

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14844

研究課題名(和文) 新奇な水生植物 - 微生物相互作用の発見と理解

研究課題名(英文) Discovery and understanding of novel aquatic plants-microbial interactions

研究代表者

森川 正章 (MORIKAWA, Masaaki)

北海道大学・地球環境科学研究院・教授

研究者番号：20230104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちは浮遊水生植物、いわゆるウキクサの表層に共存する細菌P23が、ウキクサの成長を約2倍に促進することを2010年に世界に先駆けて発見した。本研究課題では、P23が生産する植物成長促進因子が新規細胞外多糖化合物であることを明らかにした。さらに、酵母細胞表層マンナンもウキクサ植物成長促進活性を有することを発見した。その活性には主鎖 -1,6ポリマンノース構造のみが必要であることを見出した。また、酵母マンナンは、長鎖多糖化合物のままウキクサ細胞表層受容体を刺激して成長を促進することを示唆した。以上、新しい植物-微生物相互作用の分子機構を解明し、共進化の理解に一石を投じる事ができた。

研究成果の概要(英文)： We discovered for the first time in 2010 that a bacterium P23 coexisted on the floating aquatic plants so-called a duckweed, promotes the plant growth by two-folds. In this research project, we clarified that a plant growth-promoting factor produced by P23 is a novel extracellular polysaccharide compound. Furthermore, we discovered that yeast cell surface mannan also has duckweed growth-promoting activity. It was found that only the main chain -1,6 polymannose structure is necessary for its activity. It was also suggested that yeast mannan stimulates duckweed cell surface receptors as long chain polysaccharide compounds to promote the growth. We have successfully uncovered the molecular mechanism of novel plant-microbial interaction and casted a stone to understand co-evolution.

研究分野：微生物学

キーワード：植物成長促進細菌 浮遊水生植物 ウキクサ 細胞外多糖 酵母マンナン

1. 研究開始当初の背景

地球上には、大きく分けて陸域および水域の環境がある。そこに生存する生物種はそれぞれの環境に応じた独自の進化を遂げてきた。一方、動物や植物の巧みな進化戦略において、体内及び体表に共生する微生物との相互作用の果たす役割の大きさが注目されている。これを共進化という。これまでに、土壌植物では根粒細菌などを代表例として植物-微生物共生機構について詳細に研究が進められてきた。具体的には、根粒細菌は特別な修飾オリゴ糖因子を分泌することによって宿主となるマメ科植物の根粒形成遺伝子の発現を誘発する。このようにして、自らにとって快適な居住環境となる根粒を植物に準備させる代わりに根粒細菌は、空気中の窒素を固定し、その一部を硝酸などの窒素肥料として植物に提供する。そして植物の生育を加速させて、お互いの繁栄を実現している。他には、植物ホルモンそのものを合成して分泌する共生細菌も多数報告されている。

私たちはこれまで研究が遅れていた水域環境に分布する浮遊性水生植物：いわゆるウキクサと表層細菌との共進化に着目している。バイオマス生産という視点から、ウキクサにはいくつかの有利な点がある。まず、ウキクサは排水や湖沼環境水などで生育することが可能である。次にタンパク質含量が高く（最大30%）栄養価値が高い。一方、栄養枯渇や高塩分などのストレス条件下ではデンプンなど炭水化物を多く蓄積する（最大50%）ことが知られている。また、ウキクサは微細藻類に次いで生育速度が大きく、新しいバイオマス資源としても注目されている。

本研究開始当初の準備状況は、以下の通りである。

まず、野生ウキクサの表層に共生する細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 が、無菌ウキクサの成長を約2倍に促進することを世界に先駆けて発見した (Environ. Sci. Technol. 44, 6470-6474 (2010))。続いてP23が単子葉植物であるウキクサ以外にも双子葉植物であるレタス幼苗に対してクロロフィルを増加させる作用を有することを見出した (特願 2013-150997, J. Biosci. Bioeng. 118, 41-44 (2014))。さらに、本細菌のドラフトゲノム解析から新規糖転移酵素遺伝子群 (P23_2757-P23_2761) を見だし [Genome Ann. 3: e00026-15(2015)]、別種の *Acinetobacter* 属細菌および大腸菌で機能発現することに成功し、この遺伝子群がウキクサの成長促進作用に必要な十分であることを発見した (特願 2015-130895)。

2. 研究の目的

水生植物で見出された土壌植物とは異なる新しい植物-微生物相互作用を手がかりとしてその理解を深めることを本研究の目的とした。具体的には、微生物多糖によるウキクサ成長促進分子機構を解明し、その作用の

