

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12298

研究課題名(和文) 強酸性土壌に適応する植物生育促進菌の高濃度アルミニウム耐性戦略を探る

研究課題名(英文) Characterization of tolerance to high aluminum concentrations in plant growth-promoting bacteria adapted to actual acid sulfate soils.

研究代表者

相澤 朋子 (AIZAWA, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：60398849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸性硫酸塩土壌とは、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って土壌および周辺水域がpH1～4という強酸性を呈する土壌である。これまでに申請者は、東南アジアの酸性硫酸塩土壌の湿地に適応する植物を探索し、その根圏からイネの生育促進能をもつ有用微生物群を得てきた。その中で、酸性条件下で植物生育促進能があり、かつ細菌の中で最も高濃度のアルミニウム耐性を示すAL46株、および根圏にバイオフィームを形成するCA42株を得た。本研究は、AL46株やCA42株をモデルとして、新たなアルミニウム耐性・酸性土壌適応機構の一端を明らかにすることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸性硫酸塩土壌とは、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って土壌および周辺水域がpH1～4という強酸性を呈する土壌である。東南アジアの酸性硫酸塩土壌の湿地に適応する植物を探索し、その根圏からイネの生育促進能をもつ有用微生物群を得てきた。その中で、酸性条件下で植物生育促進能があり、かつ細菌の中で最も高濃度のアルミニウム耐性を示すAL46株やイネの根圏でバイオフィームを形成するCA42株を得た。本研究は、AL46株のプロテオーム解析およびCA42株のバイオフィームの構造解析により、新たなアルミニウム耐性・酸性土壌適応機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：A novel aluminum-tolerant bacterial strain CA42 was isolated from the aquatic plant *Eleocharis dulcis*, which grows in a highly acidic swamp in Vietnam. Inoculation with CA42 allowed *Oryza sativa* to grow in the presence of 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  at pH 3.5, and biofilms were observed around the roots. Using 16S rRNA gene sequencing analysis, the strain was identified as *Pullulanibacillus* sp. CA42. This strain secreted large amounts of an extracellular polysaccharide (CA42 EPS). Furthermore, the aluminum tolerance of CA42 cells was attenuated by pullulanase treatment directly on the live CA42 cells. These results suggest that CA42 EPS adsorbs aluminum ions and is involved in the aluminum tolerance mechanism of *Pullulanibacillus* sp. CA42. Thus, this strain may be a potential plant growth-promoting bacterium in acidic soils. In addition, this study is the first to report a glycogen-like polysaccharide that adsorbs aluminum ions.

研究分野：微生物生態学

キーワード：酸性土壌 アルミニウム 植物根圏微生物 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

酸性硫酸塩土壌とは、酸性土壌の中でも、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 という強酸性を呈する土壌である。この土壌では、強酸性に伴い土壌中から可溶化してくるアルミニウムや重金属が原因の金属過剰障害、可溶化したアルミニウムとリン酸が結合し、不溶性リン酸塩を形成することによるリン酸不足などが複合して植物の生育阻害を引き起こす。人口増加に伴い農作物の収量増加が求められている東南アジアでは、特に農業上深刻な問題となっている。しかし、酸性硫酸塩土壌全体の中和は困難であり、農作物の根の周囲の微細環境(根圏)に共生可能な植物根圏微生物を活用した (1) 強酸性環境の中性化、(2) 過剰金属の不活化、(3) 不溶性リン酸の可溶化、(4) 窒素化合物の供給が期待されているが、未だ実用化はなされていない。

申請者は、本研究に先立ち、現地研究者と共にベトナム・タイなど東南アジアの酸性硫酸塩土壌の湿地に適応する植物を探索し、その根圏からイネの生育促進能をもつ有用微生物群を得てきた。選抜した菌株のなかで、AL46 株は上記(1) ~ (4) の条件を満たす菌株で、既報と比較して最も高い高濃度アルミニウム・重金属耐性(表1)を示す新種であり、かつ図1に示すような複数のアルミニウム耐性機構を持っている可能性がある。

表1 AL46株の金属耐性 (pH 3.5)

金属塩	耐性濃度 (mM)
AlCl <sub>3</sub>	200
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	500
MnSO <sub>4</sub>	100
NiSO <sub>4</sub>	20
ZnSO <sub>4</sub>	20
FeCl <sub>3</sub>	0.3
CuSO <sub>4</sub>	0.1
CdSO <sub>4</sub>	1

