

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450085

研究課題名(和文)窒素固定細菌共生系における菌叢ダイナミクスモデルの構築と大気中窒素の転換

研究課題名(英文) Construction of a microbial flora dynamics model in nitrogen-fixing bacterial symbiotic system and conversion of atmospheric nitrogen

研究代表者

前田 勇 (Maeda, Isamu)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10252701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：窒素肥料の原料となるアンモニアは窒素と水素から化学合成により合成される。より温和な条件で空気中の窒素からアンモニアを合成可能な生物学的窒素固定反応は窒素固定細菌により行われ、酸素により阻害される。本研究では、酸素消費を伴い増殖する枯草菌との共培養により、枯草菌がまず増殖し、それに伴い窒素固定細菌の一種である光合成細菌が空気封入下においても活発に窒素固定を行い増殖することを示した。本成果から窒素源としての微生物資材の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ammonia, a raw material for nitrogen fertilizer, is synthesized from nitrogen and hydrogen by chemical synthesis. The biological nitrogen fixing reaction, which synthesizes ammonia from nitrogen in the air under milder conditions, is catalyzed by diazotrophic bacteria, and the reaction is inhibited by oxygen. This study demonstrates that by introducing co-culture with *Bacillus subtilis*, which can grow with oxygen consumption, photosynthetic bacteria, which belong to a group of diazotrophic bacteria, actively fixed nitrogen in the presence of air and grew diazotrophically after the growth of *B. subtilis*. From this result, development of microbial fertilizer as a nitrogen source is expected.

研究分野：応用微生物学

キーワード：窒素固定 光合成細菌 枯草菌 共培養 ニトロゲナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

農業生産への生物学的窒素固定反応の寄与の代表例として、マメ科植物における根粒中の根粒細菌による窒素固定反応が挙げられる。生物学的窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼ活性は、酸素分子とアンモニアにより遺伝子の転写と翻訳後の各段階で厳密に負の制御を受けることが知られている<sup>1)</sup>。このため、窒素固定反応を利用して大気中の窒素分子を無機態窒素に持続的に変換しようとする、酸素分子とアンモニアによるニトロゲナーゼ活性に対する抑制を排除しなければならない。宿主の根粒により酸素から防御される根粒菌や、酸素防御機構を備えるヘテロシストといった窒素固定に特化した細胞が栄養細胞と連鎖する *Anabaena* 属細菌では<sup>2)</sup>、大気中窒素分子を基質とした窒素固定が可能である。しかし、宿主植物との関係性に限定される、あるいはヘテロシストの細胞数が限られているため高い反応速度を期待できないといった背景から、より広範囲の窒素固定細菌群において空気中窒素分子の固定反応を安定的かつ持続的にに行わせる手法の開発が望まれる。

そこで、無機態窒素や有機態窒素の供給を断ち、空気の供給を低酸素分圧が維持される程度に制御し、さらには窒素固定により生成したアンモニアが系から取り除かれる、あるいは速やかに消費されるような培養条件を検討することとした。これにより、空気の存在下では窒素固定を行うことができない光合成細菌において、空気封入下の培養時に窒素固定反応を持続させることが可能になるのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では図1に示すような、光合成細菌を主体としたこれまでに報告例のない窒素固定細菌共培養系を構築することで、光エネルギーを駆動力とし、空気中窒素分子を基質とした窒素肥料の生産系の構築を目指す。共培養を構成する化学合成従属栄養細菌の呼吸によってバイオフィルム内の低酸素分圧条件を作り出すことで、光合成細菌の窒素固定能を向上させ、そしてそれを持続させる研究を展開する。化学合成従属栄養細菌としては、微生物資材としての価値も認められる枯草菌を用いる。また、反応で生成したアンモニアは光合成細菌と枯草菌に消費されて、バイオフィルム内で常に枯渇状態が維持されるような条件を設定することで、アンモニアによるニトロゲナーゼ活性の抑制をも回避する。このために、共培養系内の細胞増殖が窒素固定反応に依存するような条件、すなわち無機態窒素ならびに有機態窒素を培地に添加しない条件を設定する。また、ニトロゲナーゼの活性化に結びつくような条件を検討し、共培養系の窒素固定反応を高めることも検討する。

