

令和元年6月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0150

研究課題名(和文) 非共生細菌の作物根圏定着能の改良とその減肥栽培への応用

研究課題名(英文) Improvement of non-symbiotic bacterial fitness in crop rhizosphere

研究代表者

上田 晃弘 (Ueda, Akihiro)

広島大学・統合生命科学研究科・准教授

研究者番号：10578248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不可給態リンを可給態リンへと変換する能力を持つ細菌を可給態リン供給細菌と呼ぶ。このような細菌の作物栽培への実用化に期待が寄せられているものの、作物種子・根圏での定着能の低さが実用化には至っていない。本研究では可給態リン供給細菌の定着能を改良するために細菌のバイオフィーム形成に着目した。単離済みの可給態リン供給細菌を用いてトランスポゾン変異の導入を行い、バイオフィーム形成能が改良された細菌変異株のスクリーニングを行った。バイオフィーム形成能が改良された変異株はイネ種子表面でも高い定着能を示したことから、作物栽培への実用化が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰に施用されたリン肥料は土壌中に蓄積される。リンは有限資源であるため、土壌中に蓄積された未利用リン資源の利用・再循環技術の開発は農業持続性のために重要である。本研究では、土壌中の未利用リン資源である不可給態リンを作物が利用できる形態へと変換する能力を持つ細菌の定着能の改良を行った。細菌の定着能に関わっていると考えられているバイオフィーム形成能の改良を行った結果、作物種子表面での定着能が改良された細菌変異株の作出に成功した。このような細菌を作物栽培に使用することで土壌中のリン資源の再循環化を行うことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus supplying bacteria (PSB) can convert unavailable phosphorus to available phosphorus in soils, therefore application of PSB is expected to utilize unavailable phosphorus accumulated in soils for crop cultivation. However, non-symbiotic PSB has poor colonization ability on the surface of crop seeds and in the rhizosphere. The objective of this research is improve PSB's fitness in crop rhizosphere by focusing on bacterial biofilm formation. After screening of PSB mutants generated using transposon mutagenesis, PSBs having better ability to form biofilms were successfully isolated. These PSBs showed better performance of colonization on crop seeds and are expected to utilize for crop cultivation.

研究分野：植物栄養学、環境微生物学

キーワード：可給態リン供給細菌 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

肥料の三要素のうち、リンは窒素やカリウムよりも作物による利用効率が低い。施肥されたリン肥料のうち、最大で 80% が土壤中で難溶性リンや有機態リンに変換されて蓄積される。作物はこのような不可給態リンを効率的に利用することができないために、土壤中には未利用リン肥料資源として不可給態リンが蓄積され続けている現状がある。わが国はリン肥料資源に乏しく、そのほとんどを輸入に頼っている現状がある。持続的な農業生産のためには、リン肥料資源の節約技術の開発は喫緊の課題である。

土壤中の不可給態リンを可給態リンに変換する能力を持つ細菌のことを可給態リン供給細菌と呼ぶ。可給態リン供給細菌は、難溶性リンからリン酸を可溶化するために有機酸やその他のキレート物質を放出する能力や、有機態リンを分解するためのリン酸加水分解酵素を放出する能力を持つ。可給態リン供給細菌が作物根圏に多く存在すれば、土壤中の不可給態リンが可給態化されるため、可給態化されたリンの一部は作物が利用できると考えられている。

これまでも可給態リン供給細菌の作物栽培への利用が試みられてきたが、実用化に至ったものはない。種子表面に細菌をコーティングすることも試みられているが、土壤中に播種後に細菌数が急激に減少し、その効果の持続性の維持が困難である。その理由として、可給態リン供給細菌の作物根圏での定着能の低さが挙げられる。土壤中の作物根圏には、作物由来の根分泌物等の有機物が豊富にあるため、土壤微生物間での養水分やニッチの獲得競争が激しい。根粒菌やアーバスキュラー菌根菌のような共生微生物とは異なり、非共生細菌である可給態リン供給細菌が作物根圏で優占種となることは難しく、根圏での定着を維持することができず、結果として作物はこの細菌がもたらす可給態リン供給能力の恩恵を被ることができない。

2. 研究の目的

本研究では、細菌がどこかにとどまろうとするとときに形成するバイオフィームに着目する。バイオフィームは細菌が生産・放出する粘性多糖類や DNA に細菌自身が取り込まれた膜状構造物である。可給態リン供給細菌による土壤中の未利用資源である不可給態リンを作物栽培に利用するために、可給態リン供給細菌のバイオフィーム形成能の改良を行い、作物根圏での定着能を改良する。

3. 研究の方法

本研究では可給態リン供給細菌として、自然環境から単離したリン酸カルシウム可溶化細菌 (*Pseudomonas* sp.) を用いた。この可給態リン供給細菌にトランスポゾン変異を導入し、変異株ライブラリーを作成した。変異株ライブラリーからバイオフィーム形成量が増加した変異株のスクリーニングを行った。細菌の培養には LB 培地を用い、バイオフィーム形成は 96 穴プレートおよびコロニー形態観察の両方を用いて 28、24 時間の培養で行った (Ueda and Wood, 2009)。

