

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02845

研究課題名(和文)水生植物根圏をプラットフォームとした微生物群集デザイン技術開発と水質浄化への応用

研究課題名(英文) DEVELOPMENT OF MICROBIAL COMMUNITY DESIGN TECHNOLOGY USING THE RHIZOSPHERE OF AQUATIC PLANTS AND ITS APPLICATION TO ENVIRONMENTAL WATER QUALITY CONTROL

研究代表者

清 和成 (SEI, Kazunari)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80324177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,150,000円

研究成果の概要(和文)：水生植物が特定の微生物を根圏に集積させるメカニズムを、根圏に形成される微生物群集の特徴と、根圏微生物と共生している水生植物の遺伝子発現解析から明らかにすることを目的とした。ウキクサやコウキクサの根圏には、早期に集積する微生物群と時間をかけて着実に定着する微生物群が存在すること、根圏に選択的に集積する微生物群の特徴として、運動性の有無が重要な因子の1つである可能性が指摘できた。根圏微生物と共生したウキクサの遺伝子発現解析では、信頼に足る解析のできる質のmRNAが得られなかったが、改善点も含めて一連の実験手法を確立できたことから、今後も研究を継続していく。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism of aquatic plants to accumulate specific microorganisms in the rhizosphere from the characteristics of microbial communities formed in the rhizosphere and gene expression analysis of aquatic plants coexisting with rhizosphere microorganisms.

In the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza* and *Lemna minor*, two microorganism groups which show different accumulating behavior were confirmed. The one group showed quick, that is within 3 days, accumulation to the rhizosphere. Another group showed slow accumulation but steadily over time. As the characteristic of the microorganism group selectively accumulating in the rhizosphere, the presence of motility seemed one of important factors.

Although the gene expression analysis of *S. polyrrhiza* coexisting with rhizobacteria was failed because of the low quality of mRNA extracted from *S. polyrrhiza*, we could develop a series of experimental methods including improvement points.

研究分野：生物環境工学

キーワード：水生植物根圏 遺伝子発現解析 微生物群集構造解析 水質浄化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは 2006 年頃から、水生植物 (ウキクサ: *Spirodela polyrrhiza* やボタンウキクサ: *Pistia stratiotes* L.) の存在下で環境水中や底質中の各種芳香族化合物の分解が促進されることを明らかにしてきており、これが、水生植物と根圏微生物の共生作用によってもたらされること、特に水生植物がその根圏に芳香族化合物の分解能に長けた特殊な微生物を選択的かつ高密度に集積する能力を有していること、ウキクサが根の表面にフェノール性物質に富んだ成分を分泌していること、環境条件に応じて根分泌物成分等を変化させ、根圏に集積させる微生物を能動的に選択している可能性のあることを明らかにするとともに、4-*n*-ブチルフェノール (4-*n*-BP) やノニルフェノール (NP)、4-*tert*-BP など、これまでに生分解の報告のなかった水環境汚染物質の分解微生物や、ベンゾ[a]ピレン、4-*tert*-オクチルフェノール (4-*tert*-OP) などの水環境底質中に蓄積されやすい汚染物質の分解微生物を、ウキクサやヨシ (*Phragmites australis*) の根圏から分離、同定し、その特徴を明らかにしてきた。さらに、水生植物根圏にウキクサ根圏から分離された *Sphingobium fuliginis* OMI 株をウキクサやコウキクサ (*Lemna minor*) と共生させた際に、OMI 株の表面付着のための線毛合成等に関わる遺伝子が顕著に発現していることを見出し、微生物側の視点から特定の微生物が水生植物根圏に特異的に集積するメカニズムの一端を明らかにしてきた。

一方、このような共生作用では、水生植物が、自身の置かれた環境条件等に応じて、どのように異なる特定の微生物をその根圏に集積させようとする『はたらきかけ』をしているのか、すなわち、たとえば上述のように、特定の微生物の線毛合成をどのように促進させているのかなど、水生植物から微生物への『はたらきかけ』の全体像は全く分かっていないと言ってよい。この『はたらきかけ』を明らかにできれば、これまでに得られてきた根圏微生物側からの『応答』に関する情報と統合させることによって、水生植物と根圏微生物の共生メカニズムを、水生植物と根圏微生物の双方のアプローチから、生物の根源である遺伝子とその発現制御のレベルで明らかにでき、目的に応じて人為的に根圏微生物群を制御した水生植物 - 根圏微生物共生システムの構築が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、目的に応じて人為的に根圏微生物群を制御した水生植物 - 根圏微生物共生システムの構築のための基盤技術創出に向け、

