

研究報告書

「頑健な植物共生システム的设计に向けた「コア共生微生物」探索技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 東樹 宏和

1. 研究のねらい

土壌中には様々な細菌や真菌が生息しており、植物に土壌養分(窒素・リン)を供給するとともに、病原生物や環境ストレスから植物を保護している。野外環境における植物の健全な生育には、こうした「微生物叢」の機能が欠かせない。

根内共生真菌を対象としたこれまでの研究から、これまであまり研究対象となつてこなかった「内生菌」とよばれる菌類が、「コア微生物」として共生叢全体の動態を制御している可能性が浮上してきた。こうした内生菌の中には、菌根菌と植物体内で頻繁に同居するものが存在する。内生菌のほうが菌根菌よりも感染率が高い一般的傾向が見出されること、また、菌根菌単独の接種による菌根共生が一般的に不安定であることを考慮すると、これまで機能未知とされてきた内生菌の「隠れた」働きに光をあてることができる。

内生菌がコア微生物であることが一般的であるとすれば、応用科学分野への影響は計り知れない。菌根菌であるマツタケの栽培が難しいことに代表されるように、菌根共生を人為的に制御するのは極めて困難である。しかし、植物と菌根菌の関係を内生菌がコア共生微生物として仲介しているのであれば、菌根菌の利用技術が一挙に発展すると期待される。菌根菌と違い、内生菌には培養が容易なものが多い。そのため、植物と共生させたい菌根菌と親和性の高い内生菌系統を植物の種子や実生に感染させることで、植物の健康状態を生涯にわたって維持できる可能性がある。

本研究プロジェクトでは、自然生態系や農業生態系における野外調査、生物叢分析、および理論生態学的なビッグデータ分析を融合し、コア微生物を特定する技術の開発と日本列島におけるコア微生物のリスト作成を行う。さらに、コア微生物の候補として浮上した菌種について、植物種苗への接種試験を実施し、実際の効果を検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

日本列島全域の様々な生態系を対象に、数百・数千の植物根サンプルを採集する野外調査を実施するとともに、DNA メタバーコーディング (amplicon sequencing) によって得られた膨大なデータを基に生物間の関係性を探索する新手法を開発し、「地下共生ネットワーク」の全体像を解明した(図1)。その結果、森林・草原において生態系の要となる内生真菌 (*Cladophialophora chaetospora* 等)を見出すことができた。

こうした内生真菌は、無数の微生物種で構成されるシステム全体を安定化している可能性がある。そこで、内生真菌を利用して機能と頑健性を高めた「コア微生物叢」を設計する技術を開発した。中核として埋め込む微生物叢によって、野外環境下における生物/非生物ストレスに対する植物の抵抗性を高める基盤となる技術である。この「コア微生物叢が『鎧』と

なって植物を護る」戦略により、ストレス耐性と資源利用効率が高い農業を目指した新たな科学的アプローチを提案した。

従来、植物共生微生物に関する研究は、少数種の植物や菌に対象を絞って行われてきた。しかし、生態系レベルで起こり得る現象を予測・制御するためには、「全体像を一挙に解明した上で中核(コア)種を見出す」アプローチが必要である。さらに、コア種を最適配置して微生物叢を設計する構成的な科学領域を創成することで、食糧問題という人類共通の課題に新たな解決の糸口を提供できるであろう。

開発してきた一連の生物叢分析技術に関しては、植物や微生物以外にも適用が可能で、様々な生物に応用範囲を広げている。農業分野以外からの問い合わせも多く、食品・医療・環境ビジネスといった様々な産業領域の関係者および企業と研究協力体制を築いてきた。日本が主導権を握る新たな研究領域として、技術基盤の開発を今後も進めていきたい。

