

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07699

研究課題名(和文) 土壌の生物性評価手法としての微生物起源揮発性有機化合物の網羅的解析法の適用

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of microbial volatile organic compounds for assessment of microbial communities in soil

研究代表者

境 雅夫 (SAKAI, Masao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：20225775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：土壌微生物由来の揮発性有機化合物(VOCs)を網羅的に解析することにより、土壌の生物性を評価するための解析方法の開発を行った。土壌中に存在する微量な微生物由来VOCsを測定するため、大容量ヘッドスペース(LVSH)法を適用した。測定条件の最適化によって土壌VOCsプロファイルを得ることに成功した。また、根圏土壌のVOCs解析についても、根圏土壌をつけた状態で植物体をLVSH容器に入れて測定する方法を開発した。さらに、土壌VOCsプロファイルと土壌細菌群集構造との関係性について評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立する微生物の産生する土壌VOCsの網羅的な解析方法は煩雑なサンプル調製の必要もなく非常に迅速・簡便であり、実際の土壌環境をほとんど破壊することなく分析できる特徴がある。また、土壌の生物性を十分に反映していると考えられる。さらに、得られた結果は各サンプル土壌の土壌VOCsプロファイルとして、各種の土壌分析結果とともにデータベース化することも可能であり情報の共有が可能である。よって、本技術は土壌の生物性評価法として意義あるものである。

研究成果の概要(英文)： We have developed the analytical method for assessing the biological properties of soil by comprehensive analyzing volatile organic compounds (VOCs) derived from soil microbes. The large volume headspace (LVSH) method was applied to measure trace microbial VOCs present in soil. Optimization of the measurement conditions allowed soil VOCs profiles to be obtained. VOCs analysis of rhizosphere soil has also been made possible by placing the plant with rhizosphere soil directly into LVSH container for measurement. In addition, we evaluated the relationship between soil VOCs profiles and soil bacterial community structures.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：土壌微生物 揮発性有機化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

持続可能な農業を推進してゆくためには、自然(生態系)の持つ潜在力を最大限に引き出して、活用することが必要である。とくに土壤微生物の活用はその可能性を秘めているが、膨大な種類の多様性や機能の複雑さゆえに、これまで十分に活用できている例は少ない。土壤微生物は、土壤 1g 中に数十億の数と数千~数万の種類が存在する多様な集団であることが知られている。しかも、これらが個々に独立しているのではなく、互いに相互作用をして生きている。中には、異なる微生物間で複雑なネットワークを形成して活動する場合もある。そこで、これら土壤微生物を適切に制御して農業に活用するためには、このような土壤微生物の生態を理解し、土壤の生物性を評価する必要がある。

土壤微生物について網羅的な分析により土壤の生物性を評価する手法として、土壤のオミックス解析が用いられる。これは土壤生態系の様々な分子全体の変動を解析し、土壤生態系の現象を包括的に調べる解析手法である。具体的には、DNA 分子を対象とするメタゲノム解析、mRNA のトランスクリプトーム解析、タンパク質のプロテオーム解析、代謝化合物のメタボローム解析がある。DNA を対象としたメタゲノム解析が微生物群の存在(微生物フロラ)を示すのに対し、下流にある代謝化合物を対象とするメタボローム解析は微生物群の活動状況を示すことができる。このメタボローム解析は水溶性化合物や溶媒抽出した化合物を対象としており、化合物の土壤からの抽出操作の複雑さや化合物の膨大な多様性などの問題があり、一斉に分析することが困難である。そこで、本研究では微生物による代謝化合物のメタボローム解析のなかでも微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)に着目した。

近年、微生物の代謝化合物である VOCs の多くは微生物間(さらに微生物と植物/動物間)に様々な作用を及ぼす情報化学物質(infochemicals)であるという知見が、蓄積されてきている(U. Effmert et. al., J. Chem. Ecol., 2012; R.R. Junker et. al., J. Chem. Ecol., 2013)。すなわち、土壤中の微生物間および微生物と植物・微小動物との間において VOCs を情報化学物質とした相互作用やネットワークが形成されていると考えられる。しかし、これまでの微生物産生 VOCs の研究は分離培養した特定の微生物種を用いたものであり、実際に土壤中でこれらの微生物が産生する VOCs を網羅的に調べた研究はほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では土壤微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)を指標とした網羅的解析により、土壤の生物性を評価する技術の開発を行うため、以下の項目を研究の目的とした。

