

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780300

研究課題名（和文）耐酸性窒素固定細菌群の接種・定着化による酸性土壌でのイネの生育促進機構の解析

研究課題名（英文）Characterization and identification of novel symbiotic bacterial species isolated from plants adapted to acid sulfate soil area.

研究代表者

相澤 朋子（AIZAWA TOMOKO）

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：60398849

研究成果の概要（和文）：酸性土壌では、強酸性、アルミニウム・重金属などの金属過剰害、リン酸の不溶化、窒素固定菌の活性低下などが複合して植物の生育阻害が起こっている。酸性土壌適応植物と微生物群が形成する植物・微生物共生体から、環境修復や食糧増産などへの応用が期待される微生物群を取得してきた。これら有用微生物の生産するバイオフィーム(多糖)の解析を進めるとともに、分類学的性状について検討を加え、新種の提案を行った。

研究成果の概要（英文）：We proposed four novel *Burkholderia* and *Acidoceella* species, *Burkholderia heleia* (SA41<sup>T</sup>, SA42, and SA53), *Burkholderia acidipaludis* (SA33<sup>T</sup> and 7A078), *Burkholderia bannensis* (E25<sup>T</sup> and E21), and *Acidoceella aluminidurans* (AL46<sup>T</sup>), isolated from the chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) and torpedo grass (*Panicum repens*), growing in Acid sulfate soils (ASS) area of Vietnam and Thailand.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境修復；酸性土壌；acid sulfate soil；acid tolerance；aluminum-tolerant；rhizosphere.

## 1. 研究開始当初の背景

酸性土壌では、強酸性、アルミニウム・重金属などの金属過剰害、リン酸の不溶化によるリン不足、窒素固定菌の活性低下による窒素不足などが複合して植物の生育阻害が起こり、農業上の問題となっている。特に、アルミニウムは酸性環境下ではイオン化し、細胞膜、細胞壁、DNA など生体物質へ結合し、植物の根の伸長阻害などを引き起こす。酸性土壌のうち、硫化鉄を多く含む海成粘土層が開

墾などにより地表に露出し、これが酸化して生じる硫酸が原因となり、土壌および周辺水域が pH1～4 という強酸性を示す酸性硫酸塩土壌 (acid sulfate soil：以降 ASS) と呼ばれる土壌は作物植物への影響が特に深刻である。

酸性土壌への対策として、汲上げ水による土壌の洗浄、石灰による酸の中和等が行われているが、処理範囲が膨大でポンプの敷設・管理、大量の石灰の運搬・散布が必要であり

これら対策に多大なコストがかかることから、導入が難しい。

そこで、低コストかつ効率的な新手法、例えば植物根圏で酸性環境の中性化、過剰金属の不活化、リン酸の可溶化、窒素化合物の供給などピンポイントで効果を発揮する酸性土壌適応有用微生物の利用などが求められている。

これまでに、ASS適応植物と微生物群が形成する植物・微生物共生体から上記の機能を発揮する1000株以上の植物共生微生物を取得している。これらから、アセチレン還元法による窒素固定活性測定により選抜した。

その結果、50株以上がpH 3.0で窒素固定活性を示し、特にイネ科植物から取得した *Mangrovibacter* 属M2B3株はpH 2.5の強酸性、3%のNaCl存在下で良好な窒素固定活性を示した。また、イネに接種すると300  $\mu$ Mアルミニウムイオン存在下でイネの生育を促進する菌株 *Pullulanibacillus* 属CA42株やアルミニウム耐性・重金属耐性・不溶性リン酸可溶化菌を併せ持つ *Acidoceella* 属AL46株などを発見したが、その時、イネの根周囲には著量のバイオフィームが形成されていた。

## 2. 研究の目的

### (1) ASS 適応新規分類群の分類学的性状の検討・新種提案

申請者らは、これまでに ASS 適応植物と微生物群が形成する植物・微生物共生体から上記の機能を発揮する多くの植物共生微生物を取得している。これらには新規分類群に属する菌株が多く、その利用・制御のためにも、機能解析とともに分類学的検討を行う。これまでに選抜した ASS 適応能をもつ菌株のうち、16S rRNA 遺伝子の予備的な塩基配列解析の結果、新規分類群に属すると予想された *Burkholderia* 属細菌 (SA41, SA42, SA53, SA33, 7A078, E25, E21) および *Acidoceella* 属細菌 (AL46) を用い、これらの系統分類学的特徴について詳細に検討を行う。

