

# 研 究 報 告 書

## 「共生微生物群の機能解析とその活用による植物生長促進技術の開発」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者： 晝間 敬

### 1. 研究のねらい

植物は無数の微生物群と相互作用しており、植物の環境適応に不可欠な役割を担っていることが徐々に明らかになってきている。一方で、これまでにそのメカニズムに関するある一定の知見が得られている共生微生物はむしろ特殊な共進化を経た全体から見ると例外的な微生物であるのに対して、宿主植物と相互作用するその他大多数を占める微生物群の潜在的な機能に関する知見は依然極めて乏しい。また、共生微生物の多くは病原（寄生）菌とも近縁であり、その潜在的な寄生性を発揮させないように活用することが重要となってくるが、そもそも共生や寄生を規定し両者を区別する分子メカニズムは個別論で見ても明らかではないのが現状である。さらに、分子メカニズム解明に適した一部モデル共生微生物についても、そのほとんどは他の微生物を極力除外し、周辺環境が制御された実験室条件で行われていることから、周辺環境がしばしば予測不可能な形で変動し、かつ、他の無数の土壌・根圏微生物叢と共存・競合する必要があるフィールドでの共生微生物の振る舞い、および、それを支える仕組みは明らかになっていない。

研究者は、これまでにモデル植物シロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物の根に無病徴感染し、リン欠乏環境においては自身の菌糸を介してリンを宿主植物へと提供することで植物の生長を促す共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) を発見している (Hiruma et al., 2016)。本研究開始前に、特定の土壌においては、土壌微生物を滅菌した区と比較して、滅菌していない区において *Ct* による植物生長促進効果（共生効果）がむしろより顕著に認められることを発見した。このことから、*Ct* と土壌・根圏微生物叢が協調的に相互作用することにより、微生物叢による共生効果がさらに促進あるいは安定化される可能性が考えられた。一方で、土壌のタイプによっては、無滅菌時に *Ct* 接種によって植物生長が阻害されるケースもあったことから、土壌・根圏微生物は協調的に働く場合もあれば、負の影響を与える場合もあることが示唆された。そこで、研究者が整備した本実験系を用いることにより、土壌・根圏微生物間の複雑な相互作用から生み出される植物に対する正負の感染効果の背景について理解を深められることが期待された。

以上の背景のもと、本研究においては、*Ct* とアブラナ科植物（シロイヌナズナおよび野菜）をモデルとして、豊富な土壌微生物が存在するフィールド環境で、共生糸状菌と土壌・根圏微生物叢との協調的もしくは競合的な相互作用を可視化することをまず目指した。次に、微生物叢と植物との間の複雑な相互作用の結果生み出された、植物に対する共生効果に着目して制御実験環境でその効果を再構築することを目指した。さらに、様々なフィールド環境で単離された多彩な感染様式を持つ *Ct* 株の比較機能解析を元に、植物感染共生糸状菌の感染戦略を支える分子基盤の理解を深めることを目指した。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では、共生糸状菌 *Ct* と他の微生物叢の相互作用が植物との共生関係に与える影響を調査することを目的とした。

第一に、フィールドでの接種試験に最適な *Ct* 株の単離同定を目指し、その結果、Hiruma et al., 2016 で用いた *Ct* スペイン株と同等以上の共生効果を実験室条件で発揮する日本由来の *Ct* 株の同定に成功した。

第二に、同定した *Ct* 日本株を用いてフィールド試験を複数回行ったところ、*Ct* 株は人工肥料を加えていない処理区においてコマツナなどの生長を著しく促すことを発見した。興味深いことに、*Ct* 株による植物生長促進効果が認められた際には、土壤中の可溶性窒素が不足していた一方で、可溶性リン酸は豊富に存在していたことから、*Ct* 株はリン欠乏条件に加えて窒素枯渇条件でも植物生長を促すことができることが考えられた。

第三に、*Ct* 接種が他の根圏微生物叢の構成に与える影響についてメタゲノム解析などを通じて調査した。その結果、*Ct* 感染によって、根圏細菌叢の構成が有意に変化した。共生効果が顕著に発揮される条件では根圏細菌の構成が特に顕著に変化した。以上のことから、*Ct* は共生効果発揮時に特定のタイプの細菌を根圏に誘引することが示唆された。