土壤微生物の産生する揮発性有機化合物(VOCs)の網羅的な解析方法の確立

これまで土壤孔隙に存在する土壤空気中の微生物産生 VOCs を網羅的に解析した例はないため、新規な VOCs の網羅的な解析方法を確立し、その解析結果を土壤 VOCs プロファイルとして情報化する。

土壤 VOCs プロファイルと微生物フロラとの関連性の調査

異なる土壤サンプルの土壤 VOCs プロファイルと DNA を用いた微生物フロラ解析結果を照合することで、両者間の関係性を明らかにする。

さらに、以上の知見を総合して、開発した新規な VOCs の網羅的な解析方法が土壤の生物性評価を可能とする技術であるかを判断する。

3. 研究の方法

(1) 土壤 VOCs の測定

コアサンプラーで採取した土壤試料をそのまま 500mL 容量の専用容器に入れ、土壤空気中に存在する VOCs 成分を LVSH 法による GC-MS にて分析した。土壤試料を入れた専用容器は、30 の恒温槽内で 30 分間保温した後、直接自動濃縮装置に連結した。専用容器内のヘッドスペースガス成分は、ヘッドスペース自動濃縮装置(ENTECH 7100A、Entech Instrument inc.)により捕集および濃縮した。ガスクロマトグラフ装置(Agilent 7890A)および質量分析装置(Agilent 5975C)を用いた。GC-MS の測定後、得られた VOCs ピークについて、Agilent ChemStation software および NIST05a mass spectral database により化合物の同定を行った。また、供試土壤は大学園場の土壤(褐色低地土)を使用した。

(2) 根圏土壤および植物の VOCs 解析

供試土壤および植物は次のように調製した。大学内園場の土壤(褐色低地土)を篩(2mm 径)に通し、土壤 1kg に対して $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 2g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ を 4g、KCl を 0.8g 施肥した。トマト種子(桃太郎;タキイ)は 0.05% SDS 溶液に浸漬後、滅菌水で 5 回洗浄した。30mL 容のガラス製ポットに土壤 30g を入れ、種子を播種して人工気象器(温度 25、湿度 75%、明期 14h)で 3 葉期まで栽培した。コントロールとして土壤のみのサンプルも同様に人工気象器でインキュベーションした。栽培中の土壤水分量は滅菌脱イオン水で一定に調整した。

生育 3 葉期のトマト幼植物の葉に次の葉面処理を行い、異なる処理区を作製した。無処理区(H_2O で処理)、展着剤処理区(0.004%ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルの展着剤で処理)、アルカリ溶液処理区(pH10 のアルカリ溶液・展着剤混液で処理)の各処理液を葉にスプレーした。各植物は葉面処理後、人工気象器で 3 日間栽培し、GC-MS による測定を行った。植物と根圏土壤をポットごと LVSH 専用容器(500mL)に入れて VOCs を測定した。分析装置およ

び分析条件は上記の(1)と同様に操作した。

(3) 植物根圏細菌群集構造の解析

VOCs と根圏細菌群集構造との関係を調査した。上記(2)の実験に処理区を1つ追加したものをサンプルとした。具体的な処理区として、無処理区、展着剤処理区、アルカリ溶液処理区、MeJA (ジヤスモン酸メチル) 処理区 (展着剤溶液に終濃度 0.5%(v/v)の MeJA を添加した溶液で処理)の各処理液を葉にスプレーした。葉面処理後、人工気象器で再び栽培し、各処理区の根圏細菌群集構造の解析を行った。回収した植物体の地上部を取り除いた後、根に付着した大きな土塊をピンセットで除き、空中振盪法にて根圏土壌を採取した。

