

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月27日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07784

研究課題名(和文) ミズゴケと共生する窒素固定微生物相と光合成活性との関連

研究課題名(英文) Symbiotic nitrogen fixing microorganisms in Sphagnum plants and their relation to photosynthesis

研究代表者

原口 昭 (Haraguchi, Akira)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：50271630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：国内の6産地から得たミズゴケ試料から、無窒素培地を用いて共生微生物を単離し、16SrRNA遺伝子を用いた遺伝子解析を行った結果、Pandoraea、Sphingomonas、Paraburkholderia、Burkholderia の4属のバクテリアと、Coccomyxa属の藻類が同定された。このほか、Euglena属の共生藻類が目視で確認できた。ミズゴケ植物体の窒素安定同位体比は産地に特徴的な値を示し、低緯度の個体群では ^{15}N が高く、高緯度になるにしたがって低くなる傾向が認められた。共生微生物の直接的な窒素固定に対する寄与は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミズゴケ類は北方泥炭地の主要な泥炭形成植物であり、全球の炭素循環において重要な役割を担っているが、一次生産機能に関してはまだ十分に解析されていない。本研究の中で、ミズゴケ類の光合成曲線が顕著な季節変動を示すことがわかり、今後ミズゴケの光合成機能やミズゴケ群集の一次生産を精緻に解析するうえで季節変動が重要な要素であることが示された。共生微生物に関しては、無窒素培地での培養から5属の微生物が単離され、これらは窒素固定にかかわるものと考えられるため、ミズゴケ群集の育成における活用が期待できる。また、ミズゴケ共生微生物として、Euglena属の種が国産のミズゴケ類については初めて確認された。

研究成果の概要(英文)：Symbiotic microorganisms were selected from Sphagnum plants collected from 6 populations from Hokkaido to Kyushu. Extracts of Sphagnum plants were cultured on plate culture medium without nitrogen and four genus of bacteria; Pandoraea, Sphingomonas, Paraburkholderia, Burkholderia and Coccomyxa (Trebouxioophyceae, Eukaryota) were isolated. One species of genus Euglena was also isolated from one population of Sphagnum. Nitrogen stable isotope ratio showed specific value for localities; ^{15}N for populations in Kyushu showed around 0 and ^{15}N showed decreasing tendency with increasing latitude. However, evidence of nitrogen fixation by isolated symbiotic microorganisms has never been obtained from stable isotope analysis.

研究分野：生態学

キーワード：泥炭形成植物 共生微生物 窒素固定 安定同位体比 光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有機質土壌から形成される泥炭地は、陸地の 3% を占めるにすぎないが、泥炭地への炭素蓄積は、全球の土壌有機炭素総量の 20-30% を占め、土壌炭素の貯蓄系として地球の炭素循環で重要な機能を果たしている。泥炭地は全球の環境変動に大きく寄与する生態系であると同時に、泥炭地の特殊な環境に適応した希少種の生息地として、生物多様性の保全の観点からも重要な生態系の一つである。泥炭地は亜寒帯と熱帯に集中して分布しているが、このうち北方圏の泥炭地の生物群集の主要な構成種であり、泥炭形成植物として大気炭素の固定および土壌への蓄積に大きく貢献しているミズゴケ類は、これら北方圏泥炭地の生態系機能の鍵となる種である。しかしながら、ミズゴケ類の生理生態特性や一次生産、土壌炭素蓄積における機能についてまだ十分解析されておらず、とくに貧栄養環境で高い一次生産性を上げている理由についてはまだわかっていない。本研究では、貧栄養環境への適応として窒素代謝に注目し、窒素固定機能とこれに関係する共生微生物相の、ミズゴケの生育環境と種間比較について解析することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、ミズゴケ類と共生する窒素固定微生物の機能について、ミズゴケ類の窒素固定機能と光合成活性の関連、ミズゴケ類の窒素固定機能の種間・産地間比較、窒素固定にかかわる共生微生物相の遺伝的解析を目的とした研究を行った。この中で、安定同位体比によるミズゴケ類の窒素固定機能の評価、および窒素固定にかかわる共生微生物相の遺伝的解析について、産地間の比較を行うことを主たる目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