水生植物が特定の微生物を根圏に集積させようとするメカニズムを、各種水生植物根圏に形成される微生物群集構造の特徴と、根圏微生物と共生している水生植物の遺伝子発現解析から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 水生植物根圏に集積している微生物群集構造の解析

500 mL 容の三角フラスコに調製された 200 mL の滅菌 Arnon & Hoagland (A&H) 培地で継代栽培 (温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度 8,000 lux (16 時間明 / 8 時間暗)、静置) された無菌ウキクサおよび無菌コウキクサを用いた。無菌ウキクサ 60 株および無菌コウキクサ 90 株を、相模川水系の 2 河川 (相模川および姥川) から採取した表層水にて上述と同条件で 14 日間栽培し、0、1、3、7、14 日目に液相ならびに根表面の微生物を回収した。根表面の微生物回収は、ウキクサ 10 株あるいはコウキクサ 20 株の根を滅菌チューブに採取し、1 mL の TE バッファーとともに超音波処理によって行った。回収した微生物から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の PCR-DGGE 解析と配列解析によって、水生植物根圏に高頻度で集積される微生物の属種を調べた。

(2) ウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) の遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレイの設計と根圏微生物と共生しているウキクサの遺伝子発現解析

ウキクサの遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレイの設計にあたっては、アメリカ・エネルギー省の Joint Genome Institute (JGI) がデータベース上で公開している *Spirodela polyrrhiza* 7498 株の全ゲノム配列データを使用した。19,623 遺伝子が報告されており、このうち 18,894 遺伝子についてはアノテーションができています。これらの遺伝子配列について、アジレント・テクノロジー株式会社が提供している eArray を用いて、カスタム DNA マイクロアレイを設計した。

根圏微生物と共生しているウキクサの遺伝子発現解析に際しては、無菌ウキクサを *Acinetobacter* sp. P23 株と共生させたものを実験系とした。(1) と同様の条件で継代栽培した無菌ウキクサ 60 株を、500 mL 容の三角フラスコに調製された 200 mL の滅菌 A&H 培地に植栽し、コハク酸含有最少培地で培養した *Acinetobacter* sp. P23 株を、 $\text{OD}_{600} = 0.3$ となるように植種して共生系を作成した。P23 株を植種しない非共生系を対照系として作成し、共生系、非共生系ともに、温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度 8,000 lux (16 時間明 / 8 時間暗)、静置条件で 3 日間栽培した。

0、4、8、12、24、72 時間目にウキクサの根を回収し、RNeasy Plant Mini Kit によって全 RNA の抽出を行った上で、バイオアナライザ 2100 (アジレント・テクノロジー) を用いて RNA の分解度を RNA Integrity Number (RIN) によって評価した。ここで RIN は 1~10 の数値で表現され、数値が大きいほど RNA の分解度が低い、すなわち質の高い RNA とされている。なお、RIN が 5 未満の場合、意味のある発現解析が困難であるとされている。ここで RIN が 5 以上のサンプルについては、GeneRead Pure mRNA Kit を用いて mRNA の回収を行うこととした。また、全 RNA の抽出、mRNA の回収は、それぞれのキットを利用して自動化された QIAcube を用いて行った。得られた mRNA はその後、アジレント・テクノロジーの One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling Protocol に従って、cRNA 合成と Cy3 ラベリング、ハイブリダイゼーションとマイクロアレイの洗浄を実施し、BioChip Scanner GenePix 4000B (Molecular Devices) によってスキャン、GenePixPro7.0 (Molecular Devices) による解析を実施することとした。

4. 研究成果

(1) 水生植物根圏に集積している微生物群集構造の解析

相模川および姥川から採取した河川水試料を用いて、ウキクサおよびコウキクサを栽培した際の液相ならびに根表面の微生物群集構造を PCR-DGGE 法によって解析した。液相の PCR-DGGE バンドパターンは、河川が異なると当初 (0 日目) からパターンが異なることが確認された。また、14 日間の実験期間中、検出される優占バンドやバンドパターンが経時的に変化したことから、河川水試料中の微生物群集は、当初存在していた微生物群集のうち、ウキクサおよびコウキクサとの共生によって、存在割合を増して優占化するものと存在割合を減ずるものなど多様な影響を受けて変化することが示された。

