

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15075

研究課題名(和文) Cryo-TOF-SIMS/SEMによる根圏効果のサブミリスケールの可視化

研究課題名(英文) Submillimeter-scale visualization of rhizosphere effect using Cryo-TOF-SIMS/SEM

研究代表者

村瀬 潤 (Murase, Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30285241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：水稲根圏の化学環境をサブミリスケールで可視化することを試みた。軟寒天培地のミニ根箱で栽培した水稲幼苗を寒天ごと切り出して瞬間凍結し、最近開発された、飛行時間二次イオン質量分析/走査電子顕微鏡(Cryo-TOF-SIMS/SEM)システムを用いて根および周辺のイオン濃度分布を数100マイクロメートルの範囲で可視化することに成功した。原生生物の空間分布からも水稲根圏の微視的な環境勾配について明らかにした。また、水稲根圏の細菌群集に原生生物の捕食作用が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物根からの浸出物の供給による根圏効果は広く知られた事実であるが、周辺微小生態系への影響についての空間的情報はほとんど得られていなかった。根圏の化学環境をサブミリスケールで解析した本研究の成果は、植物と土壤微生物の相互作用のホットスポットである根圏環境の研究の新たなアプローチ、またCryo-TOF-SIMS/SEMのポテンシャルを提示するものである。また、本研究で開発したガラス製ミニ根箱は、化学環境と微生物環境の同時可視化を実現した。

研究成果の概要(英文)：Chemical environments of rice rhizosphere were visualized at the submillimeter scale. Roots of rice seedlings grown in soft agar media were sampled together with the surrounding media without destruction of rhizosphere structure, and the distribution of dissolve compounds in the shock frozen root and rhizosphere was analyzed by using the Cryo-TOF-SIMS/SEM system. The results successfully demonstrated the chemical gradients in the rice rhizosphere within a several hundred micrometers. Environmental gradients in the rice rhizosphere were also demonstrated from the spatial distribution of protists. In addition, we showed that protozoan grazing plays a pivotal role in shaping the bacterial community in the rice rhizosphere.

研究分野：土壤微生物学

キーワード：水稲 根圏効果 化学環境 濃度勾配

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物根圏における物質動態と微生物との相互作用は、植物生育や土壌の物質循環にとって極めて重要である。研究代表者は、水稻根圏における微生物群集の生態の解明を進めており、水稻根圏に特徴的な原生動物が生息し微生物食物連鎖が駆動していることを明らかにする (Asiloglu et al. 2016) とともに、微生物食物連鎖構造が根からの距離に応じて数 100 μ m の範囲で変化することを見出しつつある。このことは、根圏環境における各種物質・生物の空間的勾配を示唆しているが、水稻根から供給される物質の濃度勾配を高解像度で捕らえることはこれまで非常に困難であった。

(2) 植物細胞内の水溶性成分の細胞単位での偏在状態を空間的に可視化する手法として、凍結-飛行時間二次イオン質量分析 / 走査電子顕微鏡 (Cryo-TOF-SIMS/SEM) システムが開発された (青木ら 2013)。この方法は、植物生体試料を急速凍結し、凍結状態を維持したまま安定的に TOF-SIMS 測定および SEM 観察を行なうことができるシステムで、通常の SIMS あるいは SEM で要求される試料の乾燥をとまなわないため、濃縮や移動などのアーティファクトなしで細胞内の溶存成分の空間分布をサブミリオオーダーで解析することが可能となった。このシステムは、細胞に限らず含水試料に広く利用することが原理的に可能であり、植物根圏の化学環境の微視的解析に応用できると期待された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、この Cryo-TOF-SIMS/SEM システムを適用し、根圏環境における溶存物質の空間的な精密視覚解析を行う。実試料の解析に先立ち、環境試料の溶存物質の Cryo-TOF-SIMS/SEM による解析のポテンシャルを明らかにするとともに、根圏試料の調整に適した水稻栽培条件を確立する。解析に必要な手法の最適化と解析可能な化学物質のカタログ化を進めるとともに、水稻の種類や生理状態と根圏の化学環境に与える影響を明らかにする。また、土壌微生物共存下の根圏の化学環境を解析し、植物根からの溶存物質が根圏微生物に与える影響や根圏環境の微生物バイオマスに含まれる化学物質の分布を明らかにすることで根圏効果の実態を可視化する。

(2) 植物根圏は、根から供給される有機物によって支えられる微生物活動のホットスポットである。水稻根圏には細菌、アーキアのほかにも繊毛虫、鞭毛虫、アメーバなどの原生生物が生息しており、捕食 - 被捕食をはじめとする様々な微生物間相互作用が想定されるが、その実態は明らかではない。本研究では、(1) で確立したマイクロコズム実験系を利用して、水稻根の細菌群集に及ぼす原生生物の捕食作用の影響を検証することをもう一つの目的とする。

