

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07648

研究課題名(和文)キチン添加土壌で増加するキチン非分解微生物の生態的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the ecological roles of non-chitin-degrading microorganisms in chitin-added soil

研究代表者

齋藤 明広 (Saito, Akihiro)

静岡理工科大学・理工学部・教授

研究者番号：50375614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：キチン添加土壌でのキチン非分解細菌の生態的意義を解明するため、キチンを添加して培養した畑土壌から分離した細菌を分離して解析した。得られた細菌株は、キチン分解能の有無にかかわらず、キチン分解物であるN-アセチルグルコサミンかN,N'-ジアセチルキトビオースのいずれかもしくはその両方を資化した。これらのキチン非分解細菌は、キチン分解細菌が分泌するキチン分解酵素によって得られるキチン分解物を利用することが示唆された。キチン非分解細菌株には植物に対して有益な作用をもたらすことが報告されている。-および-プロテオバクテリア綱に含まれる細菌株に近縁のものが含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畑土壌へのキチン添加によって植物の病害が低減されることが報告されてきた。その効果は、主にキチン添加によって増加するキチン分解微生物によるものとして説明されている。本研究課題では、キチン添加土壌に存在するキチン非分解細菌に焦点を当て、研究を行った。その結果、キチン非分解細菌は、キチン分解細菌が分泌生産するキチン分解酵素によって得られるキチン分解物を資化して生きていることを想像させる結果が得られた。一方、キチン非分解細菌には、植物に対して生育促進効果をもつことが報告されているものと近縁のものが含まれていた。キチン添加による植物病害低減効果の仕組みに関する新たな側面を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the ecological significance of non-chitin-degrading bacteria in chitin-supplemented soil, bacteria isolated from field soil cultured for 45 days with the addition of chitin were analyzed. All the obtained bacterial strains with or without chitin degradation ability could utilize chitin degradation products, either N-acetylglucosamine, N, N'-diacetylchitobiose, or both. These non-chitin-degrading bacteria were suggested to utilize chitinolytic products obtained by enzymes secreted by chitinolytic bacteria. Non-chitin-degrading bacterial strains included those closely related to bacterial strains of the classes - and -Proteobacteria, which have been reported to have beneficial effects on plants.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：キチン アセチルグルコサミン 土壌改良 キチナーゼ N,N'-ジアセチルキトビオース プロテオバクテリア 病害防除

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物遺骸(バイオマス)に含まれる生体高分子の分解は、土壌環境の維持に欠かせない。多糖の分解過程を解明することで土壌管理の技術向上や環境負荷低減が期待される。土壌での多糖分解には、放線菌や糸状菌の他、多くの微生物が関与することが示されてきた。その一方で、多糖分解能はないが、多糖分解微生物が生産する分泌酵素の作用で生じる分解物を資化する微生物“Cheater”(ずる賢い微生物)の増加も知られている。セルロース分解では、セルロース分解細菌に窒素源を供給する窒素固定 Cheater 細菌や、ビタミン要求性のセルロース分解細菌にビタミンを供給する Cheater 細菌が知られている。

一方、窒素を含む多糖(アミノ多糖)であるキチンはセルロースに次いで自然界で大量に生成する生体高分子であり、放線菌は土壌での主要なキチン分解微生物である。放線菌はキチンを細胞壁に含む植物病原性糸状菌の生物制御への利用も期待されている。応募者らは、放線菌が多様なキチナーゼ遺伝子をもつこと、また、キチン分解物として生じる *N,N'*-ジアセチルキトビオース(以下、キチン2糖、とする)が、その膜輸送系タンパク質やキチナーゼの遺伝子発現を誘導すること等を明らかにしてきた。最近では、キチン分解物である *N*-アセチルグルコサミン(以下、キチン単糖、とする)が、放線菌や他の細菌の抗生物質生産制御に関与することが、海外の研究グループによって示されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、キチンについて、キチン分解への貢献の観点から Cheater の役割を解明することを一つの目的とする。一方、キチンやその他の有機物の施用によって、病害抑止土壌が生じることが知られている。キチン施用による抗菌微生物の増加とそれに伴う抗菌物質濃度の上昇が理由と考えられているが、微生物種や化合物については不明な点が多い。本研究では、これまで着目されることが無かった Cheater の抗菌活性に注目し、Cheater の生態的意義を抗菌活性の観点から解明することがもう一つの目的である。微生物分離を起点とした生物・化学研究に合わせて、分子生態学的研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) キチン分解微生物、キチン分解中間産物資化微生物(Cheater)、および抗菌微生物の分離と同定

