

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580462

研究課題名(和文)植物・微生物共生系の酸性土壌への適応機構の解析と応用

研究課題名(英文)Mechanisms of plant-microbes symbiotic systems for the adaptation to acid soil

研究代表者

砂入 道夫(SUNAIRI, Michio)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は強酸性土壌適応植物の根圏を植物・微生物共生系と捉え、共生微生物間、宿主植物・共生微生物間の相互作用をゲノム情報に基づき解析し、酸性土壌適応機構を解析することを目指した。各種共生菌のドラフトゲノムを決定し、窒素固定菌とアルミニウム耐性菌の共培養系、アルミニウム感受性イネへの接種実験や共生菌の生産する多糖の役割などの解析を進めた。高濃度アルミニウム耐性真核微生物*Rhodotorula taiwanensis* RS1のアルミニウム添加培養時に起きる膜脂質の顕著な変化についても検討を進め、アルミニウム耐性と有機酸の関係についても検討を加えた。

研究成果の概要(英文)： Although rhizospheric microorganisms of acid-soil tolerant plants might play important roles in their adaptation to acid soils, their symbiotic tolerance mechanisms has been little known. To elucidate those mechanisms the draft genome sequences of such rhizospheric microorganisms were determined. Based on these draft genome sequences and other genome informations symbiotic interactions between plant hosts and rhizospheric microorganisms and those among rhizospheric microorganisms were studied. The structure and functions of extracellular polysaccharides produced by a symbiotic bacterium were determined, which suggested its roles in acid soil tolerance of the host plant. Significant differences in membrane lipids of *Rhodotorula taiwanensis* RS1 between cells grown in the presence and absence of aluminum ions were detected and the roles of such lipid in aluminum tolerance were examined.

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：酸性土壌適応機構 遺伝子資源 根圏微生物 脂質 植物・微生物共生系 アルミニウム耐性 *Rhodotorula*酵母 多糖

1. 研究開始当初の背景

急激な増加を続ける地球人口を支える食糧増産のためには、陸地面積の約 30%を占める耕作に適さない問題土壌の耕作地への転換が急務の課題となっている。世界の問題土壌の約 30%は酸性土壌であり、酸性土壌の改良あるいは pH 2-4 の酸性土壌でも経済的に栽培できる食用作物の開発が望まれている。酸性土壌環境では、低 pH に加え、その強酸性で各種金属類が可溶化する金属過剰害、土壌中のリン酸が金属塩と結合、不溶化する低リン酸ストレスなどによる植物の生育阻害がおこることが知られている。なかでも pH 4.5 以下でイオン化し可溶化するアルミニウムが酸性土壌における植物の生育阻害要因中で最大の阻害要因として考えられており、感受性の高いモデル植物や作物植物を用いた研究が数多く行われてきた。しかし、その毒性機構や耐性機構については不明な点も多く、酸性耐性作物の育種あるいは酸性土壌での栽培法の開発は未だ困難な状況にある。

われわれは、世界に約一千万ヘクタール、そのうちの約半分がアジア地域に存在する酸性硫酸塩土壌に着目し、ベトナム、タイなどで研究を重ねてきた。耕作や開発などにより表層土が攪乱され酸性硫酸塩土壌が空気に曝され、イオウ酸化菌により酸化されると pH 2-3、アルミニウムイオン濃度 70 ppm 以上を含む強酸性土壌が生成する。このような強酸性土壌でも限られた種類ではあるが適応した植物が繁茂しており、これら強酸性土壌適応植物を植物・微生物共生体として捉え、植物だけでなく窒素固定菌やアルミニウム耐性菌などの共生微生物群にも注目し、酸性土壌に適応した食用作物の開発の為の基礎的知見を得ることを目指してきた。本研究開始以前にこれら強酸性土壌に適応した植物を多数採取し、それらの共生微生物群集を特に根圏から多数単離した。共生微生物のうち、窒素固定菌や高濃度アルミニウム耐性菌などについて個々の酸性耐性やアルミニウム耐性などの酸性土壌への適応能について解析してきた。