ミズゴケ群集の一次生産と窒素固定機能の種間比較、産地間比較を行うため、北海道、長野県、大分県でミズゴケ試料を採取した。このミズゴケ試料の中には、オオミズゴケ、ヒメミズゴケ、チャミズゴケ、ムラサキミズゴケ、スギバミズゴケの各種が含まれていた。これを用いて、炭素・窒素安定同位体比を計測した。

ミズゴケ植物の個体単位での光合成計測については、個葉計測用のチャンバーを用いた気相中での二酸化炭素収支を計測する方法、および溶存酸素電極による液相中での酸素収支を計測する方法、を併用して計測した。計測を行った個体に関しては、クロロフィル濃度の定量を行った。また、個体群レベルでの光合成活性と呼吸活性を、チャンバー内に大気を循環させる方法で計測した。

ミズゴケ類と共生する窒素固定微生物に関しては、予備実験において無窒素培地による単離が可能であることがわかっているので、この手法を用いてミズゴケ抽出物から窒素固定微生物を単離した。単離した窒素固定微生物については、その遺伝的解析を行い、属を同定した。共生微生物相に関しては、窒素固定微生物のほか、*Euglena* 属などの共生藻類を含めたより詳細なミズゴケ共生生物群集の解析を行う研究に発展させることを今後計画しており、本研究では、微生物群集の概要の把握までを行った。

4. 研究成果

(1) ミズゴケの光合成活性に関する解析

ミズゴケの光合成活性と窒素栄養、窒素固定機能との関連についての解析を試みた。この解析の中で、ミズゴケ個体の光合成速度の光強度依存性について計測したが、年 3 回の計測を行った結果、顕著な季節性が認められることがわかった(図 1)。従って、光合成活性は計測を行う季節によって大きく変動し、環境中の可給態窒素量や植物体の窒素含有量、窒素固定機能との関連を解析するにあたっては、季節性を考慮に入れなくてはならないことがわかった。そこで、光合成活性と窒素栄養との直接的な関連の解析は避け、今後季節性を考慮に入れた解析法を検討し、再度適切な方法を用いて解析を行うこととした。

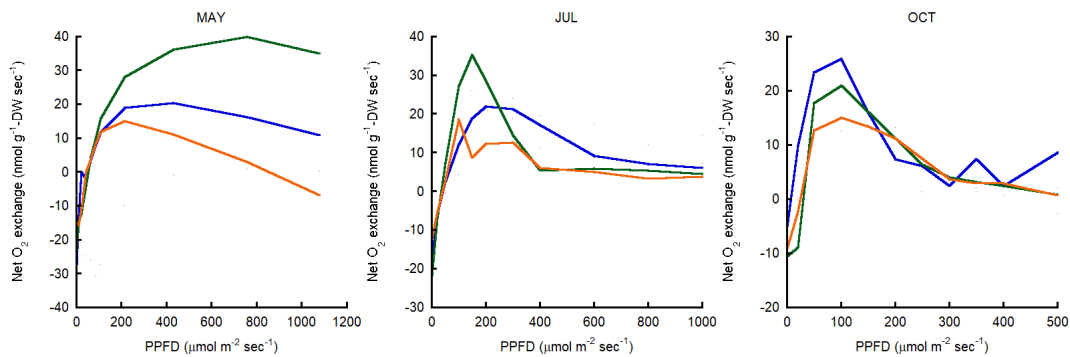


図1 長野県産ミズゴケ個体の光合成曲線の季節変化 3地点における5月、7月、10月の実測値を示す

なお、光合成活性の季節性に関しては、これ自体がこれまで報告されていないため、より詳細な検討が必要であるが、再現性を含めて今後データの蓄積を行う。

(2) 炭素・窒素安定同位体比に関する解析

ミズゴケ個体の先端部分の炭素・窒素安定同位体比の計測を6産地のミズゴケ種について行った。ここで、大分県の産地 TDW および BGT においてはオオミズゴケ、ヒメミズゴケについて、長野県の産地 OAH、MAE、TAN においては、チャミズゴケ、スギバミズゴケについて、北海道の産地 OCH においてはチャミズゴケ、ムラサキミズゴケ、スギバミズゴケについて計測を行った。計測は種ごとに分けて行ったが、計測値は産地ごとに集計して示した(図2)。