キチンを添加し培養した畑土壌から、細菌を分離し、キチン分解能、キチン分解物(キチン単糖とキチン2糖)の資化性、および植物病原菌であるフザリウム菌に対する拮抗能を調べる。これらの作業によって、キチン分解細菌とキチン非分解能がないがキチン単糖あるいはキチン2糖を資化できる細菌(Cheater)を得て、リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列情報に基づき簡易同定した。拮抗能試験の被験菌にはトマト萎凋病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1)を用いた。

(2) リボソーム RNA 遺伝子アンプリコン塩基配列解析による土壌バイオームの解析

キチン、キチン単糖、あるいはキチン2糖を添加して培養した畑土壌から抽出した DNA について、細菌バイオームをリボソーム RNA 遺伝子アンプリコン塩基配列解析によって解析した。

4. 研究成果

(1) キチン分解細菌とキチン非分解能がないがキチン単糖あるいはキチン2糖を資化できる細菌(Cheater)の獲得と分類

キチンを添加し培養した畑土壌から、細菌を分離し、キチン分解能、キチン分解物(キチン単糖とキチン2糖)の資化性を調べた結果、キチンを添加して5日間および45日間培養した畑土壌から、それぞれ14株および44株が得られた。これらはすべてキチン分解能を示さなかったが、キチン単糖あるいはキチン2糖の両方あるいはどちらか一方を資化することができる、“Cheater”細菌株とした。

これらの計58株の“Cheater”細菌株を含む、分離細菌株145株について遺伝情報に基づいて簡便に属レベルでの同定を行ったところ、“Cheater”細菌株のみで構成される細菌属と、キチン分解能を持つ菌株と“Cheater”細菌株が混同する細菌属が存在した。“Cheater”細菌株のみで構成される主な細菌属は、*Nocardioide*s, *Lysinimonas*(いずれもアクチノバクテリア門), *Ensifer*, *Rhizobium*, *Pseudoxanthomonas*(いずれもプロテオバクテリア門)であった。キチン分解能を持つ菌株と“Cheater”細菌株の両方を含む細菌属は、*Agromyces*, *Microbacterium*(いずれもアクチノバクテリア門), *Ochrobacterium*, *Bosea*, *Devosia*, *Lysobacter*(いずれもプロテオバクテリア門)、および *Bacillus*, *Paenibacillus*(いずれもファーミキューテス門)であった。一方、キチン分解能を示す細菌株から構成される細菌属は、いずれもアクチノバクテリア門であり、*Streptomyces*, *Cellulosimicrobium*, および *Oerskovia* であった。

(2) キチン分解細菌と非分解細菌の共存下でのキチン分解

キチン寒天培地での交差培養によって、キチン分解細菌株と非分解株の共存下でのキチン分解活性への様子とそれぞれの生育に対する影響を調べた。その結果、キチン非分解細菌株との共存下でキチン分解細菌株によるキチン分解が促進される場合、キチン分解細菌株によって非分解細菌株の増加が促進される場合、また、キチン非分解細菌株によって分解細菌株の生育が抑制される場合が認められた。キチン分解と互いの生育に影響を及ぼさない場合も観察された。

一方、最小培地でのキチン分解試験で陰性と判断された細菌株について、キチン分解細菌との交差培養で、増殖が促進され、かつ、キチン分解能を発現するものが見いだされた。これらの細菌株のうちの一群は *Lysobacter* 属細菌であり、メチオニン要求性を示すことがわかった。

(3) 植物病原菌であるフザリウム菌に対する拮抗能の有無とキチン分解能の有無の関係

キチン添加培養畑土壌から分離した細菌株のうち、フザリウム菌に対する拮抗能を示したのは5日間培養した土壌から分離したものでは約50%、45日間培養した土壌から分離した細菌株では約30%であった。拮抗能を示した細菌株の割合はキチン分解能を示した細菌株の方が高かった。

