

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12379

研究課題名(和文) ウリ科植物-植物成長促進細菌複合系によるファイトレメディエーション機能強化

研究課題名(英文) Functional promotion of phytoremediation by Cucurbitaceae-plant growth promoting bacteria complex system

研究代表者

片岡 良太 (Kataoka, Ryota)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：00635104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリ体内における内生細菌の多様性を培養法および非培養法で調査した。キュウリ内部には特定の細菌が常に存在し、ある種においてはキュウリによる選択を受けている可能性があった。また、キュウリの葉柄から約300の内生細菌株が分離され、PGPの可能性が調査された。PGPは分離株の中で優勢な特徴を示した5株を選抜し、ポット実験を使用してさらに調査した。菌株4と227が特に優勢であり、同時に野外実験においても果実の数と成長を増加させることが確認された。両菌株間では共通のPGP特性を示していたが、メタボローム解析を実施したところ、植物生長促進効果に対するメカニズムは根本的に異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DDTとPCP(ペンタクロロフェノール)で汚染された土壌を植物と微生物を用いて浄化するための新しい浄化技術が提案された。つまり、土壌中に低濃度かつ広範囲に広がる汚染を効率よく効果的に除去するために植物を用いた除去(ファイトレメディエーション)に加えて植物の生育を促進する内生細菌を組み合わせることで、ファイトレメディエーションの強化を図るものである。ファイトレメディエーションを微生物で機能強化した新たな汚染物質除去技術は、ファイトレメディエーションに寄与する内生細菌の多様性解析から分離・選抜、機能解析を通じて植物-微生物間相互関係や微生物の生存戦略などに関する興味深い知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The diversity of endophytic bacteria in cucumber was investigated by both cultured and non-cultured methods. Certain bacteria were always present inside the cucumber, and in some cases, it has seemed to be selected by the cucumber. In addition, about 300 endophytic bacterial strains were isolated from the stalks of cucumber, and the possibility of PGP was investigated. PGP selected 5 strains of the isolates that showed the better results for plant growth promotion and further investigated using pot experiments. Strains 4 and 227 showed particularly better results and were also found to increase fruit number and growth under field experiments. Although the two strains showed common PGP characteristics, metabolomics analysis suggested that the mechanism for the plant growth promoting effect was fundamentally different.

研究分野：土壌学および土壌微生物学

キーワード：Cucumber endophytic bacteria Plant growth promoting phytoremediation

## 1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 (POPs) は、環境中で高い残留性や生物濃縮性、長距離移動性、毒性を示すことから世界中でその製造・使用が禁止され、早急な無害化処理が求められている。DDT (2001年登録) については現在でも抗マラリア剤としての使用が一部地域で許容されている。一方、殺菌・除草剤として使用され世界中に汚染現場が存在する PCP は 2015 年に追加登録された。POPs 汚染を除去するには化学・物理的処理を用いることが多いが、大型施設を必要とするなど高コストであるだけでなく、低濃度で広域に広がる汚染への対応は困難である。そのため、微生物によるバイオレメディエーションに期待が集まっている。微生物分解に関する基礎的知見はかなり蓄積されてきているが、現場で効果的に汚染物質を分解除去する技術には至っていない。一方で植物を利用するファイトレメディエーションは、安定した除去効果に期待が持てるが、汚染物質の除去に時間がかかる上、汚染物質を吸収した植物体の後処理が問題となっている。また、POPs を吸収する植物種は極めて少ない。一般に、疎水性が高い化学物質ほど植物根への取り込みは増大するが、根から茎葉部への移行性はオクタノール/水分配係数 ( $\log K_{ow}$ ) が 1.8 付近で極大となる (Briggs, 1982)。そのため POPs など  $\log K_{ow}$  値が高い (>5) 化学物質は根に吸収されるが茎葉部への移行性は極めて小さい。しかし、ウリ科植物は POPs を積極的に吸収し、高濃度で茎葉部や果実に移行・蓄積することが明らかとなり、POPs のファイトレメディエーションへの応用が期待されている (大谷 2008)。以上のような背景から、生物を用いたレメディエーション技術の基礎研究が幅広く展開され、微生物、植物それぞれにおける特徴・利点と共に問題点も明らかになってきた。これまでも植物と根圏微生物を組合せたレメディエーションは研究されてきたが、土壌中での定着に問題があり現場での利用は困難であった。そこで本研究では、これまでの研究とは全く異なる新しいアプローチとして、植物内生細菌を活用することに着目した。