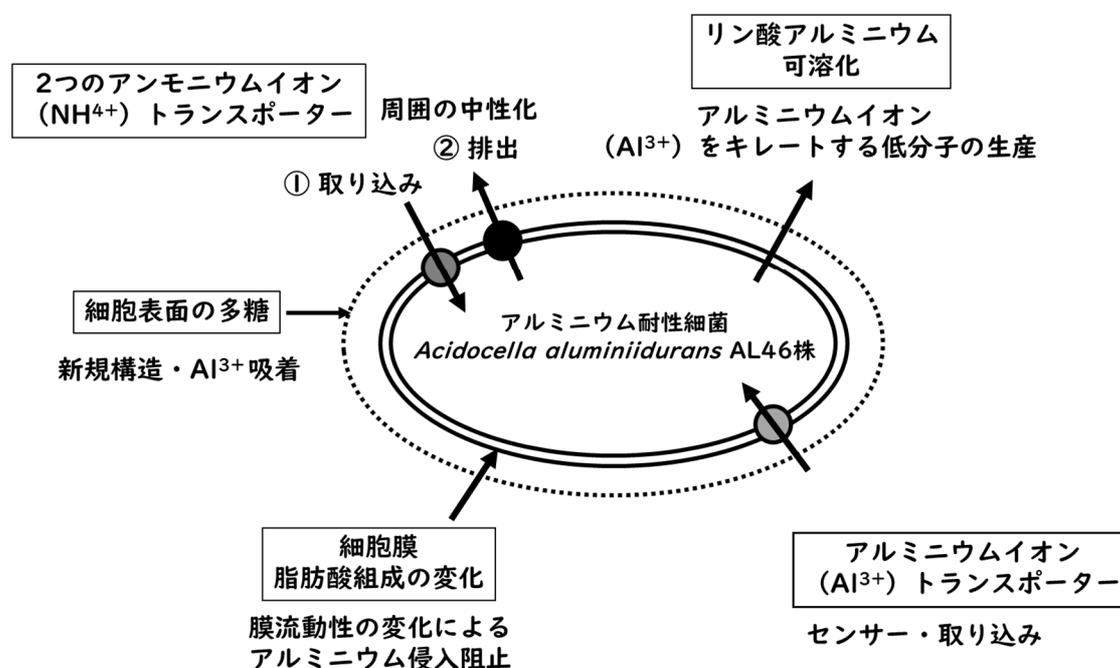


図1. アルミニウム耐性細菌に複数存在するアルミニウム耐性機構のイメージ

2. 研究の目的

AL46 株のアルミニウム耐性は、現地の酸性硫酸塩土壌で検出したアルミニウムイオン濃度(3-7 mM) の 28 倍以上(200 mM) という強い耐性を示し、作物品種の多くが μM レベルで生育阻害を受けることから考えても、その能力は突出している。AL46 株は、既報の細菌の中で最も高いアルミニウム耐性を示しているだけでなく、複数の酸性土壌適応に有効な形質を併せ持つ菌株である。また、類縁菌での金属耐性に関わる情報も少なく、AL46 株をモデルにすることで、新たなメカニズムが発見できる可能性があることを期待していた。

本研究では、イネの生育促進能を持つ高濃度アルミニウム耐性菌として選抜した AL46 株を用い、そのアルミニウム耐性・適応機構の解明を目的として、アルミニウム存在下での耐性に関わるタンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)を実施した。

また、単離菌株の 1 種でカヤツリグサ科植物 *Eleocharis dulcis* から単離された

*Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株(図2)は Al 耐性、pH 上昇能、インドール酢酸生産能を持つ。CA42 株をイネの根に接種し、pH 3.5 で  $AlCl_3$  を添加した条件におけるイネの栽培実験を行ったところ、CA42 株を接種したイネは生育が可能になった。この際に、イネの根にバイオフィーム状の物質が見られ、このバイオフィーム状物質が  $Al^{3+}$  からイネの根を保護している可能性が考えられた(図3)。よって、本研究では、バイオフィームの主成分と考えられる多糖について  $Al^{3+}$  の吸着能および多糖の構造について検討を行った。