一方、1 日目から 14 日目の根表面 (根圏) の PCR-DGGE バンドパターンは、元の河川水 (0 日目) 試料のバンドパターンとは大きく異なった。特に、0 日目には検出されなかった数種類のバンドが 1 日目から 14 日に確認されており、相模川河川水とウキクサの組み合わせの系では 1 日目から 14 日目の全ての試料において、同様のバンドパターンを示したのに対し、他の 3 試料 (すなわち、相模川河川水とコウキクサ、姥川河川水とウキクサおよびコウキクサの組み合わせの系) においては、1 日目および 3 日目は同様のバン

ドパターンを示したが、3 日目までに検出されなかった複数のバンドが 7 日目および 14 日目に検出された。

これらのことから、ウキクサおよびコウキクサの根圏では、元の河川水中とは全く異なる微生物群集が形成されることが明らかとなり、根圏に形成される微生物群集は、3 日目までの比較的早期に根圏に集積する微生物群と 3 日目以降に集積する、あるいは時間をかけて根圏に着実に定着する微生物群が存在することが示唆された。

つづいて、姥川の河川水試料を用いた実験系において、PCR-DGGE 解析で得られたバンドについて、比較的存在割合の高いと考えられるもの、他の試料では検出されなかった特徴的なものについて塩基配列を解読し、BLAST による同源性検索を行った。

元の河川水試料では、 β -Proteobacteria 綱の *Albidiferax* 属、*Rhodocyclaceae* 科、 γ -Proteobacteria 綱の *Pseudomonas* 属、*Atlantibacter* 属の既知種と高い同源性を示すものが検出された。

ウキクサとの共生系では、水相からは初期 (1~3 日目) に *Limnohabitans* 属が、根圏からは後期 (14 日目) に β -Proteobacteria 綱の *Rubrivivax* 属が特徴的なものとして検出された。

他方、コウキクサとの共生系では、水相からはウキクサ系と同様の *Limnohabitans* 属に加え、 β -Proteobacteria 綱の *Polynucleobacter* 属と高い同源性を示すものも検出された。根圏からは、7 日目のみに β -Proteobacteria 綱の *Hydrogenophaga* 属が、14 日目になって α -Proteobacteria 綱の *Blastomonas* 属、 β -Proteobacteria 綱の *Acidovorax* 属がそれぞれ特徴的なものとして検出された。

研究代表者らの過去の研究により、ウキクサ根圏より分離された *Sphingobium fuliginis* OMI 株が化学走化性に関する遺伝子を高発現することによってウキクサ/コウキクサの根圏に移動、IV 型線毛によって根面に定着するメカニズムを推定したが、本研究においてウキクサおよびコウキクサ根圏で特徴的に確認された微生物群のうち、*Rubrivivax* 属、*Hydrogenophaga* 属、*Acidovorax* 属は運動性を有していることから、水生植物根圏に選択的に集積する微生物として、運動性の有無は重要な因子の 1 つである可能性が指摘できる。

(2) ウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) の遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレイの設計と根圏微生物と共生しているウキクサの遺伝子発現解析

eArray でデザインしたウキクサの遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレイは、8×60K フ

フォーマット上に設計、搭載した。

根圏微生物と共生しているウキクサの遺伝子発現解析のために、無菌ウキクサを *Acinetobacter* sp. P23 株と共生させた実験系と、P23 株を植種しない非共生系（対照系）から経時的にウキクサの根を回収し、RNeasy Plant Mini Kit によって全 RNA の抽出を行った上で、バイオアナライザ 2100（アジレント・テクノロジー）を用いて RNA の分解度を RNA Integrity Number（RIN）によって評価した。しかしながら、今回の実験で抽出した全 RNA の RIN はいずれも 5 未満となり、その後の解析を行うのに十分な品質の RNA を得られなかった。これは、サンプリングから全 RNA の抽出の一連の操作過程で RNA の分解が進行したためであると考えられた。生物体内では、通常、速やかな RNA の分解が行われており、これを防ぐための方策が必要であることが示され、サンプリング直後に液体窒素によるサンプルの瞬間的凍結や、サンプリング時点において RNA 分解阻害剤を添加する等の工夫が望まれる。ただし、これ以外の過程の実験操作手順は本研究において確立することができたことから、引き続きの進展を目指して研究を継続していく。

<引用文献>

遠山忠, 吉仲賢晴, 清和成, 池道彦, 藤田正憲 (2005) ボタンウキクサと根圏微生物の相互作用を利用した芳香族化合物の分解促進環境工学研究論文集, **42**, 475-486.