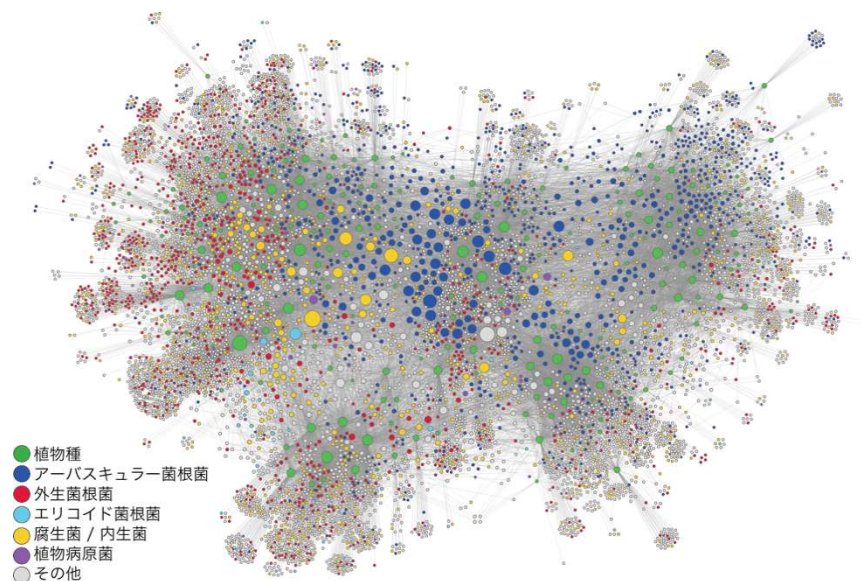


図 1. 150 種の植物と 8080 種の真菌で構成されるネットワーク。北海道から沖縄で行った微生物資源の調査に基づき、どの植物からどの真菌が検出されるかを網羅的に分析。(Toju et al. 2018 *Microbiome*)

(2) 詳細

課題 1. 「共生叢タイプ」と「コア共生微生物」にみられる一般則

北海道から沖縄までの多様な自然生態系・農業生態系で野外調査を行い、総計 400 種以上の植物について根や葉、根圏土壤に生息する細菌/真菌類の群集構造を解明した(図 2)。こうした地道な研究により、北日本および南日本のそれぞれにおいて、宿主植物の範囲が極めて広い内生菌をスクリーニングすることができた(図 1)。こうした菌類のなかには、各種野菜を始めとする草本作物種だけでなく、木本植物種にも共生できるものが含まれ、農林業の幅広い領域に応用が見込まれる。

また、こうしたスクリーニング研究を農地に適用した研究では、ダイズ根こぶ線虫を捕食する 5 種の菌類からなる「コンソーシアム」を発見した(図 3)。根こぶ線虫は、臭化メチルやクロロピクリンを用いた土壤消毒でも完全に封じ込めることができず、化学農薬への規制が EU

圏で強まる中、農業生産における主要なリスクファクターになりつつある。微生物多様性解析やネットワーク科学の融合で得られた上記成果は、微生物叢の制御による防除への第一歩となるものである。その他にも、作物品種間の微生物叢の違いや、農地管理法によって生じる微生物叢の違いに関する分析を行った(図 2 右)。膨大なデータを俯瞰したところ、一般的に、細菌叢よりも真菌叢において、農法や作物品種間による影響が顕著に現れることが明らかになった。

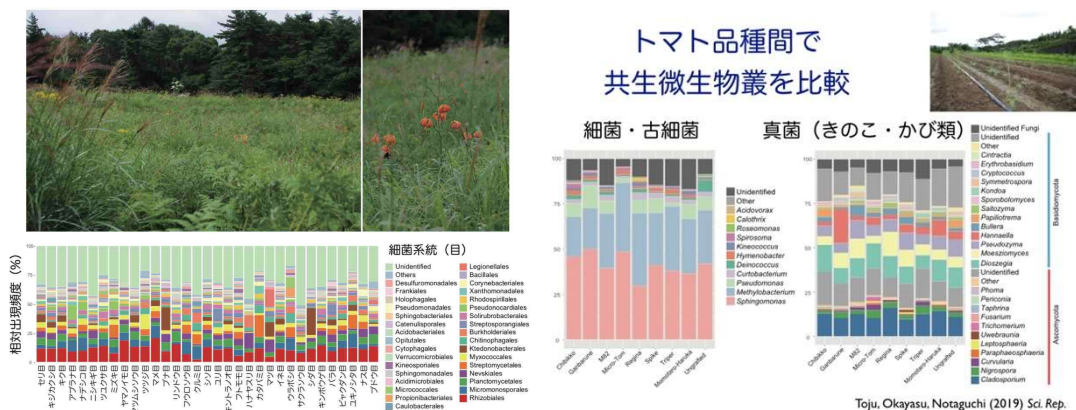


図 2. 草原生態系における植物 33 目 137 種に共生する細菌・真菌類のスクリーニング研究(左)と農業生態系におけるトマト接ぎ木品種間の微生物叢の比較(右)。Toju et al. 2019 *Frontiers in Microbiology* および Toju et al. 2019 *Sci Rep*.