### (2) ASS 適応関連物質 (バイオフィーム) の構造と機能解析

これまでの研究で、CA42 株、AL46 株、M2B3 株をはじめ選抜した ASS 適応微生物は細胞外多糖や外膜多糖、あるいは低分子キレート物質を生産している。これらは酸性条件でアルミニウムと結合することで水溶液中のアルミニウムイオン ( $Al^{3+}$ ) を減少させることが示唆された。これら物質は、新規アルミニウム吸着材としての応用も考えられるため、その構造を詳細に決定し、構造と機能の関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ASS 適応新規分類群の分類学的性状の検討・新種提案

16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (約 1500 bp) の決定はユニバーサルプライマーを用いて行った。系統解析は MEGA version 4、PHYLIP 3.65 package、ClustalX を用いた。系統樹の作成は neighbor-joining 法、maximum-parsimony 法、maximum likelihood 法を用い、ブートストラップ法を用いてその検定を行った。

各菌株および比較となる近縁の基準株を用い、以下の試験項目について比較を行った。至適生育 pH、至適生育温度、グラム染色性、発酵能試験、糖質化能試験、酵素反応試験、抗生物質耐性試験、運動性の観察は定法に従って行った。走査型電子顕微鏡による形態観察、金属イオン耐性試験と不溶性リン酸可溶化試験も合わせて行った。また、窒素固定活性はアセチレン還元試験で判定し、エチレンの定量はガスクロマトグラフ (GC-2014, SHIMADZU)、キャピラリーカラム HP-PL0TQ (Agilent) を用いた。

また、各菌株および比較となる近縁の基準株を用い、以下の試験項目について比較を行った。キノン組成; 抽出したキノンの検出は ACUITY UPLC™ (UPLC/MS/MS, Waters) を用いた。脂肪酸組成; 脂肪酸メチルエステルの分析には GCMS (QP5050, SHIMADZU)、カラムは SPB1 30m (SUPELCO) を使用した。染色体 DNA 抽出; 細胞からの DNA の抽出は定法に従って行い、分光光度計を用いて波長 260nm と 280nm の吸光度を測定し、得られた測定値の比から DNA の純度を検定した。その後、DNA 濃度の測定を Qubit fluorometer (Invitrogen) を用いて行った。この DNA 溶液を GC 含量測定および DNA-DNA 相同性試験に用いた。GC 含量測定; GC 含量の測定は HPLC (LC-10, SIMADZU) を用い、カラムは (Cosmosil 5C18-AR, 150 mm×4.6 mm) を用い、移動相に 0.2 M リン酸二水素アンモニウム-アセトニトリル (40:1) を用いて分析した。DNA-DNA 相同性試験; DNA-DNA 相同性試験はフォトビオチンを用いたマイクロプレート法で行った。

### (2) ASS 適応関連物質 (バイオフィーム) の構造と機能解析

これまでに申請者らは、微生物の生産する細胞外多糖の機能を明らかにするために、代表的な土壌放線菌である *Rhodococcus* 属細菌をモデル系として、細胞外多糖の構造決定ならびに細胞表層構造と機能の相関についても解析を進めてきた。そこで、これまでの経験と技術を用いて酸耐性窒素固定菌やアルミニウム耐性菌の細胞外多糖の機能と構造の関連を検討した。具体的には、イネの根圏でバイオフィームを生産する CA42 を用い、

各種クロマトグラフィーを用いて細胞外多糖を精製し、アルミニウムイオン吸着能などの機能解析を行った。また、糖組成分析やメチル化分析、NMR 分析を組み合わせる糖鎖構造の決定を行った。

さらに、構造を決定した多糖の、ASS で問題となるその他の金属イオン（鉄、マンガン、ニッケル、銅、亜鉛など）とアルミニウム吸着物質を反応させ、その後 ICP 発光分析装置を用いてこれら金属イオンの吸着性について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ASS 適応新規分類群の分類学的性状の検討・新種提案

