

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23658072

研究課題名（和文） イネ根圏ならびにイネ体内に棲む窒素固定複合細菌系の分子生態学的解析

研究課題名（英文） Molecular ecological analyses of nitrogen-fixing bacterial consortia in rice rhizosphere and plant

研究代表者

日高 真誠 (HIDAKA MAKOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50183918

研究成果の概要（和文）： イネ根圏窒素固定細菌（*Klebsiella oxytoca* R16）の窒素固定能発揮と根圏細菌叢での細菌間相互作用との関係を解析した。R16株を水田土壌から分離した9種類の非窒素固定細菌と混合培養したところ、*Pseudomonas* sp. RKF06に強い窒素固定賦活化能があった。イネ根圏への接種実験でも、R16株とRKF06株の混合接種は、R16株の単独接種より高い窒素固定能を発揮した。窒素固定細菌の新たな活用法を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）： Relationship between nitrogen-fixing activity of *Klebsiella oxytoca* R16, a diazotroph living in rice rhizosphere, and its bacterial interaction in rhizosphere flora was analyzed. Strain R16 was cultivated together with 9 strains of non-diazotroph isolated from paddy soil. *Pseudomonas* sp. RKF06 enhanced the nitrogen-fixing activity of R16 significantly. In inoculation assay of R16 into the rhizosphere of rice, R16 showed higher nitrogen-fixing activity when strain RKF06 was inoculated simultaneously. This finding will be a new manner to take advantage of diazotrophs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：窒素固定細菌、微生物間相互作用、生物窒素肥料

1. 研究開始当初の背景

従来の窒素固定細菌の活用研究は、単一の窒素固定細菌を無菌的状態の作物に接種して解析するものがほとんどである。申請者は、この解析条件では窒素固定細菌の能力を正當に評価できていないと考え、より自然な生態系での解析を目指してきた。その結果として、水田土壌から分離した細菌を用いて構築した細菌叢では根圏窒素固定細菌の窒素固定能が増強されることを見出すとともに、イネ体内より複合細菌系の状態でのみ窒素固定能を発揮する窒素固定エンドファイトを分離していた。

これらの複合細菌系は、窒素固定能の制御に関わる細菌叢の分子基盤を分子生態学的

に解析するための貴重な題材である。申請者は、この複合細菌系の解析をとおして、最終的には、窒素固定能を我々の自在に調節する新たな制御メカニズムを構築したいと考える。これが実現すれば、生物窒素固定を、即効性の窒素肥料、あるいは緩効性の持続型窒素肥料として自在に利用することが可能になると考える。

本申請では、申請者の保有する複合細菌系において窒素固定能が増強、あるいは発揮される際の鍵となる共存細菌にはどのような性質が求められるのか、ならびに微生物間コミュニケーションに関わる分子が何であるのかを探りたいと考えた。

2. 研究の目的

我々は、食糧生産の持続性確保のために、作物生産を主題とした様々な重要課題に迫られている。これに対して植物の絶対的な窒素要求性から考察すると、課題解決の根底に、作物生産に必要な窒素肥料をいかに地球環境への負荷なく確保するかという問題が横たわっていることが見えてくる。申請者は、この問題を解決する最終的手段は、生物窒素固定を利用すること以外にないと考えている。このためには、生物窒素固定を即効性肥料や緩効性肥料として自在に使いこなす術が必要となる。

従来行われてきた研究は、窒素固定細菌の内在的能力の改良、すなわちニトロゲナーゼの発現強化やヒドロゲナーゼの発現強化により窒素固定能を増強させるという微生物育種と、その改良株を無菌作物に単独接種してその窒素肥料効果を解析することが主流であり、申請者もそれを行ってきた。しかし、微生物のバイオフィーム形成能、異種微生物間のコミュニケーションの存在等が明らかになっている現在においては、微生物生態学的に窒素固定細菌が単独で生息する状況はあり得ないことと合わせて、複合微生物系における生態学的な窒素固定能制御機構が働くことを前提に、そのメカニズムの解析にチャレンジする必要がある。

過去の研究において、申請者は、イネ根圏窒素固定細菌である *Azospirillum lipoferum* と *Klebsiella oxytoca* の窒素固定遺伝子を改変することで窒素源存在下でも窒素固定を行う改良株を作製した。両改良株を窒素制限下で栽培するイネに接種すると、窒素吸収量の増加に伴う収量の回復が認められた。また、その回復程度は水田土壌より分離した非窒素固定細菌とともに接種した場合の方が大きかった。すなわち、微生物間相互作用が窒素固定細菌の窒素固定能を制御する可能性が示唆された。

