

イネ種子微生物叢を介した種子形質及び微生物共生の制御基盤構築

研究代表者

西條 雄介 奈良先端科学技術大学院大学

共同研究者

本郷 裕一 東京工業大学

佐藤 豊 国立遺伝学研究所

晝間 敬 奈良先端科学技術大学院大学（現 東京大学）



写真:15年以上無施肥で高品質・高収量のコメ生産を誇る優良無施肥水田圃場(京都府宇治市)

1. 研究の背景と達成目標

イネの生育や収量を左右する共生微生物叢（植物の組織内に生息する細菌・真菌の集団）に関して、特に貧栄養栽培に即した実態を明らかにするとともに、有用共生菌株の同定、並びに種子に着目して共生菌株・共生菌叢の効果的制御方法の確立を目指す。具体的には、種子からのライフサイクルを通じてイネが共生微生物叢をどのように成立させているか、①生育ステージや土壌栄養に依存した群集構造変化の捕捉、②メタ DNA データに基づきイネ栄養状態を判定する機械学習モデルの構築、③共生菌株の単離・培養や機械学習による有用共生菌株の推定と併せて単離菌株のイネ接種試験による有用菌の同定、並びに④イネの免疫活性化ペプチドを介した共生制御機構についても解明を進める。以上を併せて、共生微生物叢を活用した環境保全型農業技術の開発に道を開くことで、「食の安全」に貢献する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

①優良無施肥圃場におけるイネ共生微生物叢の動態プロファイリング

高品質・高収量の優良無施肥水田圃場及び隣接する有施肥圃場において、ジャポニカイネ 3 品種の根共生微生物叢に関するメタ 16S 解析データ（2018-2021 年）及びメタゲノム解析データ（2019 年）を得た。無施肥圃場に特徴的な共生微生物叢の群集構造や菌遺伝子情報を導き出した。イネの貧栄養適応（省施肥栽培）に即した共生微生物叢に関して、学術的・応用価値が高いデータを取得した。

②イネ施肥条件を判定する機械学習モデルの構築、優占菌株（有用共生菌候補）の推定

上記のメタ 16S データを教師データとして用いて、イネ（ジャポニカ栽培品種）の施肥条件を判定する機械学習（Random Forest）モデルを構築した。さらに、モデル構築への貢献度を基準として、無施肥圃場に特徴的な菌種（ASV; amplicon sequence variant）や共生微生物叢のハブ ASV を選定した。これらの菌種は、貧栄養土壌でイネの栄養獲得に寄与する有用共生菌候補として有望視される。

③イネ共生細菌の単離と成長促進細菌の同定

優良無施肥圃場でイネ根に共生する細菌について、600 菌株以上を単離し、共生細菌ライブラリを構築した。単離菌の幼苗への接種試験による機能評価を行い、成長促進細菌を同定した（*Sphingomonas* sp. 及び *Achromobacter* sp. など）。これらの共生細菌は、上記②の有用菌候補（優占菌種・ハブ菌種）とともに、省施肥栽培を推進する技術のシーズとして、引き続き実装化に向けての取組みを進めていく。

④イネ免疫活性化ペプチド OsPep による成長促進機能の解析とパートナー共生細菌の同定

イネの免疫活性化ペプチド OsPep ファミリーが、種子由来の共生細菌から貧栄養適応型の共生菌叢を構築し、イネの成長促進機能も併せもつことを示した。同機能の発現に重要な植物因子として OsPep 受容体 *OsPEPRI* 及び共通共生制御因子 *CCaMK* を同定した。さらに、*OsPEPRI* 及び *CCaMK* に依存してイネの成長を促進する共生細菌として、新種の *Sphingomonas* sp. を同定した。本成果は、イネの免疫ペプチド受容体が共生制御に働くことを示すとともに、その対象として制御を受けるイネ成長促進細菌も同定し、貧栄養環境で植物が生体防御と微生物共生を両立させる戦略の一端を明らかにしたもので、共生微生物の実装化に向けても有効な方策を提供するものである。