化学農薬でも抑制しきれない線虫被害 - 微生物叢による制御に向けて -

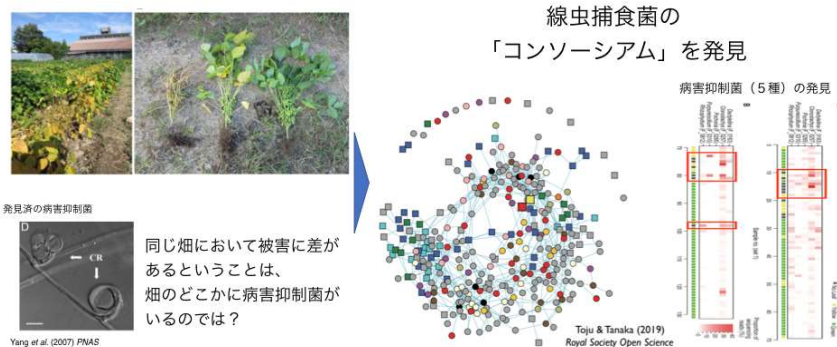


図 3. 根こぶ線虫を捕食・抑制する微生物コンソーシアムの解明。Toju & Tanaka 2019 *Royal Soc Open Sci*.

課題 2. 植物種を超えて適用できる「コア共生微生物」探索のインフォマティクス

これまでの生命科学では、遺伝子という単位の組み合わせによってゲノムをデザインし、生物機能を最適化するアプローチが主流であった。一方で、生物の群集構造に関する情報を大量に得ることができるようになった現在、「生物種を単位として、生物叢のレベルで機能や安定性を最適化する」新しい科学的アプローチを開拓することが可能となりつつある。微生物叢レベルにおける機能と安定性を最適化する戦略について提案し、その中核技術を

Nature Plants 誌で発表した(図 4)。微生物間の関係性を示す共起ネットワーク(co-occurrence networks)内において、それぞれの微生物種が持つ特性(窒素固定能や病原性)を考慮し、1) 機能的な土壌微生物をリクルートする役割、2) 植物体への病原生物の侵入阻止、3)微生物同士の相性、の 3 点で、種苗に予め接種すべきコア微生物を探索する数学的指標を構築した。この成果は、Web of Science における被引用上位 0.1% hot paper に認定された(animal & plant science 部門)。

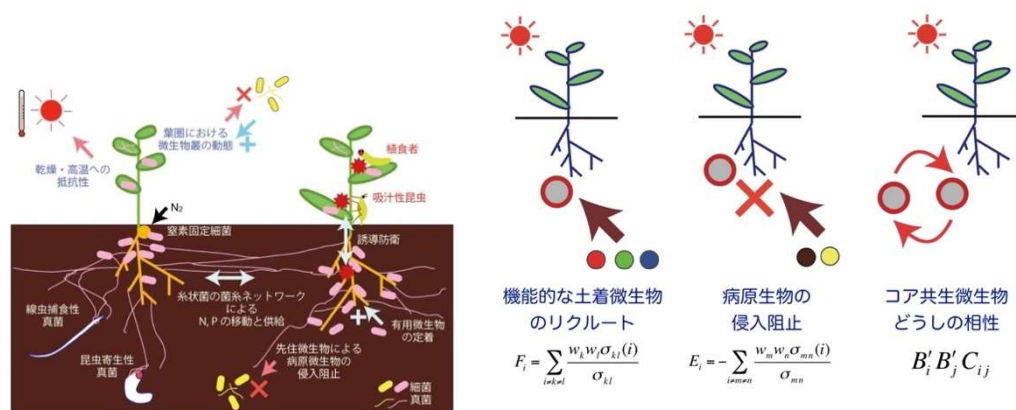


図 4. 「コア微生物叢」を設計するための 3 つの基準とその指標。Toju *et al.* 2018 *Nature plants*。

課題 3. コア共生微生物の接種をつうじた農地生態系の管理基礎技術

日本各地の様々な生態系から、菌類資源の収集を進め、3000 菌株のコレクションを作成した。この中から、課題 1 と課題 2 によって「コア微生物」と推定されたものを選び出し、植物体への接種試験を実施した。

その結果、上記で開発した微生物種の評価指標によって、植物の生育を大きく促進する内生真菌を実際にスクリーニングできることが明らかになった(図 5)。また、農地土壌の微生物叢に関するデータに同様の分析技術を適用したところ、土壌真菌についても、作物種の枠を越えて成長を促進する種を特定できることが判明した。さらに、複数微生物種の組み合わせに関する接種試験を実施し、植物の生育を促進する種の組み合わせを見出した。

