

## 学位論文題名

## Metabolomics of Rice Root Exudates

(イネ根分泌物のメタボロミクス解析)

## 学位論文内容の要旨

植物はその光合成産物のうち5~30%と、相当な部分を rhizodeposition として根から放出することが知られている。それら根分泌物は周辺環境の物理化学的改変や根の先端の保護など、様々な役割を持つと考えられている。特に生物的影響のなかでも大きなものとして根圏効果が挙げられる。これまでの研究で、根分泌物による根圏微生物叢への影響として真菌/細菌の群集構造や、微生物の機能遺伝子の分布が変化することが知られている。また、植物はストレス耐性機構の一環として根分泌物を介した根圏微生物やアーバスキュラー菌根菌(AMF)との共生を行っている。それらの貧栄養条件下での養分獲得において欠かせない共生機構は、根から放出される多くのシグナル伝達物質によって制御されていると推定される。しかし、根分泌物の多くは微生物によって容易に分解される化合物から構成されており、無菌的栽培が困難なためもあり、これまで詳細な分析がなされてこなかった。有機酸やアミノ酸、各種の二次代謝産物などといった、根圏に存在する特定の化合物を対象とした研究例はいくつかあるが、根分泌物全体について網羅的な解析を行った例はこれまで認められない。そこで本研究ではまずイネを無菌的に水耕栽培する手法を確立した。これにより微生物の混入による影響無しに根分泌物を効率よく回収することが可能になった。この系を用いて、異なるリン(P)栄養条件下で栽培したイネ幼植物体の水耕培養液から根分泌物を回収し、gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)、および ultra performance liquid chromatography (UPLC)/TOF-MS といったメタボロミクスの手法によって以下の解析を行った。

## 無菌水耕栽培法の確立

従来用いられていた無菌水耕栽培法では植物種の要求により水耕培養液への通気を要すること、また植物一個体あたりの占有スペースが大きいことなどから、複数処理、多反復での実験には不適當であった。そこで我々は 1)通気が不要であること、2)1 個体が比較的小型であること、の2条件を満たす植物種として、イネ(*Oryza sativa* L.)の幼植物体を選定した。表面殺菌したイネ(*O. sativa* L. cv. Nipponbare)の種子を MS-gelrite 平板培地に播種して暗所に2日間静置して発芽させた後、人工気象器に移し、水耕培養液を4日ごとに交換しながら生育させた。栽培には500 mL容の保存ビンまたは50 mL容の試験管を用いた。栽培装置の上部は滅菌済みのポリプロピレンフィルムで覆い、一部を通気可能な紙片で置換した。無菌状態は、市販の1/10強度に希釈したSCD培地に水耕液を添加して確認した。今回確立した栽培手法は、既存の安価な装置の組み合わせで作成可能である。以上のように、無菌水耕系を確立することにより、根分泌物の正確な測定が可能となった。またこの系により、微生物接種の効果も明確にすることが可能となった。

## GC-MS による解析

根分泌物に含まれる化合物の中でも主に一次代謝産物について解析するため、主

として低分子量帯域、 $m/z$  50-600 の化合物を対象とした GC-MS 分析を行った。前項で確立した手法を用いてイネを P 欠乏条件(-P)および標準条件(対照区、+P)下で無菌的に水耕栽培した。処理 4 日目および 8 日目に水耕培養液を交換する際に 25 mL のうち 5 mL を回収して凍結乾燥し、残渣を 100  $\mu$ L の超純水に再懸濁した後再度凍結乾燥し、乾固物を 100  $\mu$ L の冷メタノールで溶出することで 50 倍に濃縮した。GC-MS においては、水耕培養液から多数の糖やアミノ酸を含む 78 の主要ピークが検出され、そのうち 70 の同定/推定に成功した。また、GC-MS で検出、同定されたピークエリア値について主成分分析(PCA)、正交偏最小二乗法弁別分析(O-PLS-DA)といった多変量解析を行った。PCA では 8 日目において P 処理の影響が明瞭ではなかった。これは栽培日数の経過による影響が大きかったため P 処理の影響が不明瞭になったと考えられる。そこで O-PLS-DA による解析を実施した。これは P 処理、栽培日数のそれぞれに応答する成分を抽出した上で判別分析を行うものである。これにより 4 日目、8 日目のいずれにおいても P 処理による分離が明確になった。その際、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)、単糖の一種および未同定の 2 化合物が P 処理に応答して有意に変動していることが明らかになった。

