

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明
と応用に向けた基盤技術の創出」
研究課題「根圏ケミカルワールドの解明と作物頑健
性制御への応用」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年3月

研究代表者: 杉山 暁史
(京都大学 生存圏研究所、准教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本チームでは、植物の成長に大きな影響を及ぼすとされる根圏(根の近傍の土壌環境)に焦点を当て、化学成分に着目した動態・機能解明および制御技術の開発により作物頑健性を向上させることを目指した。主要な成果として(1)新規根圏ケミカルの発見と頑健性向上、(2)モデリングによる頑健型根圏の提案、(3)根圏ケミカルを計測する新規技術開発が挙げられる。

(1) 研究初年度に各グループの有する解析技術を用いてチーム全体で取り組んだ各種土壌の解析により、自然界で初めてオカラミンを発見した。オカラミンを生合成するペニシリウム属菌(hvef18株)をヘアリーベッチ根圏より分離し、hvef18株を活用した頑健性向上に取り組んだ。杉山グループは根圏微生物・代謝物解析により、オカラミンの同定や菌の性状解析を行った。藤井グループは菌の抗菌性試験を行うとともに、圃場栽培によりダイズ、トマト、ジャガイモ、コマツナ等、各種の作物において本菌株の接種により頑健性が向上(生育促進や食害の抑制)することを明らかにした。櫻井グループと青木グループはメタボローム解析、ゲノム解析、GWAS解析、mGWAS解析を担当した。hvef18株による頑健性向上に関して、特許出願し、社会実装に向けて企業と連携中である。

トマト根圏ケミカルであるトマチンがトマト根圏微生物叢を形成し頑健性を向上させることを明らかにした。櫻井グループによる根圏メタボローム解析によりトマチンを同定し、杉山グループがトマチンによりスフィンゴビウム属細菌が増加しトマト根圏微生物叢が形成されることを見出した。さらに、根圏に分泌される植物特化代謝産物が根圏微生物叢を形成する機能を有することを広く明らかにした。これらの成果は次項のモデリングに活用した。

(2) 気候変動条件での根圏微生物と根圏ケミカルを添加したトマト栽培から、データ駆動的に圃場頑健性を向上させる根圏微生物と根圏ケミカルの組み合わせを見出した。杉山グループは気候変動条件でのトマト栽培とデータ取得を担当し、青木グループが栽培条件の設定とモデル開発(SynCom-Phenotypeモデル)を行った。また、藤井グループは検証実験を東京農工大圃場で行い、データ駆動的に見出された細菌と化合物の組み合わせが、実圃場でトマト頑健性を向上させることを明らかにした。青木グループは根圏微生物叢からトマト頑健性を予測するモデル(Microbiome-Phenotypeモデル)に向けてマイクロバイオーム生成モデルを開発し、根圏判別モデルの性能を向上させた。

(3) 根圏ケミカルセンサーを開発した。櫻井グループはヘテロコア型光ファイバーに有機膜を被覆した広帯域ケミカルセンサーを開発し特許出願した。さらに、脂質-ケイ酸多孔質層を被覆したヘテロコア光ファイバーを開発し感度を向上させ植物成分への応答性を高めた。小野寺グループはBSA固定化シートを用いて、ダイズ根からのイソフラボンの分泌を可視化する技術を開発し特許出願した。根圏可視化装置は企業から試験販売開始された。さらに、根圏ケミカルに対する抗体を用いたイムノクロマトグラフィーの開発に取り組んだ。当初の研究計画ではセンサーによる根圏ケミカルのシグナルをモデリングに活用する計画であったが、中間評価を受けて研究開発を一部終了し後半期間は、技術開発促進費の支援を受けた項目の研究開発と、特許出願済みの成果を論文発表した。小林グループは、根圏微量ミネラルを分析する手法を開発し、その成果は(1)(2)の研究開発に活用された。