3. 研究の方法

(1) 種子消毒を行い、無菌状態を保ちつつ生育した水稻 (日本晴) 幼苗をガラス製ミニ根箱 (図 1) に移植し、人工気象機を用いて栽培した。ガラス製ミニ根箱は大型のスライドガラス 2 枚でゴム製のスペーサーではさんだものであり、根の伸張の経時的観察と倒立顕微鏡下で根圏環境の微細観察が可能である。水稻根からの物質供給が最も盛んな根端部に焦点をあて、根および周辺環境を凍結、切り出しを行い Cryo-TOF-SIMS/SEM 解析を行った。試料の凍結は、溶存物質の濃縮や移動など、もっとも深刻なアーティファクトを生む

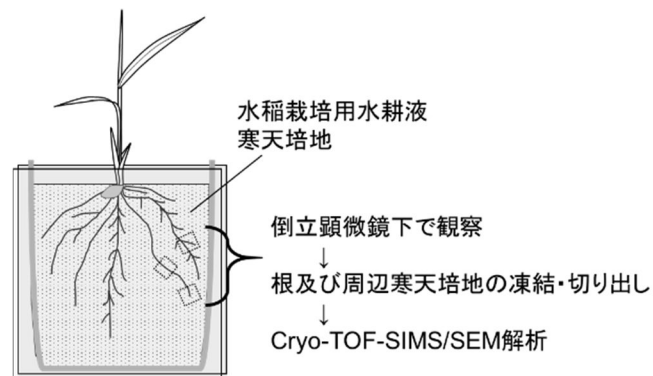


図1 ガラス製ミニ根箱

可能性のあるプロセスであり、Cryo-TOF-SIMS/SEM 解析に先立ち、根圏環境の化学的構造のかく乱を招かない根圏試料の採取方法と試料調製法 (急速冷凍法) を決定した。

(2) 土壌懸濁液と混合した軟寒天培地の入ったミニ根箱で日本晴幼苗を生育し、新たに伸張した水稻根周囲を倒立型位相差顕微鏡で観察し、原生生物 (繊毛虫、鞭毛虫、裸アメーバ) の空間分布を解析した。

(3) 水田土壌 (愛知県農業総合試験場安城農業技術センターD2区) の土壌懸濁液を孔径 2 μ m のヌクレオポアフィルターでろ過して原生生物を物理的に除去した細菌懸濁液を準備した。春日井氏液を含む軟寒天にこの細菌懸濁液を加えると同時に、捕食性原生生物の影響を調べるために、同じ水田土壌から分離した繊毛虫 (*Colpoda* sp.) のシストを添加した。これを培地としたガラス製のミニ根箱で水稻 (日本晴) 幼苗を栽培した。10 日間の栽培の後、軟寒天培地、水稻根を回収した。軟寒天培地中の細菌を蛍光顕微鏡により観察、計数するとともに、軟寒天培地、水稻根より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR による定量、PCR-DGGE (変性剤

濃度勾配ゲル電気泳動)およびアンプリコンシーケンスによる細菌群集の解析を行い、繊毛虫の接種が根圏細菌に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ミニ根箱での水稻栽培を無菌条件で行うための条件検討を行った。種子殺菌、寒天培地による無菌環境における発芽、幼苗栽培等の条件を検討した。その後軟寒天培地を入れたミニ根箱で水稻幼苗を栽培し、顕微鏡観察による根圏の無菌状態の確認をおこなった。閉鎖系での幼苗栽培については問題なく無菌的に行えたものの、開放系であるミニ根箱へ移植した後は、栽培中に供給する培養液の殺菌処理、栽培を行った人工気象装置内部の除菌処理にも関わらず、水稻根圏に微生物(細菌、原生生物)の生育が確認されるケースが頻出した。開放系における無菌状態での水稻の栽培にはさらに厳密な条件が必要であると結論された。

土壌懸濁液を加えた軟寒天培地を含むミニ根箱で栽培した水稻幼苗について、周囲の軟寒天とともに液体窒素で瞬間凍結した根端試料を Cryo-TOF-SIMS/SEM システムを用いて観察を行った。水稻根の根端試料を周囲の寒天試料ごと切り出し、液体窒素で瞬間凍結した。その後-20 程度に温度を上昇させることで、破壊を伴わず試料のトリミングを行うことができるようになった。凍結試料のトリミングや観察時の試料配置の仕方などを検討し、さらに明瞭なイメージを得ることに成功した。その結果、根およびそのごく近傍でカリウムおよび糖濃度が高くなっていることが確認されるとともに、ナトリウム、リン酸、硫酸に帰属されるイオン濃度が根近傍で低くなっている傾向が示された(図2)。これらのイオンの濃度勾配は根表面から 100 μm 以内の範囲であり、外部根圏におけるサブミリスケールの化学環境の変化の一端を明らかにすることができた。