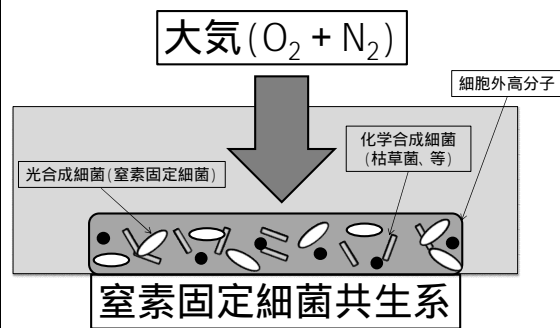


図1 窒素固定細菌共培養系の構成

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験に用いた細菌と培養条件

光合成細菌は *Rhodospseudomonas palustris* CGA009、*Rhodobacter sphaeroides* ATCC17023、*Rhodobacter capsulatus* ATCC11166 の3種を用いた。枯草菌は *Bacillus subtilis* ATCC6633、ISW1214 の2株を用いた。窒素固定に依存した増殖（ジアゾ栄養増殖）能を評価するために、無機態ならびに有機態窒素を含まない培地を用いた。嫌気条件下での窒素固定に依存した増殖を調べるために、96穴マイクロプレートに酸素吸収剤とともにプラスチックバックに封入することで条件設定を行った。培養は、周囲をパラフィルムで封じた96穴マイクロプレートかセプタム付きのスクリーキャップ試験管、ダブルシールストップゴム栓で密封した200ml容量の平板型ガラスボトルのいずれかでを行った。

#### (2) ニトロゲナーゼ遺伝子の発現量の解析

ニトロゲナーゼ遺伝子の発現量の変化は、ジニトロゲナーゼレダクターゼをコードする *nifH* の遺伝子発現量を逆転写酵素-定量ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により定量した。5日間培養を行った共培養液あるいは純粋培養液中の菌体から、RNAの抽出を行い、逆転写反応の鋳型とした。*nifH* の mRNA の定量値を16S rRNAの定量値で除することにより、発現量の補正を行った。

#### (3) ニトロゲナーゼ活性の測定

ニトロゲナーゼ活性の測定は6日間培養を行った共培養液あるいは純粋培養液を用いた。アセチレンガスを気相部の5%となるように封入し、30°Cで2時間培養を行った。その後、生成したエチレンガスをガスクロマトグラフィーで検出、定量することで活性の評価を行った。

#### (4) 培養液の窒素含量とC/Nの測定

窒素固定能の評価として、培地と菌体から成る培養液に含まれる窒素含量とC/Nの測定を行った。7日間培養した共培養液と純粋培養液を凍結乾燥にかけ水分を除去した。その乾燥粉末に対して、窒素含量はケルダール法により、C/NはNCアナライザーによりそれぞれ定量を行った。

#### (5) 共培養液の細胞密度の定量

共培養液中の両細菌の細胞密度の定量は、共培養液における種特異的遺伝子の DNA 量と細胞密度の関係を表す検量線を作成することで行った。種特異的遺伝子として、*Rps. palustris* CGA009 の細胞密度の定量には *nifH* を、*B. subtilis* ATCC6633 細胞密度の定量には  $\gamma$ -ポリグルタミン酸合成酵素をコードする *ywsC* をそれぞれ用いることとした。細胞密度は鏡検下、血球計算盤を用いて細胞数を計数することで行った。DNA 量は、共培養液から DNA を抽出し、その DNA を鋳型とした定量 PCR により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 空気封入下のジアゾ栄養増殖

光合成細菌のジアゾ栄養増殖は、好気条件および嫌気条件下で窒素源を含まない培地を用いて評価した。密封されたプラスチックバッグ中の酸素吸収剤の存在下において、試験に用いた 3 種の光合成細菌は全てで増殖が確認された。その一方、酸素吸収剤がない場合には 3 種全てで増殖が確認されなかった。試験した光合成細菌の中で、*Rps. palustris* は植菌 2 日以内にジアゾ栄養増殖を示し、培養 4 日後にはその増殖がプラトーに到達した。この結果は、空気を封入した培養においては、培養環境下の酸素濃度が減少した場合にのみ、窒素固定のための基質として窒素を利用する増殖が可能であることを意味する。