第四に、*Ct* によって誘引されるタイプの細菌群の詳細な解析を行うため、*Ct* 感染時の根から細菌を単離した。*Ct* 感染時の根から複数回の試験で共通して単離された 10 種類の細菌群および 1 種類の酵母に着目して、それらを混合した人工微生物集団によるリン欠乏条件および窒素欠乏条件での植物生長への影響を調査した。その結果、人工微生物集団接種はリン欠乏条件においては植物生長を著しく阻害したのに対して、窒素欠乏条件では植物生長に寄与した。さらに、*Ct* を同時に接種することによって、リン欠乏条件で人工微生物集団が引き起こす植物生長阻害をキャンセルするだけでなく、窒素欠乏条件では人工微生物集団と協調的に植物生長を促すことが判明した。以上のことをふまえると、フィールド環境下で *Ct* 接種時に認められた植物生長促進効果の背景には、糸状菌と細菌叢との間の協調的な相互作用が存在していることが考えられた。

最後に、フィールド環境で単離された *Ct* 寄生株と *Ct* 共生株の比較機能解析を行った。その結果、共生株との相互作用に必要な新規の宿主因子の同定に成功した。さらに、寄生株が植物ホルモンであるアブシシン酸および関連二次代謝物を活用することでその病原性を発揮していることを発見した。

### (2) 詳細

研究テーマ A「フィールド環境での *Ct* による植物生長促進を支える機構について制御環境（実験室）で紐解く」

フィールド試験を行うためには、海外産の *Ct* 株は使用できないという制約があった。そこで、研究者は、第一に、フィールド環境での試験が可能な日本産 *Ct* の中から、スペイン産 *Ct* と同等以上の共生効果を制御実験環境で発揮する株の同定を目指した。複数のアブラナ科植物に対する植物生長促進効果の程度や、感染時に宿主植物の遺伝子発現応答に与える影響を調査した結果、*Ct4* がスペイン株と同等以上の共生効果をシロイヌナズナやコマツナ

などの複数のアブラナ科野菜に対して示すことが明らかになった。一方で、興味深いことに、*Ct3* は同一条件で植物の生長を著しく阻害した(後述)。また、同時に *Ct* と類似した機能を持つ菌株の単離を目指す目的で、貧栄養なフィールドで生育させたアブラナ科野菜から糸状菌を数百種類単離した。その結果、宿主根圏で特異的に起こる近縁の病原菌との競争を通じて、植物を病原菌から守る *Colletotrichum fructicola* を新たに発見した。一方で、*Ct4* と同等以上にリン欠乏条件で植物生長を促す糸状菌は単離されなかったことから、以降のフィールド試験は *Ct4* に絞って進めることにした。

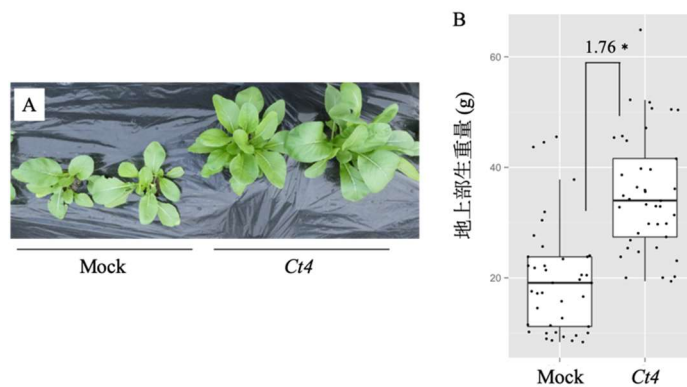


図1. 共生菌*Ct4*によるフィールド環境における植物生長促進効果  
A., *Ct4*接種の有無による植物地上部サイズの比較  
B., *Ct4*接種の有無による植物地上部生重量の比較 グラフ内の数字(1.76)は*Ct4*/Mockの比を示す。\* ( $p < 0.01$ )

フィールド試験は *Ct4* に絞って進めることにした。

第二に、フィールド環境で共生菌 *Ct4* の効果を調査するために、奈良先端科学技術大学院大学の実験圃場にて異なる季節でのフィールドでの微生物接種試験を行った。その結果、人工肥料を投与していない実験区において、*Ct4* がコマツナなどのアブラナ科野菜の植物生長を著しく促すことを 2

