

研究報告書

「植物－マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研究者: 市橋 泰範

1. 研究のねらい

農業の現場であるフィールドの土壌には、膨大な微生物で構成される生態系・マイクロバイオータが存在する。現在までの実験植物科学では微生物の影響を限りなく排除した環境下での知見が中心であるため、野外フィールドにおける植物の生命現象を包括的に理解し制御することは困難であった。一方で医学の分野においては、ノーベル賞受賞者 Lederberg 博士により、ヒトは真核細胞と原核細胞からなる「超個体」であり、ヒト細胞の機能だけでなく細菌叢の機能を含めた包括的な理解が必要であると提起している。実際に、細菌叢を整えることで疾患の治療に役立つ研究がいくつか報告され始めている。そのため、植物の根圏が地球上で最も微生物の活動が活発な空間であることを考えると、植物とマイクロバイオータとの共生現象の理解は近い将来の植物科学分野において最も重要な分野の一つになると考えられる。

そこで本研究では、植物とマイクロバイオータを一つの超個体として捉える分子生物学的研究を提案することで、従来の実験室での知見から将来的なフィールド研究への橋渡しを目指す。具体的には、植物の網羅的な表現型及び遺伝子発現データに加え、土壌に存在するマイクロバイオータのコミュニティ構成をネットワーク解析により統合し、植物－マイクロバイオータの超個体としての生命活動ネットワーク構造を明らかにする。加えて、本アプローチの大規模展開を見据えて、オミクス解析のハイスループット化を実現する技術開発を行う。さらに、マイクロバイオータによる植物形質デザインを可能とする技術開発も進めることで、植物－マイクロバイオータ超個体の分子生物学の中核基盤を確立することを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず植物－マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を可能とする植物－マイクロバイオータの実験系および解析手法を確立した。農業資材として利用されているマイクロバイオータとトマトの共生効果を実験室内で再現し、超個体のモデルとして解析した。オミクス解析により、植物の根圏環境がマイクロバイオータの多様性を維持し、マイクロバイオータの初期濃度に対して植物が免疫応答性の遺伝子発現の恒常的な変化を引き起こすことを明らかにした。また統合ネットワーク解析から、共生する細菌群に対応して複数の遺伝子転写制御系が植物ゲノムに存在することがわかり、植物－マイクロバイオータの超個体としての生命活動ネットワーク構造の一端を明らかにできた。

また本研究アプローチの有効性を農業現場のフィールドにて検証するため、土作りとして植物と微生物の調和が指摘されている有機農業を対象に解析を行った。その結果、有機農法の一つである太陽熱処理がコマツナの根圏に生息するマイクロバイオータの種類に大きく影響することがわかった。また統合ネットワーク解析から、コマツナ収量に強く関連した根圏微生物お

よび有機態窒素が明らかになり、特定の有機態窒素が栄養源や生理活性物質として収量を増加させることを証明した。本研究は、従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解明されていなかった、自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用がもたらす農作物への効果を明らかにし、有機態窒素を利用した新規農法の技術開発につながる植物栄養学上の新しい発見に至った。

さらに難培養微生物の培養に関して、環境中の細菌群が内包する共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステムを考案した。本システムは、マイクロ流路システムを用いた微小液滴技術と次世代シーケンサーを活用した技術基盤であり、難培養微生物の新規培養技術として本研究分野のブレイクスルーにつながる。期間内で本システムの完成には至っていないが、微小液滴によって細菌を1個体から複数個体での区画化培養、細菌が増殖した液滴をフローサイトメトリーによるソーティング、液滴から次世代シーケンサー解析用のライブラリー作成について個別の技術を整備した。

以上の研究から、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究のモデルケースを示し、本学問分野として必須になる中核基盤の確立に向かって前進できた。