その他に陽イオン、陰イオンともに質量電荷比(m/z)1~1,000 までの物質に関するデータが取得され、その精査と帰属が今後の課題となった。また、度重なる装置の故障により、当初予定した水稻の種類や微生物の有無による違いなどの詳細な検討には至らなかった。

(2) 水稻根には高密度で細菌捕食性の原生生物(アメーバ、鞭毛虫、繊毛虫)が生息しており、根圏周辺で活発に活動、増殖していることが明らかとなった。特に根端付近ではより広い範囲で原生生物の生息が確認された(図3)。顕微鏡観察によって見積もられた根圏に生息する原生生物の数は、土壌懸濁液にもともと存在していたと考えられる数よりもはるかに多かった。このことから、水稻根からは土壌微生物の食物連鎖を支えるだけの十分な有機物が供給されていることが確認された。餌となる微生物の高い生息密度がその生育に必要と考えられる繊毛虫が、根端付近に集中していたことから、根端は根圏への有機物供給が特に盛んであることが示された。根圏における原生生物の空間分布は種類によって大きく異なっており、繊毛虫が主に根端に生息しているのに対し、鞭毛虫は根端から基部までの根近傍に広く分布していた。アメーバは、根からやや離れた部位で観察され、繊毛虫や鞭毛虫と住み分けを行なっていることが明らかとなった。これらのことから原生生物に対する根圏効果はその種類によって空間的に異なることが示され、このことは根圏における物質の濃度勾配が形成されていることを示唆した。このような原生生物の空間分布の変化は、今後 Cryo-TOF-SIMS/SEM の解像度をもって充

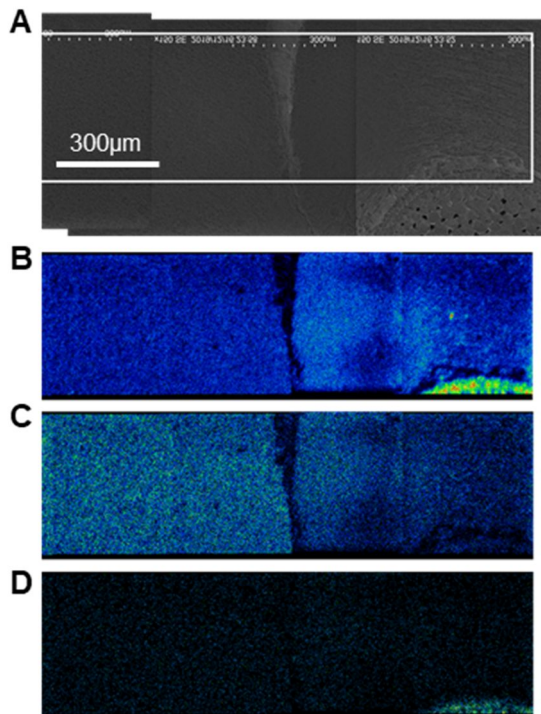


図2 水稻根および周辺培地の(A)SEM 画像および(B)カリウム、(C)ナトリウム、(D)糖類の TOF-SIMS 画像 Aの白枠は TOF-SIMS の解析範囲を示す

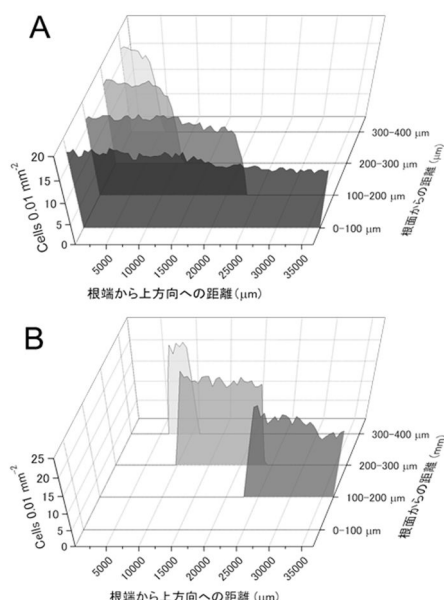


図3 水稻根周辺の(A)鞭毛虫および(B)アメーバの空間分布

分解析できるものと期待される。

(3) 水稻根圏環境におよぼす土壌原生生物の影響を検証するために、ミニ根箱での栽培に添加する土壌懸濁液から原生生物を除去するための条件検討を行い、孔径 2 μ m のフィルターによる物理的な分画によって、原生生物が効果的に除去できることを確認した。原生生物を除去した土壌懸濁液と、同じ土壌から分離培養した繊毛虫を接種したミニ根箱で水稻幼苗を栽培し、繊毛虫が根圏で活発に活動、増殖していることを確認した。