汎用性と特異性について検討する。

3. 研究の方法

研究は以下のように計画した。モデル水生植物として、北海道大学植物園幽庭湖より採取したコウキクサ *Lemna minor* RDSC #5512 を用いる。同ウキクサに共生していた成長促進細菌としてゲノム情報が揃っている *A. calcoaceticus* P23 を用いる。P23 培養液上清から成長促進因子（細胞外に分泌生産される多糖化合物）を精製し、その構造を解析する。次に、多糖化合物の構造と機能との関連について構造変異体等を用いて検討する。さらに、ウキクサ以外の植物として野菜レタスを選び水耕栽培条件において成熟個体まで生育させた場合の P23 の影響を評価する。

4. 研究成果

1) P23 が生産するウキクサ成長促進活性を有する細胞外多糖化合物の精製と構造解析

P23 培養液上清からエタノール沈殿法あるいは硫酸沈殿法による高分子画分の濃縮、フェノール抽出法による除タンパク処理によって、ウキクサ成長促進活性を有する多糖化合物を精製し、酸加水分解後にその糖組成を分析した結果、N-アセチルグルコサミン、グルコース、ガラクトースが 17:2:1 の割合で含まれることを明らかにした。土壌環境に比べて常に水の流れにさらされる水域環境においては、共生微生物はその宿主となる植物により強固に付着しておく必要がある。多くの環境微生物は動物個体や植物個体などの有機物、および岩石や砂あるいは金属表面など無機物固体表面に付着するために、細胞外に多糖化合物などを生産していわゆるヌメリを形成することが知られている。これをバイオフィームと呼ぶ。バイオフィームは環境ストレスから身を守る微生物の生存戦略の一つである。すなわち、水生植物共生細菌が植物固体表面に安定に固着するために細胞外多糖を生産することは必然と言えよう。本研究で見出したウキクサ成長促進細菌 P23 由来の多糖もそのうちのひとつといえる。しかし、ここで重要な発見は土壌環境に生息する同属同種の細菌が生産する多糖化合物とは構造が異なっていたことである。その結合様式など高次構造は未だ明らかではないが、ウキクサとの長い共生の歴史において多糖の構造に様々な試行錯誤があり、その結果としてウキクサの成長を助ける現在の構造に到達したと解釈できる。これは共進化の新しい例といえよう。

2) ウキクサ成長促進活性を有する微生物由来細胞外多糖化合物の機能単位

次に、この多糖の合成に関わる5つの遺伝子クラスターを誘導発現型の強力なプロモーター下流に連結し、大腸菌でウキクサ成長促進因子の大量生産を試みた。しかし、目的多糖化合物の細胞外への生産量はほとんど

増加しなかった。これは輸送過程が律速したため、あるいは複数の遺伝子発現量のバランスが崩れたことが原因と推定されたが、本研究期間内ではその解決には至らなかった。

そこで、さまざまな微生物由来多糖についてウキクサの成長を促進活性を比較検討した。その結果、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表層に存在する糖タンパク質の糖鎖：マンナンにもウキクサの成長を促進する活性を有していることを発見した。さらにその機能に必要な構造を特定するために、正常なマンナン構造体を持つ野生株 BA4741 とマンナンの基部構造のみを有する OCH1 変異株及びマンナン骨格主鎖構造のみを有する MNN2 変異株からそれぞれマンナンを精製し、それらのウキクサ成長促進活性を比較した。その結果、MNN2 変異株由来マンナンは野生株由来マンナンと同一の活性を維持していることがわかった。一方、基部のみを持つ OCH1 由来変異マンナンは活性が大幅に低下していた。以上のことから、分岐した酵母マンナン多糖の構造のうち側鎖部分は機能に必須ではなく、骨格となる主鎖 1-6 ポリマンノース構造だけで成長促進活性を持つことを明らかにした。さらに興味深いことに、野生株 BA4741 と変異株 MNN2 の生細胞を添加した培地でウキクサの生育速度を比較した結果、後者の方が約 2 倍近く高い成長促進活性を有していることが分かった。これは、マンナンの側鎖構造を欠失したことに伴ってもう一つの酵母細胞表層多糖である β -1-3 グルカンあるいは β -1-6 グルカンの高次構造に変化が生じたことによる複合効果と推定され、今後の有用微生物多糖の構造デザインに新たな指針を与えるものと言える。ちなみに、 β -1-6 ヘテロポリマンノース構造を有するコンニャク植物由来グルコマンナンや α -1-4 ポリグルコース（アミロース）など植物固有の多糖はウキクサ成長促進活性を全く有さなかったことも、微生物との共進化の重要性を示唆する結果と言える。