内生細菌は、病気を引き起こすことなく植物の内部組織に存在するため、様々な機能を通じて植物の成長を助けることができる。内生菌の中には、植物の病気を抑制する菌株や、宿主の成長を促進する菌株なども報告されている (Ozaktan et al., 2013)。また、これまでも植物から内生微生物が分離され、フェノール (Chen et al., 2017)、トリクロロエチレン (Doty et al., 2017)、クロルピリホス (Feng et al., 2017)、ジウロン (Wang et al., 2017) などが報告されており、その可能性を覗かせるが、DDT や PCP を分解する内生細菌の報告は殆どない。そのため、本研究では POPs を吸収できるウリ科植物の内生細菌から DDT および PCP 分解菌を選抜することで、これまでのバイオレメディエーションとファイトレメディエーションの抱える難点、すなわち微生物分解および分解菌の生育が環境に影響されやすいこと、植物の汚染物質を吸収する速度や汚染物質を吸収した植物の処理問題などが一気に解決できる。従って本研究では、主に キュウリ葉柄の内生細菌多様性、内生細菌によるキュウリの成長促進効果を調査し、植物 - 内生細菌を用いたファイトレメディエーションの強化を目指した。

## 2. 研究の目的

ファイトレメディエーションは分解除去に時間がかかるなど汚染現場での応用利用には課題 (短所) がある。しかし、植物と植物生育促進微生物を巧く組合せることでファイトレメディエーションが持つ短所を克服し浄化機能の向上が期待できる。そのため、本研究ではウリ科植物による POPs のファイトレメディエーションを生育促進微生物により機能強化させることを目的とし

ている。

### 3. 研究の方法

#### 内生細菌のサンプル調製

茎のサンプルを洗浄し、無菌はさみで2~3 mmのディスクに切断し、70%エタノールで1分間、1%NaOCl(次亜塩素酸ナトリウム)で10分間徹底的に洗浄して表面を滅菌した。次に、ディスクを洗浄し、滅菌蒸留水(SDW)で数回(少なくとも5回)洗浄した。サンプルの半分を分離に使用し、残りの半分を培養不可能な細菌の次世代シーケンシング(NGS)のために-80°Cで保存した。表面殺菌したディスクは、無菌条件下で滅菌した乳鉢と乳棒を使用して5 mLのSDWで粉碎した。懸濁液50 µLをR2A寒天培地(Oxoid)に広げ、使い捨てスプレッダーを使用して2~3枚のプレートを作成した。プレートは25°Cで6~7日間インキュベートし、出現コロニー数を計測した。プレートごとに単一のコロニーを確認し、これらのコロニーは、20%グリセロール(0.8%NaCl w/v)中で-80°Cで保存した。

#### PGPスクリーニング

種子への内生細菌の適用は、種子のバイオプライミングとして実施された。各菌株は、シリコン蓋で覆われた試験管を使用して、1 mLのR2Aプロスに表面滅菌したキュウリ種子1粒を加えて培養した。チューブを振とう(200rpm)しながら25°Cで23時間インキュベートし、幼根が出現する直前にインキュベーションを停止し、種子を播種した。種子を含むが細菌株の接種をしないR2B培地を対照とした。次いで、60 gの砂と土の混合物(1:1)(12 mLの蒸留水を加えたもの)を満たした蓋付きのポリプロピレンチューブ(外寸:4cm×11cm、容量:120 mL)をオートクレーブ処理し、プライミングした種子を播種した。栽培は人工気象室(25°C;16時間の日、8時間の夜)で実施し、35日間栽培した。その後、植物の根を洗浄し、長さを測定した。

#### メタボローム解析

メタボローム解析を実施するために細菌種を接種していないコントロールに対して、No.4とNo.227菌株を使用して実施した。土壌(砂と土の混合物(1:1))を121°Cで1時間オートクレーブ処理し、450 gをポット(100 cm<sup>2</sup>)に充填した。上で説明したように、バイオプライミングした種子を移植した。植物の成長は、前のセクションで説明した栽培条件で45日間行った。繰り返しを5とし、各植物体から4番目の本葉の茎を滅菌ハサミで切断し、凍結乾燥機(FDU-12AS、AS One Corporation、日本)で乾燥させた。凍結乾燥したサンプルをMicroSmash(TOMY SEIKO Co. Ltd.、Japan)を使用して粉碎し、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析(CE-TOFMS)を使用して、カチオン性およびアニオン性代謝物の2つのモードで分析した。

#### キュウリ-内生細菌複合系によるファイトレメディエーション効果の検討

山梨大学附属農場から採取した土壌30 gを蓋付きポリプロピレンチューブ(外寸:4cm×11cm、容量:120ml)に量り取り、蒸留水を加えた後、121°Cで1時間オートクレーブ処理した。その後、汚染物質は珪藻土(洗浄済み)をキャリアーとし土壌に混和した。DDDとDDE(それぞれ5mgkg<sup>-1</sup>の最終濃度)を同時に添加、PCPについては2mgkg<sup>-1</sup>となるよう添加した。チューブを室温で2週間エージングさせ、実験開始前に土壌中の濃度を確認するために、DDDとDDEの混合土壌、およびPCP混合土壌のそれぞれのn=3で使用した。処理ごとにn=5とし、対照、No.4およびNo.227菌株を上記のように増殖させ、チューブに播種した。キュウリによるPCPの取り込み(移植後1ヶ月と4ヶ月)とDDDとDDEの取り込み(移植後1ヶ月、3ヶ月と4ヶ月)を調査した。