① ASS 適応植物表面に存在する新規 *Burkholderia* 属細菌

本研究の前段階で酸耐性微生物として選抜された *Burkholderia* 属細菌はそれぞれ 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果、3 つの手法で系統樹を作成しても全て独立したクラスターを形成し、SA41、SA42、SA53 と SA33、7A078 および E25、E21 という 3 つの異なる種である可能性が示された。以下に、本研究で提案した新種 3 種の特徴を示す。

新規酸耐性窒素固定菌 *Burkholderia heleia*; ベトナムの ASS の湿地 (pH 2 - 4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した SA41、SA42、SA53 株は 1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると培地 pH を上昇させ、かつ無窒素半流動性培地でアセチレン還元試験を行った結果、pH 3.5 という強酸性でも窒素固定活性を示した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果、これら 3 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。SA41 株とその他単離株、近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、SA42 株 (99.9%)、SA53 株 (99.8%)、*B. silvatlantica* (98.5%)、*B. mimosarum* (98.2%)、*B. ferrariae* (98.0%)、*B. tropica* (97.0%) であった。SA41 株とその他単離株、近縁種の基準株との DNA-DNA 相性は SA42 株 (94%)、SA53 株 (89%)、*B. silvatlantica* (39%)、*B. mimosarum* (41%)、*B. ferrariae* (39%) および *B. tropica* (33%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験を総合して SA41、SA42、SA53 株を新種 *Burkholderia heleia* として提案した。

新規酸耐性・アルミニウム耐性菌 *Burkholderia acidipaludis*; ベトナムの ASS の湿地 (pH 2 - 4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した SA33 株および、タイの ASS の湿地 (pH

2 - 4) に生息するシログアイの根の組織内部より単離した 7A078 株は、1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると、培地 pH を上昇させ、かつ MT 培地 (pH 3.5) に塩化アルミニウムを加えた生育試験の結果、ASS に存在する平均的なアルミニウム濃度 (2-3 mM) を超える 5 mM に耐性を示した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果、これら 2 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。SA33 株と 7A078 株、近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は 7A078 株 (100%)、*B. kururiensis* (97.3%)、*B. sacchari* (97.1%)、*B. tubernum* (97.0%) であった。SA33 株と 7A078 株、近縁種の基準株との DNA-DNA 相性は 7A078 株 (90%)、*B. kururiensis* (47%)、*B. sacchari* (46%)、*B. tubernum* (45%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験を総合して SA33 株と 7A078 株を新種 *Burkholderia acidipaludis* として提案した。

新規酸耐性菌 *Burkholderia bannensis*; タイの ASS の湿地 (pH 2 - 4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した E25 株および根より単離した E21 株は、1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると培地 pH を上昇させた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果、これら 2 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。E25 株と E21 株、近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、E21 株 (100%)、*B. unamae* (98.7%)、*B. tropica* (98.6%)、*B. sacchari* (97.6%)、*B. nodosa* (97.4%)、*B. mimosarum* (97.3%) であった。E25 株と E21 株、近縁種の基準株との DNA-DNA 相性は E21 株 (90%)、*B. unamae* (42%)、*B. tropica* (42%)、*B. sacchari* (42%)、*B. nodosa* (45%)、*B. mimosarum* (35%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験を総合して E25 株と E21 株を新種 *Burkholderia acidipaludis* として提案した。

②アルミニウム耐性・重金属耐性・リン酸可溶化菌 *Acidocella aluminidurans*; アルミニウムは酸性環境下ではイオン化し、細胞膜、細胞壁、DNA など生体物質へ結合することで植物だけでなく動物へも毒性を示す。これまでの研究により植物のアルミニウム耐性の機作として、有機酸によるキレートなどが報告されている。一般的に、イネなど作物植物へのアルミニウム毒性は  $\mu\text{M}$  のレベルで起こるが、ベトナムおよびタイの ASS では水中のアルミニウム濃度が 6 mM 以上を示す箇所もあった。そのため、酸感受性植物を ASS で生育させる場合、水中のアルミニウムイオンをある程度吸着、除去する陽イオン吸着能をもつ微生物、または資材の適用も効果的である

