

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18662

研究課題名(和文) 遺伝子情報から探る未知の窒素固定微生物の生態と生物肥料としてのポテンシャル

研究課題名(英文) Molecular characterization of novel nitrogen-fixing bacteria and evaluation of its potential as biofertilizer

研究代表者

菅野 学 (Kanno, Manabu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10462847

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)：Streptomyces属放線菌の植物-微生物間相互作用や生物肥料としてのポテンシャルに関する基礎的知見を得ることを目的に、(i) 酸素非感受性の窒素固定能の検証と、(ii) 大気水素の利用能と植物成長促進の関係性の検証を実施した。その結果、Streptomyces属放線菌は空中窒素の利用能は有しておらず、極度に限られた窒素存在下でも増殖する別の機構を持つ可能性が考えられた。また、栄養制限下や胞子の状態での長期生存に大気水素酸化が関与しており、植物とStreptomyces属放線菌の共生関係の維持に寄与する可能性を初めて示した。

研究成果の概要(英文)：In order to explore the potential of actinobacteria (Streptomyces) as biofertilizer, we verified (i) the existence of an oxygen-tolerant nitrogenase, and (ii) plant-microbe interactions associated with their hydrogen uptake activity. As a result, two Streptomyces isolates tested were capable of continuous culture on mineral media lacking added NH₄Cl, but failed to incorporate significant 15N₂ into biomass. This suggests the strains may have an unprecedented mechanism other than already-known nitrogenase system. Furthermore, this study proposed that atmospheric H₂ may serve as the maintenance energy during starvation and sporulation of high-affinity H₂-oxidizing Streptomyces. Our observation implied that H₂ uptake of plant-associated Streptomyces may be involved in generating energy required for their long-term survival in plant, and indirectly affect level of plant growth promotion.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物 放線菌 生物共生 植物共生細菌 肥料 水素 ニトロゲナーゼ ヒドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

窒素固定微生物は、大気中の窒素分子から合成したアンモニアを宿主植物に供給することで、窒素養分の乏しい場所でも植物の旺盛な生育を可能とする。高等植物と共生する窒素固定微生物として、根粒菌、フランキア、窒素固定エンドファイトが知られるが、これらを生物肥料として活用するうえで、植物宿主範囲が限定的であることや既存の窒素固定酵素は有酸素下で失活してしまう問題がある。

1990年代にドイツの研究チームにより、炭素から分離した放線菌 *Streptomyces thermoautotrophicus* が酸素に非感受性の全く新しい窒素固定酵素を持つことが報告された[1]。この新種の放線菌は、大気中の一酸化炭素と水素のみで生育が可能な無機酸化独立栄養生物で、酸素を介した新しい窒素固定機構を持つことが示された[2] (図1)。有酸素下で機能する新しい窒素固定触媒として期待されたものの、遺伝子情報が公開されることなくその後菌株は喪失してしまっており、これ以降に *Streptomyces* 属放線菌から窒素固定能の報告はない。

我々は、非マメ科植物であるイネの体内に共生して植物の生育を促進する *Streptomyces* 属放線菌 AT52 株および OS2C 株の獲得に成功し、この株が有酸素下で窒素固定能を示す可能性を見出した。これらは、分子系統学的には一酸化炭素酸化微生物の *S. thermocarboxydovorans* や *S. thermocarboxyidus* に近縁であり、大気濃度レベルの希薄な水素を酸化しうる特異な高親和性水素酸化酵素を有する植物内生菌として分離されたものである[3]。AT52 株および OS2C 株の窒素固定遺伝子は、従来の縮重プライマー (*nif*) では検出されないことから、既知のものとは全く異なる遺伝子情報を持つ可能性が示唆された。

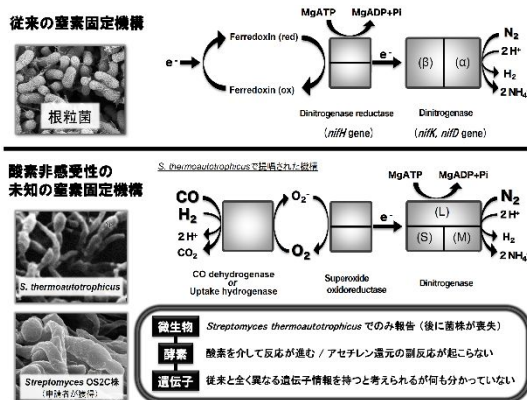


図1 *Streptomyces* 属放線菌で見出された新規な窒素固定メカニズム

2. 研究の目的

本研究は、これら *Streptomyces* 属放線菌分離株の酸素非感受性の窒素固定能の検証や未知の窒素固定酵素遺伝子の特定を通じて、*Streptomyces* 属放線菌の植物-微生物間