3. 研究成果

① イネ共生微生物叢の動態プロファイリング

優良無施肥圃場と隣接する有施肥圃場で、ジャポニカイネ3品種（日本晴、ヒノヒカリ、金南風）の根において16S rRNA アンプリコンシーケンス（メタ16S）解析を行い、2018-2021年の4年分の根共生微生物叢データを得た。根の共生微生物叢の群集構造に関して、ジャポニカ3品種いずれも、①栽培シーズンを通して施肥の有無で明確に異なること、②生育ステージの進行に伴って推移することが明らかとなった。一方で、品種間差は小さく、大きな年次変動も認められなかった（図1）。

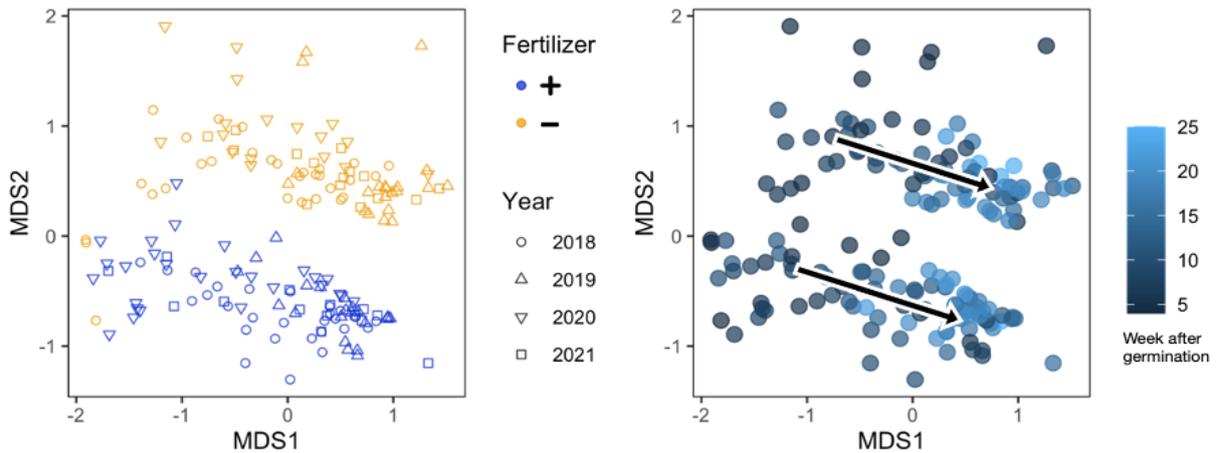


図1 優良無施肥圃場と隣接する有施肥圃場において、イネ根の共生微生物叢に関するメタ16S解析データを2018-2021年の4年間取得した。共生微生物叢の群集構造は、施肥の有無で大きく異なること、及びイネの生育ステージ進行に伴い変化することが示唆された。

また、2019年サンプルに関してメタゲノム解析も行い、無施肥圃場の共生微生物叢において特に炭水化物・グリカン代謝、及び脂質代謝関連遺伝子の比率が高まることが示された。

制御温室においても同様にメタ16S解析を行い、イネ共生微生物叢の菌組成が土壌栄養（施肥の有無）や生育ステージ進行に応じて変化することを確認した。また、イネを含む陸上植物の8割の種で菌根共生が成立し、それは *CCaMK* 等の宿主因子に依存すること並びに水稻においては有効に機能しないことが知られている。そこで、イネ *CCaMK* 欠損変異体においても同様の解析を行ったところ、水稻栽培においても *CCaMK* が共生微生物叢の制御やイネの生育に寄与すること、及び共生菌の中には *CCaMK* に依存して相対存在量が増減するグループも変化しないグループも存在することがわかった。

② 機械学習によるイネ施肥条件判定モデルの構築、優占菌株（有用共生菌候補）の推定

上記のメタ16Sデータを教師データとして用いた機械学習（Random Forest）により、イネの施肥条件（施肥有り無し）を判定

するモデルを構築した

（図2）。同モデル構築に貢献度の高い菌株（ASV）や共生微生物叢ネットワークのハブASVを選定し、優良無施肥圃場に特徴的でイネの貧栄養適応を促進すると予想される有用共生菌候補を推定し

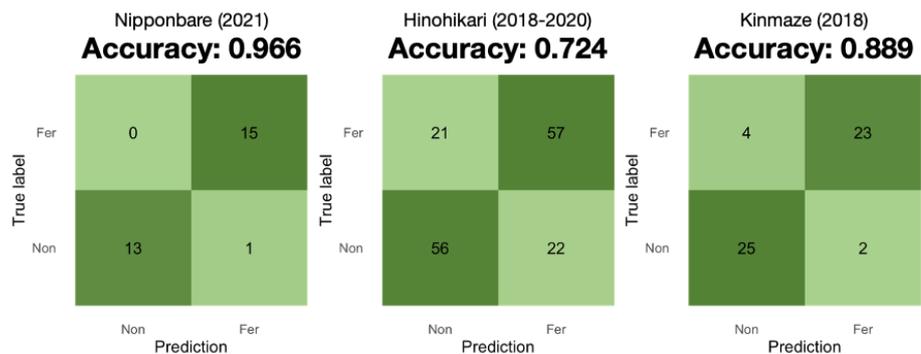


図2 共生微生物叢メタ16Sデータに基づき、ジャポニカ栽培品種の施肥条件を判定する機械学習（Random Forest）モデルを構築した。

た。上記の優良無施肥圃場に特徴的な菌種に着目して、現在、さらなる単離・培養を進めている。

③ イネ共生細菌の単離と機能評価

無施肥圃場における根の共生細菌について、600 菌株以上を単離し、rRNA 遺伝子シーケンス解析により分類情報も得て、共生細菌ライブラリを構築した。幼苗への接種試験による、単離菌の機能評価を行い、イネ成長促進細菌を同定した (図 3)。特に 2 菌株 (*Sphingomonas* sp. 及び *Achromobacter* sp.) に関して、特許出願も視野に入れて、さらに解析を進めている。同定された植物成長促進細菌の近縁菌種や上記②でリスト化した有用共生細菌候補についても単離・機能解析を進めて、共生微生物叢成立や共生機能発現の分子基盤に迫る一助としたい。

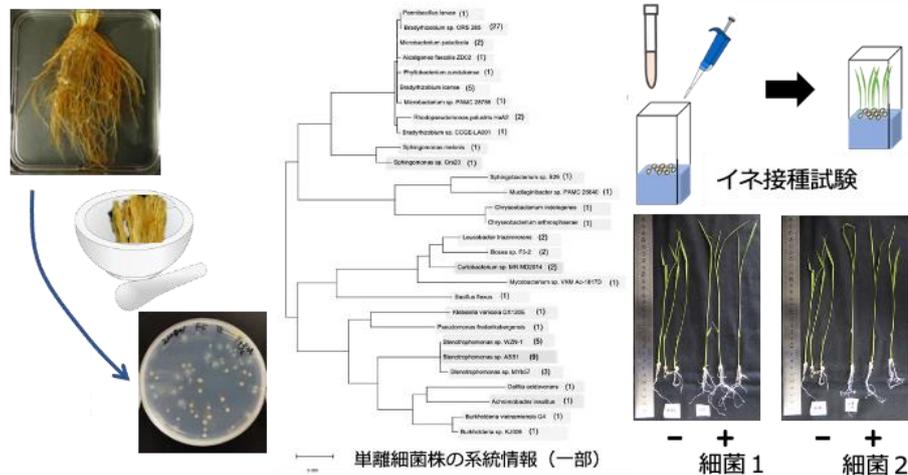


図 3 優良無施肥圃場のイネ根に共生する細菌を単離して、単離菌のイネ接種試験による機能評価を進めて植物成長促進細菌株を同定した。

④ イネ免疫活性化ペプチド OsPep による成長促進機能の解析とパートナー共生細菌の同定

イネの免疫活性化ペプチド OsPep を発芽種子に投与することで、種子由来の共生細菌から貧栄養適応型と推定される共生菌叢が根に構築され、幼苗の成長が促進されることを示した (図 4)。また、同機能は OsPep 受容体 *OsPEPR1* 及び共生制御因子 *CCaMK* に依存することを示した。