## 4. 研究成果

### キュウリ葉柄の内生細菌多様性

キュウリ葉柄における内生細菌の動的変化を培養法および非培養法で調査した。培養法および非培養法で検出された内生細菌の増加は、宿主と内生細菌叢との相互作用を示唆しており、今回は土壌細菌叢のモニタリングは実施していないが、土壌から植物内部へ根内生細菌が移行することが報告されていることから (Chi et al., 2005)、内生細菌の多くが土壌由来であると考えられた。培養法で確認された内生細菌数は、サイト 1 よりもサイト 2 の方が比較的多く、これは、サイト 1 で行われている継続的な施肥や灌漑が大きく影響していると考えられた。また、植物体の生育段階により 2 つのサイト間で内生細菌の多様性に大きな違いがあることも確認された。培養法による内生細菌の多様性を見ると、サイト 1 ではサイト 2 と比べて育苗段階および生長初期段階では内生細菌の多様性は低く、生長とともに多様性が増加していた。サイト 1 のキュウリは、一般的に行われているカボチャ台木を使用した接ぎ木であることも要因の 1 つと考えられた。育苗期に検出された内生細菌は台木由来である可能性があり、キュウリの成長とともに検出されなくなった。これまでの研究でも内生細菌群集に対する台木の影響が観察されているが、植物の成長促進能力など微生物機能に対して、台木源との関連はないと言われている (Marasco et al., 2018)。また、培養法および非培養法で検出された内生細菌グループの中にはいくつかの属で成長段階に関わらず植物体内に持続的に存在している細菌属も確認された。こうした内生細菌は、微生物が宿主に対して何等かのサポートをしている可能性もあるため、今後、更なる研究が必要だと考える。

次世代シーケンス解析を用いた内生細菌叢の解析では、サイト 1 では全体で 320 属、サイト 2 では 63 属が確認された (Others を除く)。さらに、サイト 1 では、141 属 (確認された全体の 44.1%) が育苗段階で検出され、開花開始段階で 172 属 (確認された全体の 53.8%) に増加し、果実発育段階では 280 属 (確認された全体の 87.5%)、その後、成熟段階 (移植後 90 日) で 230 属 (確認された全体の 71.9%) に減少した。対照的に、サイト 2 では、48 属 (確認された全体の 76.2%) が育苗段階で検出され、開花開始段階では 13 属 (確認された全体の 20.6%) に減少した。その後、果実発達段階で 17 属 (確認された全体の 27%) に増加し、成熟段階で 42 属 (確認された全体の 66%) となった。

### 内生細菌によるキュウリの成長促進効果

植物成長促進微生物 (Plant growth promoting microbe; PGPM) は、環境に優しい農業アプローチの開発において重要性が増している。内生菌においても PGPM に関する報告が多数あり、エンドウ豆の成長促進や塩性条件下でアブラナ科植物の根長を促進するなど、植物の成長を促し、環境ストレス耐性を向上させるなど幅広く研究が行われている (Otieno et al., 2015; Yaish et al., 2015; Puri et al., 2016)。内生細菌の植物成長促進は、窒素固定能やリン酸、カリウムの可溶化、植物ホルモンやシデロフォア、ACC デアミナーゼ活性などが一般的なメカニズムとして報告されており、間接的なメカニズムとして、病原菌の生物的防除および植物の全身抵抗性誘導などが含まれる (Bulgarelli et al., 2013; Christie and Nowak., 2000; Compant et al., 2010)。本研究では、キュウリの葉柄から約 300 の内生細菌株を分離し、PGP 活性を有する内生細菌を特定した。その結果、分離株の中から 5 菌株が PGPM として選抜され、中でも No. 4 菌株と No. 227 菌株は最も活性が高かった。

一次スクリーニングでは、対照区と比較して、内生細菌を接種したキュウリでは、根の伸長が約 3 倍になった。根のバイオマスが増大する現象は、PGPM を接種した場合、さまざまな作物で報告されている (Devi et al., 2017; Etesami and Alikhani, 2016)。根の伸長に対する内生細菌

菌の影響は、植物ホルモンの産生とシグナル伝達に関連しており (Vacheron et al., 2013) IAA の生産は根の伸長を促すことが報告されている (Aloni et al., 2006)。次いで実施したポット実験では、対照区と比較して、No. 4 菌株と No. 227 菌株で新鮮重および乾燥重量ともに大きくなることが明らかになった。しかしながら、根の長さについては、No. 72 菌株を施用したキュウリのみが対照区と比較して有意に伸長していた。これらの結果から、菌株によって生育促進機能が異なる可能性があり、宿主や環境要因など複雑な相互作用も菌株の機能に影響を与える可能性がある。

