

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658062

研究課題名（和文）

根圏効果の視覚化による植物根-微生物相互関係解析手法の開発

研究課題名（英文）

Methodological development of plant root and microorganism interaction though visualization of rhizosphere effect

研究代表者

信濃 卓郎 (SHINANO TAKURO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・生産環境

研究領域・上席研究員

研究者番号：20235542

研究成果の概要（和文）：

短半減期の炭素の放射性同位元素である ^{11}C を二酸化炭素として地上部に同化し、その根圏への分布を解析したところ、側根が発生している根ごく近傍に分布していた。根分泌物の解析を低分子と高分子（タンパク質）に関して進めると同時に、根ごく近傍の根圏土壌の微生物群集構造解析、機能的解析を根圏微生物 DNA を対象にパイロシーケンシング法で行った結果、植物の生長を説明可能な機能的遺伝子の変動があることが見いだされた。

研究成果の概要（英文）：

Short half-life period radio nuclei- ^{11}C was introduced to the shoot as carbon dioxide by photosynthesis, then the distribution of ^{11}C to the rhizosphere was analyzed. It was demonstrated that the distribution was most pronounced to the rhizosphere very close to the area of lateral root. The analytical development of collection and analysis of root secreting low molecular compounds and high molecular compounds (proteins) were developed. Phylogenetical and functional analysis of microorganism from rhizosphere soil very close to the root was performed by using pyrosequencing method on microorganism DNA and the obtained result shows that some functional gene fluctuation may explain the difference of plant growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：土壌環境、根圏

1. 研究開始当初の背景

根圏は植物の根が影響を及ぼす土壌環境と定義されているが、その領域は概念的なものであり、実際の土壌中でどこまでが根圏であり、どこからが非根圏であるかの明確な定義が設定されていない。そのため、根分泌物が多く分泌される領域を示すことと、そこに分泌される化合物の同定手法、さらにはそれに

対応して根圏土壌微生物がどのように変化を起こすのかを明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

実際の土壌系での土壌微生物役割を正確に評価することを行わない限り、土壌微生物の根圏における正確な役割は明らかに出来ない。根圏微生物は植物から供給される様々な

有機物を基質として活発に生育可能なことが知られていることから、本研究では根圏への根分泌物の量的分布とそれに伴う分泌物の質的変動、そしてこれに対応した根圏土壤微生物の構造および機能的変動を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 光合成産物の根からの分泌部位の測定。短半減期の炭素同位体である ^{14}C を含む二酸化炭素ガスを葉に同化させ、その後の根からの分布を経時的に測定する。測定には二次元的に画像解析が可能な PETIS を利用する。

(2) 土壤からの低分子化合物の採取方法の確立のために、土壤を用いた各種土壤溶液抽出法を検討する。手法として目指す方向性は安定的に抽出が可能であり、抽出される化合物の種類が多いといことを指標にして解析法の提案を行う。

(3) 根から分泌する高分子化合物の同定方法の確立。低分子化合物はそれを合成（あるいは異化で小分子）する生物種の特定が困難であるため、同位体を利用した検討を行うが、根分泌タンパク質に関してはその配列構造からそれを合成した生物種を同定すること可能である。そこでまず遺伝子情報が明確になっているモデル植物を利用して、根から分泌されるタンパク質のデータベース化を進める。

(4) 異なる根圏領域での根圏微生物の群集構造および機能性遺伝子変動の解析を行う。解析手法としてはパイロシーケンシングを活用して、網羅的に土壤微生物群集を解析することを目指す。また、同手法の導入にあたり、根圏土壤からの効率的な土壤微生物を含む土壤の採取方法を検討し、解析対象とする土壤への植物遺伝子の混入を低減する事を目指す。