年連続の秋と冬の両方の季節で見出した(図 1)。制御実験系と比較してフィールド環境での植物生長促進効果の方がむしろ顕著であった。一方で、人工肥料を(過剰に)添加した区では顕著な植物生長促進効果が認められなかった。以上から、*Ct* 活用のためには、用いる肥料の質・量を検証していく必要性もあることが同時に判明した。

第三に、*Ct* がフィールド環境および実験室環境で植物生長促進効果を示す際に根圏細菌群の多様性を高める形で微生物叢の構成を変化させることを、メタゲノム解析などを通じて発見した。一方で、根圏糸状菌の構成は *Ct* の感染の有無で有意に変化しなかった。したがって、*Ct* が何らかの仕組みで特定のタイプの細菌叢を根圏に誘因していることが示唆された。

第四に、*Ct* 感染時に顕著に根圏に存在し、貧栄養環境にも適応した細菌群を単離した。次に、単離した 10 種類の細菌群および 1 種類の酵母と *Ct* を無菌環境で植物に共接種した(再構築実験)。その結果、リン欠乏条件では、細菌群による植物生長への負の影響を *Ct* がキャンセルした。一方で、可溶性窒素が枯渇した条件では細菌群と共同で植物の生長を促すことを発見した(図 2)。秋から冬において、実験に用いたフィールドの土壌には、人工肥料を 5 年以上加えていないにもかかわらず可溶性リン酸は十分量存在した一方で、可溶性窒素が不足してい

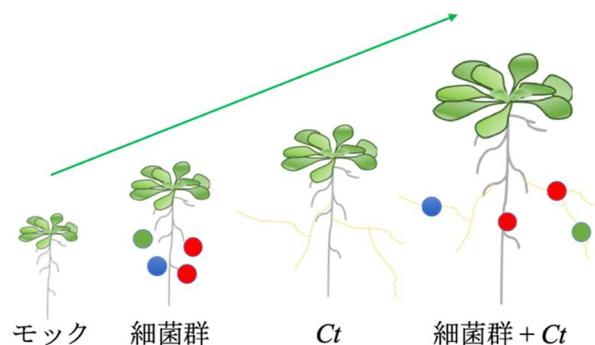


図2. 窒素欠乏条件における共生糸状菌*Ct*と細菌群による協調的な植物生長促進

たことが土壌分析から判明している。さらに、複数回の試験で土壌中の可溶性窒素の量と *Ct* 接種による植物成長促進の程度の間にも高い負の相関性が認められた。したがって、フィールド環境で *Ct* 接種時に観察された植物生長促進は、可溶性窒素が枯渇した条件での糸状菌と細菌群の共同作業によってもたらされていたことが示唆された。さらに、興味深いことに、シロイヌナズナの遺伝背景の違いによって共生効果がさらに強化され安定的に検出されることを発見しており、宿主植物による制御が、その共生機能を発揮させるために必要であることがうかがえた。

本研究により、実験室環境で植物微生物の共生系のモデルとして提唱した共生糸状菌がフィールド環境でむしろより効果的に働く場合があることを実証することができた。また、フィールド環境での発見を基に、共生糸状菌とパートナーと考えられる細菌叢が協調的に働くことで植物生長を促す事実およびその潜在的なメカニズムを再現可能な形で検証することが可能な実験系を構築することが出来た。さらには、植物への共生効果の発揮に協調的に働く微生物間の関係を明らかにしただけではなく、土壌・根圏微生物叢と根圏で競合することで植物の健康を保つ新たな共生糸状菌も発見した。微生物叢を現場で安定的に活用していくためには様々な角度からの検証が必要であるが、その検証に最適な人工微生物叢のモデル系を発見し整備できたと考えている。

