Phuong, Maeda Masumi, Yokoyama Tadashi, Umezawa Taishi, Yamada Tetsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria <i>Bacillus pumilus</i> TUAT1 Strain Inoculation on <i>Arabidopsis thaliana</i> Seedling Growth	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Asian Journal of Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 35 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3923/ajps.2024.35.45	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 Xiao Li-Er, Yamada Tetsuya, Maeda Masumi, Agake Shin-ichiro, Ngo Ngoc Phuong, Kanekatsu Motoki, Shinozaki Yoshihito, Ohkama-Ohtsu Naoko, Yokoyama Tadashi	4. 巻 69
2. 論文標題 Possible involvement of nitric oxide in promoting the initial growth of rice seedlings at low temperature by inoculation of <i>Bacillus pumilus</i> strain TUAT1 spores	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 273 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2023.2240834	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 該当する

1. 著者名 Damo Jean Louise Cocson, Shimizu Takashi, Sugiura Hinako, Yamamoto Saki, Agake Shin-ichiro, Anarna Julieta, Tanaka Haruo, Sugihara Soh, Okazaki Shin, Yokoyama Tadashi, Yasuda Michiko, Ohkama-Ohtsu Naoko	4. 巻 11
2. 論文標題 The Application of Sulfur Influences Microbiome of Soybean Rhizosphere and Nutrient-Mobilizing Bacteria in Andosol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11051193	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 Artigas Ramirez Maria Daniela, Agake Shin-ichiro, Maeda Masumi, Kojima Katsuhiko, Ohkama-Ohtsu Naoko, Yokoyama Tadashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity of Fast-Growth Spore-Forming Microbes and Their Activity as Plant Partners	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 232 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11020232	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 Zihan Yue, Kun Yuan, Mayuko Seki, Shin-Ichiro Agake, Keisuke Matsumura, Naohisa Okita, Wako Naoi, Katsuhiko Naoi, Koki Toyota, Haruo Tanaka, Soh Sugihara, Michiko Yasuda, Naoko Okama-Ohtsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative Analysis of Japanese Soils: Exploring Power Generation Capability in Relation to Bacterial Communities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sustainability	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/su16114625	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Aoudi Yosra, Shin-ichiro Agake, Safiullah Habibi, Michiko Yasuda, Naoko Ohkama-Ohtsu
2. 発表標題 Evaluation of Purified Bacterial Exopolysaccharide as Biostimulant Agent Improving Plant Growth Under Abiotic Stress
3. 学会等名 The 36th JSME & The 13th ASME (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jean Louise C. Damo, Maria Daniela Artigas Ramirez, Shin-ichiro Agake, Christian Oliver A. Kalaw, Lovely B. Willauer, Mannix S. Pedro, Shin Okazaki, Naoko Ohkama-Ohtsu
2. 発表標題 Diversity and Characterization of Isolated Phosphate-Solubilizing Bacteria from Paddy Field Soils in Philippines
3. 学会等名 ISSAAS International Scientific Congress & General Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin-ichiro Agake, Jae hyo Song, Gabriel Lemes Jorge, Jay J. Thelen, Gary Stacey
2. 発表標題 Unraveling the Initial Signaling Cascades in Soybean Nodulation: Insights from Proteomic and Transcriptomic Analyses
3. 学会等名 Soy2023 International Conference: Biennial Cellular & Molecular Biology of the Soybean Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Md Monirul Islam, Shin-ichiro Agake, Tetsuya Yamasda, Naoko Ohkama Ohtsu
2. 発表標題 Involvement of receptor proteins for peptidoglycans in mediation of growth promoting effects by <i>Bacillus pumilus</i> TUAT1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安掛真一郎, 佐伯爽, 大川泰一郎, 大津(大鎌)直子, 横山正
2. 発表標題 バイオ肥料原体微生物 <i>Bacillus pumilus</i> TUAT1 の芽胞を噴霧したイネ種子の直播栽培法
3. 学会等名 復興農学会 2022年度 第2回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin-ichiro Agake, Jae Hyo Song, Gary Stacey
2. 発表標題 Transcriptome Analysis of Soybean Root Hair Cells in Response to <i>Bradyrhizobium</i> Infection through Nod Factor and Type III Secretion System
3. 学会等名 2024 IPG Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024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	安田 美智子  (Yasuda Michiko)		
研究協力者	アウディ ユースラ  (Aoudi Yosra)		
研究協力者	ステイシー ゲイリー  (Stacey Gary)		
連携研究者	大津 直子  (Ohtsu Naoko)  (40513437)	東京農工大学・グローバルイノベーション研究院・教授    (12605)	

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		
米国	ミズーリ大学		