上記(1)~(3)に加え、2020年度より三宅(親)チームとの課題間連携研究を行った。環境ストレスとROSマーカーに関する複数の成果が得られ現在論文化を目指している。

以上のように、本研究開発において、ブラックボックスであった根圏ケミカルの機能の一端が解明され、環境変動に対する頑健性の基盤となる新たな原理が見出された。

(2) 顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 根圏メタボローム解析によるオカラミンの発見

概要: 各種土壌サンプルのノンターゲットメタボローム解析によりヘアリーベッチ根圏に自然界で初めてオカラミンを発見した。ヘアリーベッチの後作のダイズ根圏においてもオカラミンを検出し、オカラミン生合成能がヘアリーベッチからダイズに受け渡されることを明らかにした。オカラミンは殺虫活性物質として1980年代に報告されていたが自然界で発見されたのはこれが初めてである。この発見を契機に作物頑健性向上へとつなげた(次項 2)。「最新のメタボローム解析の到達点を示すランドマーク的な研究」として高く評価され、各学会等からの解説記事等を依頼された。

2. 根圏ケミカル(植物特化代謝産物)による微生物叢形成能の発見

概要: トマト根圏にトマチンを見出し、その機能がスフィンゴビウム属を増加によるトマト根圏微生物叢生成であることを示した。さらにサポニン類やイソフラボン等根圏に分泌される特化代謝物がその植物固有の微生物叢形成に重要であり、さらに化学構造の違いにより微生物の属レベルで微生物叢を制御できることを示した。この根圏機能を基盤として、微生物と根圏ケミカルを組み合わせた SynCom-Phenotype モデリングに展開した(次項 2)。

3. オミクスデータの生成モデリング技術基盤の確立

概要: 高次元・低サンプルサイズ ($p \gg n$) 問題の影響を受けやすいオミクスデータの機械学習を効率的に実施するための基盤技術として、トランスクリプトーム(遺伝子発現)データやマイクロバイオーム(微生物存在頻度)データの生成モデルを開発した。構築したモデルを活用した「高次元の入力データの次元圧縮」や「合成データを教師データに加えるデータ拡張」を前処理として導入することで、コスト面でデータサイズに制限がかかりやすいオミクスデータを対象とした機械学習モデルの性能を改善できることを提案した。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. オカラミン生産ペニシリウム属菌による作物頑健性向上

概要: ヘアリーベッチ内生菌である *Penicillium ochrochloron* hvef18 株がダイズ、トマト等複数の作物に対して圃場頑健性を向上させることを明らかにした。特許を出願し、企業との連携を開始した。

2. 頑健性モデリングからデータ駆動的にバイオスティミュラント候補を取得

概要: 根圏ケミカルワールドを構成する複雑な因子の中から重要な候補を選抜し、初期根圏構成要素から生育を予測する SynCom-Phenotype モデリングに供した。その結果、頑健性に寄与するマーカーとして微生物と代謝物の組み合わせが見出された。それらを用いて圃場環境でトマト生育を調査したところ、トマト生育を向上させる組み合わせが見出された。

3. 根圏ケミカルを検出するセンサーの開発

概要: ヘテロコア型光ファイバを用いたセンサー部に特定の有機膜を形成させることにより化学成分を検出するという新しい原理を発見した(特願 2020-025847)。有機膜の選択により成分応答性を変えることを明らかにした。根の接触を感知するカメラとヘテロコア光ファイバケミカルセンサを組み合わせたセンサデバイスを開発し、遠隔モニタリングシステムを構築した。偏波保持ファイバをヘテロコア部として用いることで、センサー感度を向上させる新たなセンサ原理を発明した(特願 2022-155223)。社会実装に向けて株式会社コアシステムズジャパンと連携して進めている。ウシ血清アルブミン(BSA)とイソフラボンの相互作用により起こる蛍光消光を利用し、ダイズの根から分泌されるダイゼインの濃度分布を可視化する BSA 固定化シートを開発し(特願 2020-174861)、イソフラボンがダイズ根の先端から多く分泌されることを、世界

