

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658080

研究課題名(和文) 新手法による *Azospirillum* 属細菌の網羅的分離と分類研究課題名(英文) Global isolation and classification of *Azospirillum* species by a new method

研究代表者

谷 明生 (Tani, Akio)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：00335621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)： *Azospirillum*属細菌は植物根圏に共生し、窒素固定を行い、植物の生育を促進可能な細菌の一群である。本属細菌の分離には工夫が必要で、また分類系統も良く確立しておらず、共生する植物との関連性も分かっていない。本研究では広く植物から本属細菌を分離することと、質量分析法を用いた新しい手法で効率よく網羅的に分類すること、同時に新種菌を見だし分類系統に新たな知見を加えることを目的としている。本属細菌の分離には窒素源を含まない培地を用いた好気条件が重要であることを見だし、約60株の本属細菌を分離した。質量分析により正確な分類を行った。またイネに対して約20%の生育促進効果を持つ菌を分離した。

研究成果の概要(英文)： *Azospirillum* species is azotrophic bacteria symbiotic to plant roots, and capable of promoting plant growth. Isolation of this species is difficult, and their classification and relationship between their host plants is not well elucidated. This study aims to isolate the species as many as possible, to classify them using mass-spectrometry dependent method, and to give a new insight into the classification of the species by finding new species. We found that nitrogen-free medium under micro-aerobic condition is important for their isolation, and we isolated 60 isolates. They were subjected to mass spectrometry for precise classification. We also found some species capable of promoting rice growth by 20%.

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：国際情報交換 *Azospirillum*属細菌 窒素固定 根圏

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

植物の成長を促すために多くの化成肥料が農地に投入されているが、硝酸体窒素の形成により地下水の汚染や、一酸化窒素の形成による大気汚染が懸念されている。そこで古くから窒素固定菌を利用した成長促進が試みられている。その働きが植物の生育促進をもたらすことについては多くの報告がある。これらの菌は窒素固定をするだけでなく、オーキシン類やアミノ酸を分泌することにより、植物の成長を促進すると考えられている。

窒素固定菌を応用した成長促進剤を作ることにより、上記の問題を解決できる可能性があるが、窒素固定菌の種と、それらが相互作用する植物種の間には何らかの特異性があるかどうか、その成長促進作用にも植物種特異性があるかどうかは、いわゆる根粒菌以外については不明であり、そもそもこれまでに、重要な窒素固定菌について分離・分類が十分なされていない。

一方、近年の質量分析器の発達により、MALDI 型の質量分析器を用いて、迅速に微生物の分類を行う手法が確立されている。本法では、微生物の細胞をそのままサンプルとして用い、総タンパク質を抽出して、その混合物の質量を測定し、スペクトルのパターンを比較するという方法である。本法は革新的に迅速であり、数百サンプルを1日で処理できる。

本法を利用すれば、植物の根圏から多くの窒素固定菌をまず分離し、ハイスループットな質量分析器の能力を最大限に利用して、属・種・さらには株レベルまで分類が可能である。その結果を基に同じ種の菌を除いたライブラリを構成し、その後、16SrRNA 遺伝子の解析などを通じて同定を行えば非常に効率的に、かつ網羅的に分類同定が可能であ

る。

## 2. 研究の目的

本研究では植物の根圏に生育し、窒素固定などを通じて植物の成長を促進すると報告されている非常に重要かつ有用な *Azospirillum* 属細菌に注目して、選択的な分離と分類同定を行うことを主眼とし、分離源となる植物種との相関関係と、重要な作物に対しての接種効果を確認することを目的とした。またこれまで既報の種に関しても質量分析と 16S rRNA 遺伝子の解析などを通じて分類体系を確立することも目的とした。さらには、本属細菌が属するプロテオバクテリアで新奇なメタノール代謝経路が発見されているため、本属細菌にもそれが存在するかどうかを検討することにした。

## 3. 研究の方法と成果

(1) *Azospirillum* 属細菌の網羅的分離

まずイネを中心とする植物約 50 サンプルの根圏土壌から、窒素源を含まない固体培地で、Congo red 存在下で赤色を呈するコロニーを約 90 株分離した。コロニーを MALDI-TOF/MS で分析し、タンパク質スペクトルを得て、*Azospirillum* 属細菌の基準株と比較した系統樹を作成した。各クラスターから代表株を選び、16S rRNA 遺伝子の一部を解読した。その結果、*Azospirillum* 属細菌と考えられるものは全く得られなかった。