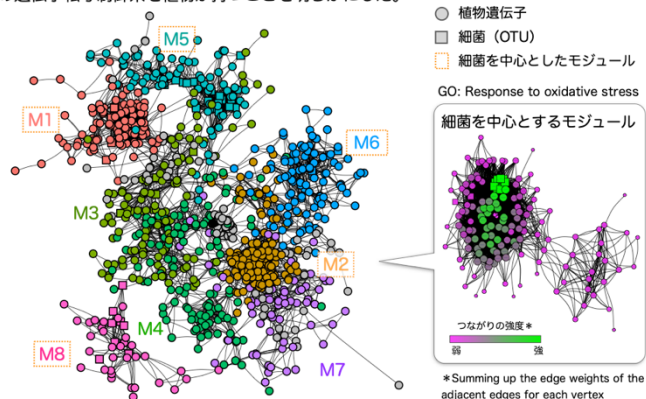
(2) 詳細

研究テーマ A 「植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

本テーマでは、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を可能とする植物-マイクロバイオータの実験系および解析手法を提案して(市橋ら、アグリバイオ、2017)、そのモデルケースとなる研究を実施した。農業資材として利用されているマイクロバイオータを対象として解析を進め、まず優占種が存在しない、150 種以上の様々な門に属するマイクロバイオータであることを確認した。このマイクロバイオータを使ってトマトへの接種実験から、トマトの根圏環境がマイクロバイオータの多様性を維持していることがわかり、トマトの主要な病気である青枯病に対する効果は検出されなかったが、トマトの成長を促進させていることがわかった。加えて、このマイクロバイオータは14種類以上の炭素源に対して代謝活性を持つことがわかった。トランスクリプトーム解析から、植物は接種するマイクロバイオータの初期濃度に対して免疫応答性の遺伝子発現の恒常的な変化を引き起こすことが明らかになった。またトランスクリプトームデータとマイクロバイオームデータの統合ネットワーク解析から、細菌を中心とする植物遺伝子で構成されたモジュールが複数検出され、共生する細菌群に対応して複数の遺伝子転写制御系が植物ゲノムに存在することが明らかになった。以上より、共生関係を築いている植物-マイクロバイオータの超個体を示す制御系として、植物遺伝子と細菌群との相互作用の一端を明らかにできた。

植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明

- 植物-マイクロバイオータの超個体を示す制御系として、共存する細菌に対応する複数の遺伝子転写制御系が植物が持つことを明らかにした。



さらに本アプローチの大規模展開を見据えて、オミクス解析のハイスループット化を実現する技術開発も行ってきた。安価でハイスループットな RNA-seq ライブラリー作成法である BrAD-seq を改良し(Ichihashi *et al.*, *Method in Molecular Biology*, 2018)、本技術を使った共同研究 36 プロジェクト(計 1,505 ライブラリー)を進め、その一部が論文としての成果につながった(Uemura *et al.*, *Plant reproduction*, 2017; Wu *et al.*, *Plant, Cell & Environment*, 2019)。また本技術を、DNA-seq や微生物を対象とした RNA-seq へ応用する技術開発も進め、その一部の成果は特許出願へと進んでいる。さらにネットワーク解析手法についても実績を積むことができた(Ichihashi *et al.*, *Plant and Cell Physiology*, 2018; An and Ichihashi *et al.*, *PLoS ONE*, 2016)。

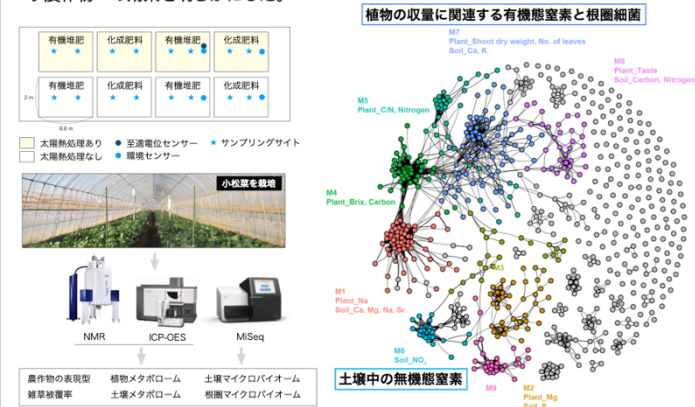
研究テーマ B 「フィールドでの植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