3) レタス水耕栽培における P23 の効果

最後に、P23 が水耕栽培レタス幼苗のクロロフィルを増加させる効果（J. Biosci. Bioeng. 118, 41-44 (2014)発表済み）についてさらなる応用可能性について検討するために、OAT ハウス A 処方培地に P23 細胞を添加し、レタス成熟個体までの長期間水耕栽培試験を行った（N=3）。その結果、P23 無添加区と比べてクロロフィル量に有意な違いは見られなかったが、個体成長量で 20%程度の促進効果が見られた。次に、光照度を通常の半分に減らした条件で栽培試験を行ったところ、すべての個体で生育不良（ねじれ）が見られたが、P23 添加区ではクロロフィル量は 30%程度、個体湿重量においても最大 50%増加していた。今後はクロロフィルだけではなく、他の栄養価など品質への影響についても調べることも必要である。

以上、本研究の推進により、バイオマス資

源としてさまざまな利用が期待されている水生植物ウキクサの成長を促進する微生物多糖の構造-機能相関について新たな知見が多数得られた。特に、当初予想していなかった酵母マンナンにその活性を見出したことは正に挑戦的萌芽研究課題にふさわしい成果をあげることができた。

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 5 件)

(1) Tohyama T, Tanaka Y, Morikawa M, Mori K, Comprehensive evaluation of nitrogen removal rate and biomass, ethanol, and methane production yields by combination of four major duckweeds and three types of wastewater effluent. *Bioresource Technol.*, 査読有, vol. 250, 2018, pp. 464-473,
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.054>

(2) Luepongpatana S, Thaniyavarn J, Morikawa M, Production of massoia lactone by *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 isolated from the Gulf of Thailand and its fragrant biosurfactant properties. *J. Appl. Microbiol.*, 査読有, vol. 123, No. 6, 2017, pp. 1488-1497,
DOI: 10.1111/jam.13598

(3) Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M, Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant. Phys. Biochem.*, 査読有, vol. 118, 2017, pp.667-673,
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.006>

(4) Toyama T, Kuroda M, Ogata Y, Hachiya Y, Quach A, Tokura K, Tanaka Y, Mori M, Morikawa M, Ike M, Enhanced biomass production of duckweeds by inoculating a plant growth-promoting bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* P23, in sterile medium and non-sterile environmental waters. *Water Sci. Technol.*, 査読有, vol.76, No. 6, 2017, pp. 1418-1428,
DOI: 10.2166/wst.2017.296

(5) Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M, Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnol. Biofuels.*, 査読有, vol.10, No. 62, 2017,
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0746-8>

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 石澤秀紘, 黒田真史, 森川正章, 池道彦, 植物成長促進細菌 *Aquitalea magnusonii*

H3 株によるコウキクサへの付着挙動の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018
(2) 小林美水, 岡田全朗, 小山時隆, 遠山忠, 森 一博, 三輪京子, 森川正章、工場排水を活用したウキクサバイオマス生産への取り組み、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018
(3) 森川正章、次世代バイオマス浮き草の魅力と微生物共生作用、北海道植物学会大会 2017、2017
(4) Masaaki Morikawa, Mutualism could be a password for future biotechnology, Lecture at Sichuan University, 2017
(5) Hidehiro Ishizawa, Masashi Kuroda, Masaaki Morikawa, Michihiko Ike, Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward the co-existence of plant growth-promoting/inhibiting bacteria, International Joint Workshop on Advanced Engineering Technology for Environment and Energy (AETEE), 2017
(6) Hidehiro Ishizawa, Masashi Kuroda, Masaaki Morikawa, Michihiko Ike, Effects of bacterial community formed in the root zone on the biomass production of duckweed, *Lemna minor*, IUMS 2017, 2017
(7) Masaaki Morikawa, Ami Kawahata, Kyoko Miwa, Developing biomass producing rhizoremediation technology by symbiosis of duckweed and beneficial bacteria, Biotech 2017 France, 2017
(8) Masaaki Morikawa, Environmental microbes – How do they adapt and benefit to the tough but sweet global environments, General Lecture at Gadja Mada University, 2017
(9) 森川正章、ウキクサが獲得した新しい植物-微生物相互作用とその産業利用への期待、酵素工学会第 77 回講演会、2017
(10) 大畑慶真, 森川正章, 渡辺 均, 加藤淳太郎, 星野洋一郎、花粉発芽培地に添加したマンナンがペチュニアおよびアルストロメリアの花粉発芽に及ぼす影響、園芸学会平成 29 年度春季大会、2017
(11) 清水勇希, 加地由季子, 黒田真史, 玉木秀幸, 森川正章, 池 道彦、*Pelomonas saccharophila* MRB3 によるコウキクサの成長促進、第 51 回日本水環境学会年会、2017
(12) 岩下智貴, 遠山 忠, 森 一博, 田中靖浩, 玉木秀幸, 米田恭子, 牧野彩花, 鎌形洋一, 森川正章、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 回日本水環境学会年会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/morikawalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 正章 (MORIKAWA, Masaaki)

北海道大学大学院地球環境科学研究院・教授

研究者番号：20230104

(2) 研究分担者

なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし()