

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00580

研究課題名(和文) ウキクサ科植物の葉状体の機能強化とコベネフィット型植生浄化プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of a co-benefit type vegetative treatment system using the Lemnoideae with enhanced frond function

研究代表者

田中 靖浩 (TANAKA, Yasuhiro)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：50377587

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)：ウキクサ亜科植物の一つであるコウキクサの生育を2倍以上促進する菌株としてLA-C6株、SP-2-C10株をコウキクサの葉状体を分離源として取得した。また、これら2株には藻類に対する生育促進効果も見出された。さらに、有害化学物質分解菌として、フェノールやトリクロロエチレンなどの分解に関与するdmpN遺伝子を保有する菌株27株をウキクサ亜科植物の葉状体から分離した。これらの菌株のうち、21L25株、22L16株、22L21株、32L3株、22L7株を導入したウキクサにおいて、フェノール分解機能の強化に成功した。また、22L7株に関しては、コウキクサに対する生育促進活性も見出された。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in isolating two plant growth-promoting bacteria (PGPB; the strains LA-C6 and SP-2-C10) from Lemna minor, a member of Lemnoideae. These PGPB also elevated the growth of microalgae. Additionally, 27 bacterial strains, which have a gene for phenol hydroxylase involving degradation of phenol and trichloroethylene etc., were isolated from the fronds of Lemnoideae. By inoculating the phenol hydroxylase gene positive strains, 21L25, 22L16, 22L21, 32L3 and 22L7, into aseptic duckweed, we successfully obtained the plant possessing high level of phenol degrading ability. During this process, it was also revealed that the strain 22L7 is a PGPB for L. minor.

研究分野：環境微生物学

キーワード：ウキクサ PGPB 水質浄化

### 1. 研究開始当初の背景

ウキクサ亜科植物の多くは葉と茎が融合した葉状体と根で構成される浮遊性の水生植物でデンプンを多く含有することから、バイオエタノール等のエネルギー生産資源や家畜の飼料としての利用が検討されている。このような背景から、我々は当該植物の根部分(根圏)から多数の有害化学物質分解菌と植物生育促進効果を示す微生物(Plant Growth Promoting Bacteria; PGPB)を分離培養し、これらを根圏に再導入すること(根圏機能の強化)でウキクサ亜科植物の浄化能力とバイオマス生産性を向上させ、排水処理とエネルギー資源生産の両方を可能とする“コベネフィット型植生浄化ユニット”の開発を目指してきた。以上のような検討は、植物の浄化機能においては、「浄化能力=根圏微生物が関与」という定説に基づき行ったものであるが、ウキクサ亜科植物に関しては葉状体も水に接触していることから、ここに生息する微生物も水質浄化に関与している可能性が考えられる。しかし、これまでにウキクサ亜科植物の葉状体に生息する微生物に関する研究例は無く盲点となっていた。

### 2. 研究の目的

これまで未開拓であったウキクサ亜科植物の葉状体に生息する微生物群集を標的とし、まずはPGPBと有害化学物質分解菌を検索し、これらを植物体に再導入することで“機能強化ウキクサ亜科植物”を創製することを目的とした。さらに、“機能強化ウキクサ亜科植物”を用いたコベネフィット型植生浄化ユニットの構築についても検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウキクサ亜科植物

山梨県森林公園「金川の森」内の人工池で栽培したウキクサ(*Spirodela polyrhiza*)、アオウキクサ(*Lemna aequinoctialis*)、コウキクサ(*Lemna minor*)と研究室内で栽培している無菌のウキクサ、コウキクサ、アオウキクサ、ミジンコウキクサ(*Wolffia arrhiza*と*Wolffia globosa*の2種)を用いた。

#### (2) 葉状体からの微生物分離

各ウキクサ亜科植物の葉状体からの微生物分離はDTS培地(市販のTryptic Soy Brothを100倍希釈したもの)を用いた平板培養法により行った(25°Cで1ヶ月間の培養)。

#### (3) ウキクサ亜科植物葉状体由来微生物からのPGPBのスクリーニング

系統解析を行った菌株の中から特に新規性が高い菌株(既知種由来16S rRNA遺伝子の相同性が95%以下のもの)を対象にPGP活性を有する菌株を検索した。各菌株の懸濁液を植物栽培用のHoagland培地40 mLに接種し、