好気性細菌である枯草菌は、酸素に対する高い感受性および優れた酸素消費能力を有するために、生化学的酸素要求量を測定する細菌センサーの一つとして使用されている<sup>3)</sup>。これらの特徴に加えて、枯草菌のある株は、植物および根の生長促進および植物病原体に対する植物防御に寄与する微生物資材として有益な効果を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。したがって試験では枯草菌 2 株を、窒素源を含まない培地に植菌した。これらの純粋培養では、ジアゾ栄養増殖は確認されなかった。他方、これら枯草菌 2 株をそれぞれ別個に光合成細菌と共に植菌した場合、試験した全ての枯草菌と光合成細菌の組み合わせにおいて培養液の濁度増加が観察された。接種 5 日後の共培養液、およびそれに続く接種 7 日後の最初の継代培養液を、それぞれ窒素源を含まない培地に再度植菌した場合、培養液の濁度増加が繰り返し観察された。最初の共培養においては、培養液の濁度増加が比較的速やかに生じた。これは、植菌に用いた残留培地および菌体によって持ち込まれた前培養に由来する窒素源によって引き起こされている可能性が考えられる。しかしながら、継代培養における培養液濁度の反復的な増加は、空気中の窒素を用いたジアゾ栄養増殖が共培養において生じたことを示唆している。試験した共培養の組み合わせにおいて、*Rps. palustris* CGA009 と *B. subtilis* ATCC6633 の組み合わせは、最初の共培養、およびそれ

に続く継代培養の繰り返しの中で最も安定的なジアゾ栄養増殖が確認されたため、この組み合わせにおいて以降の検討を行うこととした。

*nifH* 遺伝子の発現量は、塩化アンモニウムで増殖させた *Rps. palustris* の純粋培養液と比較し共培養において顕著に増加した。また、共培養を行った後の培養液中の全窒素濃度は 0.474 mM であった。それに対して *Rps. palustris* のみを、窒素源を含まない培地に植菌し培養した場合にはジアゾ栄養増殖が認められなかったため、その培養液中では窒素が検出されなかった。また共培養液を、窒素源を含まない培地に移植した直後の培養液でも同様に窒素は検出されなかった。これらの結果は、枯草菌と共培養することでニトロゲナーゼ遺伝子が窒素源非存在下において脱抑制された結果、*Rps. palustris* が封入空気中の窒素を窒素固定により無機態および有機の窒素に変換したことを示すものである。

#### (2) 共培養液中のニトロゲナーゼ活性の脱抑制と C/N の低下

図 2 に示す、*Rps. palustris* CGA009 および *B. subtilis* ATCC6633 の純粋培養液、ならびにそれらの共培養液について、ニトロゲナーゼ活性および C/N の測定を行った。その結果、ニトロゲナーゼ活性は、共培養においてのみ検出された。さらに、共培養液の凍結乾燥物の C/N は、*Rps. palustris* と枯草菌をそれぞれ単独で植菌した窒素源を含まない培地の凍結乾燥物と比較して減少した。共培養液では、純粋培養液と比較して炭素含量が減少し、窒素含量が顕著に増加した。この炭素含量の減少と窒素含量の増加は、共培養菌体による培地中の有機炭素源の二酸化炭素への部分的変換による炭素の気相部への移行と、空気中窒素の無機態および有機態窒素への変換による気相部窒素の液相部への移行によってそれぞれ引き起こされた可能性が高いと考えられる。これらの結果は、共培養菌体を培養容器中で空気と封入した場合には、共培養物液においてニトロゲナーゼ活性および窒素固定能が持続されることを示す。