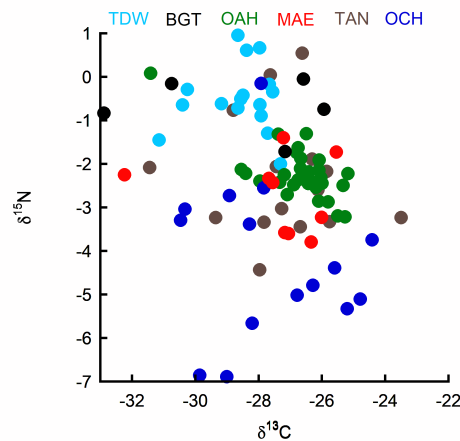


図2 ミズゴケ個体の炭素・窒素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)の産地間比較 産地名は、TDW, BGT, OAH, MAE, TAN, OCH の略称で示す

$\delta^{13}\text{C}$ に関しては、各産地においてはほぼ -32 - -23‰ の範囲に入り、産地間の差が有意に認められなかったが、 $\delta^{15}\text{N}$ に関しては、大分県産のもので高く、北海道産のもので低い傾向が認められた。また、長野県産のものではこれらの中間的な値を示した。これらのなかで、大分県産のものが $\delta^{15}\text{N} = 0$ 付近に分布したことから、ここに産するミズゴケは窒素固定に依存する割合が高いことが予想される。北海道の産地における試料の $\delta^{15}\text{N}$ は -3‰ 以下の特異的に低い値を示した。植物体の窒素含有量と $\delta^{15}\text{N}$ の間には有意な相関が認められなかったことから、窒素栄養の観点からは充足されていると考えられ、今後窒素の供給源について検討する。

(3) ミズゴケ共生生物群集の遺伝的解析

ミズゴケ個体より得た微生物の遺伝子解析の詳細な方法について示す。

ミズゴケ抽出液はミズゴケ試料の先端 5mm を切り取り、滅菌水 0.6mL 中でホモジナイザーを使って細かくきざみ、これを原液とした。原液を滅菌水で希釈し、10 倍希釈用液、100 倍希釈用液をつくった。これを、Tris-MES バッファーを加えた BG₁₁₀ (無窒素) 固体培地上に均一に塗抹し、温度 25 °C、上面の光強度 24.52 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件下で 60 日間培養した。

観察は毎日行い、コロニー径が 1mm を超えたものについて計数した。ここで、CFU と希釈倍率の関係をみると、希釈倍率が高いほど CFU が大きくなる傾向が見られ、ミズゴケ抽出液の制菌作用によってコロニーの形成が抑えられていることが確認できた。BG₁₁₀ 培地での培養で確認したコロニーは、それぞれ BG₁₁ 斜面培地に植え継ぎ、純化した。

DNA 抽出は ISOPLANT を用いた。抽出した DNA は、530F および 907R プライマーを用いた PCR により 16SrRNA 遺伝子の部分配列を増幅し、塩基配列の解析を行った、Codon Code Aligner を用いて編集後、Silva 検索、Blast 検索を行った。

BG₁₁₀ 培地を用いた 3 回の培養で得られた全 53 のコロニーのうち、14 試料について PCR 産物が確認でき、そのうちの 5 試料について塩基配列が特定できた。

表 1 ミズゴケ抽出液から無窒素培地で単離され属が同定された共生微生物の産地および属名

産地	個体群番号	属名	綱
北海道	OCH-2	<i>Pandoraea</i>	Betaproteobacteria
長野	OAH-2	<i>Burkholderia</i>	Betaproteobacteria
長野	OAH-5	<i>Coccomyxa</i>	Trebouxiophyceae (Eukaryota)
長野	MAE-1	<i>Paraburkholderia</i>	Betaproteobacteria
長野	MAE-2	<i>Sphingomonas</i>	Alphaproteobacteria

ミズゴケ個体から無窒素培地で単離された *Pandoraea* sp.、*Sphingomonas* sp.、*Paraburkholderia* sp.、*Coccomyxa* sp.、*Burkholderia* sp.のうち、*Burkholderia* sp.については、フィンランド産の同種のミズゴケからも単離されており、産地が異なるミズゴケ種が同じ属の細菌と共生していることが分かった。また、同属が窒素固定能を持ち、貧栄養環境でも生育できるとの報告があり、ミズゴケ類が生育していくうえで重要な共生細菌であると考えられる。

