

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292207

研究課題名(和文) 水稲根圏におけるメタンの動態に関わる微生物食物連鎖の構造と機能の解析

研究課題名(英文) The structure and function of the microbial food chain involved in methane dynamics in the rice rhizosphere

研究代表者

村瀬 潤 (Murase, Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30285241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：水田におけるメタン動態のホットスポットである水稲根圏における微生物食物連鎖の構造と機能を解析した。圃場調査、ポット実験、室内のマイクロコスム実験から、水稲根圏には特徴的な原生物(繊毛虫、鞭毛虫、アメーバ)が生息しており、酸素や有機物の供給に応答してその群集構造が変化することが明らかとなった。また、メタン酸化によって駆動する食物連鎖の構造も水稲根圏とそれ以外の土壌では異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The structure and functions of the microbial food web in the rice rhizosphere, the hot spot of methane dynamics in a rice field ecosystem, were studied. Field surveys and pot and microcosm experiments revealed that the rice rhizosphere was inhabited by the specific members of heterotrophic protists (ciliates, flagellates, and amoeba) showing the community shift to the redox conditions and supply of organic matters in the environment. The structure of the microbial food web in the rice rhizosphere that was driven by methane oxidation was also distinct from that of bulk soil.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：水稲 根圏 メタン 原生物 微生物食物連鎖 真核微生物

1. 研究開始当初の背景

水田は、温室効果ガスであるメタンの発生源の1つであり、発生のメカニズムや抑制方法に関する研究が国内・国外の研究グループによって精力的に行われてきた。メタン生成の基質となる有機物には、土壌有機物、植物遺体、そして水稲根から供給される有機物があるが、そのうち水稲根由来の有機物を起源とするメタンは発生量全体の約80%を占めており、メタン発生が活発な時期においてはそのほとんどが水稲体の有機物に由来すると見積もられている(Kimura et al. 2004)。一方で、水田で生成されるメタンの約80%以上が大気へ放出される前に酸化されており(Reeburgh 2007)、メタン生成と酸化のバランスが水田からのメタン放出を制御する鍵といえる。

水田生態系でメタン生成・酸化に関わる微生物の多様性と働きについては、これまで様々な手法を用いて研究が行われてきた(Conrad 2007)。水稲根圏におけるメタン生成古細菌、メタン酸化細菌についても、群集構造の解析や光合成由来産物からメタンを生成する古細菌の特定、水稲根圏でメタンを消費するメタン酸化細菌群集の特定、水稲品種とメタン酸化細菌群集の違いなど、国内外のグループが精力的に研究を進めてきた。一方で、水田土壌におけるメタンの動態に関連する微生物学的研究の対象は、その直接の行為者であるメタン生成古細菌・メタン酸化細菌に集中しており、それ以外の土壌微生物群との関わりやその影響については全く注目されてこなかった。

2. 研究の目的

水田におけるメタン動態のホットスポットである水稲根圏に焦点をあて、野外調査、室内実験によってメタンの動態に関わる微生物食物連鎖の構造と機能を解析する。

3. 研究の方法

(1)水稲根圏に生息する真核微生物群集の分子生物学的解析

愛知県農業総合試験場安城農業技術センターの二毛作水田圃場より、水稲体(葵の風)を定期的に採取し、根圏土壌、水稲根からDNAを採取し、ssu rRNA (18S rRNA) 遺伝子を対象としたPCR-DGGE法によって真核生物群集を解析し、非根圏土壌あるいは同じ圃場で栽培された小麦の根圏に生息する群集と比較を行なった。

(2)水稲根圏で活動する真核微生物群集の解析

根域を制限するための金網円筒を入れたポットを用いて水稲(日本晴)を栽培した。水稲の生育と根圏の土壌 Eh を観測しつつ、根圏が十分に酸化的な生育初期から、根圏が嫌氣的になった生育中期、水稲が成熟した生育後期に根圏土壌を採取した。土壌から RNA

を抽出し、RT-PCR-DGGE法によって、rRNAを発現している活性の高いと考えられる真核微生物群集を解析した。

(3)水稲根圏における原生生物の微視的空間分布

水稲根圏に生育する原生生物の空間分布を詳細に解析するために、大型スライドガラスを組み合わせた「ミニ根箱」を作成した。土壌懸濁液を加えた軟寒天で満たしたミニ根箱で水稲幼苗を育成し、顕微鏡観察によって根の近傍を観察した。また、経時的に根圏試料を採取し、生息する真核微生物群集をDGGE法により解析した。