#### メタボロミクス分析

PGP 細菌の役割については多くの研究例があるが、有益な微生物と植物間の生化学的インターフェースまたは相互作用のレベルについてはほとんど知られていない。したがって、本研究では、内生細菌による植物成長促進を調査することに加えて、植物代謝に与える影響についても調査を実施した。すると、試験した全ての代謝物は処理間で異なり、その約 43% が内生細菌を処理したキュウリで増加していた。特に有機酸は、内生細菌を接種した植物体で比較的高い値を示した。対照区では 2-オキソグルタル酸やクエン酸、イソクエン酸、およびフマル酸の値が低く、これらは植物の窒素欠乏と関連している可能性があり、Stitt and Fernie (2003) の報告と一致していた。しかし、Stitt and Fernie (2003) は、リンゴ酸の減少も確認したが、リンゴ酸の減少については、本研究では確認されなかった。さらに、リンの獲得についても植物が浸出するリンゴ酸塩の関与が議論されている (Schulze et al., 2002)。対照区で確認された高いリンゴ酸の値は、植物が生産したリンゴ酸がリンの利用可能性を高めるために土壤に分泌された可能性もある。また、No. 4 菌株を接種した植物では、酸化的損傷に対応するためにアスコルビン酸濃度が高くなっている可能性があるが (Smirnoff and Wheeler, 2000) No. 227 菌株ではニコチン酸が同じ機能を果たしている可能性が示された (Berglund et al., 2017)。内生細菌を植物に接種することで、対照区では検出されなかった異なる代謝産物の産生または誘導をもたらした。No. 4 菌株と No. 227 菌株は共通の PGP 特性を示すが、キュウリの代謝に与える影響は異なっており、両内生細菌株は根本的な成長促進メカニズムが異なる可能性が示された。

#### 植物 - 内生細菌複合系によるハイブリッドレメディエーション

植物生長促進内生細菌 (PGPE) は、生物防除や植物生長および収量の向上、汚染物質の分解を含む幅広い分野で研究が実施されてきた (Compant et al., 2019; He et al., 2019; Santoyo et al., 2016; White et al., 2019)。内生菌を利用したファイトレメディエーションについても研究例が見られるが、植物 - 内生細菌複合系におけるファイトレメディエーションの相乗効果については十分に検討されていない現状にある。DDT に関しては、DDE のファイトレメディエーションが実施されたが良い結果は得られておらず (Eevers et al., 2016, 2018) PCP も同様で、Nakamura et al. (2004) は、PCP の生物変換に対する根圏微生物の影響を調査したが、内生細菌については着目していなかった。そのため、本研究では、PGPE が、植物生長促進に伴い汚染物質の取り込みを促進できるかどうかを確認した。DDD + DDE および PCP 汚染培地でキュウリを栽培し No. 4 菌株および No. 227 菌株を接種すると、No. 4 菌株および No. 227 菌株の接種によってキュウリの生長は促進されたが、生長促進したキュウリは DDD および DDE の取り込みを促進することはなかった。しかし、PCP についてはキュウリの生長促進に対応した蓄積が観察された。このことから、No. 4 菌株および No. 227 菌株は、非汚染地での植物生長を促進するだけでなく、汚染地でもキュウリの生長を促進し、それにより PCP の取り込みも促されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asghar Waleed, Kondo Shiho, Iguchi Riho, Mahmood Ahmad, Kataoka Ryota	4. 巻 10
2. 論文標題 Agricultural Utilization of Unused Resources: Liquid Food Waste Material as a New Source of Plant Growth-Promoting Microbes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 954 ~ 954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agronomy10070954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Taku, Mahmood Ahmad, Ito Takahide, Kataoka Ryota	4. 巻 -
2. 論文標題 Non-target Impact of Dinotefuran and Azoxystrobin on Soil Bacterial Community and Nitrification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00128-021-03163-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mahmood Ahmad, Kataoka Ryota	4. 巻 234
2. 論文標題 Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiological Research	6. 最初と最後の頁 126421 ~ 126421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micres.2020.126421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryota Kataoka
2. 発表標題 The possibility of microbial degradation on the soil contaminants such as endosulfan and endosulfan sulfate
3. 学会等名 15th Chengdu international water exhibition（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mahmood Ahmad, Ryota Kataoka
2. 発表標題 Plant growth promoting endophytic bacteria confer growth promoting effect and different metabolite profiling in host plant
3. 学会等名 2019 ESAFS (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mahmood Ahmad, Ryota Kataoka	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 604
3. 書名 Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関