

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870789

研究課題名(和文) 強酸耐性植物根圏の共生微生物でイネを守る～その強さの秘密を解き明かせ

研究課題名(英文) Characterization and application of symbiotic bacteria isolated from plants adapted to highly acidic soils.

研究代表者

相澤 朋子 (AIZAWA, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：60398849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：pH 4.5以下の酸性土壌では、アルミニウムが土壌から溶け出す事により、植物とその根圏微生物に深刻な影響が起こる。酸性土壌でのアルミニウムの毒性機構や耐性機構についての情報は少ない。本課題では、問題土壌の多くを占める「酸性土壌」での農業へ適用可能な植物生育促進に使用する微生物として、酸性硫酸塩(ASS)適応植物に共生する有用微生物群をモデルとして用い、ASS適応遺伝子・タンパク質群の選抜と機能解明、根圏微生物の生存と定着・耐性に関する多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析などを行った。

研究成果の概要(英文)：Below pH 4.5, aluminum (Al) becomes more soluble in soils and consequently toxic to plants and their rhizospheric microorganisms, which can cause serious destruction of the environment and significant economic loss. Although there have been numerous reports on the toxicity of acid soils and the tolerance mechanisms in plants and microorganisms, especially the Al-toxicity and tolerance mechanisms, the research is still necessary to overcome the problems. Our results suggested that consortia or individual strains of symbiotic bacteria of plants growing in AASS areas might play important roles in the adaptation of these plants and may promote the growth of crop plants under acidic conditions. This knowledge will greatly help the development of new bioremediation methods for AASS areas, e.g., new bacterial inoculants to increase crop yield in AASS areas and neutralization of AASS by use of plant-microbe symbiotic systems.

研究分野：環境微生物学

キーワード：根圏微生物 酸性土壌 アルミニウム耐性

1. 研究開始当初の背景

人口増加に伴う食糧増産の必要性が世界的命題となっているなかで、耕作に適さない「問題土壌」の利用が求められているが、その約 30%は、「酸性土壌」であるといわれている。本課題では、「問題土壌」の多くを占める「酸性土壌」での農業へ適用可能な植物生育促進に使用する微生物として、酸性硫酸塩(ASS)適応植物に共生する有用微生物群をモデルとして用い、ASS 適応遺伝子・タンパク質群の選抜と機能解明、根圏微生物の生存と定着・耐性に関する多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析を行う。これにより根圏での植物-ASS 適応微生物間の相互作用の解明を目指す。

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て生体物質へ結合し、植物生育阻害を引き起こす。日本の農地のほとんどが酸性土壌だとされているが、通常その pH は 4 以上を示し、かつ作土に応じた施肥や処理がされており問題は少ない。しかし、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・酸化して生じる硫酸により、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)と呼ばれる土壌では農作物の収量低下が特に深刻である。その多くは人口増加を続けるベトナム・タイなどの東南アジア地域に集中して存在し、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、これら対策に多大な労力とコストがかかることから、農地の持続的利用が難しい地域が多い。

そこで、ASS のような強酸性環境で適用できる低コストかつ効率的な新手法、例えば植物根圏での中性化、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。また、ASS の脅威は東南アジアだけの問題に限らない。先の震災で農業地帯を含む陸地を襲った黒色の津波の色は海底堆積物に含まれる硫化鉄も原因であり、泥として堆積することで、塩害だけでなく ASS 形成の原因となる。この問題も、生態系と農業への影響を通して長年にわたり深刻な影響を及ぼすことが懸念されており、ASS 適応微生物群の応用が期待できる。

2. 研究の目的

アルミニウム等の金属イオン耐性、低 pH 耐性、不溶性リン酸塩可溶化、バイオフィーム形成に関与する新規 ASS 適応機構を見出すために、まず、トランスポゾン導入変異株を用いた各種培養条件での ASS 適応遺伝子破壊