植物とマイクロバイオータを同時に解析対象とする本研究アプローチの有効性を農業現場のフィールドにて検証するため、土作りとして植物と微生物の調和が指摘されている有機農業を対象にマイクロバイオータ解析およびメタボローム解析を行った(日本農業新聞 2017 年 8 月 29 日)。その結果、太陽熱処理が農作物の収量を 1.7 倍に増加させることが明らかになり、さらに翌年も太陽熱処理による成長促進効果が確認された。そのメカニズムを明らかにするため、土壌のメタボローム解析を行った結果、異なる処理による土壌特性が検出されるものの、アンモニア態および硝酸態の無機態窒素は太陽熱処理間で有意な違いはなく、現在の農学分野で主流であるリービッヒの無機栄養説では今回の太陽熱処理による成長促進効果を説明できないことがわかった。興味深いことに、マイクロバイオータ解析から、太陽熱処理は土壌全体の微生物でなく、コマツナの根圏に生息する微生物の種類に大きく影響することがわかった。門レベルでの大きな影響が確認され、デイノコックス・テルムス門やフィルミクテス門が太陽熱処理をした根圏で多くなること、特に植物の成長促進に関与する根圏バクテリアとしてパエニバシラス属とシュードモナス属が太陽熱処理により多くなることがわかった。これらの結果から、有機物と根圏微生物叢の相互作用が太陽熱処理による成長促進効果に関与していることが示唆された。そこで全データの統合したネットワーク解析を行ったところ、個別の比較解析では明らかにできなかった収量に強く相関した有機態窒素や根圏微生物の存在が明らかになった。そこで、検出された有機態窒素が太陽熱処理によって誘導された有機物と根圏微生物叢の相互作用の最終産物として植物の成長を促進させるという仮説を立て

検証実験を行った。その結果、特定の有機態窒素が栄養源や生理活性物質としてコマツナの収量を増加させることを明らかにし、さらにダブルラベルしたアミノ酸を使うことで、コマツナが直接アミノ酸を吸収・代謝していることを証明した。

有機農業園場における植物とマイクロバイオータの動態

- 現代農業を支える理論とは異なる、有機態窒素とマイクロバイオータの相互作用がもたらす農作物への効果を明らかにした。



現在の慣行農法はリービッチの無機栄養説をもとに確立されているが、本研究の結果は、従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解析されていなかった、自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用がもたらす農作物への効果を強く示唆する。過去の研究で実験室レベルでは有機態窒素が植物に吸収されることは実証されているが、本研究により初めてフィールドレベルで有機態窒素が農作物の生育促進に関与していることを実証したケースとなった。本研究の発見から、有機態窒素を利用した新規農法の技術開発につながることを期待される(日本農業新聞 2018 年 3 月 28 日)。

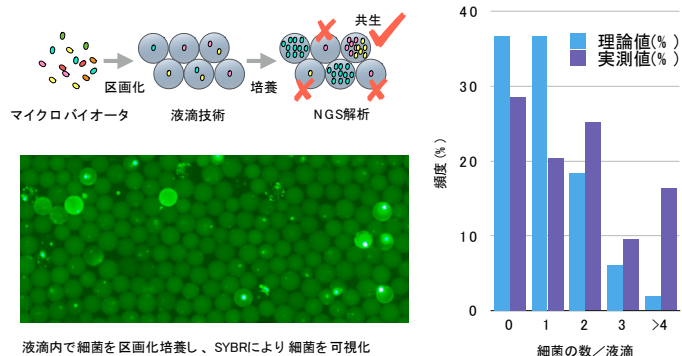
研究テーマ C 「マイクロバイオータによる植物形質デザインを可能とする技術開発」

マイクロバイオータによる植物形質デザインを実現するには、マイクロバイオータを使った検証実験が必要になり、微生物培養が必須となる。一方で、地球上にはおよそ 1 兆種の微生物が存在し、そのうち 99%以上は難培養性である。とくに進化の過程において微生物同士は複雑なネットワークを構築しているため、単独では生存できない共生関係を形成していることが多い。難培養性微生物の培養を可能にするには、個々の微生物間の共生関係を包括的に理解する必要がある。そこで本研究では、環境中の細菌群が内包する共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステムを考案した。具体的には、マイクロ流路システムを用いた微小液滴技術により微小液滴に細菌を 1 個体、もしくは複数個体に区画化し、培養する。液滴同士は物質の交換が無く、同じ液滴内に増殖の条件が揃う場合のみ細菌が増殖する。細菌が増殖した液滴をフローサイトメトリーでソートし、次世代シーケンサーで読み取ることにより、どの細菌がどの細菌と共生関係であるかを伺い知ることができる。現在までに本システムの構築には至っていないが、微小液滴による区画化培養、液滴のソーティング、液滴から次世代シーケンサー解析用のライブラリー作成の個々のプロセスについて技術的に実行可能とした。本システムが完成すれば、共生により培養が可能となる細菌群の組み合わせを網羅的に

解明することができ、難培養微生物の新規培養技術として本研究分野のブレイクスルーにつながる。このような微小液滴技術を使ったマイクロバイオータの培養技術の実現により、微生物の機能を明らかにする検証実験が可能となり植物微生物共分野の理解ひいては農業への応用が期待される(Toju *et al.*, *Nature Plants*, 2018)。