抽出した DNA (10ng/ μ L) をプライマー-341f-GC および 907r を用いて PCR 増幅した。反応液は Premix ExTaq™ Hot Start Version (タカラバイオ) 12.5 μ L、各プライマー (最終濃度 0.8 μ M)、抽出 DNA 1 μ L を含む計 25 μ L とした。増幅条件は 94 で 3 分間、[94 で 1 分間、54 で 1 分間、72 で 2 分間] \times 30 サイクル、72 で 10 分間、を用いた。各サンプルの増幅 DNA を DGGE 解析に供した。DGGE ゲルの変性剤濃度勾配は 32.5% から 61.25% を用い、60、100V、14 時間の条件で電気泳動を行った。泳動後のゲルを SYBR Gold にて染色し、UV 照射して撮影した。処理ごとの群集構造を比較するため、Phoretix 1D software (TotalLab) を使用してクラスター解析を行った。

4. 研究成果

(1) 土壌 VOCs の網羅的解析

土壌中に存在する微量な生物由来 VOCs を網羅的に測定するため、大容量ヘッドスペース(LVSH)法の適用を検討した。これは、試料を専用のガラス容器に入れ、その大容量のヘッドスペースガスを超低温濃縮することで GC-MS へ導入する方法である。物質の抽出操作などが不要で、試料そのままの状態の微量な VOCs を測定することが可能である。また、土壌空気には大量の水や二酸化炭素が存在するためヘッドスペースガスの GC-MS 分析を障害するが、この LVSH 法の濃縮方法ではこれらを除去して GC-MS へ導入することが可能である。しかし、これまで土壌の VOCs を測定する目的で LVSH 法が用いられたことはないため、測定条件の最適化および網羅的解析法としての評価を行った。

ヘッドスペースガスの測定量の影響

LVSH 法ではヘッドスペースガスを吸引 (Pulsed Vacuum Extraction) して GC-MS へ導入しているが、その際の導入量の最適量を調べた。1 回の吸引量が約 100mL であるため、1 回 (100mL) ~ 5 回 (500mL) の間で比較した。その結果、ヘッドスペースガスの導入量が多いほどより多くの VOCs ピークを検出することができた。図 1 にヘッドスペースガスの導入量 1 回 (100mL) および 5 回 (500mL) の結果を示した。これ以降の実験には注入方法として Pulsed Vacuum Extraction 100ml \times 5 を用いた。

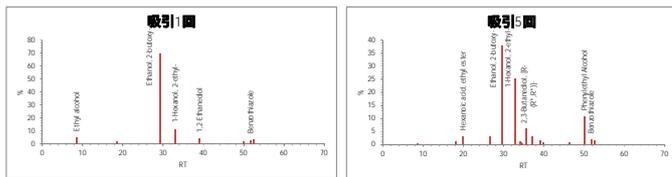


図 1 ヘッドスペースガス測定量の影響

土壌サンプル量が VOCs 検出に及ぼす影響

LVSH 専用容器 (500mL) に入れる適正な土壌の量について調査した。土壌サンプル量を 10g、50g、100g で測定した場合の結果を比較した。その結果、図 2 に示すように各ピークのエリア面積で比較した場合、100g の土壌サンプルを用いた時が最も低い数値を示した。一方、土壌サンプル量 10g の場合が最も高いエリア面積を示した。この原因は特定できていないが、ヘッドスペースの減少や土壌粒子への VOCs の再吸着が考えられる。

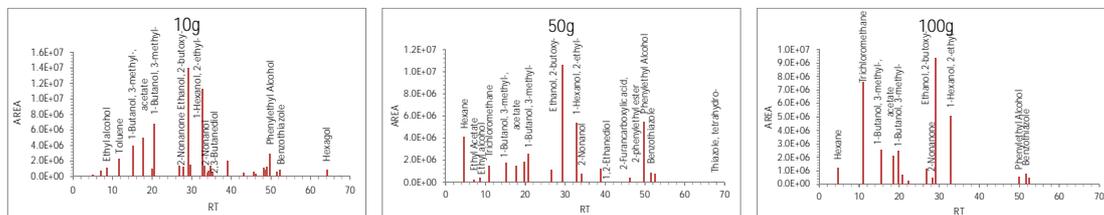


図 2 土壌サンプル量が VOCs プロファイルに及ぼす影響

土壌サンプル量と測定結果の安定性

土壌サンプル量が小さい方が VOCs のエリア面積が大きいことが示唆された。しかし、土壌サンプル量が小さい場合、測定結果の安定性は低下することが予想される。そこで、土壌サンプル量 10g と 30g で各 3 反復の土壌サンプルを準備して測定を行った。その結果は図 3 および図 4 に示した。土壌サンプル量 10g 内および 30g 内における検出された VOCs ピークの種類はともに一定していた。しかし、各ピークのエリア面積も考慮した場合は、土壌サンプル量 30g の方が VOCs プロファイルのパターンの類似性が高かった。したがって、土壌サンプル量 30g が測定結

