

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：23303

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05152

研究課題名（和文）超個体化における植物全身応答とその動態を暴き出す超個体イメージャーの構築

研究課題名（英文）Construction of a plant holobiont imager to reveal the systemic responses and their dynamics

研究代表者

宮島 俊介 (Miyashima, Shunsuke)

石川県立大学・生物資源環境学部・講師

研究者番号：20727169

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 40,300,000円

研究成果の概要（和文）：植物は、多様な微生物との共生を通じ「超個体」を形成し、過酷な自然環境下に適応している。この超個体の確立の過程において、共生微生物との相互作用が、植物の生理応答にダイナミックな変化をもたらしていると考えられるが、これまでその過程を可視化する技術は確立されていなかった。本研究では、土壌環境下での根と微生物との相互作用に焦点を当て、根や微生物の遺伝子発現の変動、生命動態、および物質輸送を非破壊的に可視化する「超個体イメージャー」を構築した。本研究が構築した観察技術は、様々な植物-微生物相互作用を発端とする根圏超個体化現象を紐解くための基盤技術となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究から、植物の根は様々な土壌微生物と共存関係を構築していることが見出されている。一方、土壌という隠れた空間のなかでの根と微生物との相互作用を実際に可視化する技術は非常に乏しかった。本研究では、新たな観察デバイスの構築、さらには、可視光と放射線という性質の異なる光を検出する新たな実験系を立ち上げることで、土壌空間での、根と糸状菌の相互作用や物質輸送の実態を見出す研究手法を確立した。本研究の成果は、今後、様々な植物と微生物との共存関係を理解するための研究基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Plants form a "superorganism" through interactions with diverse microorganisms, adapting to natural environments. It is believed that interactions with microorganisms induce dynamic changes in plant physiological responses, which lead the establishment of this superorganism; however, until now, technologies to visualize this process had not been established. This study focuses on the interactions between roots and microorganisms in the soil environment, constructing a "superorganism imager" that non-destructively visualizes variations in gene expression, life dynamics, and material transport of roots and microorganisms. The observation technology developed in this research is expected to serve as a foundational technology for elucidating the rhizosphere superorganism phenomena initiated by various plant-microbe interactions.

研究分野：植物発生学

キーワード：植物微生物相互作用 蛍光イメージング RIイメージング 画像解析

1. 研究開始当初の背景

植物は葉・根でそれぞれ異なる微生物叢と共生関係を結び、「拡張された超個体」を構築することで、環境適応能力の飛躍的な向上を達成する。この超個体の構築において、植物は葉圏・根圏での局所的に多発する微生物情報を個体全体で統合し、地上部-地下部の器官機能を連動させると考えられる。しかしながら、細胞レベルの解像度で、地上-地下に展開する植物体全体で生じる微生物相互作用や、それにより引き起こされる遺伝子発現変動および植物生理応答の変化を非破壊的に可視化する実験手法は未だ確立されていない。

研究代表者は、これまでモデル植物シロイヌナズナを研究材料に、蛍光を用いた生体イメージング技法による遺伝子発現や細胞動態を可視化により、植物の個体発生の分子機構の解明を行ってきた (Miyashima et al., Nature 2019)。本研究では、研究代表者に加え、生体内での分子移動を可視化する RI イメージング技法を有する杉田、さらには、自動学習による画像解析技術を有する戸田とともに研究グループを構成し、植物超個体化現象を可視化・定量化するイメージング技術の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究は、グループ内の研究者が有する独自の生体イメージング技術および画像解析技術を集結し、植物-微生物相互作用、地上-地下物質輸送、器官成長といった「植物と微生物の超個体化」を読み解く鍵となる現象を、時系列を追って包括的かつ高解像度で可視化する研究プラットフォーム「超個体イメージャー」を構築する事を目標とする(図1)。この技術革新から、葉圏・根圏に分断されていた植物微生物相互作用研究を統一し、本研究領域の掲げる「植物超個体機能学」の推進に貢献する。