2. 研究の目的

本研究では強酸性土壌に適応した植物の根圏に共生する窒素固定菌やアルミニウム耐性菌、酵母などの微生物群に注目し、植物・微生物共生系における共生微生物間、宿主植物・共生微生物間の相互作用をゲノム情報を基に解析し、植物・微生物共生体のアルミニウム耐性などの酸性土壌適応機構を解析することを目指した。

これらの知見を蓄積することで、将来的には、これら強酸性土壌に適応した植物の根圏共生微生物群を活用して、高濃度 Al^{3+} 存在下では生育が困難な作物植物を Al^{3+} から保護し、酸性土壌で栽培することが可能になる事が

期待される。

3. 研究の方法

多糖の構造解析：構成糖の組成は酸加水分解し、N-アセチル化後、アミノ安息香酸エチルエステルで蛍光標識し、HPLC で分析した。結合様式は、多糖を重水に溶解させ、NMR による DQF-COSY、HMQC、HMBC などの測定により決定した。

ゲノムのドラフト解析：Roche 社次世代シーケンサー FLX などにより得られた配列を Newbler によりアッセムブリーし、MiGAP をはじめ各種解析ソフトで遺伝子解析 (アノテーション) を行った。

脂質分析：総脂質、中性脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、リン脂質やそれぞれの酸加水分解産物を TLC、GC/MS、LC/MS/MS により分析した。

4. 研究成果

強酸性土壌に適応したカヤツリグサ科植物 *Eleocharis dulcis* から単離した *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株は強いアルミニウムイオン耐性、pH 上昇能、インドール酢酸生産能を有するが、同菌を酸感受性イネ (IR36) の根に接種したところ、接種したイネの生育が促進され、イネの根にバイオフィーム状の物質が見られた。そこで、CA42 株が培地上で生産する多糖 (CA42-PS) を菌体から剥離し、 $AlCl_3$ 溶液と反応させた結果、溶液中に残存するアルミニウムイオン濃度の減少が見られた。また、CA42-PS のアルミニウムやその他酸性土壌で問題となる重金属の吸着能についても検討を行ったところ高い吸着能が認められた。さらに CA42 株の生産する多糖の構造を決定し、同多糖のアルミニウム耐性にかかわる構造を推定した。また同菌のゲノムをドラフト解析し、CA42-PS 合成遺伝子群を推定した。

また酸性土壌適応植物の根圏から単離した窒素固定菌とアルミニウム耐性菌を各種組み合わせた共培養系を作成し、これら根圏共生微生物間の相互作用を検討したところ、アルミニウム感受性窒素固定菌と高濃度アルミニウム耐性菌を高濃度アルミニウム存在下に共培養した場合に窒素固定が認められた。この高濃度アルミニウム耐性菌によるアルミニウム感受性窒素固定に対する保護効果には同菌の細胞表層成分が関与していることが示唆された。

これまで分析していなかった根圏の真核微生物に関する解析も進めた。新たに中国の酸性土壌 (茶畑) から単離した高濃度アルミニウム耐性真核微生物 *Rhodotorula taiwanensis* RS1 に着目した。同酵母は真核微生物であるだけでなく、これまで我々が解析してきた共生微生物群とは異なるアルミニウム耐性機構を有する可能性が示唆され

たことから、先ずそのドラフトゲノム配列を決定、解析した。*Rhodotorula* 酵母のアルミニウム耐性にはミトコンドリアの機能が重要であるとの報告があるため、同酵母のミトコンドリアゲノムに詳細な検討を加えた。また同酵母はアルミニウム存在下に生育させると脂質に大きな変化が起こることを認め、その組成、特に脂肪酸構成について検討を加えた。またアルミニウム添加培養時に細胞や細胞内小器官で起きる脂質の変化についても検討を加えた。これらの脂質の変化とアルミニウム耐性との関連を網羅的に解析するリポドミックス研究のための基盤を、本研究で得られたゲノム情報などに基づいて構築した。