果の安定性が高いと推察されるため、これ以降の実験では土壌サンプル量 30g で土壌 VOCs の測定を行った。

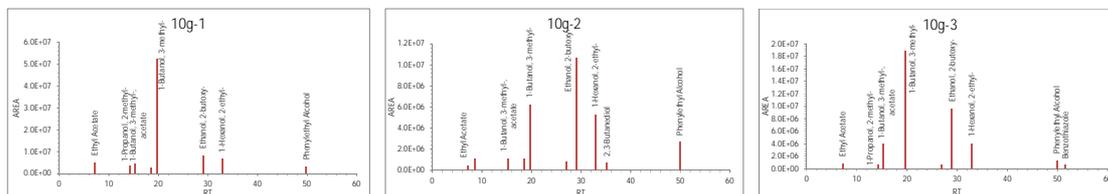


図3 土壌サンプル量 10g での測定結果の変動

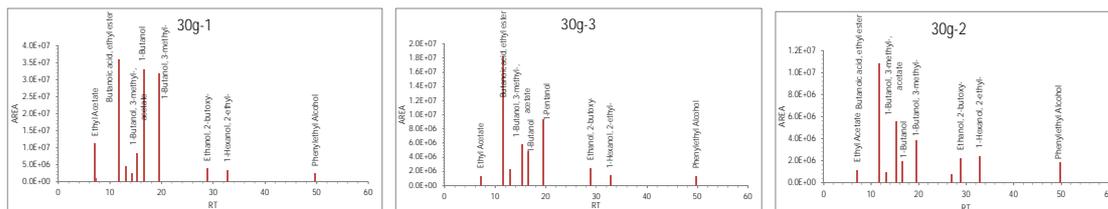


図4 土壌サンプル量 30g での測定結果の変動

植生の異なる土壌間での VOCs の変化

異なる土壌間における VOCs のパターンの違いについて調査した。学内土壌（褐色低地土）から、作物を栽培している畑土壌、植物のない裸地土壌、林地土壌をサンプルとして土壌 VOCs の測定を行った。その結果、植生の違いにより、VOCs プロファイルのパターンが大きく異なることが示された（図5）。土壌の環境により生息する土壌微生物の種類や活性が異なり、放出される微生物由来の VOCs の種類や量が変化することが示唆された。例えば、畑土壌では 2,3-Butanediol が検出されているが、裸地土壌には認められない。2,3-Butanediol は植物根圏に生息する *Bacillus* 属細菌が産生し、植物の病害抵抗性の発現に関与することが報告されている（M.A. Farag et al., J. Chem. Ecol., 2013）。すなわち、土壌 VOCs を網羅的に解析することでその土壌微生物の活動状況を推定できる可能性が明らかとなった。