図1. 研究目的概要

3. 研究の方法

宿主としてモデル植物シロイヌナズナを用い、地下器官である根に寄生・共生するコレトリカム系状菌を実験材料として用いた。土壤環境での根やそれと相互作用する系状菌を細胞レベル可視化するために、第一に、植物体および系状菌を GFP および RFP の異なる蛍光タンパク質によりラベルされた形質転換体を作成した。さらに、土壤環境を再現しつつ非破壊的に可視化するための専用の観察デバイスを構築し、これらシロイヌナズナおよびコレトリカム系状菌をデバイス内で数週間共培養した後、蛍光タイリングイメージングにより、根全体に展開する系状菌の様子を可視化した。続けて、放射線同位体 14 炭素からなる二酸化炭素ガス ($^{14}\text{CO}_2$) を与えることで、植物体の光合成により固定された炭素元素が土壤中への移動実体を見出すとともに、蛍光タイリングイメージとの比較から、地上から地下の根および系状菌菌糸への転流を調査した。さらに、土壤中でのコレトリカム系状菌との相互作用におけるシロイヌナズナ根の防御二次代謝産物合成に関して、その代謝酵素発現の時空間動態の可視化および制御系の解明を行った。

4. 研究成果

(1) 土壤環境のシロイヌナズナ根系および系状菌の可視化技術の開発

可視光を透過しない土壤空間での根や微生物を非破壊的に観察するため、透明プラスチックの前面にセロファンシートを張り、内部に土壤を封入した Plant Box を作成した(図2 左)。細胞膜局在型赤色蛍光タンパク質を発現するシロイヌナズナ (Lti6b_tdTOMATO) を Plant Box 内で生育させ、セロファンシート越しに根系を約 1000 枚の蛍光画像に分割し取得、その後、個々の画像をタイリングすることで根系の全体像を可視化することに成功した(図2 中央 右)。



図2. 土壤空間根系の蛍光タイリングイメージング

次に、GFP を発現するコレトリカム系状菌 *Colletotrichum incanum* (Ci-GFP) を用い、土壤空間でシロイヌナズナ根に感染した系状菌の成長を調査した。上記の画像タイリングを用いた手法を用い根系全体の Ci-GFP 菌糸を細胞レベルで可視化し、さらにはその経時変化を観察した。その結果、シロイヌナズナ根への感染初期に局所的に存在していた Ci-GFP 菌糸は、菌

糸を土壌空間に均一に展開するのではなく、シロイヌナズナ根の成長に沿って菌糸展開することを見出した(図3)。さらに1週間後の感染後期においては、初期の段階で感染が確認された領域において、シロイヌナズナ根の内部組織からCiの分生子が発生する様子も確認された(図3)。以上、本研究では、土壌中の根とそれに感染する糸状菌を可視化する技術の構築に成功した。さらには、培養から観察までシームレスに行うことができるPlant Boxを用いることで、根や糸状菌の生命活動を長期的な時間単位で経時的に観察することが可能となった。

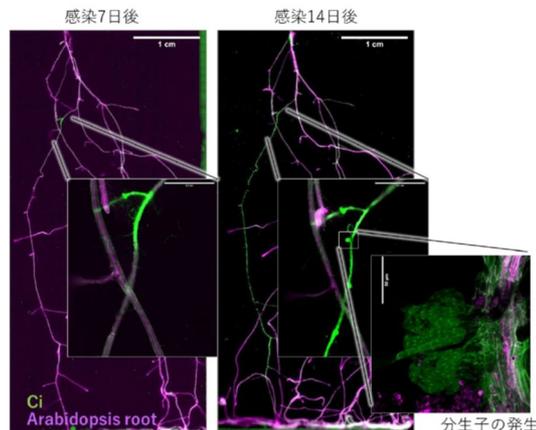
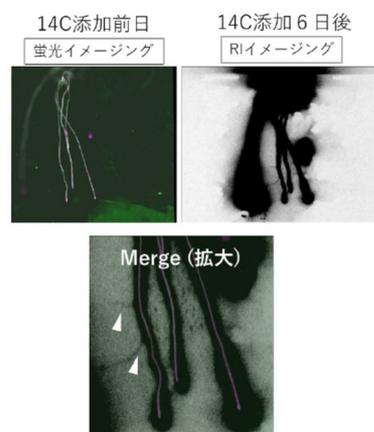


図3. 土壌空間の根と糸状菌の生命動態

(2) RI イメージングと蛍光イメージングの統合による根と微生物の介する根圏空間への炭素転流の動態解析

根圏での超個体化においては、ホストとなる植物由来の固定炭素が寄生・共生微生物に栄養源として供給されていると考えられる。炭素元素の空間的移動の可視化には、放射性同位元素を用いたRI イメージングが有効である。糸状菌菌糸のような微細構造を可視化しつつ、固定炭素の移動を可視化するために、上記の蛍光タイリングイメージングとRI イメージングの統合を行った。上記の蛍光タイリングイメージによる根系および糸状菌菌糸の展開を可視化したのち、放射性同位体 14C を二酸化炭素ガスの形状で添加することで、根圏への炭素元素の移動を調査した。