#### 研究テーマ B「共生から寄生と対照的な感染様式を示す *Ct* 菌株間での比較機能解析」

ゲノム情報の相違点が多くなる近縁種間の比較解析を行うよりも、同種でありながら、対照的な感染戦略を有する *Ct* 菌を比較解析することで効率よく共生・寄生に必要な因子を絞り込めると考えた(図 3, Hiruma et al., 2018)。そこで、上述した、共生から寄生と対照的な感染効果をシロイヌナズナに対して示す *Ct* 株の全ゲノム情報を新たに取得した。次に、得られたゲノム情報を活用した比較ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。植物側の遺伝子発現変動を調査した結果、感染初期に共生型と寄生型間で顕著な遺伝子発現応答の違いが認められたことから、共生・寄生の感染様式の決定はその初期段階で行われていることが考えられた。次に、本研究で取得した菌の全ゲノム情報を用いて菌側のトランスクリプトーム解析を行ったところ、共生型・寄生型が共通して有する菌ゲノム上の同一クラスターに座乗する毒素およびアブシジン酸 (ABA) 合成に関わる遺伝子群を、寄生型 *Ct* だけがその植物感染初期に活性化させることを見出した。毒素合成や ABA 合成に関わる遺伝子群が寄生型 *Ct* の宿主感染および寄生型 *Ct* による生長阻害効果の発揮に実際に必要であることを、合成経路内の複数の遺伝子を欠損させた菌変異体を用いた遺伝学的解析から証明した。植物感染微生物が植物ホルモンを産生する例はこれまでに報告されているものの、ジベレリンなど、ごく数例を除いてはその宿主感染時の役割は明らかになっていない。微生物による ABA 合成に関しては、40 年以上前から一部の植物感染糸状菌で知られていたが、その植物感染時における機能は全く不明であった。本研究により、菌由来の ABA が果たす感染時における役割の一端を明らかにできたと考えている。また、菌が合成する ABA は植物が合成する ABA と構造が同一であるため、宿主植物の保存された ABA 経路をターゲットとすることが考えられる。実際に ABA 関連経路に異常を持つシロイヌナズナ変異体においては寄生型 *Ct* 菌による寄生効果が有意に低下する。植物の広く保存された経路をターゲッ

トとした菌による宿主植物応答の攪乱行動は植物によって打破されにくいと考えられ、菌が ABA を用いることは理にかなった感染戦略であるように見える。しかしながら、*Colletotrichum* 属間および近縁の属菌間での比較ゲノム解析により、実際には ABA 合成酵素遺伝子群を持つ菌株はむしろ稀であることが判明している。今後、植物感染微生物が ABA などの植物ホルモン合成能を獲得した進化的な起源を明らかにすることに加えて、植