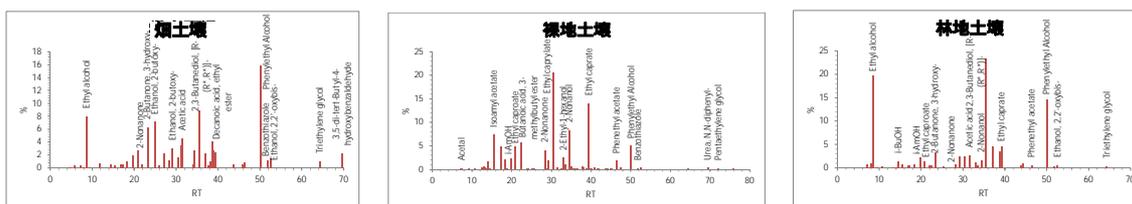


図5 植生の異なる土壌間での VOCs プロファイルの変化

(2) 根圏土壌および植物の VOCs 解析

上記の実験において植物根圏において植物の病害抵抗性に重要な働きを示す VOCs である 2,3-Butanediol が検出されたことから、根圏の微生物由来 VOCs の測定に注目した。根圏の微生物由来 VOCs を非破壊的に測定するためには、LVSH 専用容器に根圏土壌を含む植物体ごとに入れて測定する必要があると考えた。そこで、土壌 VOCs で用いた大容量ヘッドスペース (LVSH) 法を根圏の微生物由来 VOCs の測定に適用できるかについて検討した。植物をポットで栽培し、ポットごとそのまま LVSH 専用容器に移し、一定時間後の容器中のヘッドスペースに存在する VOCs 成分を網羅的に GC-MS にて分析した。

また、葉面処理によってジャスモン酸 (JA) 関連遺伝子の発現を誘導した場合、その影響が根圏に及ぶことが知られているため、葉面処理の違いによる VOCs の変化についても調査した。葉面処理後 3 日目の各処理区の VOCs プロファイルを図6に示した。この LVSH 法により、土壌サンプルと同様に植物体の存在するサンプルにおいても VOCs プロファイルが得られることが分かった。VOCs を詳細にみれば、(+)-4-Carene と -Phellandrene は植物体の存在するサンプルで共通して検出され、土壌のみのコントロール区では検出されていないため、植物体由来の VOCs と推定される。それ以外の土壌サンプルと共通する VOCs は根圏の土壌微生物由来の VOCs と考えられる。

さらに、葉面処理の違いに注目すると、Copaene と Linalool がアルカリ溶液で葉面処理した処理区のみで特異的に検出された。Copaene については、害虫による食害が生じた際や JA 合成遺伝子の発現を誘導したときにトマト植物から放出されることが報告されている（K. Ament et al., Plant Physiology, 2004; D.C. Degenhardt et al., Phytochemistry, 2010）。Linalool については、イネ白葉枯れ病原菌 (*Xanthomonas oryzae*) に対する抵抗性に関与することが報告されている（S. Taniguchi et al., Plant, Cell and Environment 2014）。またトマト植物においても、害虫による食害が生じた際や JA を処理した際に LeMT1 遺伝子が花弁、若葉、葉柄の

組織で発現し、Linalool が放出されることが報告されている (C.C.N.van Schie et al., Plant Mol. Biol., 2007)。これらのことから、Copaene と Linalool の検出は、アルカリ溶液葉面処理による植物体からの放出を示しており、この葉面処理は植物の病害抵抗性に影響を及ぼした可能性を示唆している。