(4)水稲根に生息する新規メタン酸化細菌の分離と同定

愛知県農業総合試験場安城農業技術センター水田圃場から採取した水稲の根から、メタンを加えた無機塩培地によってメタン酸化細菌を集積培養した。寒天培地を用いて純粋分離株を得、分子生物学的、生化学的、形態学的解析の結果に基づいて、その菌学的性質を明らかにした。

(5)安定同位体プロービング法を用いた水稲根圏のメタン酸化微生物食物連鎖の構造解析

つくば FACE (Free Air CO₂ Enrichment) 実験圃場から幼穂形成期の水稲を採取し、根圏試料(根+根圏土壌)を¹³Cで標識したメタン雰囲気下で2週間培養した。培養後の試料からDNAを抽出し、密度勾配遠心分離によって¹³CでラベルされたDNA画分を分画し、PCR-DGGE法、クローンライブラリー法によって、メタン炭素の同化に関わる細菌、真核生物、T4型ファージの解析を行った。

4. 研究成果

(1)水稲根圏に生息する真核微生物群集の分子生物学的解析

解析に先立ち、水稲由来の ssu rRNA 遺伝子のPCR増幅を抑制するための人工DNA(ペプチド核酸)を設計した。また、ssu rRNA 遺伝子を対象とした真核微生物の分子生物学的解析に広く用いられるユニバーサルプライマー(1A, 516r)が一部の土壌微生物、特にアメーバの多様性を過小評価することが明らかになったため、研究グループで分離したアメーバおよび公的データベースの塩基配列情報を元にプライマーの改良を行った。その結果、根圏土壌および水稲根試料から抽出したDNA試料の解析において、イネ由来 ssu rRNA 遺伝子のPCR増幅を効率的に抑えることに成功した。また、従来のプライマーでは検出されなかった原生生物の存在が確認できるようになった。

水稲根の真核微生物群集は非根圏土壌とは異なっており、水稲の生育時期に応じて変

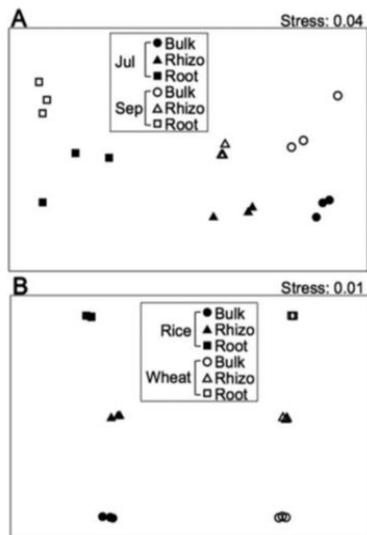


図1 水稻根、根圏土壌、非根圏土壌に生息する真核微生物群集のMDS解析

化した(図1)。根圏土壌の群集は、根あるいは非根圏土壌と共通する生物群から構成されており、結果的に根や非根圏土壌の群集とは異なる構造を示した。水稻根の真核微生物群集は小麦根の群集とも異なっていた。水稻根圏(根および根圏土壌)の群集を特徴づける真核微生物は、*Polymyxa*、鞭毛虫、卵菌類に近縁を示し、寄生者、細菌捕食者、分解者などの生態的役割を果たす多様な真核微生物が水稻根圏に生息していることが示唆された。以上の結果から、水稻根および水稻の生育時期が水稻根圏の真核微生物群集を規定する主な要因であることが示唆された。

(2) 水稻根圏で活動する真核微生物群集の解析

DNAを対象とした(1)の解析では、水稻根圏を特徴づける真核微生物が確認されたが、一方ですべての試料に共通する真核微生物として緑藻類が優占していることが示された。この緑藻は、耐久体などを形成して土壌中で生残するものの解析の時点では活発に活動しているわけではないと推察された。そこで、ssu rRNAを対象とした解析により、水稻根圏で活性を有すると考えられる真核微生物群集を解析した。

金網円筒内に植えた水稻は健全な生育を示し、水稻根バイオマスも栽培26日目から93日目まで直線的に増加した(図2)。円筒外の非根圏土壌のEhは、湛水後経時的に低下した。一方円筒内の根圏土壌のEhは、栽培16日目に上昇し、非根圏土壌にくらべて高い値を維持した。その後栽培27日目に急激に低下し、栽培34日目には非根圏よりも低くなった。その後栽培69日目には、根圏土壌と非根圏土壌のEhに大きな差は認められなくなった。以上の結果は、水稻からの酸素と有機物の供給によって、根圏の酸化還元状態が大きく変動することを示している。