(4) 細菌群集構造

キチン分解物であるキチン単糖を添加した畑土壌では *Bacillus* 属が一過的に著しく割合が増えた。一方、キチン2糖を添加した場合には、一過的に顕著に *Paenibacillus* 属割合が増えるとともに *Streptomyces* 属放線菌の割合も増加した。その他のキチン分解能を持つ菌株と“Cheater”細菌株の両方を含む細菌属 (*Agromyces*, *Microbacterium*, *Ochrobacterium*, *Bosea*, *Devosia*, *Lysobacter*) の割合は影響を受けなかった。また、“Cheater”細菌株のみで構成される主な細菌属 (*Nocardioideis*, *Lysinimonas*, *Ensifer*, *Rhizibium*, *Pseudoxanthomonas*) も、いずれもキチン単糖やキチン2糖の添加の影響を受けなかった。

本研究では、キチン添加培養畑土壌からキチン非分解細菌を分離し、その生態的な意義を解明すべく、解析を行った。キチン非分解株と分解株の両方を含む細菌属は、*Ochrobacterium*, *Bosea*, *Devosia*, *Lysobacter*, *Bacillus*, および *Paenibacillus* の6属、キチン非分解細菌のみの細菌属は *Nocardioideis*, *Lysinimonas*, *Ensifer*, *Rhizibium*, *Pseudoxanthomonas* の5属であった。これらのうちのほとんどはキチン単糖のキチン2糖の両方を資化することができ、そのほかの菌株もそれらのいずれかを資化することができた。キチン単糖もしくはキチン2糖を添加した土壌において、これらの11の細菌属のうち、*Bacillus* 属はキチン単糖の添加によって、*Paenibacillus* 属はキチン2糖の添加によって著しく割合が増えた。しかしながら、その他の9の細菌属の割合は顕著に変化しなかった。これらのキチン非分解細菌属がキチン単糖とキチン2糖を添加した土壌で増加するには、その他の要因が必要であることが考えられた。キチン分解細菌と非分解細菌の交差培養実験の結果を合わせて考えると、キチン分解細菌やその他の細菌の増殖によって供給される何かしらの化合物が必要なかもしれない。

本研究によって、キチン添加土壌に存在するキチン非分解細菌は、キチン分解物を資化する能力を持つことが明らかとなった。また、キチン非分解細菌は、キチン分解細菌とキチン分解物以外の化合物の授受を介して互いの生育に影響を及ぼしていることを想像させる結果を得ることができた。キチン添加土壌からメチオニン要求性を示すキチン分解細菌株として *Lysobacter* 属が複数分離されたことから、キチン分解物以外の化合物の細菌間の授受は、キチン分解細菌と非分解細菌の間だけでなく、キチン分解細菌間でも行われていることが想像された。

本研究では、分離細菌株を用いた *in vitro* の実験系での解析を行ったが、今後は土壌団粒構造を考慮した空間的な要素も考慮しつつ解析する必要があるだろう。キチン非分解細菌株のみから構成された細菌属には、根圏細菌として植物に対して生育促進効果が報告されているものが多く見受けられた。キチン添加畑土壌に存在するキチン非分解細菌は植物に対しても影響しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yukari Iwasaki, Tatsuya Ichino, Akihiro Saito	4. 巻 35
2. 論文標題 Transition of the bacterial community and culturable chitinolytic bacteria in chitin-treated upland soil: From Streptomyces to methionine-auxotrophic Lysobacter and other genera	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME19070	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 -
1. 著者名 Yusuke Shimoi, Daichi Honma, Airi Kurematsu, Yukari Iwasaki, Yohei Kotsuchibashi, Yusuke Wakikawa, Akihiro Saito	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of chitin degradation products N-acetylglucosamine and N,N'-diacetylchitobiose on chitinase activity and bacterial community structure in an incubated upland soil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2020.1767488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森田 明雄, 廣野 祐平, 切岩 祥和, 齋藤 明広, 甲斐 剛, 小池 誠, 中野 敬之, 二川 雅登, 名田 和義, 平塚 伸	4. 巻 91
2. 論文標題 静岡のスマート農業の今とこれから	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 106-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20710/dojo.91.2_106	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yuta Kumeta, Kaori Inami, Kozue Ishimaru, Yasushi Yamazaki, Reiko Sameshima-Saito, Akihiro Saito	4. 巻 64
2. 論文標題 Thermogravimetric evaluation of chitin degradation in soil: implication for the enhancement of ammonification of native organic nitrogen by chitin addition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 512-519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2018.1457408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshiki Shiga, Hiromitsu Mori, Keiichi Uemura, Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Aika Yamawaki-Ogata, Yuji Narita, Akihiro Saito, Yohei Kotsuchibashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the bactericidal and fungicidal activities of poly([2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethyl ammonium chloride)(poly(METAC))-based materials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym10090947	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 -