無菌コウキクサを1株浮かべた。その後、人工気象器内で2週間栽培後に生育したコウキクサの葉状体数を計数し、PGP活性(微生物接種区の葉状体数/微生物非接種区の葉状体数)を求めた。

#### (4) ウキクサ亜科植物葉状体由来微生物からの有害化学物質分解菌の検索

本研究では、有害化学物質分解菌のモデルとしてフェノール分解菌をターゲットとした。河川水中の微生物群集を無菌ウキクサに接種後、50 ppm フェノールを含む培地で一定期間栽培した。その後、ウキクサの葉状体から分離した微生物菌株96株を対象に、フェノール脱水素酵素遺伝子(*dmpN*)の有無を指標にフェノール分解菌の検索を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ウキクサ亜科植物葉状体由来微生物からのPGPBのスクリーニング

ウキクサ、アオウキクサ、コウキクサの3種のウキクサ亜科植物の葉状体から計261株の微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析に供した。その結果、全分離株の約27%に相当する70株が系統的に新規な微生物であることが明らかとなった。これらの中で比較的培養が容易な30株を対象にコウキクサに対するPGPB検索を行ったところ、2.5倍以上の生育促進効果を示す菌株として最終的に9株を得た(図1;この中で安定的に活性を示す3株(LM-L3株、SP-2-C10株、LA-C6株)に絞り、以降の実験に用いることとした)。なお、この9株の中には、これまでに分離培養例が4例しかない*Armatimonadetes*門に属する菌株も含まれていた。

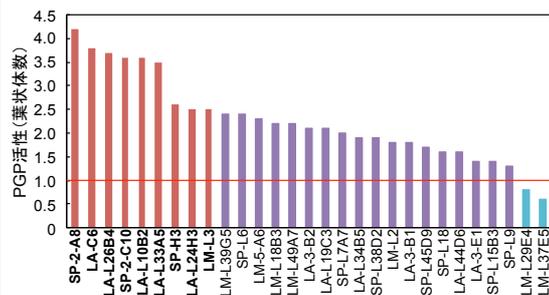


図1. 葉状体由来微生物からのPGPBのスクリーニング

#### (2) 取得したPGPBの生育促進メカニズムの比較

陸生植物のPGPBが有する代表的な生育促進因子(シデロフォア生産能、インドール-3-酢酸生産能、リン酸可溶化能)を測定したところ、シデロフォア生産については3株すべてで確認されたが、不溶性リン酸可溶化能を有するのはSP-2-C10株、LM-L3株の2株、インドール-3-酢酸の生産能を有する菌株はLM-L3株の1株のみであった。また、これら3株の様々なウキクサ亜科植物に対する生育促進能を比較したところ、それぞれの生育促

進スペクトルが異なっていた。これらの結果から、本研究で取得した3株のPGPBはそれぞれ異なるメカニズムでコウキクサを生育促進している可能性が高いと考えられた。

(3) 下水二次処理水中におけるPGPB接種機能強化コウキクサの生育(簡易植生浄化ユニットにおけるPGPBの生育促進効果)  
 本研究で取得した3株のPGPBを接種したコウキクサの下水二次処理水での生育を非接種区と比較した。その結果、3株すべてのPGPB接種コウキクサにおいて既存のウキクサ亜科植物根由来PGPB(P23株、SP4株)と同様に非接種区よりもバイオマス生産能が2倍以上となっており、PGPBとしての有効性が確認された(図2)。