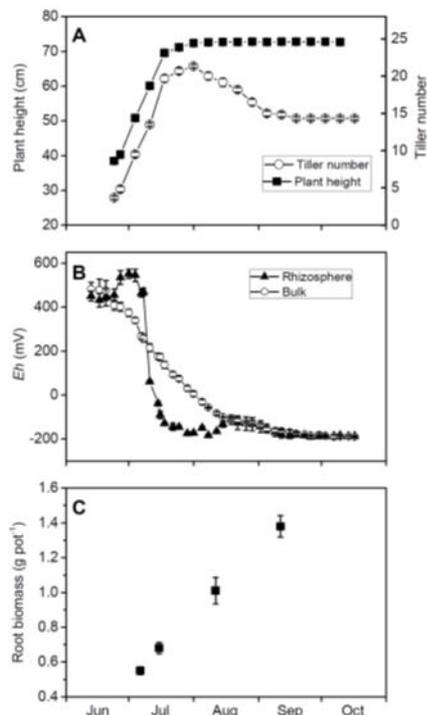


図2 根圏隔離ポットにおける水稻の生育と土壌 Eh の経時変化 . A. 水稻の体長および分けつ数、B. 根圏および非根圏土壌の Eh、C. 水稻根バイオマス

この結果を受け、分けつ期で根圏土壌が酸化的な栽培26日目、その後急激にEhが低下した栽培35日目、出穂期(栽培62日目)および収穫期(栽培93日目)に水稻根圏の真核微生物群集の解析を行った。いずれの時

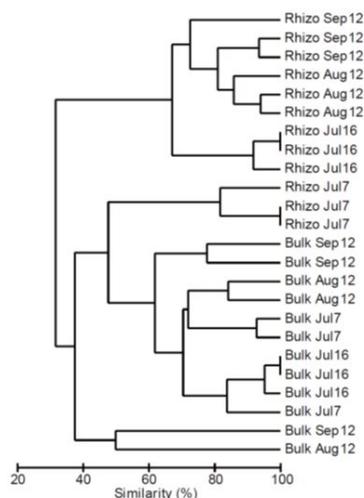


図3 DGGEバンドパターン(図4)にもとづく rRNA を発現する真核微生物群集のクラスター解析

期においても、根圏の真核微生物の群集構造は非根圏と明確に異なっていた(図3)。また、土壌 Eh が急激に変化した栽培26日と35日目の間で根圏の真核微生物群集が大き

く変化した。さらに Eh は同程度でも分け時期と出穂期・収穫期の群集には違いが認められた。以上のことから、水稻根圏には特有の真核微生物群集が生息し、根から供給される酸素と有機物のバランスによってその活動がコントロールされているものと推察された。DGGE 断片のシークエンス解析の結果、根圏で活動する真核微生物には、卵菌、ミズカビ、子囊菌などの菌類の他に、繊毛虫、Heterolobosea アメーバなどの原生生物が確認され、根圏環境が好氣的な栽培初期だけでなく、嫌氣的になる栽培中期 - 後期においても根圏で微生物食物連鎖が機能していることが推察された。

(3) 水稻根圏における原生生物の微視的空間分布

ミニ根箱のスライドガラス近傍で伸張する水稻根を倒立顕微鏡で観察することにより、根圏の原生生物の生息状況をサブミクロスケールで解析することができるようになった。根の近傍には、繊毛虫、鞭毛虫、アメーバが高頻度かつ非常に高密度で生息する様子が明らかになった(図4, 5)。その数