これとは別に、イネ体内に棲息する窒素固定細菌（窒素固定エンドファイト）を探索し、複数種の細菌が共存することで好気条件でのみ窒素固定を行う複合細菌系を分離した。窒素固定能を有するのは嫌気性細菌 *Anaerospira* sp.であったが、この細菌は単独で嫌気培養すると窒素固定能を発揮せず、複合細菌系をなす好気性細菌、特に *Bacillus* sp. と好氣的に共培養した場合にのみ窒素固定能を発揮する。すなわち、この系においても、微生物間相互作用が窒素固定細菌の窒素固定能を制御する可能性が示唆された。

以上のことから、現在申請者が保持する複合細菌系を題材に、生態学的な窒素固定能制御機構の実態を明らかにすることを目指す。生きた細菌の共存が絶対的に必要であることが明らかとなれば、それは微生物生態学に

とって画期的発見となり、また、微生物間コミュニケーションのメディエーターである分子を明らかにできれば、それは微生物ホルモンやクオルモンとは別の新たな微生物間コミュニケーション機構を提唱することに繋がる。また、その分子は生態系における窒素固定制御のためのツールとして利用することもできる。

3. 研究の方法

根圏細菌叢における細菌間コミュニケーションの解析

(1) まず、改良型の窒素固定細菌 (*Azospirillum lipoferum* TA1 と *Klebsiella oxytoca* R16) と水田土壌から分離した非窒素固定細菌 (9種類、図1の青字) を混合した液体培養系を構築し、窒素固定能がどの程度賦活されるのかを試験した。発揮される窒素固定能はアセチレン還元法により測定した。

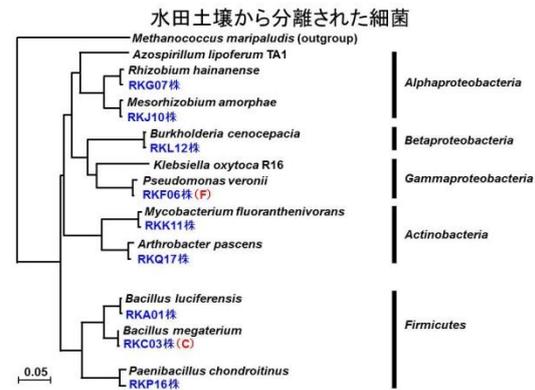


図1 水田土壌分離細菌の系統

次に、この賦活化に積極的に関与する非窒素固定細菌が何であるのかを解析した。組み合わせとしては、窒素固定細菌に対して非窒素固定細菌を1種類ずつ混合する系、ならびに、2種類の非窒素固定菌を混合する系などを試験した。

(2) *Klebsiella oxytoca* R16、*Bacillus* sp. RKC03、*Pseudomonas* sp. RKF06 の3種類の細菌で構築した複合細菌系の培養経過に伴う各細菌の数やサイズの変化を、サイズアナライザーにより解析した。さらに、細菌間の物理的接触の有無や窒素固定細菌の形態変化の有無を、顕微鏡観察でより詳細に解析した。

(3) 混合培養法の二つ目として、高い窒素固定能発現をもたらすことができる軟寒天包埋培養法を行った。この系では、ニトロゲナ

一ゼの遺伝子 (*nifH*) のプロモーターの下流に発色型のレポーター遺伝子を繋いだ合成遺伝子を導入した窒素固定細菌を用いることにより、窒素固定能の発揮が混合培養のどのような部位において行われるのかについても観察を行った。

(4) 第二の解析として、*Pseudomonas* sp. RKF06 を培養した培養上清 (conditioned media) での窒素固定細菌の培養により、細菌の共存なしに窒素固定能が増強されるのかを解析した。

(5) 第三の解析として、軟寒天培地で栽培するイネに *K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 を混合接種し、根圏においても窒素固定能の賦活が起きるのかを解析した。これは、試験管内実験によって得られた結果が実際の生態系においても再現されるのかを確認するためのものである。

4. 研究成果

(1) 液体混合培養による窒素固定能の解析
まず、イネ根圏より分離した窒素固定細菌 (*Azospirillum lipoferum* TA1 と *Klebsiella oxytoca* R16) を窒素固定細菌の性状試験で一般的に利用される改変 Rennie 培地で液体培養した。静置培養、100 rpm 振盪培養、300 rpm 振盪培養を試験したところ、静置培養において明瞭なアセチレン還元能を示した。したがって、以後は静置培養のみを試験した。

① *A. lipoferum* TA1 を 9 種類の細菌全てと混合培養したところ、アセチレン還元能に *A. lipoferum* TA1 の単独培養のものとの変化はなかった。

K. oxytoca R16 を 9 種類の細菌全てと混合培養したところ、アセチレン還元能は *K. oxytoca* R16 の単独培養のもの 8 倍 (9 日間培養でのエチレン蓄積量) あるいは 4 倍 (33 日間培養でのエチレン蓄積量) に達した。