4. 研究成果

(1) 植物は根箱を利用して栽培した。このときに根箱を斜めにするにより、根を下面に密着してのばす事が可能であり、一定期間栽培後に根箱の一部を取り外す事で、根を土壤表面にある状態にすることが可能となった。この状態の根を用いて、植物体に $^{14}\text{CO}_2$ を同化させた後の根圏への ^{14}C の分泌について解析を行った。当初は植物根が存在したままの状態を観察を試みたが、根そのものの ^{14}C 量が多すぎるために、土壤への分泌が確認できなかった。そのため、根を取り除いた後の土壤について PETIS を用いて観察をしたところ、大豆を用いた場合に主根上部および側根の発生基部（ただし上の方に位置する根に多い）に多く分泌されることが確認された。

(2) 土壤からの低分子化合物の単離にはメタノールを用いたアルコール置換法、外径

2.5mm のポーラスカップを用いた減圧ポーラスカップ法、遠心分離法、飽水土壤抽出法、飽水土壤+遠心分離法による土壤溶液の抽出を試みた。得られた溶液を濃縮乾固した後 GC-MS 分析には誘導体化し質量分析、LC-MS と CE-MS 分析には溶媒に再溶解した後に一斉分析に供試した。得られた代表的な化合物が試験反復での変動がもっとも小さく、より多くの化合物が抽出可能な方法として下図に示すようにメタノールによるアルコール置換法が最も優れていると判断された。

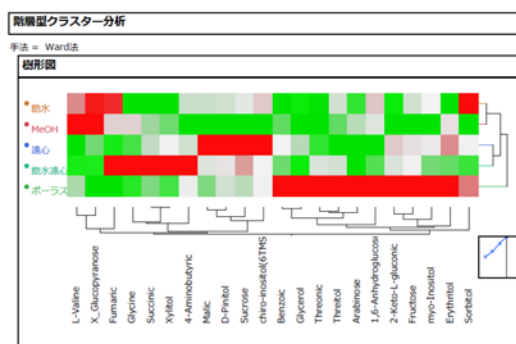


図 各抽出方法中の代謝産物のRSD値のクラスター解析

(3) 根から分泌される高分子化合物の中でタンパク質に着目した。これまで根からのタンパク質の分泌は知られているが、その種類は極めて少なく（酸性フォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、キチナーゼ等）、これらのタンパク質の種類から類推できるように、養分欠乏や病害などのストレス環境下での解析がほとんどである。そのため、植物根が分泌するタンパク質の包括的な解析は根の培養細胞などではあるものの、インタクトな植物体を用いた解析はほとんど行われていない。イネはゲノム解析が終了しており、その多くの遺伝子が機能性に基づく分類作業が進んでいる (RAP-DB)。そこで、本研究ではまずイネを供試し、無菌的に水耕栽培を行い、根から分泌されるタンパク質の包括的なデータベースの作成に取り組んだ。無菌水耕栽培溶液 400ml を濃縮、脱塩して最終的に数 μg のタンパク質を採取する事に成功し、これを LC-MS/MS によるショットガンシーケンスによって解析を行った。約 400 種類の異なるタンパク質が同定された。細胞からの滲出物の影響などが懸念されたが、そのタンパク質の 6 割以上がシグナルペプチドを有しており (SignalP による解析)、やはり 6 割以上が TargetP による解析から分泌に関与していることが示され、3 割以上が無菌条件下にも関わらず PR タンパク質（感染時特異的タンパク質）に分類されることなどから、極めて特殊な組成のタンパク質集団となっていることが明らかにされた。特に PR タンパク質には従来イネにおいてゲノム上での存在

は知られていたが、タンパク質としての発現が観察されていなかった 2 種類の PR タンパク質が検出されており、根分泌タンパク質は新たな植物の部位別タンパク質グループに分類される可能性が明らかになった。実際に根の内部のタンパク質組成や、細胞壁に関して行われた研究との比較においても下図で示すような機能性に基づくタンパク質の分類からは全くことなる様相を示していた。