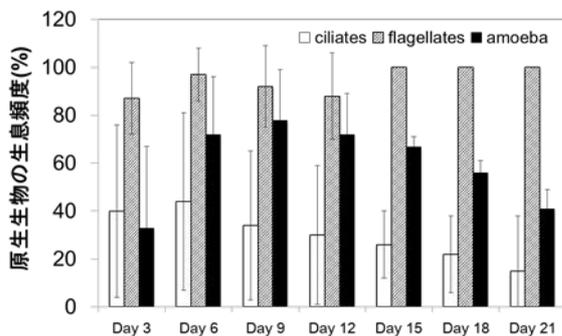


図4 水稻根圏における原生生物の生息頻度

はもともとの土壌懸濁液よりもはるかに多いと見積もられること、水稻のない根箱や根

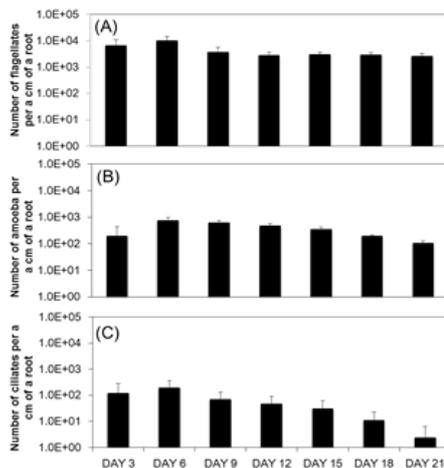


図5 水稻根に生息する(A)繊毛虫、(B)鞭毛虫、(C)アメーバの根1cmあたりの個体数

から1cm以上離れたところでは原生生物がほとんど観察されないことから、水稻根か

らの有機物供給によって、根圏で微生物食物連鎖が駆動することが示された。水稻根の各部位の中で根端部の原生生物の密度が最も高く、分布範囲も広がった(図6)。根端から基部に向かって原生動物の分布範囲が狭くなった。興味深いことに、鞭毛虫が根のごく近傍に生息しているのに対し、アメーバはそれよりもやや外側に分布しており、鞭毛虫とアメーバは根の近傍で極めて明確な「住み分け」をしていることが明らかとなった。繊毛虫は、根端部を中心に生息しており、鞭毛虫の生息域を重複して遊泳行動を示した。

根圏試料の分子生物学的解析により、根圏に生息する原生生物として、Cercozoa 鞭毛虫、下毛類の繊毛虫、Gymnophrys, Echiemoeba に近縁な裸アメーバが確認された(図11)。これまで水稻根における原生生物の生態研究のために用いられてきた *Acanthamoeba* は検出されなかった。原生生物の捕食機能特性は種類によって大きく異なることが知られており(Murase and Frenzel 2008)、今後水稻根圏における原生生物の役割を明らかにするためには、実際の群集を考慮する必要があると考えられた。

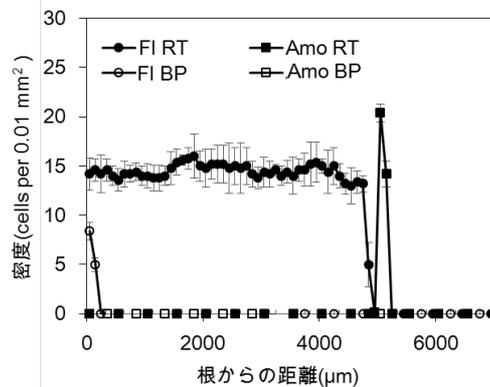


図6 水稻根近傍における根端部(RT)および基部(BP)における根圏の鞭毛虫(FI)およびアメーバ(Amo)の生息密度

(4) 水稻根に生息する新規メタン酸化細菌の分離と同定

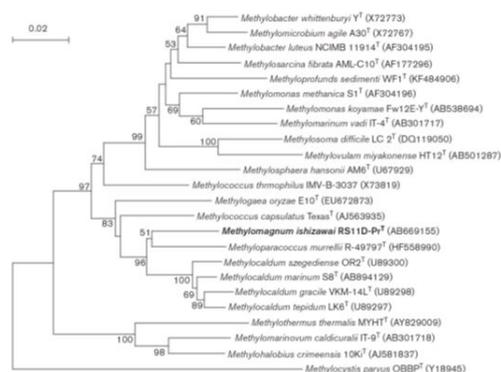


図7 水稻根から分離された新規メタン酸化細菌の16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統関係

水稻根圏から新規に分離されたメタン酸

化細菌 RS11D-Pr 株は、グラム陰性菌で極鞭毛を1本もち、Type I に属するメタン酸化細菌に典型的な内膜構造を示した。16S rRNA 遺伝子の配列から、*Methylococcaceae* 科に属し、最も近縁な *Methyloparacoccus murrellii* R-49797^T 株との相同性が低かった(94.6%)ことから新属であると考えられた(図7)。GC含量、脂肪酸組成、キノン組成、メタン酸化酵素の系統関係、その他の表現型、遺伝型、系統学的性質を総合し、本株を新属新種のメタン酸化細菌 *Methylomagnum ishizawai* として提案した。