### UPLC/TOF-MS による解析

分子量帯域  $m/z$  100-1000 を対象とした UPLC/TOF-MS により、GC-MS では検出不可能な高分子量帯域の化合物についても分析を行った。前項と同様に P 欠乏条件(-P)および標準条件(対照区、+P)下で無菌的に水耕栽培したイネの水耕培養液から処理 4 日目および 8 日目に根分泌物を回収した。100  $\mu$ L のメタノールに溶出したサンプルを、UPLC/TOF-MS による分析に供した。検出された total ion chromatography (TIC) について MarkerLynx™を使用して PCA を行った。ESI positive mode で検出されたピーク群は PCA によって P 処理および栽培日数に応じて明瞭な分離を示したが、栽培日数の経過による変動の方がより顕著であった。ESI negative mode で検出されたピークについては良好な分離が見られなかったため、以後の解析からは割愛した。ESI positive mode で検出された 6481 のピークのうち、PCA において 0.05 以上の有意差を示した 704 のピークについてさらに解析を行い、P 処理および栽培日数によって 25%以上の増減を示したピーク群を可視化した。両処理に対して応答したグループの中で最大のものは、P 処理の有無に関わらず処理 8 日目で増加した 163 のピーク群であった。次に大きかったのは、処理 4 日目において -P 処理により増加した 140 のピーク群であった。また、これら処理や栽培日数に応じて変動したピーク群について元素組成の推定を行った。

今回確立されたイネ幼植物体の無菌栽培手法の活用により、根分泌物の無菌的回収および網羅的分析が可能になった。本研究ではイネの根分泌物に含まれる化合物において、GC-MS では P 処理に応じて変動した化合物は 4 種であり、栽培日数の経過に伴って 58 種の化合物が変動したのと比較して少数であった。対照的に、比較的高分子量の化合物を対象とする UPLC/TOF-MS では、多数のピークが P 処理に応答して変動した。この分析から、根分泌物の P 処理に対する反応は、低分子領域(GC-MS)よりも高分子領域(UPLC/TOF-MS)で顕著であることが明らかとなった。根分泌性の一次代謝産物(比較的低分子量)は周辺微生物によりエネルギー源や構成化合物として利用されるが、主として生育段階により大きく変動し、P 栄養条件などの周辺環境の影響をさほど受けないと考えられる。一方、根分泌性の二次代謝産物(比較的高分子量)は周辺へのシグナル伝達や根圏における植物・微生物共生関係に影響を及ぼす可能性があり、P 栄養条件により敏感に反応してその構成を変化させることが示された。したがって、これら網羅的な解析により、特別な根分泌化合物が放出され、根圏機能を改良していると推定された。特に、分泌された二次代謝産物の種類が多ことから、微生物の栄養源というよりは何らかのシグナル機能を持つ化合物が分泌されていると推定された。これらの知見は今後、植物根・微生物間相互作用の解明に大きな進展をもたらすと期待される。

# 学位論文審査の要旨

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 主 査 | 教 授 | 大 崎 | 満   |
| 副 査 | 教 授 | 松 井 | 博 和 |
| 副 査 | 助 教 | 渡 部 | 敏 裕 |
| 副 査 | 准教授 | 松 浦 | 英 幸 |

学 位 論 文 題 名

## Metabolomics of Rice Root Exudates

(イネ根分泌物のメタボロミクス解析)

本論文は 56 頁、参考文献 1 報、図 25、表 6 から構成された英語論文で、他に参考論文が 1 報付属している。本論文の目的は、根からの分泌物を解析するために、1) 無菌培養系を開発し、2) 分泌された、一次代謝産物(比較的低分子量)と二次代謝産物(比較的高分子量)の網羅的機器分析法を開発し、3) それらを用いて、リン栄養が根分泌物に及ぼすメタボロミクス解析をおこなうことにある。

植物は光合成産物のうち相当部分を rhizodeposition としてその根から放出することが知られている。それら根分泌物には周辺環境の物理化学的変化や根の先端の保護、植物根圏微生物叢の変化などさまざまに作用すると考えられている。しかし、分泌物の多くは微生物によって容易に分解されてしまうため、これまで詳細な分析がなされてこなかった。本研究ではまずイネを無菌的に水耕栽培し、微生物の影響無しに根分泌物を効率よく回収する手法を確立した。つぎに、異なるリン(P)栄養条件下で栽培したイネ幼植物体の水耕培養液から根分泌物を回収し、gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)、および ultra performance liquid chromatography (UPLC)/TOF-MS といったメタボロミクスの手法によって以下の解析を行った。