図 2 枯草菌(左)、*Rps. palustris* と枯草菌(中央)、*Rps. palustris* (右) 培養後の培養液

### (3) *Rps. palustris* と枯草菌の共培養における菌叢の経時的変化

顕微鏡観察においては、共培養液を移植直後および共培養 6 日後には共培養で形成されたバイオフィルムは主に、マラカイトグリーンで染色された *Rps. palustris* の細胞で構成されていた。しかしながら、共培養 2 日後には、サフラニンで染色された枯草菌栄養細胞の数の増加が観察された。枯草菌の芽胞と考えられる小さく透明な粒子は、共培養 6 日後のバイオフィルムに多く見いだされた。*Bacillus* sp. の芽胞から DNA を抽出することは困難であることが示されている<sup>5)</sup>。したがって、これらの結果は、共培養 6 日後の枯草菌 DNA 量が、窒素源制限による増殖制限下での芽胞形成および芽胞からの DNA 抽出効率の低さによって減少する可能性を示唆するものである。

そこで共培養において、*Rps. palustris* および枯草菌の細胞密度の経時的変化を追跡した。その結果、枯草菌は共培養初期に顕著に増殖し、一方、共培養中期では *Rps. palustris* 細胞のジアゾ栄養増殖が顕著になり枯草菌の細胞密度は低下することが示された。また、枯草菌の増殖による到達細胞密度は *Rps. palustris* のジアゾ栄養増殖による到達細胞密度と比較して低いことが明らかとなった。これは培地中に窒素源が含まれておらず、また *Rps. palustris* からの窒素フローも枯草菌の十分な増殖を支えるには不足しているためと考えられる。共培養後期においては、*Rps. palustris* の細胞密度も減少した。これらの結果は、培養容器中に存在する気相の空気から培地への酸素の浸透がある程度制限された条件では、共培養初期における、枯草菌の酸素消費を伴う増殖が *Rps. palustris* のニトロゲナーゼ活性を誘導する上で重要な役割を果たすことを示唆している。

#### < 引用文献 >

- 1) B. Masepohl and P. C. Hallenbeck: *Adv Exp Med Biol*, **675**, 49-70 (2010)
- 2) P. Fay: *Microbiol Rev*, **56**, 340-73 (1992)
- 3) J. Hu, Y. Li, G. Gao and S. Xia: *Sensors (Basel)*, **17**, (2017)
- 4) M. Kilian, U. Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht and R. Hain: *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **1**, 72-93 (2000)
- 5) C. R. Kuske, K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill and P. J. Jackson: *Appl Environ Microbiol*, **64**, 2463-72 (1998)

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

前田 勇, 微生物共培養による窒素固定能の発現: 微生物共生体における窒素からアンモニアへの変換, *化学と生物*, **55**, 113-118 (2017)

②Naito, T., Sachuronggui, Ueki, M., and Maeda, L. Light-enhanced bioaccumulation of molybdenum by nitrogen-deprived recombinant anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **80**, 407-413 (2016)

##### [ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

前田 勇, 嵐田 遥, 渡辺 昌規, 空気封入下の光合成細菌 枯草菌共培養におけるニトロゲナーゼ活性発現, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017 年 9 月, 東京

前田 勇, 久下沼 匠, 光合成細菌と枯草菌の共培養による酸素ガス共存下の窒素固定, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016 年 9 月, 富山

前田 勇, 久下沼 匠, 大気中窒素ガスを N 源とした枯草菌 紅色非硫黄細菌共生系の増殖評価, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月, 札幌

前田 勇, 久下沼 匠, 大気中窒素分子を N 源とした紅色非硫黄細菌の増殖能の評価, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月, 札幌

##### [ その他 ]

ホームページ等

光合成細菌と枯草菌の共培養による窒素固定

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/jmicrobio/microb-engl.html>

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

前田 勇 ( MAEDA Isamu )  
宇都宮大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 1 0 2 5 2 7 0 1

##### (2) 連携協力者

渡辺 昌規 ( WATANABE Masanori )  
山形大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 2 0 3 2 0 0 2 0

##### (3) 研究協力者

久下沼 匠 ( KUGENUMA Takumi )

嵐田 遥 ( ARASHIDA Haruka )