(5)安定同位体プロービング法を用いた水稻根圏のメタン酸化微生物食物連鎖の構造解析

根圏土壌は遅滞期をとまなわない速やかなメタン酸化活性を示した。¹³C 標識メタンを加えた根圏試料から抽出した DNA を分画後、ssu rRNA 遺伝子を対象とした真正細菌、真核生物群集の PCR-DGGE 解析を行ったところ、真正細菌、真核生物ともメタン由来の炭素を取り込んでいることが明らかとなった。根圏試料でメタン由来の炭素の取り込みに関わる真核微生物群集は、非根圏試料のそれとは大きく異なっており、根圏ではアメーバ、

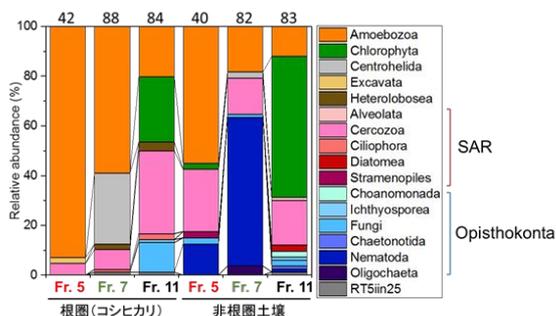


図8 密度勾配遠心分離後の DNA を対象とした真核微生物群集のクローン解析。Fr.5、Fr.7 は ¹³C を取り込んだ群集、Fr.11 は ¹³C の取り込みに関与しなかった群集

Cercozoa が優占していたのに対し、非根圏土壌では線虫が優占していた(図8)。非根圏土壌においてもアメーバ、鞭毛虫によるメタン由来炭素の取り込みが確認されたが、その系統関係は根圏とはやや異なっていた。以上のことから、水稻根圏におけるメタン酸化にかかわる微生物食物連鎖の特徴の一端が明らかになった。一方 T4 型ファージのカプシド遺伝子を対象とした解析では、ファージへのメタン由来炭素の取り込みは確認できなかった。

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8件)

1. 村瀬 潤 2013: 安定同位体プロービング

法で探る水田土壌の炭素動態と微生物、土と微生物, 67(1), 39-46.

2. 浅川 晋・渡邊健史 2013: 水田からのメタン発生とメタン生成古細菌、遺伝, 67(5), 579-585.

3. Yong Li, Takeshi Watanabe, Jun Murase, Susumu Asakawa, Makoto Kimura 2013: Identification of the major capsid gene (g23) of T4-type bacteriophages that assimilate substrates from root cap cells under aerobic and anaerobic soil conditions using a DNA-SIP approach. *Soil Biol. Biochem.*, 63, 97-105.

4. Yong Li, Takeshi Watanabe, Jun Murase, Susumu Asakawa, Makoto Kimura 2013: Growth of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogens on substrate from rice plant callus cells in anaerobic soil: an estimation to the role of slough-off root cap cells to their growth. *Soil Sci. Plant Nutr.* 59, 548-558.

5. Jun Murase, Yuriko Takenouchi, Kazufumi Iwasaki, Makoto Kimura 2014: Microeukaryotic community and oxygen response in rice field soil revealed using a combined rRNA-gene and rRNA-based approach. *Microbes Environ.*, 29, 74-81.

6. Ashraf Khalifa, Chol Gyu Lee, Takuya Ogiso, Chihoko Ueno, Dayeri Dianou, Toyoko Demachi, Arata Katayama, Susumu Asakawa 2015: *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov., a mesophilic type I methanotroph isolated from rice rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 3527-3534.

7. Rasit Asiloglu, Hiroki Honjo, Norikuni Saka, Susumu Asakawa, Jun Murase 2015: Community structure of microeukaryotes in a rice rhizosphere revealed by DNA-based PCR-DGGE. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 61, 761-768.

8. Jun Murase, Azusa Hida, Kaori Ogawa, Toshihiro Nonoyama, Nanako Yoshikawa, Katsuhiko Imai 2015: Impact of long-term fertilizer treatment on the microeukaryotic community structure of a rice field soil. *Soil Biol. Biochem.*, 80, 237-243.