その結果、植物の地上組織での炭素固定とその後の維管束を通じた地下組織である根への炭素転流は、14C 添加後数時間以内に起こることが観察された。また、一方、根から土壌空間に展開する糸状菌への炭素移動の検出には、14C 添加後7日程度必要であり(図4)さらに、時間経過と共に、土壌中に展開する菌糸に14C が移動する様子が観察された。植物の地上部から地下部への炭素元素移動は、光合成の産物として糖の形状で師部輸送により生じることが知られている。本研究では、根から菌糸への14C の移動は、地上-地下の輸送に比べ、はるかに時間の要するプロセスであること見出しており、スクロース等の糖以外の形状での炭素移動が推察される。また、本研究が構築した観察技術により、今後、根圏超個体化における土壌空間への炭素移動の実体に迫ると共に、他の植物-微生物相互作用への応用展開も期待される。



▷ 菌糸への14C移動

図4. RI-蛍光統合イメージングによる炭素元素の根圏への移動の可視化

(3) シロイヌナズナ根冠は防御二次代謝経路を活性化する糸状菌の感染を抑制する

シロイヌナズナの根は、コレトリカム糸状菌を認識し、トリプトファン由来防御二次代謝経路を活性化することで、糸状菌の感染や増殖など生命動態を適切に制御することで、根圏超個体化を達成する。一方、この防御二次代謝経路の活性化が「いつ・どこで」発生しているか、その時空間動態およびその制御系に関しては不明であった。トリプトファン由来防御二次代謝経路の主要酵素の発現を可視化する蛍光レポーターシステムを作成し、糸状菌接種時の発現変動を調査した。その結果、これら酵素は、糸状菌に反応し、根の先端にある根冠組織で特異的に発現が誘導されることを見出した(図5)。さらに、トリプトファン由来防御二次代謝経路の初発酵素の機能欠損体 *cyp79b2 cyp79b3* 背景で、根冠特異的に CYP79B3 酵素の発現を回復させることで、コレトリカム糸状菌の感染を抑制することができることを発見した。これらの発見から、根の先端にある根冠組織が、糸状菌の認識さらにはそれに対する応答をする中枢機能を有し、根圏超個体化の鍵となる組織であることが示唆された。