以上により、野外調査・DNA メタバーコーディング・理論生態学的解析・接種試験を組み合わせた新しいアプローチにより、迅速かつ効率的に農業上有望な菌のスクリーニングを行えることを示すことができた。



図 5. データベース内から選定した菌種を接種したトマト(右)と接種していないトマト(左)。

3. 今後の展開

本研究プロジェクトにより、以下の研究資源を蓄積することができた。

- 日本列島全域を対象とした、植物共生微生物叢および土壌微生物叢のデータベース
- 膨大な微生物種のリストの中から、農業上有望なものを絞り込む技術
- 機能をカスタマイズした微生物叢を設計する技術
- 特殊な植物内生菌や土壌菌の菌株コレクション(3000 菌株)
- 微生物の高効率接種試験システム
- 複雑微生物叢の動態予測システム

本さがけプロジェクトでは、膨大な微生物資源のなかから有望なものを効率的に絞り込む技術の開発に集中したが、今後はその例となる微生物種について、de novo ゲノム解読や RNA-seq 等の遺伝子発現解析を進め、生理学的な機能を詳細に解明していきたい。そうした知見を蓄積することで、生態系の中で中核的な役割を演じる微生物種に共通した特徴が浮かび上がってくると期待される。

様々な産業分野の企業から、共同研究契約や学術指導契約の締結依頼を受けるようになってきたため、応用研究と基礎研究をフィードバックさせ、開発を加速していきたい。

4. 自己評価

本プロジェクトでは、野外(フィールド)環境における泥臭い調査や各種技術の開発、接種試験による検証と、広範な領域を個人研究として展開しなければならなかったため、非常に慌ただしいプロジェクトであった。加えて、微生物叢という、科学的な取り扱いがまだ固まっていない研究対象を扱う新領域であったため、アドバイザーの要求も厳しく、理解を得るのが難しい局面もあった。最終的に、さまざまな産業分野の企業から引き合いがある技術体系の核を構築することができ、基礎科学における革新と応用科学への展開の両面において、成果を上げることができたと自負している。研究業績としても、12 報の論文を出版し、Web of Science 高被引用文献(上位 0.1%)も出すことができた。

フィールド植物制御だけでなく、さがけ交流会などを通じて、さまざまな分野の研究者との交流ネットワークを構築することもでき、総じて、生産性の高い 3 年半であった。今後は、さらなる基礎科学における革新を目指しつつ、応用分野における科学者としての責任を果たせるよう、アカデミア・産業界双方のネットワークをつなげる活動を展開していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. 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. (2018) Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nature Plants* 4:247–257
2. Toju H, Tanabe AS, Sato H (2018) Network hubs in root-associated fungal metacommunities. *Microbiome* 6:116
3. Toju H, Kurokawa H, Kenta T (2019) Factors influencing leaf- and root-associated communities of bacteria and fungi across 33 plant orders in a grassland. *Frontiers in Microbiology* 10:241
4. Toju H, Tanaka Y (2019) Consortia of anti-nematode fungi and bacteria in the rhizosphere

of soybean plants attacked by root-knot nematodes. Royal Society Open Science 6:181693

5. Kadowaki K, Yamamoto S, Sato H, Tanabe AS, Hidaka A, Toju H (2018) Mycorrhizal fungi mediate the direction and strength of plant-soil feedbacks differently between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal communities. Communications Biology 1:196

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(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. 「日本列島の多様な菌から農業利用可能なものを選別
～植物150種と真菌8,080系統からなる巨大ネットワーク・データ～」
京都大学・JST 共同プレスリリース (2018 年 6 月 26 日)
2. 「微生物界の「キーパーソン」を農業に役立てる」JST News 2018 年 9 月号
3. 東樹宏和. 「複雑微生物叢の制御は可能か?」. 2019 年度発酵と代謝研究会第1回勉強会. 2019 年 7 月 12 日. 一般財団法人バイオインダストリー協会. 【招待講演】
4. 東樹宏和. 「複雑微生物叢を設計・制御する;「コア微生物叢」の組み立て」. シンポジウム「次世代のバイオプロセスを拓く複合微生物系精密制御技術」. 第 71 回日本生物工学会. 岡山大学. 【招待講演】
5. 東樹宏和. 「大規模ネットワーク分析による菌叢動態の解明と制御」. シンポジウム「植物微生物研究で共創する未来」. 第 33 回日本微生物生態学会. 山梨大学. 【招待講演】