相互作用や生物肥料としてのポテンシャルに関する基盤的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 窒素固定能の検証

S. thermocarboxydovorans AT52 株や *S. thermocarboxyidus* OS2C 株を窒素源を含まない培養液を用いて、長期培養と繰り返し継代を行い、微生物増殖の有無を観察した。さらに、安定同位体比質量分析により培養菌体中の重窒素 (^{15}N) の同位体比を解析した。

(2) ゲノム情報を基盤とした遺伝子組換え株の作製と特性解析

次世代シーケンサー HiSeq を用いて、両菌株のドラフトゲノムのシーケンス情報を獲得し、MiGAP を用いたアノテーションを行った。シーケンス情報を参考に、OS2C 株の高親和性ヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター下流に GFP 遺伝子を部位特異的に挿入した発現レポーター株を作製し、人工培地中での菌体の GFP 蛍光を顕微鏡観察することにより当該遺伝子の発現挙動を調べた。また、*Streptomyces* 属放線菌のゲノム編集用 CRISPR-Cas9 ベクター[4]を用いて、OS2C 株の高親和性ヒドロゲナーゼ遺伝子の小サブユニットと大サブユニットを欠失した遺伝子破壊株を作製した。微量水素の高感度検出器 RGD を用いて密閉環境における大気水素の減少を分析することで、遺伝子破壊株の水素酸化活性を調べた。さらに、植物の生育促進に関連する既知の生理学的特性を、野生株と破壊株で網羅的に比較した。

(3) 植物接種試験

無菌土耕栽培したイネに OS2C 株の野生株および水素酸化遺伝子破壊株をそれぞれ接種して、接種約 1 ヶ月後の植物体を固定・脱水・テクノビット置換した後に、マイクロトームで樹脂包埋切片を作成した。これを放線菌特異的な蛍光プローブを用いた FISH 法 (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) に供試することで、植物体内および植物表面における分離株の局在を調べた。また、接種約 1 ヶ月後のマイクロコズム総体の水素消費活性、および植物と土壌の各々のフラクションの水素消費活性を測定した。植物地上部および根の体内、表面、根圏土壌の各フラクションの微生物数をコロニーカウント法により経時的に調べた。さらに、接種約 1 ヶ月後の植物体の地上部および根の長さや乾燥重量を測定した。別試験として、作製したレポーター株をイネに接種して、植物体内・植物表面・土壌のいずれの場所で、水素酸化遺伝子を発現するかを調べた。無菌植物や滅菌土壌の大気水素の消費能も並行して調べた。

4. 研究成果

(1) 窒素固定能の検証

両菌株とも、窒素源を含まない培養液中で何世代も安定的に増殖することを確認した(図2)。例えば、AT52株は、窒素無添加条件で計7ヵ月間、17回の繰り返し継代後も良好な生育を示した。両菌株について、菌体中の重窒素の同位体比を分析したところ、有意な窒素の取り込みは見られなかった。したがって、当該菌株は空中窒素の利用能は有しておらず、極度に限られた窒素存在下でも増殖する別の機構を持つ可能性が考えられた。我々の検証と同年に、イギリスの研究グループが先の *S. thermoautotrophicus* 株に対して安定同位体比質量分析を行って当該菌株の窒素固定能に関して同様に結論づけており、我々の分離株の結果はこれを支持するものである[5]。

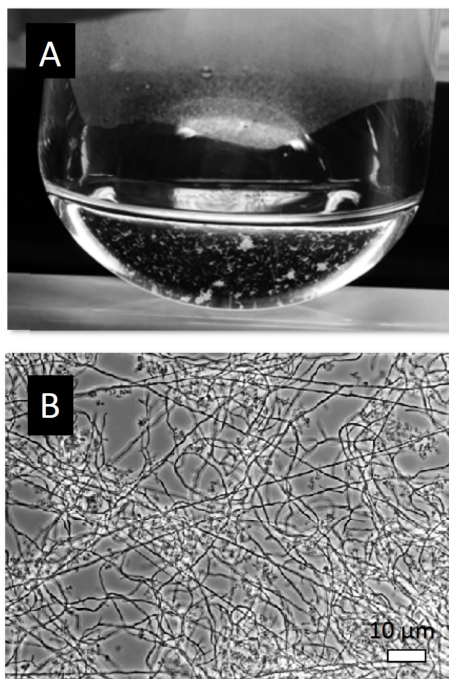


図2 高親和性水素酸化細菌 *Streptomyces thermocarboxydovorus* AT52 株の窒素無添加条件での継代14回目のフラスコにおける生育
A) 無窒素培養液における植菌14日後の菌体
B) A)の菌体の光学顕微鏡写真