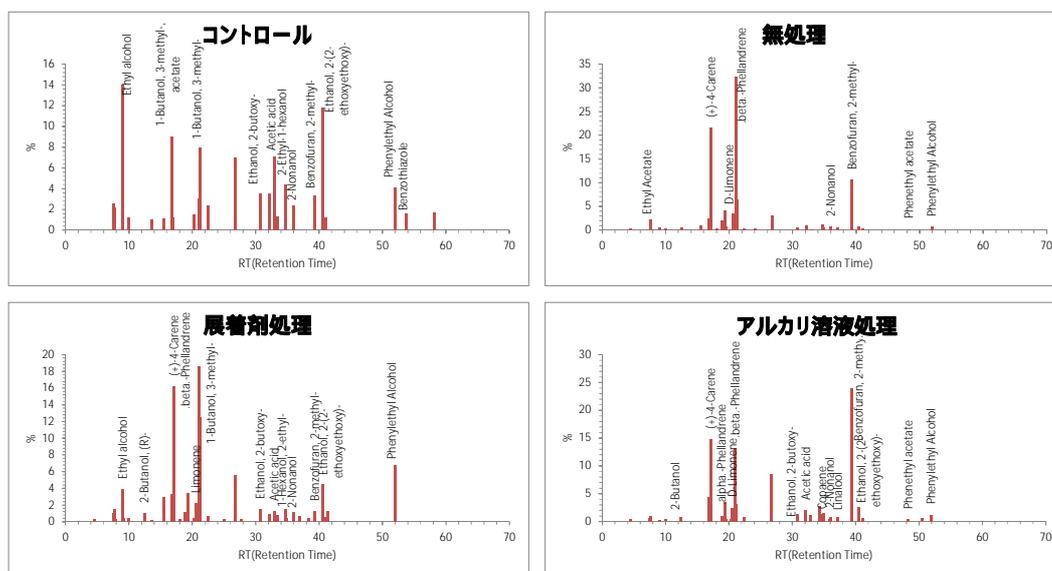


図6 根圏土壌の VOCs プロファイル

(3) 植物根圏細菌群集構造の解析

上記の実験によりアルカリ溶液による葉面処理によって、植物ホルモン JA がシグナル物質となりセスキテルペンの Copaene やモノテルペンである Linalool などの VOCs の放出が示唆された。また、JA で葉面処理した場合に根からリンゴ酸などの物質を分泌することで植物の耐病性に関与する微生物を根の周りにリクルートする作用が確認されている (M.A. Farag et al., J. Chem. Ecol., 2013)。

そこで、アルカリ溶液で葉面処理したときの根圏細菌群集構造の変化を調査し、VOCs プロファイルとの関係性について考察した。上記の実験の無処理区、展着剤処理区、アルカリ溶液処理区に加えて、MeJA (ジャスモン酸メチル) で葉面処理した MeJA 処理区を調製して解析した。細菌群集構造の分析は DGGE 法により行い (図7)、クラスター解析した結果を図8に示した。

アルカリ溶液処理区と MeJA 処理区が同じクラスターを形成したことから、両サンプルの根圏土壌の細菌群集構造は類似しており、この処理は根圏細菌群集に影響を与えることが示された。しかしながら、VOCs プロファイルの結果と合わせて考えた場合、細菌群集構造は明らかに変化していたが、アルカリ溶液処理区での微生物由来の特異的な VOCs は検出されなかった。すなわち、本実験では根圏細菌群集構造と VOCs プロファイルとの関係性を明らかにすることはできなかった。

本研究において土壌および根圏土壌における網羅的な VOCs プロファイルを検出することが可能であることを明らかにした。さらに今後、本技術を改良して検出感度や安定性を向上するとともに、多様な土壌での VOCs 解析結果の集積を進めれば、土壌の生物性評価指標として、土壌 VOCs プロファイルの利用が期待される。

無処理 展着剤 アルカリ MeJA
| a b | a b | a b | a b |

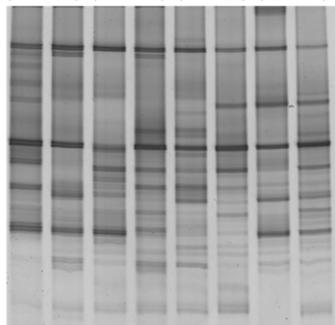


図7 根圏土壌細菌群の DGGE

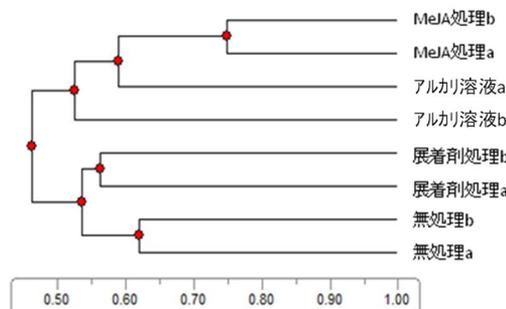


図8 細菌群集構造クラスター解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池永 誠・川内智裕・吉崎由美子・境 雅夫
2. 発表標題 土壌・植物根圏における揮発性有機化合物（VOC）の網羅的解析による微生物群集の評価
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川内智裕・山野優花・吉崎由美子・池永 誠・境 雅夫
2. 発表標題 土壌の生物性評価手法としての微生物起源揮発性有機化合物の網羅的解析法の検討
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池永 誠・山野優花・吉崎由美子・境 雅夫
2. 発表標題 植物および根圏微生物群の揮発性有機化合物のメタボローム解析
3. 学会等名 第13回 メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山野優花・池永 誠・吉崎由美子・境 雅夫
2. 発表標題 植物根圏土壌における微生物群集構造と揮発性有機化合物の網羅的解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会九州支部会
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
--	---------------------------	-----------------------	----