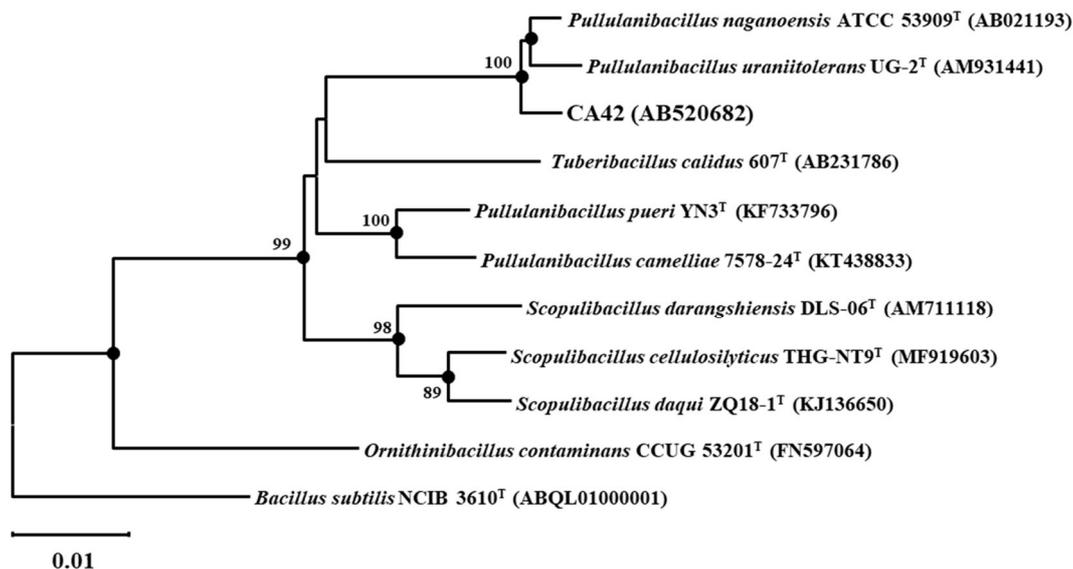


図2. CA42株の分子系統樹 (NJ法)

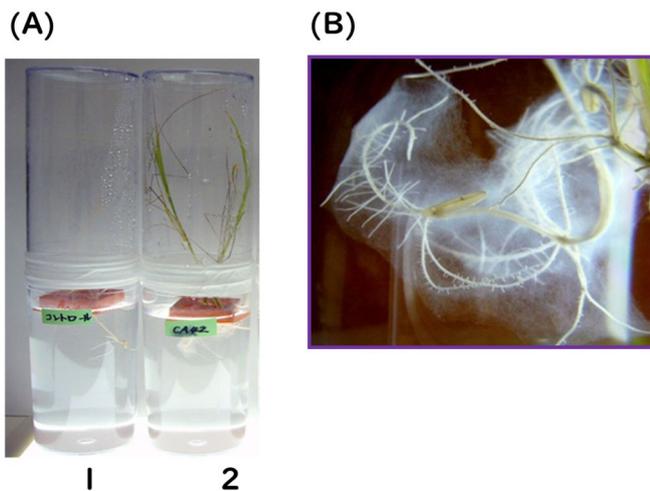


図3. (A) アルミニウム耐性細菌(CA42株) の接種によるイネの生育促進、(B) CA42株を摂取したイネの根面に見られるバイオフィーム

### 3. 研究の方法

アルミニウムの存在下、非存在下で AL46 株を培養して細胞を回収後、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。これによりアルミニウム等の金属耐性に関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た。

CA42 株のバイオフィームについては、培養後の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。

#### 4. 研究成果

AL46 株を塩化アルミニウム濃度が 0 mM, 20 mM の培地を用いて培養してショットガンプロテオーム解析を実施した。その結果、0 mM に対して 20 mM の試料中で 4 倍以上増加したタンパク質は 32 個あり、16 倍以上増加したタンパク質は 8 個あった。その中には物質の輸送に関するタンパク質が多くみられ、中でもリン酸の輸送に関するタンパク質が複数見つかった。アルミニウム存在下では土壌中のリン酸が不溶化して根からの取り込みが困難となるため、リン酸輸送に関わるタンパク質が検出されたのは興味深い。また、高濃度 (90 mM) のアルミニウム存在下でも「4 倍以上増加」で 3 個、「16 倍以上増加」で 4 個が 20 mM の条件で検出されたタンパク質と共通して検出され、これらのタンパク質は特にアルミニウム耐性機構において重要な役割を果たすことが期待できた。