で初めて可視化することに成功した。可視化装置は九州計測器(株)で試験販売を開始した。今後、根圏ケミカルの動態等を明らかにできる技術開発の活性化につながる。

<代表的な論文>

1. Nozomu Sakurai, Hossein Mardani Korrani, Masaru Nakayasu, Kazuhiko Matsuda, Kumiko Ochiai, Masaru Kobayashi, Yusuke Tahara, Takeshi Onodera, Yuichi Aoki, Takashi Motobayashi, Masakazu Komatsuzaki, Makoto Ihara, Daisuke Shibata, Yoshiharu Fujii, Akifumi Sugiyama “Metabolome analysis identified okaramines in the soybean rhizosphere as a legacy of hairy vetch”, *Frontiers in Genetics*, 11, 114 (2020)

概要： 土壌サンプルのノンターゲットメタボローム解析から独自の基準で特徴的な化合物を選抜し、標品を用いて、自然界で初めてオカラミンを発見した。オカラミンはヘアリーベッチ根圏のみならず、ヘアリーベッチの後作のダイズ根圏にもオカラミン B が殺虫活性を示す濃度で含まれることを明らかにし、ヘアリーベッチからダイズへ「遺産」として根圏ケミカルが受け渡されることを明らかにした。メタボローム解析により根圏ケミカルワールドの鍵因子を特定した先駆的な成果である。

2. Masaru Nakayasu, Kohei Ohno, Kyoko Takamatsu, Yuichi Aoki, Shinichi Yamazaki, Hisabumi Takase, Tsubasa Shoji, Kazufumi Yazaki, Akifumi Sugiyama “Tomato roots secrete tomatine to modulate the bacterial assemblage of the rhizosphere” *Plant Physiology*, 186(1), 270-284 (2021)

概要： メタボローム解析によりトマト根圏にトマチンを同定したがその機能は不明であった。トマト変異体や試験管内での化合物添加系により、根圏におけるトマチンの機能が、スフィンゴビウム属の増加によるトマト根圏微生物叢の形成であることを示した。スフィンゴモナス属の中でも特定の配列を有する細菌がトマト根圏に増加することを明らかにし、トマト根圏より分離したこの細菌がトマチン代謝能を有することを明らかにした。

3. Takeshi Onodera, Haruna Miyazaki, Xinzhu Li, Jin Wang, Masaru Nakayasu, Rui Yatabe, Yusuke Tahara, Ai Hosoki, Nozomu Sakurai, Akifumi Sugiyama “Development of two-dimensional qualitative visualization method for isoflavones secreted from soybean roots using sheets with immobilized bovine serum albumin.” *Biosensors and Bioelectronics* 196, 113705 (2022)

概要： ウシ血清アルブミン (BSA) がダイズイソフラボンとの相互作用による蛍光消失を利用した。ガラスマイクロファイバーフィルタ (GMFF) にウシ血清アルブミン (BSA) を化学結合させたシートにダイズの根を接触させる前後の蛍光画像を電子増倍型電荷結合素子カメラで撮影した。シートこのシートを用いることで、ダイズ根から分泌されるイソフラボンを二次元的に可視化することに成功した。ダイズ側根の先端部から、イソフラボン分泌が多く分泌されることを示した。一方、ダイズイソフラボンを分泌しないカボチャの根では、蛍光消光強度が低いことがわかった。根圏ケミカルの二次元検出法として新しい技術である。センサー分野のトップジャーナルに掲載された。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「杉山」グループ

研究代表者: 杉山 暁史 (京都大学生存圏研究所、准教授)

研究項目

- ・トマトの栽培とデータ取得
- ・根圏微生物の単離と解析
- ・根圏メタボローム解析
- ・センサー開発用根箱装置の作成と根圏解析
- ・制御環境下でのトマト栽培と情報取得
- ・頑健性バイオマーカーの探索

② 「藤井」グループ

主たる共同研究者: 藤井義晴 (東京農工大学農学研究院、教授)