1. 著者名 Chiharu Inuma, Akihiro Saito, Takayuki Ohnuma, Elodie Tenconi, Adeline Rosu, Severine Colson, Yuuki Mizutani, Feng Liu, Magdalena Swiatek-Poltynska, Gilles P. van Wezel, Sebastien Rigali, Takeshi Fujii, Kiyotaka Miyashita	4. 巻 33
2. 論文標題 NgcESco acts as a lower-affinity binding protein of an ABC transporter for the uptake of N,N'-diacetylchitobiose in Streptomyces coelicolor A3(2)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 272-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17172	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 該当する

1. 著者名 Mariko Mochizuki, Noriyuki Hayakawa, Fumiko Minowa, Akihiro Saito, Katsumi Ishioka, Fukiko Ueda, Kimihiro Okubo, Hiroyuki Tazaki	4. 巻 188
2. 論文標題 The concentration of iodine in horse serum and its relationship with thyroxin concentration by geological difference	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Environmental Monitoring and Assessment	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10661-016-5221-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 下位祐輔, 本間大智, 齋藤明広
2. 発表標題 N-アセチルグルコサミンとN,N'-ジアセチルキトビオースの培養畑土壌での消長と細菌群集構造への影響
3. 学会等名 日本キチン・キトサン学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間大智, 下位祐輔, 齋藤明広
2. 発表標題 細菌と真菌の細胞壁に由来する土壌中のN-アセチルグルコサミンの定量の試み
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年度静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoto Tada, Natsumi Sugawara, Mitsuo Kawade, Akihiro Saito, Akikazu Ando
2. 発表標題 Analysis of bacterial community structure for evaluating maturation of compost for <i>Agaricus blazei</i> Murrill cultivation
3. 学会等名 Asian Mycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎由夏里, 齋藤明広
2. 発表標題 キチン添加土壌で増えるキチン分解細菌群の変動と相互作用
3. 学会等名 日本土壌微生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間大智, 脇川祐輔, 齋藤明広
2. 発表標題 土壌でのN-アセチルグルコサミン残基の定量方法の開発
3. 学会等名 日本土壌微生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎由夏里、齋藤明広
2. 発表標題 キチン添加土壌でのLysobacter属細菌の増加への放線菌の関与
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 組田恵里、岩崎由夏里、齋藤明広
2. 発表標題 観賞魚水槽用濾材としての木質プラスチックの利用： アンモニア/亜硝酸除去能と付着細菌群集構造
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Saito
2. 発表標題 Induction of chitinase production and transporters for N,N'-diacetylchitobiose in Streptomyces coelicolor A3(2)
3. 学会等名 14th International Chitin and Chitosan Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間大智、齋藤明広
2. 発表標題 酵素とGC/MSを用いた土壌中のN-アセチルヘキサミンの検出
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間大智, 下位裕輔, 樽松愛理, 岩崎由夏里, 齋藤明広
2. 発表標題 培養畑土壌でのキチン分解物の消長と細菌文集構造の変化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会中部支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎由夏里, 齋藤明広
2. 発表標題 キチン添加畑土壌でのキチン分解菌と非分解菌の挙動と相互作用
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本間大智, 齋藤明広
2. 発表標題 Streptomyces coelicolor A3(2)の推定N-アセチルグルコサミダーゼの解析と土壌添加
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樽松愛理, 齋藤明広
2. 発表標題 土壌中のキチン分解酵素活性と微生物に対するN-アセチルグルコサミンとN,N'-ジアセチルキトビオースの影響
3. 学会等名 日本土壌微生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大塚恵巳、三澤義知、樋口昌宏、齋藤明広
2. 発表標題 畑土壌での低分子量キチンの分解特性と微生物群集構造への影響
3. 学会等名 日本キチン・キトサン学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大塚恵巳、三澤義知、樋口昌宏、齋藤明広
2. 発表標題 キチンと低分子量キチンの畑土壌での分解特性と微生物群集構造への影響の比較解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ベンゾオキサボロール基を含有する抗菌性ドレッシング材	発明者 小土橋洋平，齋藤明 広	権利者 学校法人静岡理 工科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-152296	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	鮫島 玲子 (Sameshima-Saito Reiko) (00377722)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	
研究 分担者	小谷 真也 (Kodani Shinya) (20510621)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	