と考えられる。

ASS に優占して生息するハイキビやシログアイの表面には非常に強いアルミニウム耐性菌やアルミニウムイオンを吸着、除去するバイオフィーム構成菌が棲息し、植物を保護している可能性がある。そこで、ベトナムのASS の湿地 (pH 3) に生息するハイキビ (*Panicum repens*) の水中茎表面よりアルミニウム耐性を指標に選抜した。選抜した菌株はすべて *Acidocella* 属に属しており。これらの菌株は、これまでの報告を大きく上回る濃度の塩化アルミニウム (150 mM) や硫酸マンガン (1 M)、硫酸ニッケル (20 mM)、硫酸カドミウム (1 mM)、塩化鉄 (0.4 mM)、硫酸銅 (0.1 mM) を含む酸性培地 (pH 3) で良好な生育を示した。また、これらの菌株の外膜多糖 (LPS) は水溶液中のアルミニウムイオンを吸着し、リン酸アルミニウムやリン酸鉄などの不溶性リン酸塩の可溶化能も示した。AL46 株と近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、*A. facilis* (99.4%)、*A. aminolytica* (97.8%) であった。これら株との DNA-DNA 相同性は *A. facilis* (40.3%)、*A. aminolytica* (39.6%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験を総合して、AL46 株を新種 *Acidocella aluminidurans* として提案した。

#### (2) ASS 適応関連物質 (バイオフィーム) の構造と機能解析

CA42 の生産するバイオフィーム (多糖) は、菌体を生理食塩水に回収・振盪して多糖を剥離させ、DNase、RNase を用いて核酸物質を分解し、フェノール・クロロホルムでタンパク質を除去した後、透析により精製を行い、凍結乾燥をして取得した。取得した多糖を  $AlCl_3$  溶液と反応させ、PCV 法により溶液中に残る  $Al^{3+}$  濃度を測定した。その結果、多糖を反応させた溶液は、溶液中に残存する  $Al^{3+}$  濃度の減少が見られた。これにより多糖に  $Al^{3+}$  の吸着能がある事が確認された。そこで、詳細な機能について検討を行うために構造解析を行った。多糖の組成分析、メチル化分析・NMR を用いて構造解析をしたところ、グルコースを主成分として持つ多糖であり、アルミニウムのほかにマンガン、ニッケル、鉄を吸着することが分かった (投稿準備中)。

また、CA42 および類縁の単離株 09M122 株、09M123 株の 16S rDNA 配列解析、DNA-DNA Hybridization および生理・生化学分類試験や化学分類試験の結果、CA42 株を始めとするこれら菌株は *Pullulanibacillus* 属に属する新種であると考えられ、現在新種提案中である。

#### 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 T. Aizawa, P. Vijarnsorn, M. Nakajima, and M. Sunairi: *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidic pH-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) that grows in highly acidic swamps in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1645 - 1650, 2011 (査読あり)

② T. Aizawa, V. B. Nguyen, P. Vijarnsorn, M. Nakajima and M. Sunairi: *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from the Chinese water chestnut, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in Southeast Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2036 - 2041, 2010 (査読あり)

③ T. Aizawa, V. B. Nguyen, M. Nakajima and M. Sunairi: *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1152 - 1157, 2010 (査読あり)

④ K. Kimoto, T. Aizawa, M. Urai, V. B. Nguyen, K. Suzuki, M. Nakajima and M. Sunairi: *Acidocella aluminidurans* sp. nov., an aluminum-tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 674 - 678, 2010 (査読あり)

⑤ T. Aizawa, M. Urai, N. Iwabuchi, M. Nakajima, and M. Sunairi: *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., xylanase-producing alkaliphilic bacteria isolated from larval guts of *Trypoxylus dichotomus*, the Japanese horned beetle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 61 - 66, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

① T. Aizawa, K. Kimoto, V. B. Nguyen, P. Vijarnsorn, M. Nakajima and M. Sunairi: Characterization and application of symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from plants adapted to highly acidic soils. *1st Asian Conference on*

*Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation* (2010, 9月21日, 宮崎)

- ② 相澤朋子, 田口博規, 木本健一郎, 姜東鎮, Pisoot Vijarnsorn, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫: 「酸性硫酸塩土地帯の植物より単離した耐酸性窒素固定菌について」日本微生物資源学会 第16回大会. (2009, 6月25日, 大阪)
- ③ 相澤朋子, 田口博規, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫: 「酸性硫酸塩土地帯の湿地に自生する *Ludwigia adscendens* 表面から単離した新規 *Frateuria* 属細菌について」日本農芸化学会 2009年度大会. (2009, 3月28日, 福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 朋子 (AIZAWA TOMOKO)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号: 60398849