株の選抜を行う。次に、アルミニウム共存下、非共存下など各培養条件での網羅的タンパク質解析を行う。

さらに、これら微生物の生存と定着には多糖によるバイオフィームが重要である可能性があるため、多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析を行う。

(1) ASS 適応遺伝子・タンパク質群の選抜

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 *Acidocella* 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) 根圏微生物の生存と定着・耐性に関する多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析

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) トランスポゾン導入変異株を用いた ASS 適応遺伝子群の探索

トランスポゾン (EZ-Tn5) を用いてランダム遺伝子ノックアウトライブラリーとして 2000 以上株の変異株を取得してある。前述したように、野生株で示されたアルミニウムなどの金属イオン耐性、低 pH 耐性、リン酸可溶性などの形質を失う変異株、または形質が強化される変異株などを培地での生育を指標に、24 ウェルや 96 ウェルマイクロプレートを用いた培養法で多検体をスクリーニングする。次に、選抜した変異株のトランスポゾン導入部位を決定し、ASS 適応関連遺伝子群の候補を選抜する。さらに、決定したトランスポゾン導入部位の周辺遺伝子を相同組み換え法による遺伝子破壊や遺伝子相補実験を行い、選抜した機能遺伝子の同定を行う。

(2) プロテオーム解析

アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸鉄存などの不溶性リン酸存在下、および非

存在下で培養した細胞を回収後、タンパク質を抽出し、SDS-PAGE での分離後にトリプシン消化して LC/MS/MS 分析することで、網羅的に蛋白質を同定・定量するショットガンプロテオームを行う。これによりアルミニウム耐性や不溶性リン酸可溶化に關与するタンパク質の候補を選抜し、それぞれのタンパク質の発現量を解析する。さらにこれらタンパク質に關する周辺遺伝子の遺伝子破壊および遺伝子相補実験を行い、機能遺伝子の同定を行う。

(3) 根圏微生物の生存と定着・耐性に關与する多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析

AL46 株、CA42 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。これらは酸性条件下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、構造と機能の關係を明らかにする。さらに、ASS で問題となるその他の金属イオン(鉄、マンガ、ニッケル、カドミウム、銅、亜鉛やその他陽イオン)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する。これまでに申請者は、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、代表的な土壤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。また、これまでに構築した解析系を用いて CA42 株の細胞外多糖の構造を決定しており、AL46 株についても同様の手法で細胞外多糖や外膜多糖、低分子キレート物質の機能と構造の關連を検討する。

4. 研究成果

(1) トランスポゾン導入変異株を用いた ASS 適応遺伝子群の探索

トランスポゾン(EZ-Tn5)を用いてランダム遺伝子ノックアウトライブラリーとして 2000 以上株の変異株を取得した。野生株で示されたアルミニウムなどの金属イオン耐性、低 pH 耐性、リン酸可溶化能などの形質を失う変異株、または形質が強化される変異株などを培地での生育を指標に、24 ウェルや 96 ウェルマイクロプレートを用いた培養法で多検体スクリーニングを行った。その結果、200 株以上の野生株と生育の異なる変異株を選抜した。現在は、選抜した変異株のトランスポゾン導入部位を決定し、ASS 適応關連遺伝子群の候補を選抜している。