### 無菌水耕栽培法の確立

従来の無菌水耕栽培法では水耕培養液への通気を要すること、また一個体あたりのスペースが大きいことなどから、複数処理、多反復での実験には不相当であった。そこで、1)通気が不要であること、2)1 個体が比較的小型であること、の 2 条件を満たす植物種として、イネ(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)の幼植物体を選定した。表面殺菌したイネ種子を MS 平板培地に播種して 2 日間発芽させた後、水耕培養液を 4 日ごとに交換しながら生育させた。栽培には 500 mL 容の保存ビンまたは 50 mL 容の試験管を用いた。栽培装置の上部は滅菌済みのポリプロピレンフィルムで覆い、一部を通気可能な紙片で置換した。無菌状態は、市販の 1/10 強度に希釈した SCD 培地に水耕液を添加して確認した。以上のように、無菌水耕系を確立することにより、根分泌物の正確な測定が可能となった。またこの系により、微生物接種の効果も明確にすることが可能となった。

### GC-MS による解析

根分泌物に含まれる化合物の中でも主に一次代謝産物について解析するため、GC-MS 分析を行った。前項で確立した手法を用いてイネをリン欠乏条件(-P)および標準条件(対照区、+P)下で無菌的に水耕栽培した。処理 4 日目および 8 日目に水耕培養液を交換する際にその一部を

回収して凍結乾燥し、乾固物をメタノールで抽出して 50 倍に濃縮した。GC-MS においては多数の糖やアミノ酸を含む 78 の主要ピークが検出され、そのうち 70 の同定/推定に成功した。また、GC-MS で検出、同定されたピークエリア値について主成分分析(PCA)、正交偏最小二乗法弁別分析(O-PLS-DA)といった多変量解析を行ってリン(P)処理および栽培日数の影響を抽出した。PCA では 8 日目において P 処理の影響が明瞭ではなかったが、O-PLS-DA の導入により 4 日目、8 日目のいずれにおいても P 処理による分離が明確になった。

#### UPLC/TOF-MS による解析

GC-MS では検出不可能な高分子領域の化合物について、UPLC/TOF-MS による分析を行った。前項と同様にリン欠乏条件(-P)および標準条件(対照区、+P)下で無菌的に水耕栽培したイネの水耕培養液から処理 4 日目および 8 日目に根分泌物を回収し、UPLC/TOF-MS で検出された total ion chromatography (TIC)について PCA を行った。ESI positive mode で検出されたピーク群は PCA によって P 処理および栽培日数に応じて明瞭な分離を示したが、栽培日数の経過による変動の方が顕著であった。検出された 6481 のピークのうち PCA において 0.05 以上の寄与率を示した 704 のピークについてさらに解析を行い、P 処理および栽培日数によって 25%以上の増減を示したピーク群を可視化した。両処理に対して応答したグループの中で最大のものは、P 処理の有無に関わらず D8 で増加した 163 のピーク群であった。次に大きかったのは、D4 において-P 処理により増加した 140 のピーク群であった。

今回確立されたイネ幼植物体の無菌栽培手法の活用により、根分泌物の無菌的回収および網羅的分析が可能になった。GC-MS においては P 処理に応じて変動する化合物は栽培日数の経過に伴う変化と比較して少数であったのに対し、UPLC/TOF-MS では多数のピークが P 処理に応答して変動することが示唆された。これにより、根分泌性の一次代謝産物(比較的低分子量)は周辺微生物によりエネルギー源や構成化合物として利用されるが、主として生育段階により大きく変動し、P 栄養条件などの周辺環境の影響をさほど受けないと考えられた。一方、根分泌性の二次代謝産物(比較的高分子量)は周辺へのシグナル伝達や根圏における植物-微生物共生関係に影響を及ぼす可能性があり、P 栄養条件により敏感に反応してその構成を変化させることが示された。したがって、これら網羅的な解析により、特別な根分泌化合物が放出され、根圏機能を改良していると推定された。特に、分泌された二次代謝産物の種類が多いことから、微生物の栄養源というよりは何らかのシグナル機能を持つ化合物が分泌されていると推定された。これらの解析法の確立とそれによって得られた知見は今後、植物根-微生物間相互作用の解明に大きな進展をもたらすと期待される。

よって、審査員一同は、鈴木克昌が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。