Tadashi Toyama, Ning Yu, Hirohide Kumada, Kazunari Sei, Michihiko Ike, Masanori Fujita (2006) Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101(4)**, 346-353.

Hai Hoang, Ning Yu, Tadashi Toyama, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Michihiko Ike (2010) Accelerated degradation of a variety of aromatic compounds by *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations and contribution of root exudates released from *S. polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences*, **22(4)**, 494-499.

Tadashi Toyama, Kazunari Sei, Ning Yu, Hirohide Kumada, Daisuke Inoue, Hai Hoang, Satoshi Soda, Young-Cheol Chang, Shintaro Kikuchi, Masanori Fujita, Michihiko Ike (2009) Enrichment of bacteria possessing catechol dioxygenase genes in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*: a mechanism of

accelerated biodegradation of phenol. *Water Research*, **43(15)**, 3765-3776.

Hai Hoang, Daisuke Inoue, Naonori Momotani, Ning Yu, Tadashi Toyama, Kazunari Sei, Michihiko Ike (2009) Characterization of novel 4-*n*-butylphenol degrading *Pseudomonas veronii* strains isolated from rhizosphere of giant duckweed, *Spirodela polyrrhiza*. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, **45(2)**, 83-92.

池道彦, 井上大介, 遠山忠, 松永祐紀, 桃谷尚憲, Hoang Hai, 清和成, 惣田訓 (2009) ウキクサ根圏におけるノニルフェノールの微生物分解 分解菌の分離とその特徴. *環境技術*, **38(9)**, 633-641.

Tadashi Toyama, Naonori Momotani, Yuka Ogata, Yuji Miyamori, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Kazuhiro Mori, Shintaro Kikuchi, Michihiko Ike (2010) Isolation and characterization of 4-*tert*-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, **76(20)**, 6733-6740.

Tadashi Toyama, Tetsuya Furukawa, Noritaka Maeda, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Shintaro Kikuchi, Michihiko Ike (2011) Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in *Phragmites australis* rhizosphere by rhizosphere bacteria-root exudates interactions. *Water Research*, **45(4)**, 1629-1638.

Tadashi Toyama, Manabu Murashita, Kazutaka Kobayashi, Shintaro Kikuchi, Kazunari Sei, Yasuhiro Tanaka, Michihiko Ike, Kazuhiro Mori (2011) Acceleration of nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol degradation in sediment by *Phragmites australis* and associated rhizosphere bacteria. *Environmental Science and Technology*, **45(15)**, 6524-6530.

Kazunari Sei, Megumi Fukasawa, Kanako Kubo, Shiori Akaike, Rina Saitoh, Daisuke Inoue, Masaaki Morikawa (2014) Gene expression analysis of *Sphingobium fuliginis* OMI, isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*, for the elucidation of symbiotic mechanism. *Proceedings of 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014)*, Vol. II, 509-513.

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1件)

Masashi Kuroda, Yuka Ogata, Tatsuya Yahara, Takashi Yokoyama, Hidehiro Ishizawa, Kazuki Takada, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Michihiko Ike (2017) Draft genome sequence of *Spingobium fuliginis* OMI, a bacterium that degrades alkylphenols and bisphenols. *Genome Announcements* **5**, e01323-17. (DOI: 10.1128/genomeA.01323-17) (査読有)

[学会発表](計2件)

清和成, 澤田和子, 井上大介, 玉木秀幸, 遠山忠, 田中靖浩, 森一博, 黒田真史, 池道彦, 森川正章 (2016) 水生植物根圏に形成される微生物群集の特殊性. 第19回日本水環境学会シンポジウム. 秋田県立大学 (秋田県秋田市) (2016年9月14日) (招待講演).

Kazuko Sawada, Ryo Yamato, Daisuke Inoue, Masaaki Morikawa, Kazunari Sei (2016) Analysis of microbial community enriched in the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza* and *Lemna minor* cultivated in river water. Water and Environment Technology Conference 2016 (WET2016). Chuo University (東京都文京区) (2016年8月28日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清和成 (SEI, Kazunari)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号: 80324177

(2) 研究分担者

井上大介 (INOUE, Daisuke)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号: 70448091
(平成28年度まで)

古川隼士 (FURUKAWA, Takashi)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 90632729
(平成29年度から)

(3) 研究協力者

澤田和子 (SAWADA, Kazuko)