(2) プロテオーム解析

これまでに、ASS 適応微生物群から、既報を大きく上回る濃度の $AlCl_3$ (200 mM) や

$MnSO_4$ (3 M)、 $NiSO_4$ (20 mM)、 $CdSO_4$ (1 mM)、 $FeCl_3$ (0.4 mM)、 $CuSO_4$ (0.1 mM)を含む酸性培地 (pH 3) で良好な生育を示す菌株を選抜し、新種 *Acidocella aluminidurans* AL46 株として報告している。この AL46 株に加え、イネの根周囲に著量の金属吸着性バイオフィルムを形成する CA42 株のドラフトゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定している。これらの情報を元に、アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸鉄存などの不溶性リン酸存在下、および非存在下で培養した AL46 株の細胞を回収後、タンパク質を抽出し、SDS-PAGE での分離後にトリプシン消化して LC/MS/MS 分析することで、網羅的に蛋白質を同定・定量するショットガンプロテオームを行った。その結果、アルミニウム (0 mM, 25 mM, 50 mM) の存在下で発現するタンパク質を複数回の分析を行うことで再現性よく解析できることを確認した。現在、アルミニウム耐性や不溶性リン酸可溶化に關与するタンパク質の候補を選抜し、それぞれのタンパク質の発現量を解析している。さらにこれらタンパク質に關する周辺遺伝子の遺伝子破壊および遺伝子相補実験を行い、機能遺伝子の同定を行う予定である。

(3) 根圏微生物の生存と定着・耐性に關与する多糖など金属イオン吸着物質の機能と構造解析

CA42 の生産するバイオフィルム(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。

CA42 株の細胞外多糖を用い、ASS で問題となるその他の金属イオン(鉄、マンガ、ニッケル、カドミウム、銅、亜鉛やその他陽イオン)と細胞外多糖を反応させ、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。その結果、CA42 株の細胞外多糖は特にアルミニウムを吸着し、最大で $0.17 \mu mol/mg$ の吸着を示し、その他の酸性硫酸塩土壤で問題になる金属(銅、鉄、ニッケル、亜鉛、マンガ)についても吸着が見られた。

そこで、この多糖について機能と構造の検討を行なった。CA42-多糖について、HPLC 分析などによりグルコースのホモポリマーと考えられ、NMR 分析、メチル化分析の結合様式の解析の結果を考慮して多糖の構造を決定した。CA42-多糖は主鎖に 1-4 結合を持ち、グルコース残基約 10 個毎に 1-4, 1-6 結合を持つグルコースが存在し、1-6 結合から 1-4 結合を繰り返すグリコゲンを生産してい

ると判明した。また、側鎖の鎖長の検討を行った結果、2糖、3糖、4糖を側鎖に持つと考えられる。また、CA42-多糖、グリコーゲン、でんぷんは Al^{3+} 除去能を示し、これらの多糖に共通する 1-6 結合の分岐が Al^{3+} 除去に必要なのではないかと考え、プルラーゼ処理を行った各多糖の Al^{3+} 除去能を調べた結果、1-6 結合が重要であると判明した。

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4件)

M. Urai, T. Aizawa, M. Nakajima, M. Sunairi. An Anionic Polymer Incorporating Low Amounts of Hydrophobic Residues Is a Multifunctional Surfactant. Part 1: Emulsifying, Thickening, Moisture absorption and Moisture-retention Abilities of a Fatty Acid-Containing Anionic Polysaccharide. ACES 5(2):173-180, 2015. 査読あり

M. Urai, T. Aizawa, M. Nakajima, M. Sunairi. An Anionic Polymer Incorporating Low Amounts of Hydrophobic Residues Is a Multifunctional Surfactant. Part 2: Emulsification, Moisture Absorption, and Moisture Retention of Alkyl Esterified Poly- γ -Glutamic Acid. ACES 5(2):181-191, 2015. 査読あり

X. Q. Zhao, T. Aizawa, J. Schneider, C. Wang, R. F. Shen, M. Sunairi: Complete mitochondrial genome of the aluminum-tolerant fungus *Rhodotorula taiwanensis* RS1 and comparative analysis of Basidiomycota mitochondrial genomes. MicrobiologyOpen 2, 308-317, 2013 査読あり

C. Wang, X. Q. Zhao, T. Aizawa, M. Sunairi, R. F. Shen: High aluminum tolerance of *Rhodotorula* sp. RS1 is associated with thickening of the cell wall but not chelation of aluminum ions. Pedosphere 23, 29-38, 2013. 査読あり

[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]

なし

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・助教

研究者番号: 60398849