CA42 株のバイオフィルムを構成する多糖の組成について HPLC で調べたところ、糖の組成成分についてはグルコースのみが検出された。次にメチル化分析・NMR を用いて構造解析をしたところ、主鎖に 1-4 結合を持ち、グルコース残基が約 10 個ごとに 1-6 結合の側鎖を持つ構造と分かり、CA42 株の Al<sup>3+</sup> の吸着能を持つ多糖はグリコーゲンである事が判明した (図 4・5)。

本研究で、酸性土壌地帯に適応する植物根圏から植物生育促進能をもつ 2 株の根圏細菌、すなわちアルミニウム耐性菌である AL46 株とバイオフィルム生産菌である CA42 株を用いて、その酸性土壌耐性機構の解明につながる基礎的知見を得ることができた。今後はこれらの知見が具体的にどの程度耐性に寄与しているかなどの検討を進める予定である。

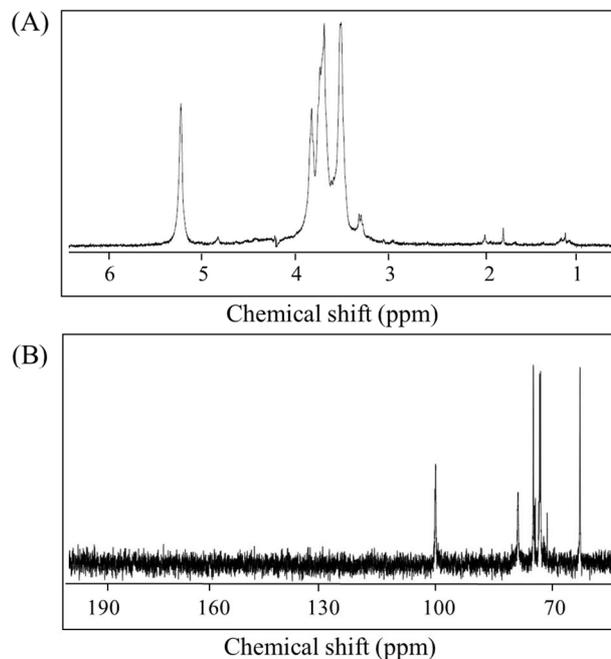


図4. CA42株の細胞外多糖のNMR分析 (A) プロトンNMR、(B) カーボンNMR

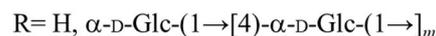
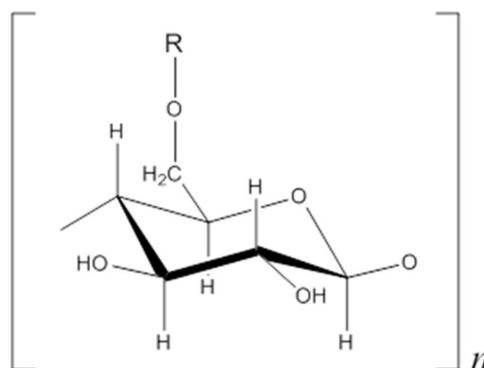


図5. CA42株の細胞外多糖の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aizawa Tomoko, Sato Junki, Saito Shimon, Yasuda Takanari, Maruyama Yutaro, Urai Makoto	4. 巻 14
2. 論文標題 An extracellular polysaccharide is involved in the aluminum tolerance of <i>Pullulanibacillus</i> sp. CA42, a newly isolated strain from the Chinese water chestnut growing in an actual acid sulfate soil area in Vietnam	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1241244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保田 貴成, 相澤 朋子, 浦井 誠
2. 発表標題 酸耐性アルミニウム耐性菌 <i>Acidoceella aluminidurans</i> AI46株の アルミニウム耐性機構の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 保田 貴成, 佐久間 郁樺, 相澤 朋子, 浦井 誠.
2. 発表標題 酸耐性アルミニウム耐性菌 <i>Acidoceella aluminidurans</i> AL46株のシクロプロパン脂肪酸を介したアルミニウム耐性機構の解析.
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐久間 郁樺, 保田 貴成, 相澤 朋子, 浦井 誠
2. 発表標題 <i>Acidoceella</i> 属細菌の高濃度アルミニウム耐性機構の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	浦井 誠  (Urai Makoto)  (20398853)	東京農業大学・生命科学部・教授    (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------