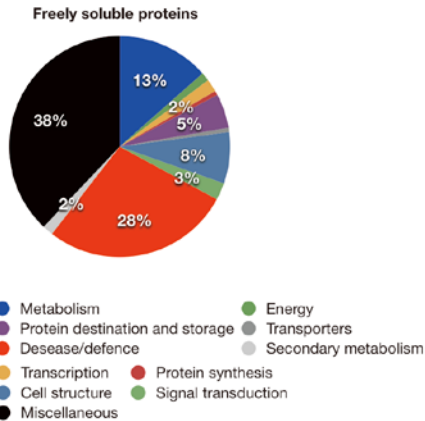


図 イネ根分泌タンパク質の機能的分類

(4) 根圏土壤微生物の多様性の解析にはこれまでも様々な手法が試みられてきている。日本で広く利用されている手法としては PCR-DGGE 法であるが、その解像度(異なる微生物種を分けられる能力)は約 300 程度であり、実際の土壤微生物の多種多様性を考えると大きな微生物相の変動が合った場合には有効であることが推定されるものの、一見わずかな変動の場合にはその違いは検出されない。例えば、一本の根の根圏においても本研究の成果から示されるように、地上部からの光合成産物の供給量は大きく異なる。さらに過去の知見から分泌される構成化合物に違いがあることが知られる。このような同じ微生物群集を母体にして、植物の影響によって引き起こされる変動を検出する場合には解像度の低い手法では十分な応答を検出できないことが危惧される。そこで、本研究では次世代型の超並列シーケンサーを活用したメタゲノム解析手法を導入した。研究ではミヤコグサを用い、光合成産物由来の根分泌物が多く分泌されている結果が示されている根(側根)が発生している極近傍の土壤を回収した。特に土耕栽培の場合、植物の生長はわずかな条件の違いによっても大きく異なる場合が多い。本研究ではこのような条件下で植物根圏群集構造がどのような変化を起こしているのかを解析した。試験では特にリン酸の利用についての解析を行った。まず PCR-DGGE 法で検討を行った結果が下図である。若干の違いはあるものの、この程度の違いで植物の生長量の違いを説明するには

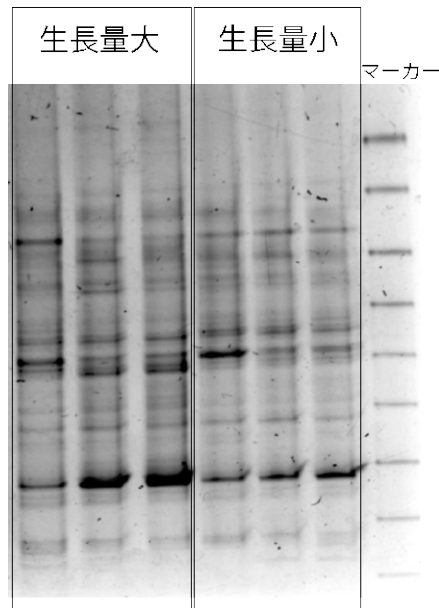


図 同じ土壤で栽培し、生長量に差が認められる個体の根圏土壤微生物群集構造

(PCR-DGGE 法)

いたらない。そのため、同じ土壤試料を用いてパイロシーケンシングを行ったところ、下図で示すように、いくつかの微生物属で大きく変動をしていることが示された。

さらに、同じ試料を用いて代謝などに関わる機能性遺伝子の変動を解析したところ、生育量が大きい個体の根圏土壤微生物においては有機酸合成能、有機態リン酸分解能などのいくつかの植物と土壤の間での重要な物質動態に関与していると想定される遺伝子群が大きく変動していることが明らかになった。