4. 研究成果

可給態リン供給細菌の抗生物質耐性を調べたところ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールに感受性であることが分かった。そこでゲンタマイシン耐性を付与しうるトランスポゾン変異を導入し、クロラムフェニコールおよびゲンタマイシン含有 LB 培地上でトランスポゾン変異株ライブラリーを作成した。およそ 1,000 株の変異株を 24 時間の培養後にスクリーニングした結果、バイオフィーム形成能が大きく改良された変異株を 10 株単離することに成功した。単離された変異株のうち、MT-4, MT-5, MT6, MT-7, MT-8, MT-10 の 6 株は特に高いバイオフィーム形成量を示したほか、MT-4, MT-5, MT6, MT-10 株は野生株と比較して培養開始 72 時間後も高いバイオフィーム形成量を示した。(図 1)

このうち、特に高いバイオフィーム形成量を示した MT-5 株に着目して、さらなる解析を行った。MT-5 株は極めて高いバイオフィーム形成能を示すが (野生株のおよそ 20 倍) MT-5 株の定着能の高さは培養後のガラス器具内でも観察することができる (図 2)。トランスポゾン変異が可給態リン供給細菌としての能力 (リン酸カルシウム可溶化能) に影響を与えていないか確認をしたところ、野生株と遜色ないことが分かった。

MT-5 株ゲノムにおけるトランスポゾン変異挿入部位を同定したところ、機能が同定されていない ABC トランスポーターの機能が喪失していることが分かった。この ABC トランスポーターがどのような機能を持っているのかは不明であるが、今後詳細に解析をしていく必要がある。

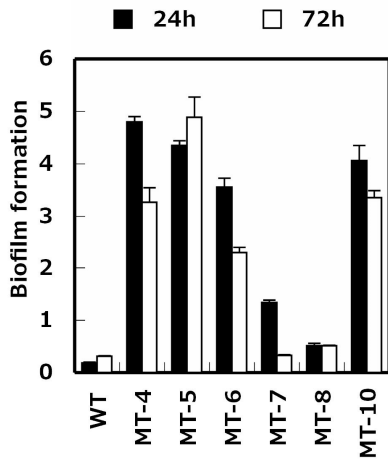


図1．可給態リン供給細菌のバイオフィーム形成能の改良。WTは野生株、MTはバイオフィーム形成能が向上した変異株を示す。

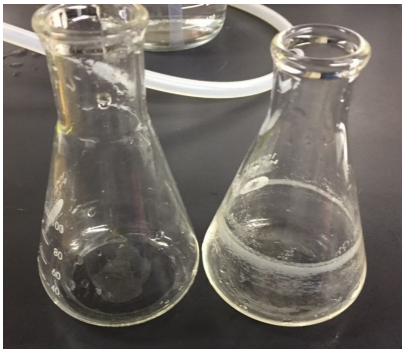


図2．可給態リン供給細菌野生株（左）と改良された変異株 MT-5（右）の培養後フラスコ内の様子。

96 穴プレート（ポリスチレン）や三角フラスコ（ガラス）等の非生物表面での定着能の飛躍的な改良が見られた MT-5 株の生物表面での定着能について調べた。可給態リン供給細菌野生株と MT-5 株をそれぞれイネ種子とともに共培養を行った。その後、激しく洗浄した後に種子表面に定着した細菌数の測定を行った。コロニー形成数は MT-5 株で 3 倍に増加していることが分かった（図3）。MT-5 株では野生株と比較してバイオフィーム形成量は 20 倍に向上していたものの、イネ種子表面での定着能は 3 倍程度の向上となった。MT-5 株はバイオフィーム形成を行うほか、細菌同士が凝集する傾向にあるため、個々の細菌をうまく分離することができない場合には平板希釈法での細菌数の計測は過小評価につながる。今後、リアルタイム PCR を用いた DNA ベースの評価方法や超音波処理を併用した平板希釈法を用いるなど、MT-5 株数の正確な評価方法を開発する必要がある。

以上のように、本研究では細菌のバイオフィーム形成能の改良が非生物表面や生物表面での細菌の定着能の改良につながるということが明確に示された。今後はバイオフィーム形成能をどの程度改良すれば植物表面での定着能の向上につながるのか、定着した細菌数の正確な評価方法の開発を行うとともに、作物栽培試験により減肥栽培に実用可能かどうかの検証を続ける必要がある。

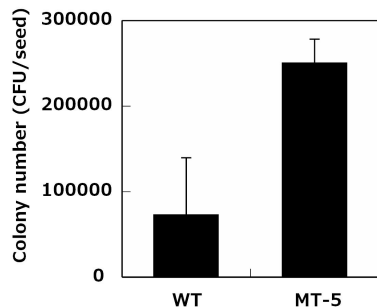


図3．イネ種子表面に定着した可給態リン供給細菌野生株および変異株 MT-5。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

上田晃弘、大戸貴裕、近藤もも、大村尚 (2019)
植物生育促進細菌の実用化に向けた試み
土と微生物 73: 5-9 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

上田晃弘
非共生型細菌の植物種子表面への新規固定化技術の開発
アグリビジネス創出フェア、2018年

上田晃弘
植物の生育を良くする善玉細菌のはたらき
日本土壌微生物学会 市民公開シンポジウム、2018年

上田晃弘
非共生型細菌の植物種子表面への新規固定化技術の開発
アグリビジネス創出フェア、2017年

上田晃弘
難溶性リン可溶化細菌の植物種子・根圏定着能の改良
JST 新技術発表会、2016年

渡邊湧也、上田晃弘、実岡寛文
環境ストレス下における植物生育促進細菌 *Pseudomonas putida* のバイオフィルム形成特性
日本土壌肥料学会佐賀大会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：新規微生物及びその作成方法

発明者：上田晃弘

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願 2018-505856

出願年：2017年

国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。