

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 ASILOGLU Muhammet Rasit

論文題目

Study on the community structure and spatial distribution of soil protists in a rice rhizosphere

(水稲根圏に生息する土壌原生生物の群集構成と空間分布に関する研究)

論文審査担当者

主査	名古屋大学准教授	村瀬	潤
委員	名古屋大学教授	中園	幹生
委員	名古屋大学教授	浅川	晋
委員	名古屋大学助教	渡邊	健史

論文審査の結果の要旨

植物根圏は植物と土壌が密接に関連する場である。植物根からは根の浸出物、ムシゲル、脱落細胞など様々な有機物が根圏に供給され、そこでは活発な微生物活動が観察される。反対に根圏微生物の活動は、植物根の生育や生理に影響を与えている。湛水環境で生育する水稲の根は、有機物の供給および酸素の供給を通じて根圏の酸化還元環境を制御しているという点で畑や草地の植物とは異なる特徴を有している。これまで、水稲根圏の微生物群集の多様性や機能については真正細菌やメタン生成古細菌などの原核生物を中心に研究が進められてきた。一方で、土壌環境中で有機物の分解者や他微生物の捕食者としての役割を果たす原生生物の水稲根圏環境における多様性やその制御要因に関する知見は極めて限られている。Asiloglu は、圃場レベルの調査およびモデル生態系における解析実験により、水稲根圏に生息する原生生物群集の特徴とその空間分布を解析した。

水田-小麦の二毛作圃場から水稲根、根圏土壌、非根圏土壌を経時的に採取し、PCR-DGGE (変性濃度勾配ゲル電気泳動) 法により原生生物群集の分子生物学的解析を行った。原生生物は多系統のグループで形成されているため、真核生物群集全体を網羅する 18S rRNA 遺伝子を対象とした。その際、従来のユニバーサルプライマーを改良したより広範な土壌真核微生物群を網羅した PCR プライマーと、イネ由来の 18S rRNA 遺伝子の増幅を特異的に抑制するためにデザインしたペプチド核酸 (PNA) の併用により、水稲根圏に生息する原生生物群集のより広範な解析を可能にした。DGGE のバンドパターンに基づく真核微生物群集の構造は、水稲根、根圏土壌、非根圏土壌の間で異なっており、水稲根圏に特異的な群集が生息することが明らかとなった。水稲根の真核微生物群集は経時的な変化を示した。収穫期の水稲、小麦に生息する根圏微生物群集を比較したところ、水稲特有のグループが存在することが示された。DGGE 断片から得られた塩基配列の解析の結果、植物寄生性の卵菌類 (*Pythium* sp. に近縁のグループ)、細菌捕食性の原生動物 (Rhizaria に属する鞭毛虫) が水稲根圏の原生生物群集を特徴付けていた。以上のことから、これまで細菌群集について知られている水田土壌の微生物に対する水稲の根圏効果が原生生物に対しても働いていることが示唆された。

水稲生育の各時期において根圏で活動している群集をより直接的に解析するために、rRNA を対象とした原生生物群集の分子生物学的解析を行った。ナイロンメッシュによって根域を制限してポット栽培を行なった水稲根および根圏土壌から全 RNA を抽出し、18S rRNA を対象とした RT-PCR-DGGE により真核微生物群集の解析を行った。その際、PNA よりも阻害効果が高い Locked Nucleic Acid を用いることにより、イネ由来の rRNA の PCR 増幅をさらに効率よく抑えることに成功した。水稲根圏は移植後 4 週間ごろまでは非根圏環境に比べて酸化的であり、根からの酸素供給が活発であると推察されたが、その後急激に還元的な環境へと変化した。真核微生物群集

論文審査の結果の要旨

植物根圏は植物と土壌が密接に関連する場である。植物根からは根の浸出物、ムシゲル、脱落細胞など様々な有機物が根圏に供給され、そこでは活発な微生物活動が観察される。反対に根圏微生物の活動は、植物根の生育や生理に影響を与えている。湛水環境で生育する水稲の根は、有機物の供給および酸素の供給を通じて根圏の酸化還元環境を制御しているという点で畑や草地の植物とは異なる特徴を有している。これまで、水稲根圏の微生物群集の多様性や機能については真正細菌やメタン生成古細菌などの原核生物を中心に研究が進められてきた。一方で、土壌環境中で有機物の分解者や他微生物の捕食者としての役割を果たす原生生物の水稲根圏環境における多様性やその制御要因に関する知見は極めて限られている。Asiloglu は、圃場レベルの調査およびモデル生態系における解析実験により、水稲根圏に生息する原生生物群集の特徴とその空間分布を解析した。