(2) ゲノム情報を基盤とした遺伝子組換え株の作製と特性解析

得られたドラフトゲノム情報から窒素固定関連遺伝子の探索を行ったが検出されなかった。安定同位体の解析結果より、対象菌株が空中窒素を利用しない可能性が示唆されたため、当初の研究計画を見直し、窒素固定ではなく空中水素の利用能と植物生育促進の関係性に着目した研究にシフトした。

ドラフトゲノム情報から、OS2C株は高親和性ヒドロゲナーゼ遺伝子をゲノム中に1コピー持つことを明らかとした。作製した発現レポーター株は、薬剤耐性マーカー非存在下で十数回の継代を行ってもGFP遺伝子は脱離せずゲノム中に安定的に存在した。レポーターアッセイの結果、人工培地中で、孢子でのみ

GFP 蛍光が観察され、菌糸体では蛍光が検出されず、放線菌の形態分化と水素酸化活性の関連が示唆された。遺伝子破壊株は、水素酸化能の完全な喪失がガス分析によって確認された。

OS2C株はリン酸可溶化能やシデロフォア及びインドール酢酸様基質の生産能といった植物の生育促進に関連する生理学的特性のいずれの活性も有しておらず、他の要因が当該菌株の生育促進効果に関係する可能性が考えられた。野生株と水素酸化遺伝子破壊株で種々の生理学的特性に顕著な違いは見られなかった。

(3) 水素酸化能と植物共生の関係性の解明

イネの発芽種子に OS2C 株を接種して無菌土耕栽培を行ったところ、約1ヵ月後に植物体内の局在が観察された。さらに、地上部および根の長さや乾燥重量が未接種個体と比較して増大することを確認した(図3)。

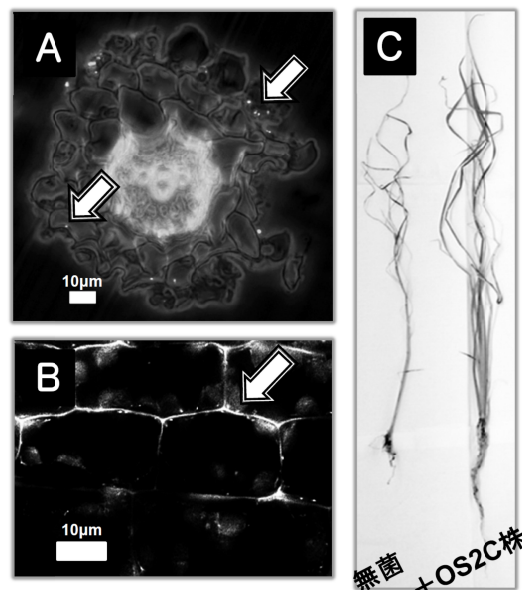


図3 高親和性水素酸化細菌 *Streptomyces thermocarboxydus* OS2C株の A) イネ根部体内のFISH解析による蛍光検出、B) イネ茎部体内の局在の検出、C) 植物生育促進効果

発現レポーター株を接種したところ、植物に局在する主に孢子でGFP蛍光が観察された。微生物が共生した植物では、フィールドの観測報告値と同等の水素酸化活性が確認された一方、無菌植物では水素の減少が全く見られなかったことより、植物に共生する *Streptomyces* 属放線菌の孢子によって大気水素が消費されたと考えられた。

水素酸化能を欠失した遺伝子破壊株を接種したところ、野生株と比較して生育促進効果の低減が見られた。植物体での生細胞数を経時的に調べた結果、接種10日後の時点ではイネ根内の生細胞数に違いが見られないことから、放線菌が植物に侵入定着する初期段階において水素酸化能の欠失は影響しな

いと推察された。一方で、接種4週間後に破壊株はイネ体内から完全に消失したため、植物との共生関係の維持に大気水素の取り込みが寄与すると考えられ、定着率の減少によって植物生育促進効果が低減したと推察された。