したがって、今回用いた細菌の組合せでは *A. lipoferum* TA1 は窒素固定複合細菌系の形成には主たる役割を果たさないと考え、以後は *K. oxytoca* R16 の解析に絞った。

② *K. oxytoca* R16 に水田土壌細菌を 1 株ずつ加えて混合培養 (33 日間培養) したところ、*Bacillus* sp. RKC03 を混合した系が 2.5 倍のアセチレン還元能を示し、次に *Pseudomonas* sp. RKF06 を混合した系が 1.5 倍のアセチレン還元能を示した (図 2)。他の混合系は、*K. oxytoca* R16 の窒素固定能を賦活することはなかった。

③ *K. oxytoca* R16 と *Bacillus* sp. RKC03

を混合した系に、さらに残りの細菌を 1 種類ずつ加えて混合培養 (33 日間培養) したところ、*Pseudomonas* sp. RKF06 以外の細菌ではアセチレン還元能が上昇することはなかったのに対し、*Pseudomonas* sp. RKF06 を加えた三者混合培養系のアセチレン還元能は、*K. oxytoca* R16 と 9 種類の細菌全てを混合培養した際のアセチレン還元能と同等の値を示した (図 2)。すなわち、*K. oxytoca* R16 に対しては、*Bacillus* sp. RKC03 と *Pseudomonas* sp. RKF06 の共存が窒素固定複合細菌系を構築するために必要であることが明らかとなった。

R16株を水田土壌細菌と共培養したときのARA

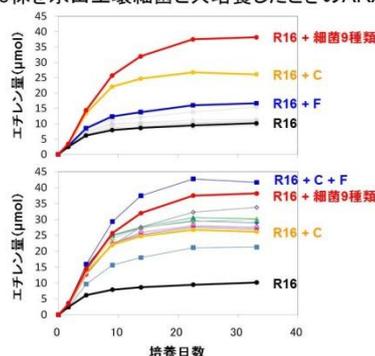


図 2 混合培養によるアセチレン還元能 (ARA) の賦活

(2) *K. oxytoca* R16、*Bacillus* sp. RKC03、*Pseudomonas* sp. RKF06 で構築する窒素固定複合細菌系における各細菌の挙動の解析

サイズアナライザー (バックマン・コーンター製 Multisizer 3) を用いて複合細菌系全体の細菌数と細胞サイズの変化の解析を行った。

① 混合培養開始時の各細菌の大きさ (粒径ピーク) は、小さい方から、*Pseudomonas* sp. RKF06 が 0.9 μm、*K. oxytoca* R16 が 1.0 μm、*Bacillus* sp. RKC03 が 2.2 μm であり、培養中も *Bacillus* sp. RKC03 は他の 2 種類の細菌とは区別できると考えた。ところが、混合培養開始 1 日目には、*Bacillus* sp. RKC03 に相当するピークが消失し、*Bacillus* sp. RKC03 の大部分はこの時点で溶菌してしまっていると考えざるをえなかった。

② 混合培養 1 日目の粒径ピークは 1.1 μm であり、*K. oxytoca* R16 単独培養時の粒径ピークと一致したので、このピークは *K. oxytoca* R16 に由来するものと考えた。以後、粒径ピークは、2 日目に 1.2 μm と大きくなり、4 日目以降 10 日目まで同じ値を維持した。

一方、*K. oxytoca* R16 を単独培養した場合には、粒径ピークは、1 日目では 1.1 μm となり、2 日目と 4 日目もこれを維持したが、7 日目には少し小さくなり、10 日目には 1.0 μm に戻っていた。

③ 上記の推移の間の細胞の長さを顕微鏡で観察した。*K. oxytoca* R16 単独培養では、1 日目には 2 μm から 3 μm の長さの細胞が主体となり、その中に 5 μm 以上に伸長した細胞がかなりの数存在していた。2 日目には 5 μm 以上に伸長した細胞が認められなくなり、4 日目以降は 1.0 μm 程度の細胞が主体となっていた。

一方、混合培養では、1 日目には 3 μm から 5 μm の長さの細胞が主体となり、2 日目には 5 μm 程度の長さの細胞が主体となった。そして、この細胞の長さは、10 日目まで維持された。

④ アセチレン還元能の変化と細胞の大きさの変化との相関を見ると、混合培養では 1 日目の大きなエチレン蓄積に続いて 2 日目以降もエチレン蓄積が継続したのに対して、単独培養では 1 日目にはエチレンが大きく蓄積するものの、2 日目以降のエチレン蓄積は緩慢になっていたことから、*K. oxytoca* R16 の窒素固定能は伸長した状態の細胞に担われていることが示唆された。

(3) 軟寒天包埋培養法による *K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 との相互作用の解析

上記(2)の解析で、*Bacillus* sp. RKC03 は窒素固定複合細菌系において初期に溶菌することが示唆された。そこで、以後は、*K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 の 2 種類の細菌で構築する窒素固定複合細菌系について解析をすすめた。