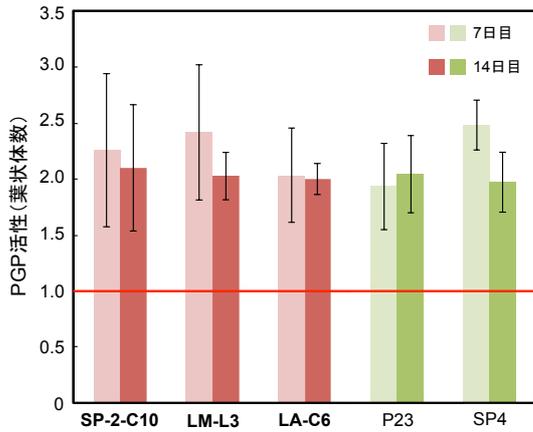


図2. 下水二次処理水中におけるウキクサ亜科植物葉状体由来PGPBの活性

また、これら3株のうち、ハンドリングしやすい(菌体の調製が容易な)SP-2-C10株とLA-C6株PGPBについて葉状体と根の局在性についてチェックしたところ、いずれの菌株も7日間の共培養以降で根よりも葉状体の方が10倍以上の菌数が定着していることが明らかとなり、これらのPGPBが葉状体由来であることの裏付けが取れた(図3, 4)。

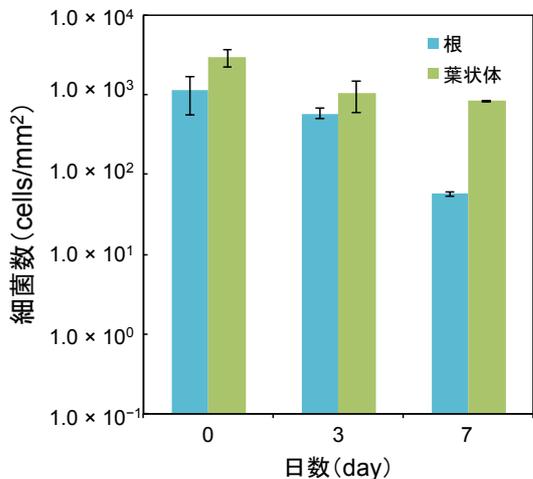


図3. LA-C6株のコウキクサ根および葉状体における細菌数

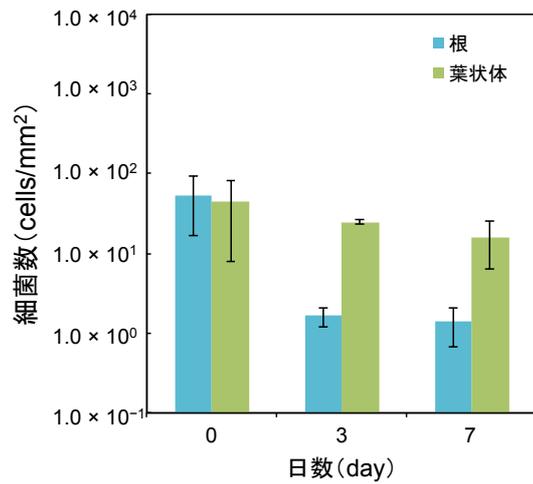


図4. SP-2-C10株のコウキクサ根および葉状体における細菌数

(4) SP-2-C10株とLA-C6株による藻類の生育促進

SP-2-C10株とLA-C6株のウキクサ以外への利用の可能性を探るべく、オイル含量が高く新たなバイオマスリソースとして注目されている微細藻類 *Euglena gracilis* に対する生育促進活性を測定した。その結果、使用する培地条件により活性は異なるものの、いずれの菌株とも1.3~4.5倍の生育促進効果を有し、MGPB (Microalgae Growth Promoting Bacteria) としても有効であることが示された(図5)。

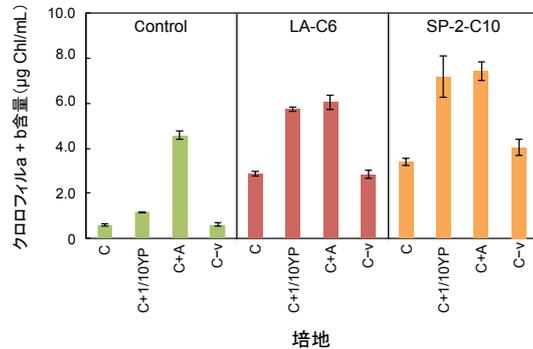


図5. LA-C6株およびSP-2-C10株による藻類の生育促進

C: C培地(無機塩培地), C+1/10YP: C培地+酵母エキス, C+A: C培地+アンモニア, C-V: C培地-ビタミン

(5) ウキクサ亜科植物葉状体由来微生物からのフェノール分解菌の検索

50 ppm フェノールで馴化栽培したウキクサの葉状体から分離した96株の細菌をターゲットに、フェノール脱水素酵素遺伝子(*dmpN*)を有する菌株を検索したところ、21株に当該遺伝子が検出された。これらの菌株の中で生育が良好な菌株8株について、実際にフェノール分解活性を有するか調べたところ、すべての菌株に活性が検出された(50 ppm フェノールを含む培地での培養時に3日以内に80%以上のフェノールを分解)。