放線菌は土壤中に普遍的に見られる微生物であるが、多様な植物種の表面や体内に生息し、植物の生育や耐病性に影響を及ぼすことが知られる。本研究により、*Streptomyces* 属放線菌は窒素固定とは別の機構により窒素欠乏環境で生育している可能性が考えられた。また本研究は、*Streptomyces* 属放線菌の大気水素酸化が栄養制限下や胞子の状態での長期生存に関与しており、植物との共生関係の維持に関与する可能性を初めて示した。これらは、放線菌の植物圏における頑健性や植物-微生物間相互作用、農耕地での窒素や水素の循環に新たな視座を与えるものである。放線菌と植物の共生関係の全容のさらなる理解は、当該微生物群のポテンシャルを活用した農業を展開していくうえで重要である。

<引用文献>

- [1] D. Gadkari et al., J. Bacteriol. 174, 680 (1992).
- [2] M. Ribbe et al., J Biol. Chem. 272, 26627 (1997).
- [3] M. Kanno et al., Environ. Microbiol. 65, 805 (2015).
- [4] H. Huang et al., Acta Biochim. Biophys. Sin. 47, 231 (2015).
- [5] D. MacKellar et al., Scientific reports. 6, 20086 (2016).

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5件)

菅野 学, Philippe Constant, 玉木 秀幸, 鎌形 洋一, Detection and isolation of plant-associated bacteria scavenging atmospheric molecular hydrogen, Environmental microbiology, 査読有, Vol.18, No.8, 2016, pp. 2495 - 2506, DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13162>

菅野 学, 大気中のうすい水素を利用する微生物がいた!, 生物工学会誌, 査読無, Vol.94, No.8, 2016, pp. 496, https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9408/9408_biomed_1.pdf

菅野 学, 大気中の水素が植物と微生物の共生関係に関与する可能性, 日本微生物生態学会誌, 査読無, Vol.32, No.1, 2017, pp. 7 - 9, DOI: https://doi.org/10.20709/jsmeja.32.1_7

菅野 学, 地球規模の大気水素循環に重要な役割を果たす鍵微生物群の発見と生理生態学的特性, 化学と生物, 査読有, Vol.55, No.9, 2017, pp. 587 - 589, <https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=847>

菅野 学, 高親和性ヒドロゲナーゼ: 大気水素を利用する放線菌, バイオサイエンスとインダストリー, 査読有, Vol.75, No.5, 2017, pp. 420 - 421, <http://182.93.117.100/pc/bi/index.html>

[学会発表](計11件)

菅野 学, 植物共生放線菌の研究 ~ 農耕地の水素循環からの視座 ~, 農業微生物研究セミナー, 2016

菅野 学, Philippe Constant, 玉木 秀幸, 鎌形 洋一, 植物圏における大気水素の消費に寄与する微生物群の発見と生態学的特性の解明, 日本地球惑星科学連合2016年度大会, 2016

菅野 学, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, 植物と高親和性水素酸化放線菌の共生関係 ~ 大気中の水素は植物共生に寄与するのか ~, 日本土壌微生物学会2016年度大会, 2016

菅野 学, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, Potential significance of atmospheric H₂ scavenging on plant-microbe interactions: ecophysiological aspects of plant-associated high-affinity H₂-oxidizing streptomycetes, 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), 2016

菅野 学, Philippe Constant, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, 大気中の水素を利用する植物共生放線菌の生態学的研究, 第31回日本放線菌学会大会, 2016

菅野 学, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, 大気水素が紡ぐ共生関係: 空中の水素を取り込む植物共生微生物の生態的解明, 日本微生物生態学会第31回大会, 2016

菅野 学, 玉木 秀幸, 空中の水素を利用する, 眠らない放線菌胞子, 第90回日本細菌学会総会, 2017

菅野 学, Philippe Constant, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, Detection and isolation of plant-associated bacteria consuming atmospheric hydrogen, The 9th Asian Symposium on Microbial Ecology (ASME9), 2017

菅野 学, Philippe Constant, 玉木 秀幸, 加藤 創一郎, 鎌形 洋一, Plant-associated Streptomycetes consume atmospheric H₂ using a high-affinity hydrogenase, 18th International Symposium on the Biology

of Actinomycetes (ISBA18)、2017
菅野 学、玉木 秀幸、加藤 創一郎、鎌形
洋一、大気中の水素を利用する放線菌と
植物の共生関係の解明、第 32 回日本放線
菌学会大会、2017
菅野 学、植物微生物群が大気微量成分の
循環に果たす役割 ~水素を例に~、大気
-森林-土壌循環ワークショップ、2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅野 学 (MANABU KANNO)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生
物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：10462847