R. taiwanensis RS1 酵母のプロテオミックス解析により、アルミニウム添加培養時にはリンゴ酸デヒドロゲナーゼが増加し、細胞内にクエン酸が蓄積することが示されたことから、アルミニウム耐性と細胞内有機酸の関係について各種突然変異体を用いて検討を加えた。また酸性土壌耐性が報告されている黄花ルピナスについても、その有用性についてプロテオーム解析を行った。

本研究では、酸性土壌に適応した植物・微生物共生系における相互作用に関与する重要な多糖の機能と構造についてゲノム情報を基に明らかにした。共培養系実験より根圏ではアルミニウム感受性窒素固定菌が高濃度アルミニウム耐性菌と共生することにより機能している可能性が示唆された。また真核生物においてアルミニウム耐性に関与する有機酸や脂質の変化に関する興味深いデータが得られた。今後の研究、特に脂質の網羅的研究(リポドミックス解析)のための基盤を整備した。

これらの知見はアルミニウム毒性機構や耐性機構の解明だけでなく、共生微生物群を利用した酸性土壌での作物栽培法開発のための基礎的知見として役立つことが期待される。

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)

Xue Qiang Zhao, Tomoko Aizawa, Jessica Schneider, Chao Wang, Ren Fang Shen and Michio Sunairi. "Complete mitochondrial genome of the aluminum-tolerant fungus *Rhodotorula taiwanensis* RS1 and comparative analysis of *Basidiomycota* mitochondrial genomes" *MicrobiologyOpen* 2(2): 308-317 (2013) DOI: 10.1002/mbo3.74 査読有

Takahiro Ogura, Jun Ogihara, Michio

Sunairi, Javier Alcaino, Haroldo Salvo-Garrido, and Iván J. Maureira-Butler. "Identification of a low digestibility -Conglutin in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seed meal for atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by coupling 2D-PAGE and mass spectrometry." *PLoS One*. 2013 Nov 22; 8(11):e80369. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0080369. 査読有

Xue Qiang Zhao, Shi Wei Guo, Fumie Shinmachi, Michio Sunairi, Akira Noguchi, Isao Hasegawa and Ren Fang Shen. "Aluminium tolerance in rice is antagonistic with nitrate preference and synergistic with ammonium preference." *Annals of Botany* 111(1): 69-77 (2013). 査読有

Chao Wang, Xue Qiang Zhao, Tomoko Aizawa, Michio Sunairi, and Ren Fang Shen. "High aluminum tolerance of *Rhodotorula* sp. RS1 is associated with thickening of the cell wall rather than chelation of aluminum ions." *Pedosphere* 23(1): 29-38 (2013). 査読有

Tomoko Aizawa, Pissot Vijarnsorn, Mutsuyasu Nakajima, and Michio Sunairi. "*Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) that grows in highly acidic swamps." (2011) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61(7): 1645-1650. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

Zhao Xue Qiang, Tomoko Aizawa, Wang Chao, Schneider Jessica, Shen Ren Fang, and Michio Sunairi. "The mechanism of high Al tolerance in *Rhodotorula taiwanensis* RS1" 日本土壌肥料学会 2013 年大会 (名古屋・名古屋大学) (2013.9.11)

佐藤准貴, 相澤朋子, 浦井誠, 砂入道夫. "アルミニウム・重金属耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産するアルミニウム、金属吸着性多糖の機能・構造" 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台・東北大学) (2013.3.26)

佐藤准貴, 相澤朋子, 浦井誠, 砂入道夫. "Al 耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産する Al 吸着性多糖の機能・構造" 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都・京都女子大学) (2012.3.25)

佐藤准貴，相澤朋子，浦井誠，砂入道夫.
“AI 耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42
株の生産する AI 吸着性多糖の構造につい
て” 植物微生物研究会第 21 回研究交流会
(岡山・岡山大学) (2011.9.20)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂入 道夫 (SUNAIRI MICHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：