マイクロバイオータの新規培養技術の開発

- ・ マイクロ流路を用いた微小液滴技術と次世代シーケンサーを活用して、共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステム構築を考案した。
* システムの完成には至っていないが、個別の技術を整備した。



3. 今後の展開

本研究では世界にさがけて、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を実験室内及びフィールドにおいて実施し、超個体の制御系の特性を明らかにするとともに、農業分野の技術開発に貢献できる知見を得ることもできた。植物-マイクロバイオータ超個体の分子

生物学をさらに推し進めるため、単離したマイクロバイオータによる検証実験が最も重要な位置付けとなる。そこで今後は、微生物培養技術の開発を中心に進め、より洗練した実験系の確立を目指したい。さらに植物とマイクロバイオータを同時に対象とするフィールドオミクスにより、農業現場における情報整備を大規模に進めることで、研究成果を社会・経済に還元できる研究プロジェクトを開始している。

4. 自己評価

本研究は、アイデア先行で予備結果がない状態で開始したチャレンジングな課題である。そのため研究期間の前半は研究総括をはじめ、アドバイザーの先生、さがけ研究者メンバー、国内外の関連分野の研究者から多くの助言をいただき、多岐にわたる試行錯誤を繰り返して研究を進めた。当初計画していた実験の遂行以前に基盤整備に多くの時間と労力を費やしたが、本研究に参加していただいた研究補助者や学生、また共同研究者からの多大な協力のもと、さがけ研究でサポートされた研究費や研究者交流会を活用することで、最終的には植物－マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究のモデルケースとなるような実験室内およびフィールドでの研究を展開することができ、上述の研究成果を得ることができた。研究成果の論文文化に加えて、オミクス解析の新技术や微生物培養技術の確立まで研究期間内に完了することができなかったのは残念であるが、本研究をもとに 2018 年度から理化学研究所バイオリソース研究センターに新チームを立ち上げる機会をいただき、さらに内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)スマートバイオ産業・農業基盤技術の課題へとつながった。これらは本さがけ研究の発展の機会を与えられたものと自負して、今後の研究に邁進していきたい。

また BrAD-seq 解析のアウトソーシングや技術開発の共同研究を通じて、様々な研究者と交流し、多くの研究課題に触れることで研究者として成長させていただく機会を得た。本さがけ研究を通して、研究アプローチや科学技術の開発ができたことは、本さがけ領域が目指す植物科学における次世代基盤技術の創出に貢献できると考え、今後も技術開発を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Wu J, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K, Yamaguchi N, Ito T. Absciscic acid-dependent histone demethylation during post-germination growth arrest in Arabidopsis. Plant, Cell & Environment. 2019, in press
2. Ichihashi Y*, Fukushima A, Shibata A, Shirasu K. High Impact Gene Discovery: Simple Strand Specific mRNA Library Construction and Differential Regulatory Analysis Based on Gene Co-expression Network. Methods in Molecular Biology. 2018, 1830, 163-189. *Corresponding author.
3. Ichihashi Y*, Kusano M, Kobayashi M, Suetsugu K, Yoshida S, Wakatake T, Kumaishi K, Shibata A, Saito K, Shirasu K*. Transcriptomic and Metabolomic Reprogramming from Roots to Haustoria in the Parasitic Plant, Thesium chinense. Plant and Cell Physiology. 2018, 59(4), 729-738. *Corresponding authors.

4. Uemura A, Yamaguchi N, Xu Y, Wee W, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K, Ito T. Regulation of floral meristem activity through the interaction of AGAMOUS, SUPERMAN, and CLAVATA3 in Arabidopsis. Plant Reproduction. 2018, 31(1), 89–105.
5. An CI*†, Ichihashi Y*†, Peng J, Sinha NR, and Hagiwara N*. Transcriptome Dynamics and Potential Roles of Sox6 in the Postnatal Heart. PLoS ONE, 2016, 11(11), e0166574.
*Corresponding authors, †Equal contribution.

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K, Kiers ET, Core microbiomes for sustainable agroecosystems. Nature Plants. 2018, 4, 247–257.
2. 市橋 泰範, 石垣 祐二, 白須 賢. 植物と根圏微生物叢との相互作用. アグリバイオ. 2017 年 9 月号.
3. 「有機農業の土壌・作物 科学的に効果解明へ」日本農業新聞 2017 年 8 月 29 日
4. 「太陽熱処理後の作物生育 有機態窒素増が関与」日本農業新聞 2018 年 3 月 28 日