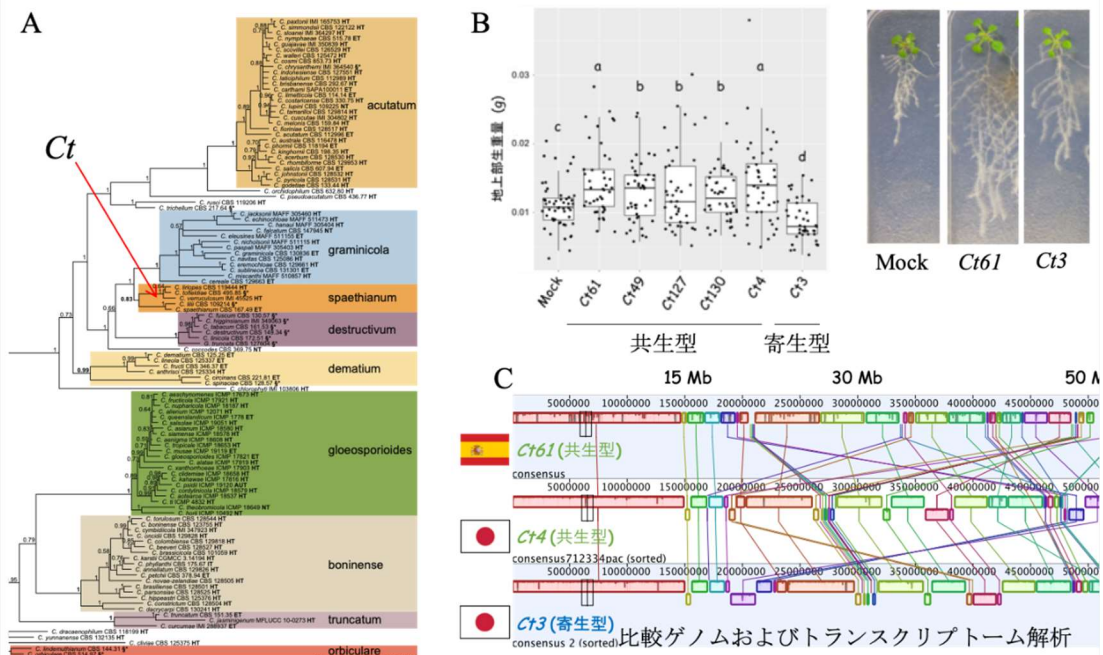


図3. 多彩な*Colletotrichum*属菌を活用した比較機能解析

- A. *Colletotrichum*属菌の系統樹 様々な菌株(15種類)をすでにテストしており、共生型から寄生型へと幅広い感染戦略を示すことを確認している  
 B. リン欠乏条件において*Ct*株間での植物生長に与える影響の調査  
 C. 共生型と寄生型*Ct*間での比較ゲノム解析の一例

物ホルモン合成を植物感染微生物が行うことのメリット・デメリットを多面的に明らかにしていく必要性があろう。最後に、共生型 *Ct* がその感染後期に特異的に誘導する植物遺伝子群に着目したところ、これまでその機能に関する解析が行われていない植物の高親和性リン酸トランスポーターが皮層細胞内の *Ct* 菌糸の周りに集積すること、および、*Ct* を介した植物地上部のリン蓄積および *Ct* による植物生長促進効果の発揮に必要であることを発見した。まとめると、寄生菌 *Ct* による寄生性発揮機構に加えて、共生菌 *Ct* による共生効果発揮機構の一端を明らかにした。

### 3. 今後の展開

今回、糸状菌と複数の細菌からなる人工微生物集団が窒素欠乏環境で植物の生長を著しく促進することを実験室環境とフィールド環境の双方で見出した。一方で、接種された植物個体の中には微生物集団による植物生長をうまく享受できない個体もある一定頻度で存在しており、それら個体では細菌の過剰増殖が起こっていることを示唆する結果を得ている。また、宿主の遺伝学的背景に応じて、共生に失敗したと考えられる植物個体が有意に減少し、植物が受ける

共生効果がさらに高まることから、人工微生物集団が宿主によって積極的に制御されている可能性を示唆する。今後は、異なるタイプの微生物群が根圏で集団を形成し、特定の共生効果を植物に発揮する仕組みを、その一つ一つのステップに切り分け、それぞれのメカニズムを詳細に解析する必要があると考えている。そのためには一細胞レベルでの菌および植物応答のイメージング解析や数理生物学の知見も積極的に取り入れていく必要があると考えている。また、同時に、得られた人工微生物集団を活用して様々なフィールド環境での接種試験も産業界も含めて協力して行うことで、人工微生物集団による共生効果発揮機構を理解するための基礎知見が得られるだけでなく、微生物を資材として活用するためのノウハウが蓄積されることが期待される

今回、*Ct* 株間での比較解析により、新たな植物・菌因子の発見につながった。今後は、*Ct* 株間での比較解析に加えて、近縁の *Colletotrichum* 属の糸状菌にも比較解析を広げ、共生・寄生に関与する植物・菌因子を網羅的に単離していきたい。共生・寄生と一口で言っても、それぞれの実際の感染様式は実に多彩であることから、異なる植物経路をターゲットとする新たな菌因子や環境適応に必須な新規植物因子を多数同定できると期待している。実際に、上記で報告した成果に加えて、共生菌 *Ct* によるリン欠乏における植物成長促進効果に植物の鉄欠乏応答トランスポーターである IRT1 およびマスター転写因子 FIT が必要であること、および、これら鉄欠乏関連因子が上述の高親和性リン酸トランスポーターなどの *Ct* 共生に必要な遺伝子群の転写を *Ct* 感染時特異的に制御することを見出している。さらには、これまでに得られた共生時に顕著に誘導される植物因子を目印とした順遺伝学的なアプローチも同時に組み合わせて解析したい。