しかしながら、完全滅菌した無菌種子においては OsPep 投与は幼苗の成長に抑制的に働いてしまう (おそらく過度の免疫活性化のため)。そこで、上記③で構築した共生細菌ライブラリから菌接種により OsPep 成長促進機能を発現させる菌株をスクリーニングし、新種の共生細菌 *Sphingomonas* sp. の同定に努めた (図 5)。本成果は、種子微生物叢から、貧栄養環境で根の共生微生物叢の構築に働く免疫経路を同定した点で学術的進歩性が高い。同時

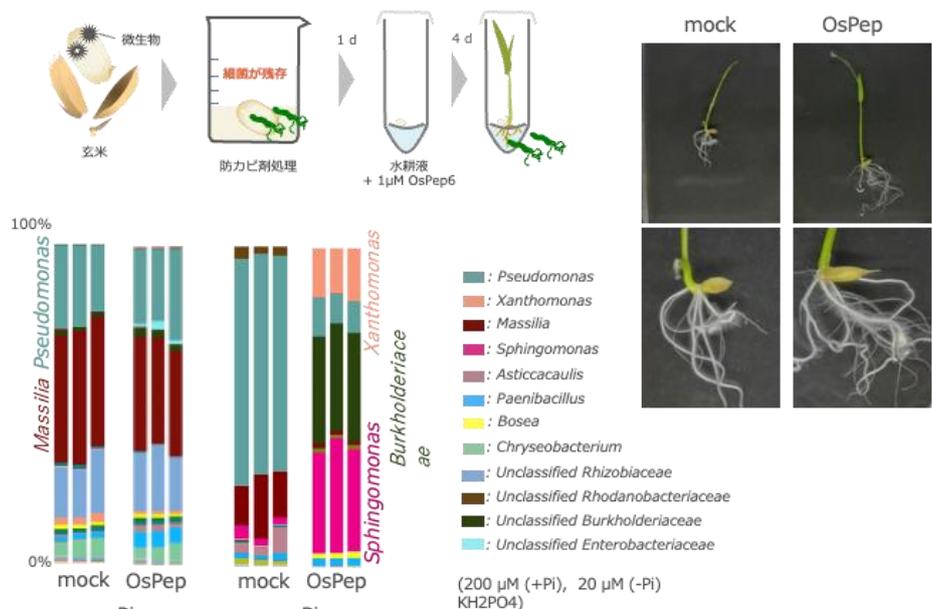


図 4 OsPepペプチドによる、種子由来共生細菌に依存したイネ成長促進効果 (上、右)、及び根における共生微生物叢の群集構造変化 (下)。

に、有用共生菌の実装化、並びに作物の生体防御と生育の両立を推進する技術シーズとして、免疫活性化剤と共生細菌のセット使用が有効であることを強く示唆するものである。

4. 今後の展開

1) 共生微生物叢のメタ 16S 解析データに基づくイネ栄養状態判定モデルの汎用性(オーバーフィッティング対策)を検証するため、他の無施肥・有施肥圃場のデータ取得・判定を進めている。野外圃場データを ASV より上階層の分類群で分別して教師データとして用いることで、制御温室で得たデータを判定する際に一定の有効性が認められている。

2) 本アプローチ(共生微生物叢プロファイリングと機械学習の組合せによる有用共生菌種の推定、共生菌の単離と接種試験による有用共生菌スク

リーニング、植物成長親和型の免疫活性化剤との併用による有用共生菌の活用)の有効性を圃場レベルで検証する。

- 有用共生菌種の推定に際して、共生微生物同士の機能性ネットワークの検出・推定方法を改善することで重要ハブ菌種の推定・同定がさらに加速化できると期待される。
- OsPep ペプチドはあくまで植物成長親和型の免疫経路の一つに過ぎず、類似の機能をもつ他の免疫・共生制御経路の同定や活用も併せて進めていきたい。
- 有用共生菌の獲得・定着・伝播の実態や制御機構の解明。種子由来で根の共生微生物叢で拡大される様子は認められたものの、葉や根から再び種子に含まれる過程や機構に関しては解明が待たれる。