そこで、蠟燭をデシケーター内で燃焼させ酸素を消費した微好気条件で分離を試み、約 90 株の分離菌を得、同様に解析を行った結果、58 株の *Azospirillum* 属細菌と近縁と考えられる分離菌を得た。デシケーターを用いたため、当初の目標 500 株には至らなかったが、効率よく本属細菌を分離することが出来た。

本属細菌に属しない菌としては、上記で得られたものを含め、*Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Massilia*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus*, *Serratia* 属細菌が分離された。これらの分離菌に関しては、これ以上の検討は加えていない。

#### (2) 本属細菌の分類

得られた本属細菌の分離株の 16S rRNA 遺伝子を解読し、基準株と 98.6% 以下の相同性を示す新種と思われる分離菌を 7 株得た。現在、最も基準株と遠い系統的位置にある一株について、窒素固定遺伝子の塩基配列決定、BioLOG 試験を行った。脂肪酸分析、キノン分析、保存機関への寄託を進めているが、海外保存機関の対応が遅くこれらはまだ結果が得られていない。DNA-DNA 相同性試験も行っているが、DNA の精製度が悪く(純度の高い DNA を得にくいようである)、再現性のある結果を得られていない状況にある。

また同時にトルコの共同研究者が分離した汽水域由来本属細菌についても新種提唱を行うべく同様の試験を行っている。また、すでに本属細菌として登録された *A. amazonense*, *A. irakense* 等は本属細菌として考えるには系統関係が遠く、別の属に近いいため、新属を立てるべきであると考えている。

#### (3) 本属細菌の植物生育促進効果

得られた本属細菌のうち、同じ株と思われるものを除いた約 35 株と、基準株約 20 株を用いて、温室でイネに対する生長促進効果を確認した。3 回繰り返した結果、全ての菌の平均として約 50% の促進効果が得られている。本属細菌は生育促進効果で知られているが、属を通じてイネに対して効果があると考えられる。またこのスクリーニングで得られた

優良株については圃場レベルでの促進効果の確認を行う必要があり、継続して研究を行う予定である。本属細菌が合成する植物ホルモンの種類と量に関しても、LC-MS を用いた網羅的精密定量法を用いて行う予定である。また、大麦を用いて同様の試験を行ったところ、用いた菌全ての平均で約 6% の促進効果に留まった。おそらく、本属細菌が窒素固定を行う上で阻害的に働く酸素が畑作では多いものと考えられた。

#### (4) 本属細菌のメタノール資化

本属細菌が属するプロテオバクテリアでは、植物と共生する *Methylobacterium* や *Bradyrhizobium* 属細菌が存在する。前者はメタノールを単一炭素源として利用できることは広く知られている。近年、後者に関して、希土類元素依存的にメタノールを利用できることが分かってきた。メタノールの初発酸化酵素はメタノール脱水素酵素(MDH)であり、MDH には MxaF と XoxF と呼ばれるタンパク質が知られていた。MxaF がカルシウム依存であるのに対し、XoxF は希土類元素依存であることが明らかにされた。本属細菌のゲノム(解読されているのは *A. brasiliense* と *A. lipoferum* の二株)にも XoxF 遺伝子が存在する。そこで本属細菌についても種々の培地を用いてメタノールに対する生育を調べたところ、基準株の一つに希土類元素依存でメタノールを利用するものを見いだした。今後ゲノム解析を通じてメタノール代謝経路遺伝子を見いだすことは重要であると考えられる。興味深いことに、上記二株を含めた他の種はメタノールに生育しない。おそらく本属細菌は広くメタノール代謝経路遺伝子を保持しているが培養条件が最適化されていないことによるものと示唆される結果が得られている。これらの結果から、メタノール資化性細菌のパラエティはこれまで知られて

いるより、希土類という新しいファクターによって大きく広がる可能性があると共に、植物と共生細菌がメタノールと希土類元素によって密接な関係を持っていることが示唆される。

#### 4. 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)

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

谷 明生 (TANI AKIO)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：00335621

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

中川智行 (NAKAGAWA TOMOYUKI)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70318179

三井亮司 (MITSUI RYOJI)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60319936

##### (4)研究協力者

Nurettin Sahin

ムグラ大学(トルコ共和国)・教育学部・教授

研究者番号：なし