(6) フェノール分解菌の導入によるウキクサの機能強化

上記のフェノール分解菌 8 株の中で、特に活性の高かった 5 株 (21L25 株、22L16 株、22L21 株、32L3 株、22L7 株) について、個別に無菌ウキクサに接種・導入した。この“機能強化ウキクサ”を 50 ppm のフェノールを添加した人工排水の浄化実験に供したところ、22L16 株、22L21 株、32L3 株または 22L7 株を導入したウキクサで効率的なフェノールの分解 (浄化) が確認された。特に 22L7 株 (*Pseudomonas* 属) を導入したウキクサの浄化能力が高く、4 株を 55 mL の人工排水に投入した実験系において処理開始 18 時間で 50%、48 時間で 100% のフェノールを分解した。また、本菌株 (22L7 株) はコウキクサに導入した場合でもウキクサの場合と同様の浄化活性が確認された。

(7) 葉状体由来フェノール分解菌によるウキクサの生育促進

“コベネフィット型植生浄化ユニット”を構築するにあたっては、有害化学物質分解能を持ちつつ、PGP 活性も持つ菌株の利用が効果的である。しかし、これまでに、そのような菌株は *Acinetobacter* sp. P23 株 (フェノール分解能を持つ) しか報告されていない。そこで、本研究で取得したフェノール分解菌について、ウキクサ亜科植物 (ウキクサとコウキクサ) に対する PGP 活性を持つかを調べた。その結果、4-6 のウキクサの機能強化で良い成績を示した 22L7 株がコウキクサに対して PGPB としても機能することが明らかとなった (2.3 倍の PGP 活性; 図 6)。