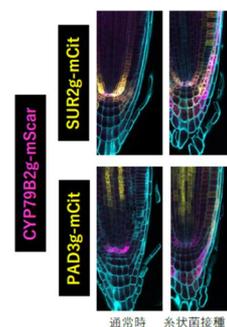


図.5 根冠における糸状菌に反応した防御二次代謝経路の活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sugita Ryohei	4. 巻 33
2. 論文標題 Development of a live imaging system using radioactive tracers to study the dynamics of mineral elements in living plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 9~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.33.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Huang Chaokun, Kurotani Ken-ichi, Tabata Ryo, Mitsuda Nobutaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Notaguchi Michitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 <i>Nicotiana benthamiana XYLEM CYSTEINE PROTEASE</i> genes facilitate tracheary element formation in interfamily grafting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhad072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagatoshi Yukari, Ikazaki Kenta, Kobayashi Yasufumi, Mizuno Nobuyuki, Sugita Ryohei, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Sakakibara Hitoshi, Kobayashi Natsuko I., Tanoi Keitaro, Fujii Kenichiro, Baba Junya, Ogiso-Tanaka Eri, Ishimoto Masao, Yasui Yasuo, Oya Tetsuji, Fujita Yasunari	4. 巻 14
2. 論文標題 Phosphate starvation response precedes abscisic acid response under progressive mild drought in plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40773-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiruma Kei, Aoki Seishiro, Takino Junya, Higa Takeshi, Utami Yuniar Devi, Shiina Akito, Okamoto Masanori, Nakamura Masami, Kawamura Nanami, Ohmori Yoshihiro, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Sato Toyozo, Oikawa Hideaki, Minami Atsushi, Iwasaki Wataru, Saijo Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in <i>Colletotrichum tofieldiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-40867-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Rikako, Takagi Momoko, Toda Yosuke, Mine Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct Observation and Automated Measurement of Stomatal Responses to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> ;	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/66112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurita Yuko, Kanno Satomi, Sugita Ryohei, Hirose Atsushi, Ohnishi Miwa, Tezuka Ayumi, Deguchi Ayumi, Ishizaki Kimitsune, Fukaki Hidehiro, Baba Kei'ichi, Nagano Atsushi J., Tanoi Keitaro, Nakanishi Tomoko M., Mimura Tetsuro	4. 巻 45
2. 論文標題 Visualization of phosphorus re translocation and phosphate transporter expression profiles in a shortened annual cycle system of poplar	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda Yusaku, Sugita Ryohei, Hirose Atsushi, Kawachi Naoki, Tanoi Keitaro, Furukawa Jun, Naito Ken	4. 巻 72
2. 論文標題 Diversity of Na ⁺ allocation in salt-tolerant species of the genus <i>Vigna</i> ;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 326 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.22012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Motohiro, Imamura Miyu, Matsushita Katsuyoshi, Roszak Pawel, Yamashino Takafumi, Hosokawa Yoichiroh, Nakajima Keiji, Fujimoto Koichi, Miyashima Shunsuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Patterned proliferation orients tissue-wide stress to control root vascular symmetry in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 886 ~ 898.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2023.01.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Suetsugu Kenji, Sugita Ryohei, Yoshihara Akiko, Okada Hidehito, Akita Kae, Nagata Noriko, Tanoi Keitaro, Kobayashi Koichi	4. 巻 238
2. 論文標題 Aerial roots of the leafless epiphytic orchid <i>Taeniophyllum</i> are specialized for performing crassulacean acid metabolism photosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 932 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Momoko, Hirata Rikako, Aihara Yusuke, Hayashi Yuki, Mizutani-Aihara Miya, Ando Eigo, Yoshimura-Kono Megumi, Tomiyama Masakazu, Kinoshita Toshinori, Mine Akira, Toda Yosuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Image-Based Quantification of <i>Arabidopsis thaliana</i> Stomatal Aperture from Leaf Images	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮島 俊介
2. 発表標題 蛍光寿命イメージングによる根の対微生物応答の時空間ダイナミクスの解明
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田亮平, 小林奈通子, 中西友子, 田野井慶太郎
2. 発表標題 放射線イメージングによる根の養分ダイナミクスの解明
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田陽介
2. 発表標題 リモートでもオンサイトでも：植物の生理応答を定量化する技術の開発と適用
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩井雅斗, 宮島俊介, 中島敬二
2. 発表標題 シロイヌナズナの根におけるキチン応答の組織特異性とその病害抵抗性における機能
3. 学会等名 第85回 日本植物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 亮平、小林 奈通子、廣瀬 農、岩田 錬、鈴木 寿、田野井 慶太郎、中西 友子
2. 発表標題 リアルタイムRI イメージングを用いた光の変化がイネの元素動態に与える影響の解析
3. 学会等名 アイソトープ研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木桃子, 平田梨佳子, 相原悠介, 林優紀, 水谷未耶, 安藤英伍, 河野(吉村)恵実, 富山将和, 木下俊則, 峯彰, 戸田陽介
2. 発表標題 ディープラーニングを用いたシロイヌナズナの気孔開度自動定量技術の開発
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮島俊介, 中島敬二
2. 発表標題 蛍光寿命イメージングが明らかにするシロイヌナズナ根冠機能とその発動
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木桃子, 岡崎まなみ, Xinpeng Liu, 晝間敬, 大倉史生, 戸田陽介
2. 発表標題 機械学習を用いた画像解析によるシロイヌナズナ根の表現型定量技術の開発
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 戸田陽介
2. 発表標題 Recent Methods in Stomatal Trait Phenotyping
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉田亮平
2. 発表標題 植物体内における元素動態の非破壊RIイメージング技術の開発
3. 学会等名 第60回アイソトープ 放射線研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮島俊介
2. 発表標題 根冠が駆動する対土壤微生物応答とその動態
3. 学会等名 日本植物学会 第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮島俊介
2. 発表標題 根冠の組織形成が創発する根の防御応答の時空間制御とその動態
3. 学会等名 第65回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸田 陽介 (Toda Yosuke) (00808264)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・招へい教員 (13901)	
研究分担者	杉田 亮平 (Sugita Ryohei) (60724747)	名古屋大学・アイソトープ総合センター・講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	University of Helsinki			
英国	University of Cambridge			