[学会発表](計12件)

1. 村瀬潤, 南寿子, 李勇, 渡邊健史, 浅川晋, 木村真人 イネ由来の新鮮有機物を利用する水田土壌の真核微生物群集の解析 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島 2013.11

2. Rasit M. Asiloglu, Jun Murase Microeukaryotic community affected by rice roots in a rice field soil revealed by RNA-based DGGE analysis 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島 2013.11

3. Jun Murase, Chol Gyu Lee, Yong Li, Manami

- Shibata, Haruka Nakatani, Hisako Minami, Takeshi Watanabe, Susumu Asakawa, Makoto Kimura Assimilation of plant-derived carbon by microeukaryotes in rice field soil revealed using stable-isotope probing The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology 台湾 2013.11
4. Yong Li, Takeshi Watanabe, Susumu Asakawa, Makoto Kimura Identification of carbon flow derived from callus mediated by T4-type bacteriophages in microbial loop in rice soil 20th World Congress of Soil Science (WCSS) 韓国, 済州 2014.6
5. Jun Murase, Chol Gyu Lee, Yong Li, Manami Shibata, Haruka Nakatani, Hisako Minami, Takeshi Watanabe, Susumu Asakawa, Makoto Kimura Assimilation of plant-derived carbon by microeukaryotes in a rice field soil 15th International Symposium on Microbial Ecology (ISME 15) 韓国, ソウル 2014.8
6. Takeshi Watanabe Uniqueness of the community structure of methanogenic archaea in paddy field ecosystem International workshop 'Biogeochemistry of submerged agro-ecosystems: Properties, processes, cycles and functions' ドイツ, フライジング 2014.9
7. 浅川晋 水田生態系に生息する新規 typeI メタン酸化細菌の分離と同定 日本微生物生態学会第 30 回大会 土浦 2015.10
8. Rasit Asiloglu, Jun Murase Spatial distribution and community structure of soil protists in the rice rhizosphere revealed by a "mini-rhizobox experiment" 日本微生物生態学会第 30 回大会 土浦 2015.10
9. Jun Murase Diversity and ecology of microeukaryotic community in a paddy soil 12th International Conference of East and Southeast Asia Federation of Soil Science Society (ESAFS) 南京 2015.9
10. Jun Murase Methane-driven microbial food web in a rice field soil International Symposium "From classic to Frontiers: Methanotrophy and Meta-omics" 南京 2015.9
11. Ashraf Khalifa, 李哲揆, 小木曾拓也, 上野千穂子, Dayeri Dianou, 出町豊子, 片山新太, 浅川晋 水稻根圏土壌より分離した TypeI メタン酸化細菌 *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov. 日本農芸化学会 2015 年度大会 岡山 2015.3
12. Jun Murase Methane-driven microbial food web in a rice field soil International Symposium "From classic to Frontiers: Methanotrophy and Meta-omics" 南京 2015.9
- 〔図書〕(計 7 件)
1. 村瀬 潤 (分担執筆) 2013 : 第 10 章 原生動物 10-2. 直接顕微鏡法による繊毛虫の計数、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、p. 82、養賢堂、東京
2. 村瀬 潤 (分担執筆) 2013 : 第 10 章 原

- 生動物 10-3. 有殻アメーバの計数、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、p. 82、養賢堂、東京
3. 村瀬 潤 (分担執筆) 2013 : 第 10 章 原生動物 10-4. 裸アメーバ・べん毛虫の計数、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、p. 82、養賢堂、東京
4. 村瀬 潤 (分担執筆) 2013 : 第 10 章 原生動物 10-5. アメーバ・べん毛虫の分離・同定、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、p. 82、養賢堂、東京
5. 村瀬 潤 (分担執筆) 2013 : 第 16 章 Stable Isotope Probing (SIP)、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、pp. 137-144、養賢堂、東京
6. 渡邊健史・浅川 晋 (分担執筆) 2013 : 第 22 章 メタン生成・酸化菌 22-1. メタン生成菌、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、pp. 262-268、養賢堂、東京
7. 浅川 晋・渡邊健史 (分担執筆) 2013 : 第 22 章 メタン生成・酸化菌 22-2. メタン酸化菌、土壌微生物実験法第 3 版、日本土壌微生物学会編、pp. 268-273、養賢堂、東京

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ
http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~soil/Soil_Biology_and_Chemistry/toppupeji.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
村瀬 潤 (MURASE, Jun)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号 : 3 0 2 8 5 2 4 1

(2) 研究分担者
浅川 晋 (ASAKAWA, Susumu)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 : 5 0 3 3 5 0 1 4

渡邊健史 (WATANABE, Takeshi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師
研究者番号 : 6 0 5 4 7 0 1 6

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
ASILOGLU, Mohammed Rasit
名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士課程後期課程
LI Yong
名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士課程後期課程