3) 上記のアプローチのイネにおける概念実証(本研究)に続いて、他の作物への展開も図っていく。

5. 発表実績

論文

- Yusuke Saijo and Eliza Po-iiian Loo, Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses, *New Phytologist* (2020) 225: 87-104. Doi: 10.1111/nph.15989. (査読あり)

学会発表・講演

- 足立旭、本郷裕一、西條雄介 他、イネにおける土壌栄養条件と共生制御因子に依存した共生微生物

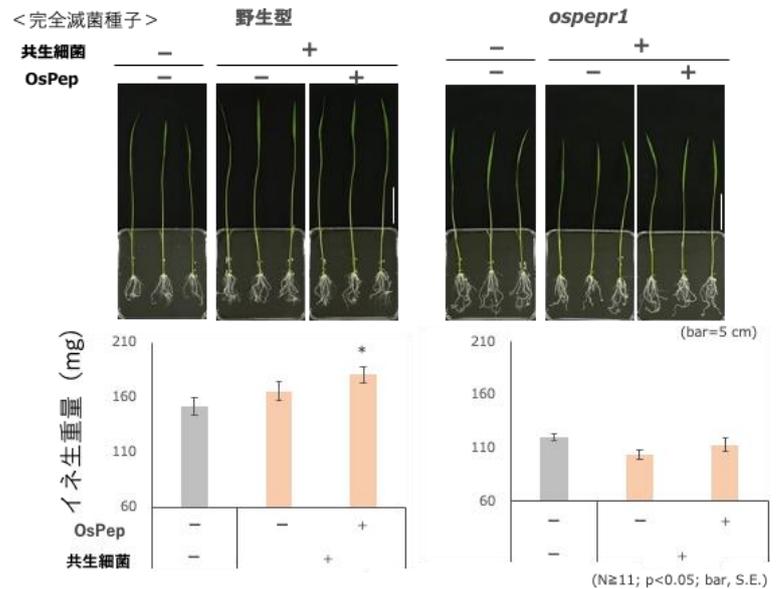


図5 イネのOsPepシグナル経路に依存して、苗の成長促進に働く共生細菌を同定した (*Shingomonas* sp.)。

物叢の制御。2022年3月、第63回日本植物生理学会年会。

- 木戸將太, 西條雄介 他、イネの環境適応に即した共生細菌の同定と機能解析。2022年3月、第63回日本植物生理学会年会。
- 切田澄礼、西條雄介 他、イネの共生制御因子 *CCaMK* を介した共生微生物叢の制御。2022年3月、第63回日本植物生理学会年会。
- Masako Fuji, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo et al. Immunogenic OsPep peptides promote rice growth dependent on root microbes. 2022年3月、第63回日本植物生理学会年会。
- Shunsuke Imai, Yusuke Saijo et al. Machine learning prediction of rice fertilization states and key microbial species in root microbiomes. 2021年3月、第62回日本植物生理学会年会。
- Yusa Aritoshi, Yusuke Saijo et al. Soil nutrient- and developmental state-dependent regulation of rice microbiome in rice. 2021年3月、第62回日本植物生理学会年会。
- Masako Fuji, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo et al. Elicitor-active Pep peptide modulation of root system architecture and root-associated microbiome under phosphate deficiency in rice. 2020年3月、第61回日本植物生理学会年会。
- 藤雅子、西條雄介 他。貧栄養土壌におけるイネ共生微生物叢の実態と機能の解析。2019年9月、日本土壤肥料学会 2019年静岡大会シンポジウム。
- Masako Fuji, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo et al. Damage-associated immunomodulatory OsPep peptides influence root system architecture and root-associated microbiome in rice. 2019年6月、International Symposium on Plant Receptor Kinases and Cell Signaling. 北京、中国。