水田-小麦の二毛作圃場から水稲根、根圏土壌、非根圏土壌を経時的に採取し、PCR-DGGE (変性濃度勾配ゲル電気泳動) 法により原生生物群集の分子生物学的解析を行った。原生生物は多系統のグループで形成されているため、真核生物群集全体を網羅する 18S rRNA 遺伝子を対象とした。その際、従来のユニバーサルプライマーを改良したより広範な土壌真核微生物群を網羅した PCR プライマーと、イネ由来の 18S rRNA 遺伝子の増幅を特異的に抑制するためにデザインしたペプチド核酸 (PNA) の併用により、水稲根圏に生息する原生生物群集のより広範な解析を可能にした。DGGE のバンドパターンに基づく真核微生物群集の構造は、水稲根、根圏土壌、非根圏土壌の間で異なっており、水稲根圏に特異的な群集が生息することが明らかとなった。水稲根の真核微生物群集は経時的な変化を示した。収穫期の水稲、小麦に生息する根圏微生物群集を比較したところ、水稲特有のグループが存在することが示された。DGGE 断片から得られた塩基配列の解析の結果、植物寄生性の卵菌類 (*Pythium* sp. に近縁のグループ)、細菌捕食性の原生動物 (Rhizaria に属する鞭毛虫) が水稲根圏の原生生物群集を特徴付けていた。以上のことから、これまで細菌群集について知られている水田土壌の微生物に対する水稲の根圏効果が原生生物に対しても働いていることが示唆された。

水稲生育の各時期において根圏で活動している群集をより直接的に解析するために、rRNA を対象とした原生生物群集の分子生物学的解析を行った。ナイロンメッシュによって根域を制限してポット栽培を行なった水稲根および根圏土壌から全 RNA を抽出し、18S rRNA を対象とした RT-PCR-DGGE により真核微生物群集の解析を行った。その際、PNA よりも阻害効果が高い Locked Nucleic Acid を用いることにより、イネ由来の rRNA の PCR 増幅をさらに効率よく抑えることに成功した。水稲根圏は移植後 4 週間ごろまでは非根圏環境に比べて酸化的であり、根からの酸素供給が活発であると推察されたが、その後に急激に還元的な環境へと変化した。真核微生物群集

の DGGE バントパターンは酸化還元電位の低下にともなって大きく変化した。また、根圏環境が嫌氣的となった後も、水稻の生育にともなう真核微生物群集の遷移が認められた。このことから、水稻根から放出される酸素が活動する根圏真核微生物の群集に影響を与えること、また嫌気環境に適応した真核微生物が根圏に生息することが示された。rRNA レベルでの微生物群集の変化は DNA (rRNA 遺伝子) レベルの解析の結果よりもさらに明瞭であり、rRNA を対象とした解析が環境の変化に対する真核微生物の応答をより鋭敏に反映すると考えられた。水稻根圏で特徴的に活動する原生生物として、Heterolobosea に属するアメーバ、繊毛虫、および卵菌類が検出された。

水稻根圏における原生生物の空間分布をさらに詳細に解析するために、大型のスライドガラスを用いたミニ根箱を作成した。土壌懸濁液と混合した軟寒天培地の入ったミニ根箱で水稻幼苗を生育し、新たに伸張した水稻根周囲を顕微鏡観察した。水稻根には高頻度で従属栄養性の原生生物（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。特に根端付近では集中的な原生生物の生息が確認された。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微視的空間内で異なることが示された。

以上のように、Asiloglu は水稻根および根圏土壌における原生生物群集を解析し、分子生物学的手法の改良により示された原生生物グループの存在を含め、その特徴を初めて明らかにした。原生生物群集に与える根圏効果は、捕食者、分解者として位置づけられる各微生物群の根圏における生態学的役割を示すものである。また、rRNA レベルでの解析結果により、原生生物が嫌気条件の水稻根圏においても一定の役割を果たしていることを示した。さらに養分吸収および細胞分裂が活発な根端における集中的な原生生物の分布は、原生生物が水稻の生育に何らかの影響を与えている可能性を示唆するものである。本研究の成果は、水田土壌の微生物学分野において新規性、独自性に優れるとともに、水稻根圏における土壌原生生物の多様性とその潜在的重要性を指摘したという点で当該分野の学術研究に大きく貢献するものと判断された。審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査に合格と判定した。