ミニ根箱から採取した培地中の細菌には、単体で存在するものと集合体を形成するものが観察され、集合体の数は繊毛虫の接種によって 3 倍程度増加した。一方、単体で存在する細菌数は繊毛虫の接種によって低下する傾向が認められた。また、16S rRNA 遺伝子のコピー数は繊毛虫の接種により、4 分の 1 程度に低下した。これらのことから、繊毛虫が単体で存在する細菌を捕食する一方で、捕食作用の影響を受けにくい集合体は生残、増殖するものと推察された。水稻根と培地から抽出した DNA を対象とした PCR-DGGE バンドパターンは繊毛虫の接種により大きく変化した。アンプリコンシーケンスによる群集解析でも同様の結果であった(図 4)。アンプリコンシーケンスでは、繊毛虫接種の有無に関わらず、Proteobacteria が 80% 以上を占め、Actinobacteria がそれに次いだ。Actinobacteria の構成に繊毛虫接種の影響は認められなかったが、Proteobacteria の構成は繊毛虫の有無によって大きく異なった。すなわち、繊毛虫無接種条件では、Pseudomonadales、Burkholderiales、Xanthomonadales、Sphingomonadales の各目が全配列の 10~33% を占めたのに対し、繊毛虫接種条件では、Enterobacteriales、Rhizobiales、および繊毛虫無接種条件とは異なる OTU が優占する Burkholderiales 目がそれぞれ 24~31% を占めた。それ以外にも、繊毛虫の有無により検出される配列に大きな違いが認められた。以上のことから、繊毛虫の捕食作用は水稻根圏に生息する細菌群集の存在形態や群集構造を支配する重要な生物因子であることが示唆された。

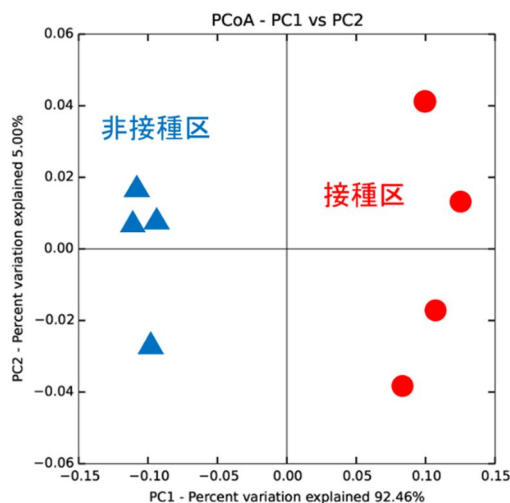


図 4 水稻根圏細菌群集におよぼす繊毛虫接種の影響

< 引用文献 >

- Asiloglu R, Murase J. Active community structure of microeukaryotes in a rice (*Oryza sativa* L.) rhizosphere revealed by RNA-based PCR-DGGE. *Soil Sci Plant Nutr* 62, 440-446 (2016)
- 青木弾, 黒田克史, 端谷祐人, 齋藤香織, 高間瑠佳, 松下泰幸, 福島和彦: Cryo-TOD-SIMS/SEM システムの開発と植物生体分子のトポケミカル分析への適応. *木材学会誌* 59, 367-374 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asiloglu, Rasit Murase, Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 Microhabitat segregation of heterotrophic protists in the rice (<i>Oryza sativa</i> L.) rhizosphere	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rhizosphere	6. 最初と最後の頁 82-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rhisph.2017.08.001	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 Murase, Jun	4. 巻 32
2. 論文標題 Quest of soil protists in a new era	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 99-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME3202rh	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 村瀬 潤	4. 巻 74
2. 論文標題 田んぼの中の原生生物たちの暮らし	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Jun MURASE
2. 発表標題 Ecology of protists in a rice rhizosphere
3. 学会等名 International Workshop of Mollisols Ecology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Maeda, Jun Murase
2. 発表標題 The effect of humic substances on the methanogenic microbial community in the artificial rice field soil
3. 学会等名 17th International Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村瀬 潤
2. 発表標題 水稻根圏における原生生物の生態と機能
3. 学会等名 大気-森林-土壌循環ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井裕也、村瀬潤
2. 発表標題 水稻根圏の細菌群集に及ぼす原生生物の影響
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村瀬 潤
2. 発表標題 田んぼの中の原生生物たちの暮らし
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2019年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
研究協力者	アシロオグル ラシット (Asloglu Rasit)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士後期課程 (13901)	
研究協力者	永井 裕也 (Nagai Yuya)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士前期課程 (13901)	