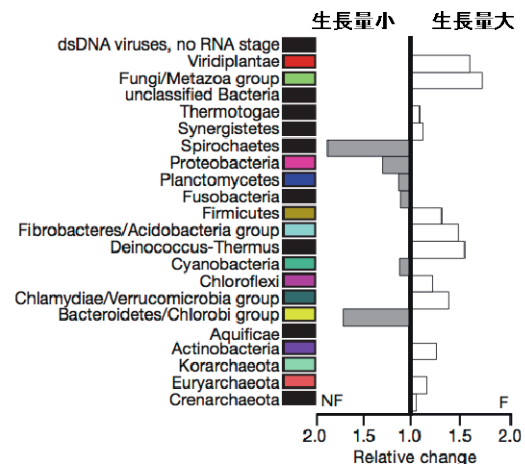


図 同じ土壤で栽培し、生長量に差が認められる個体の根圏土壤微生物群集構造(パイロシーケンシング法)

(5) 今後の展望としては、今回の研究で確立された根圏での光合成産物の分泌位置の視覚化、土壤溶液中の化合物の同定法、根分泌タンパク質のデータベース化、根圏微生物群集構造解析手法を有機的に統合する。そのためにはより精細な画像解析技術とそれに

合わせたより微量の試料を扱う技術開発を開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) 信濃卓郎 植物根圏微生物の機能解析手法開発, 日草誌, 査読有、59(1), 70-73, 2013

(2) Unno, Y. and Shinano T. Metagenomic analysis of the rhizosphere soil microbiome with respect to phytic acid utilization. *Microbes and Environment*, 査読有、28(1), 120-127 (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME12181>

(3) Tawaraya, K., Horie, R., Saito, A., Shinano, T., Wagatsuma, T., Saito, K. and Oikawa, A. Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice plant under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 査読有 36(7), 1138-1159, (2013)

(4) Shinano, T., Komatsu, S., Yoshimura, T., Tokutake, S., Kong, F.-J., Watanabe, T., Wasaki, J. and Osaki, M. Proteomic analysis of secreted proteins from aseptically grown rice. *Phytochemistry*, 査読有、2011, 72(4-5), 312-320.

[学会発表] (計6件)

(1) 信濃卓郎、植物と土壌の接点?根圏?をめぐる研究、第30回農薬環境科学研究会 2012. 10. 18-19、前橋

(2) Unno, Y. and Shinano, T. Evaluation of microbial community structure and function in the field soil by using a comprehensive analysis methods of soil DNA and RNA. 第28回日本微生物生態学会大会, 2012. 09. 19-22、豊橋

(3) Shinano, T. Behavior of Rhizosphere, 北海道国際農学会議 2012, 2012. 08-27-29, 札幌

(4) 信濃卓郎、植物根圏微生物の機能解析手法開発、日本草地学会、2012. 08. 27-29、江別

(5) Shinano, T. 他 Nano LC-MS analysis on root secreting proteins. Roots to the Future conference, ISRR2012, 2012. 06. 26-29, Dundee, England

(6) 信濃卓郎微生物全体から見たわずかな違いがもたらす植物生産性への意義, 2011, 10, 8-10 日本土壌微生物生態学会、京都

[図書] (計2件)

(1) Unno, Y. and Shinano, T. Metagenomic analysis on the rhizosphere soil microbial community. In: Frans J. de Brjin (ed.) *Molecular*

Microbial Ecology of the Rhizosphere, (2013) Wiley-Blackwell Publishers, pp. 1099-1103.

(2) 三枝雅彦・太田健・信濃卓郎・南澤究・稲村達也 土壌科学を基盤とする学術の動向と展開: Part 1 作物の生産基盤としての土壌科学、土肥誌, 2012, 83(4), 483-486.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信濃卓郎 (SHINANO TAKURO)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・生産環境研究領域・上席研究員
研究者番号: 20235542

(2) 研究分担者

藤巻 秀 (FUJIMAKI SHU)
独立行政法人 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号: 20354962

(3) 研究分担者

中村 卓司 (NAKAMURA TAKUJI)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・生産環境研究領域・主任研究員
研究者番号: 60399425

;