まず、*K. oxytoca* R16 のニトロゲナーゼの遺伝子の一つである *nifH* のプロモーターに *gus* 遺伝子を繋いだ *PnifH-gus* を作製し、このレポーター遺伝子を導入した *K. oxytoca* R16 を作製した。

① 改変 Rennie 軟寒天培地で *PnifH-gus* を保有する *K. oxytoca* R16 を培養した。気相は空気 85%、アセチレン 15%の好気条件とした。その結果、培地全域に渡って GUS 活性が認められるなかで、培地表層から少し下層の領域での GUS 活性が最も強かった。従来、*K. oxytoca* は嫌気条件のみで窒素固定を行うと考えられてきたが、今回の結果から、窒素固定遺伝子の発現は嫌気条件よりも微好気条件でより強くなると考えざるをえなかった。

そこで、気相を空気 85%、アセチレン 15%の好気条件としたものと、アルゴン 85%、ア

セチレン 15%の嫌気条件としたものとおけるアセチレン還元能を比較したところ、どちらの条件でも培養 10 日間ほどに渡って還元能が持続するものの、好気条件での還元能は嫌気条件でのものの 2 倍を維持した。したがって、窒素固定能に関しても、軟寒天包埋培養法では好気条件でより強くなることが明らかとなった。

② 改変 Rennie 軟寒天培地で *Pseudomonas* sp. RKF06 を好氣的に培養すると、培地表層で生育することが判明した。炭素源としてはスクロースやマンニトールを、窒素源としては Yeast Extract を利用して生育したものと考えられる。

そこで、*PnifH-gus* を保有する *K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 を好氣的に混合培養したところ、培地下層（嫌気条件）での GUS 活性は全く認められず、培地表層からその下層部にかけての領域で非常に強い GUS 活性が認められた。すなわち、*K. oxytoca* R16 が *Pseudomonas* sp. RKF06 から何らかの相互作用を受ける領域において、窒素固定遺伝子の発現が非常に昂進されることが明らかとなった。

アセチレン還元能に関しても、*K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 の混合培養の値は、*K. oxytoca* R16 単独培養の値の約 2 倍を示した。

以上より、*K. oxytoca* R16 の窒素固定能に対して *Pseudomonas* sp. RKF06 がもたらす賦活は、水田のイネ根圏（根から空気が放出されるため、好気条件にある）においても機能するものと期待できる。

(4) *Pseudomonas* sp. RKF06 の培養上清の窒素固定賦活作用の解析

改変 Rennie 液体培地で *Pseudomonas* sp. RKF06 を一晩振盪培養した。これを遠心し、その上清を 0.22 μm フィルターに通したものを培養上清とした。この培養上清と改変 Rennie 培地を 3:2 で混合して寒天で固化したものを培養上清軟寒天培地とした。

PnifH-gus を保有する *K. oxytoca* R16 を培養上清軟寒天培地ならびに改変 Rennie 軟寒天培地で好氣的に培養（30 日間）し、GUS 活性ならびにアセチレン還元能を比較した。

上記(3)と同様、両培地とも GUS 活性は培地全域に認められ、特に培地表層から少し下層の領域で強かった。青色発色の程度を吸光度計で測定して比較したところ、培養上清軟寒天培地での発色は、改変 Rennie 軟寒天培地での発色より常に濃かった。

また、アセチレン還元能も、培養上清軟寒天培地のものは改変 Rennie 軟寒天培地のものの 1.5 倍ほどを維持し続けた。

これより、*Pseudomonas* sp. RKF06 の生

産する何らかの物質が *K. oxytoca* R16 の窒素固定の賦活に関与することが明らかとなった。

(5) イネ根圏における *Pseudomonas* sp. RKF06 の窒素固定能賦活作用の解析

イネ水耕液軟寒天培地にイネ（豊雪矮性）の発芽種子を置き、10日目（イネが第5葉を展開する時期）に *K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 をイネの根本の軟寒天培地表面に注ぎ込み、菌体接種とした。以後の栽培は、28°C、明期（約 4000 lx）16 h、暗期 8 h で行った。細菌接種後1週間目から、1週間おきに4週間までにわたってアセチレン還元能を測定した。

K. oxytoca R16 を単独接種したイネにおいて、アセチレン還元能は4回の測定ともほぼ一定の値を示した。そして、*K. oxytoca* R16 と *Pseudomonas* sp. RKF06 を混合接種したイネにおけるアセチレン還元能は、単独接種のものに比べて約 1.5 倍の値を維持し続けた。

これより、*Pseudomonas* sp. RKF06 による窒素固定能の賦活は、イネ根圏においても長期に渡って作用することが示された。

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

—

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 真誠 (HIDAKA MAKOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50183918