#### 4. 自己評価

本研究では、窒素枯渇条件において複数の種類の異なる微生物(微生物叢)が協調的に植物生長を促すことをフィールド環境で発見しただけでなく、その効果を再現可能な実験系を実験室環境で構築することに成功した。ほとんどの植物微生物叢の先行・類似研究がいまだに、特定の植物種の微生物のカタログ化や、微生物叢の構成を制御する宿主基盤の探索にとどまっていることを踏まえると、微生物叢としての有用機能の一つを発見した意味で本研究は大きな前進であると考えている。特に、今回は共生糸状菌(カビ)が共生微生物叢形成に決定的な役割を担っていることから、糸状菌研究が細菌と比べて技術的に困難であるという理由で細菌叢研究に集中している現在の植物微生物叢の研究トレンドに一石を投じる成果だとも考えている。また、以上の成果は、さきがけ研究開始時に想定していたリン欠乏環境を想定するだけではもたらされず、フィールド環境での共生微生物と植物の相互作用関係を理解したいというモチベーションがきっかけとなって明らかにされた。以上からも、本さきがけ領域での目的の一つであるフィールド環境での植物研究の重要性をある程度示すことが出来たと考えている。

さらに、同じくフィールド環境で単離された *Ct* 菌株間での比較解析を切り口として、シロイヌナズナを活用できるため比較的容易である植物側の基盤だけではなく、菌の寄生性感染戦略を支える想定外の菌側因子の同定にまで到達できた点は目的以上の成果だと考えている。以上の研究成果は、現在投稿準備中であり専門研究領域の内外にインパクトを与える内容として報告すべく最善を尽くす。

雇用した技術補佐員の方は微生物接種の条件検討をフィールド・制御環境双方で行う本研

究に合致した適性・技術・経験を有しており研究推進に大いに貢献された。一方で、実験室内だけではなくフィールドでの研究を最速で行っていくためには、研究協力者の人員が足りていなかった。適切な人員を適切なタイミングで本体制に組み込めなかった点については反省し今後改善していきたい。

社会・経済への波及効果については、共生微生物群を圃場環境で適応していくためにヒントとなるデータが得られた。一方で、今回の研究の中で、過剰な人工肥料を加えた場合は、*Ct* 接種による共生効果が確認されないなど、産業革命以降の既存の農業システムと統合していく上で課題も見えてきた。これらの問題は研究者個人では解決していくことには限界があるため、今後は産業界も含む様々な異分野の研究者とも共同で解決していきたい。さらには、植物を加工するためや植物に付加価値を付加するために微生物を活用する使用法の例も本研究を通じて見えてきた。加工および付加価値を付与するアプローチはそのターゲットが比較的明確であり想定される変数もフィールドでの微生物利用を目指す場合と比較して少ないことが予想されることから、実際の社会実装までの距離がより近いかもしれない。以上、微生物利用の促進に向けて課題は山積みではあるが、本研究は、実社会への研究成果の還元を目指す方向性においても、大きな一歩であったと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Shinya T, Yasuda S, Hyodo K, Tani R, Hojo Y, Fujiwara Y, Hiruma K, Ishizaki T, Fujita Y, Saijo Y and Ivan G (2018). Integration of danger peptide signals with HAMP signaling amplifies the anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J* 94, 626–637.
2. Okamoto-Yoshiyama K, Aoshima N, Takahashi N, Sakamoto T, Hiruma K, Saijo Y, Hidema J, Umeda M, Kimura S (2020). *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1* acts as a regulator coordinating crosstalk between DNA damage response and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 103, 321–340.

### (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. \*Hiruma K, Kobae Y and Toju H (2018). Beneficial associations between Brassicaceae plants and fungal endophytes under nutrient-limiting conditions: evolutionary origins and host-symbiont molecular mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 44:145–154. (総説) \* 責任著者
2. \*Hiruma K (2019). Roles of plant-derived secondary metabolites during interactions with pathogenic and beneficial microbes under conditions of environmental stress. *Microorganisms*, 7(9),362. (総説)
3. Hiruma K. The beneficial associations between a root-associated fungal endophyte and Brassicaceae vegetables in field (The 30th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2019) 2019, Wuhan, China 16–21 June, 2019). (招待講演)

4. Hiruma K. A. comparative analysis between closely-related plant mutualistic and parasitic fungi (23rd Evolutionary Biology Meeting at Marseille, Marseille, France 24–27 Sep., 2019). (招待講演)
5. Hiruma K. Transition between pathogenic and mutualistic lifestyles of Colletotrichum fungi associated with plant roots (Sino-German Symposium: Microbiomics and Plant Health, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China 24–30 Sep., 2018). (招待講演)