研究項目

- ・ヘアリーベッチ栽培及び根圏解析
- ・ダイズ等作物の圃場栽培とデータ取得
- ・アレロケミカル動態解析(フィールドオミックス解析)
- ・根圏環境改善型栽培技術の開発
- ・アレロケミカルの影響評価

③ 櫻井グループ

主たる共同研究者: 櫻井 望 (国立遺伝学研究所 特任准教授)

研究項目

- ・メタボローム解析による根圏ケミカルの網羅的な検出
- ・センサーおよび IoT 技術を用いた新規根圏モニター技術の開発

④ 「小林」グループ

主たる共同研究者: 小林 優 (京都大学大学院農学研究科 准教授)

研究項目

- ・根圏土壌のミネラル分析
- ・作物のカルシウム栄養診断法の開発

⑤ 「青木」グループ

研究代表者: 青木 裕一 (東北大学 東北メディカル・メガバンク機構、講師)

研究項目

- ・根圏オミクスデータ解析と統合データベース開発
- ・公共データを用いたオミクス表現学習手法の開発
- ・オミクス生成モデルの開発
- ・ゲノム解析
- ・栽培試験データの統合モデリング
- ・頑健性バイオマーカーの同定に向けた統合モデリング

⑥ 「小野寺」グループ

主たる共同研究者: 小野寺 武 (九州大学大学院システム情報科学研究院、准教授)

研究項目

- ・ケミカル計測技術の開発
- ・センサーデバイスの製作

⑦ 「伊福」グループ

主たる共同研究者:伊福 健太郎 (京都大学大学院農学研究科、教授)

研究項目

- ・ROS マーカー活用法の検討

⑧ 「三宅」グループ

主たる共同研究者:三宅 親弘 (神戸大学大学院農学研究科、教授)

研究項目

- ・迅速栄養診断法の開発

⑨ 「細木」グループ

主たる共同研究者:細木 藍 (富山大学学術研究部理学系 特命助教)

研究項目

- ・センサーおよび IoT 技術を用いた新規根圏モニター技術の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

CREST 領域内では、三宅（親）チームと連携し、ROS field master を用いた圃場での頑健性測定に関して共同研究を推進している。永野チームとは RNA-seq 解析に関して連携し、共著論文を 3 報発表した。本領域の目標である気候変動下での作物頑健性向上に向けて、幅広い分野の専門家との連携を深めるために、2018 年 11 月にシンポジウム「気候変動への適応に向けた植物・大気科学の展望」(CREST との共催)を開催し、大気科学や計算科学等の専門家との議論を深めた。

本研究開発に関して、242 件の発表（うち 90 件は招待講演）を国内外の学会等で行い、関連研究者との議論を深め、新たな連携にも展開させた。根に関する研究成果を広く公表するとともに、海外の著名な研究者とのネットワークを形成するために、宇賀チームと共同で 2022 年 11 月 4 日に国際ワークショップ"Unveiling the secret of underground: technologies for visualizing root and rhizosphere"を開催した。アメリカ、イギリス、オランダ、中国から根の形態やイメージング、マイクロバイオータ領域で国際的に著名な研究者を招聘して講演と議論を行った。

産業界との連携については、ヘテロコア型光ファイバによるケミカルセンサーに関して、社会実装を念頭におき、株式会社コアシステムズジャパンと特許の共同出願を行うなど、連携を取りながら開発を進めた。BSA センサー（根圏ケミカル濃度分布可視化シートの計測システム）は、充実種子選別装置の製造販売を手がける九州計測器(株)と連携し、同システムは試験販売開始となった。圃場関係では、2019 年度より、農業関係の企業と土壌管理技術の共同開発を目指し共同研究を行った。特願 2021-199569 「新規な微生物、当該微生物を用いた微生物資材、当該微生物を利用した植物の栽培方法」の圃場試験に関して農業試験場と共同で試験を進めている。実用化に向けて、民間企業と連携している。