(4) ミズゴケと共生する *Euglena* に関する知見

試料として用いた国内産 2 産地のミズゴケ植物体の中から、*Euglena* 種が確認できた。これは、坑排水中に生息し、*Euglena mutabilis* Schmitz. と同定されている種と形態的に類似しており、フィンランドの 1 産地のミズゴケからも同一の形態の *Euglena* 種が確認されている。

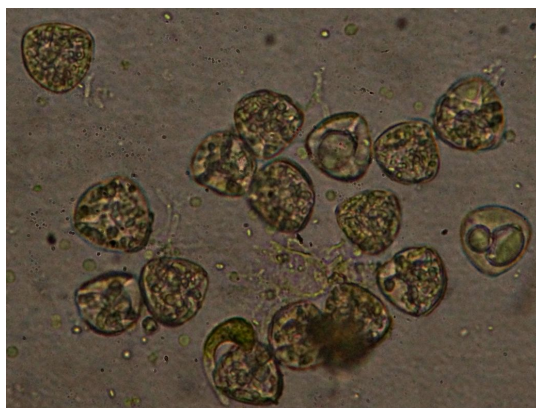


図 3 長野県産のミズゴケ個体中に確認された *Euglena* 種およびミズゴケ胞子

この *Euglena* 種が窒素固定と関連を持つか否かについては確認されていないが、今後、ミズゴケ共生微生物の 1 種として、その機能について解析を進める予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) Zheng J, Haraguchi A (2018) Inorganic nitrogen source for autotrophic growth of *Euglena mutabilis* Schmitz. Phycological Research 66: 155-158 (peer reviewed)
- 2) Granath G, Rydin H, Baltzer JL, Bengtsson F, Boncek N, Bragazza L, Bu Z-J, Caporn SJM, Dorrepaal E, Galanina O, Gałka M, Ganeva A, Gillikin DP, Goia I, Goncharova N, Hájek M, Haraguchi A, Harris LI, Humphreys E, Jiroušek M, Kajukalo K, Karofeld E, Koronatova NG, Kosykh NP, Lamentowicz M, Lapshina E, Limpens J, Linkosalmi

M, Ma J-Z, Mauritz M, Munir TM, Natali S, Natcheva R, Noskova M, Payne RJ, Pilkington K, Robinson S, Robroek B JM, Rochefort L, Singer D, Stenøien HK, Tuittila E-S, Vellak K, Verheyden A, Waddington JM, Rice SK (2018) Environmental and taxonomic controls of carbon and oxygen stable isotope composition in *Sphagnum* across broad climatic and geographic ranges. *Biogeosciences* 15: 5189-5202 (peer reviewed)

- 3) Haraguchi A, Matsuda T (2018) Effect of salinity on seed germination and seedling growth of the halophyte *Suaeda japonica* Makino. *Plant Species Biology* 33: 229-235 (peer reviewed)
- 4) Kang H, Kwon MJ, Kim S, Lee S, Jones TG, Johncock AC, Haraguchi A, Freeman C (2018) Biologically driven DOC release from peatlands during recovery from acidification. *Nature Communications* 9: 3807(Article number) (peer reviewed)
- 5) Rahmawati D, Wijaya CH, Hashidoko Y, Djajakirana G, Haraguchi A, Watanabe T, Kuramochi K, and Nion YA (2017) Concentration of Some Trace Elements in Two Wild Edible Ferns, *Diplazium esculentum* and *Stenochlaena palustris*, Inhabiting Tropical Peatlands under Different Environments in Central Kalimantan. *Eurasian J. For. Res.* 20: 11-20 (peer reviewed)
- 6) Kamari A, Yusof N, Abdullah H, Haraguchi A & Abas MF(2017) Assessment of heavy metals in water, sediment, *Anabas testudineus* and *Eichhornia crassipes* in a former mining pond in Perak, Malaysia, *Chemistry and Ecology*, 33: 637-651 DOI: 10.1080/02757540.2017.1351553 (peer reviewed)

6 . 研究組織