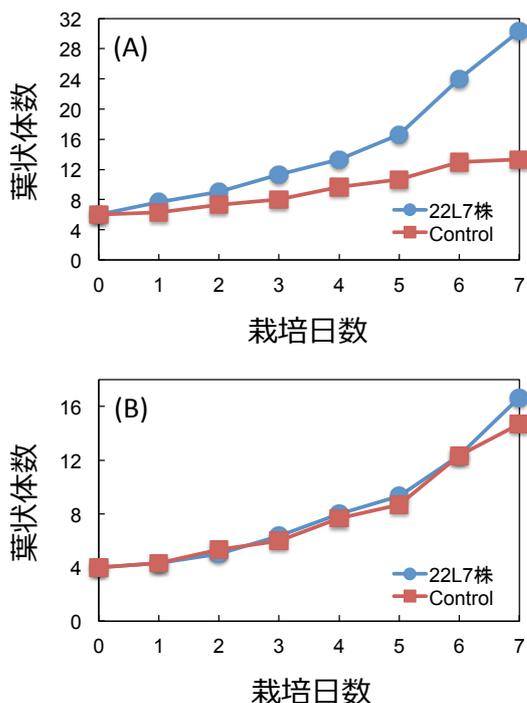


図 6. 22L7 株のウキクサ亜科植物に対する PGP 活性

(A) *L. minor* (B) *S. polyrhiza*

## 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 3 件)

- ① Yasuhiro Tanaka, Hiroaki Matsuzawa, Hideyuki Tamaki, Masahiro Tagawa, Tadashi Toyama, Yoichi Kamagata & Kazuhiro Mori. Isolation of novel bacteria including rarely cultivated phyla, *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*, from the roots of emergent plants by simple culturing method. *Microbes and Environments* Vol. 32, 2017, pp. 288-292  
DOI: 10.1264/jsme2.ME17027 (査読有)
- ② 田中靖造, 遠山忠, 森一博, 玉木秀幸. ウキクサ亜科植物と微生物間の相互作用を用いた新しい植生浄化プロセスの開発. *アグリバイオ* 1 巻, 2017, pp. 68-69 (査読無)
- ③ Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, Ryogo Takai, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Yasuhiro Tanaka, Yoichi Kamagata & Makoto Ubukata. Zincmethylpyrins and coproporphyrins, novel growth factors released by *Sphingopyxis* sp., enable laboratory cultivation of previously uncultured *Leucobacter* sp. through interspecies mutualism. *The Journal of Antibiotics* Vol. 69, 2015, pp. 97-103  
DOI: 10.1038/ja.2015.87 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 岩下智貴, 花岡翼, 遠山忠, 森一博, 田中靖造, 玉木秀幸, 米田恭子, 牧野彩花, 鎌形洋一, 森川正章. *Fimbrimonadaceae* 科、*Hyphomonadaceae* 科に属する新規細菌によるウキクサおよび微細藻類の生育促進. 第 52 回日本水環境学会年会. 2018 年 3 月 15 日~17 日 (北海道大学工学部; 北海道札幌市)
- ② 戸澤恵里奈, 田中靖造, 遠山忠, 森一博, 玉木秀幸, 米田恭子, 牧野彩花, 鎌形洋一, 森川正章. ウキクサを釣り針とした難培養性微生物の捕集と分離培養. 第 52 回日本水環境学会年会. 2018 年 3 月 15 日~17 日 (北海道大学工学部; 北海道札幌市)
- ③ Tomoki Iwashita, Yasuhiro Tanaka, Hideyuki Tamaki, Yasuko Yoneda, Ayaka Makino, Tadashi Toyama, Yoichi Kamagata, Masaaki Morikawa, Kazuhiro Mori. Isolation of plant growth-promoting bacteria from cormosphere of duckweed. The 5th International Young researchers Workshop on River Basin Environment

- and Management. 2017. 10. 28-29 (Hotel Swiss Garden Resort; Kuantan, India)
- ④ 岩下智貴, 田中靖造, 玉木秀幸, 米田恭子, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. ウキクサ亜科植物に接種した PGPB の葉状体および根における定着性の評価. 第 51 回日本水環境学会. 2017 年 3 月 15 日~17 日 (熊本大学黒髪キャンパス; 熊本県熊本市)
- ⑤ 岩下智貴, 田中靖造, 玉木秀幸, 立野由佳, 米田恭子, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. 難培養性細菌群 *Armatimonadetes* 門に属する新規細菌 LA-C6 株によるウキクサ亜科の生育促進. 日本微生物生態学会第 31 回大会. 2016 年 10 月 22~25 日 (横須賀市文化会館; 神奈川県横須賀市)
- ⑥ 戸澤恵里奈, 田中靖造, 玉木秀幸, 新村杏奈, 米田恭子, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. 水生植物ウキクサからの難培養性細菌群 *Verrucomicrobia* 門細菌および *Armatimonadetes* 門細菌の分離培養. 日本微生物生態学会第 31 回大会. 2016 年 10 月 22~25 日 (横須賀市文化会館; 神奈川県横須賀市)
- ⑦ 大内源樹, 田中靖造, 玉木秀幸, 新村杏奈, 米田恭子, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. ウキクサの葉状体と根に集積するフェノール分解菌の分離と比較. 日本微生物生態学会第 31 回大会. 2016 年 10 月 22~25 日 (横須賀市文化会館; 神奈川県横須賀市)
- ⑧ 岩下智貴, 田中靖造, 玉木秀幸, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. ウキクサ亜科植物葉状体からの植物生育促進細菌の探索. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 27 日~30 日 (札幌コンベンションセンター; 北海道札幌市)
- ⑨ 岩下智貴, 田中靖造, 玉木秀幸, 牧野彩花, 遠山忠, 鎌形洋一, 森川正章, 森一博. ウキクサ亜科葉状体由来新規微生物コレクションからの PGPB の検索. 第 67 回日本生物工学会大会. 2015 年 10 月 26~28 日 (城山観光ホテル; 鹿児島県鹿児島市)

[その他]

ホームページ等

<https://evtanaka.blogspot.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 靖造 (TANAKA, Yasuhiro)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号: 50377587

### (2) 研究分担者

森 一博 (MORI, Kazuhiro)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授  
研究者番号: 90294040

遠山 忠 (TOYAMA, Tadashi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号: 60431392