

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02319

研究課題名(和文) 植物 内生分解菌による新規ハイブリッドレメディエーション創出とPOPs汚染の修復

研究課題名(英文) Creation of novel plant-microbe hybrid remediation system by a POPs-degrading endophytic bacteria and Cucurbitaceae plant.

研究代表者

高木 和広 (Takagi, Kazuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・主席研究員

研究者番号：70354074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物-微生物複合系構築によるレメディエーションは可能か？という学術的問いからアプローチを試みた。POPsを特異的に吸収するウリ科植物を用い、ウリ科植物内に生息する内生細菌相を明らかにした。一方でウリ科植物内部に生息する内生細菌からDDTやPCP分解菌を探索したところ、残念ながらDDT分解菌は見つけることができなかった。しかし、PCP分解菌を特定することに成功し、単結晶X線構造解析法をもちいた最新の分析技術からPCPは新規代謝物であるPCPリン酸に変換していること、PCPリン酸がターミナル化合物であることが判明した。植物内生細菌によるPOPs分解例は報告がなく、世界初の成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、植物-微生物複合系構築によるレメディエーションは可能か？という当初の問いかけに対して回答し得る一定の成果を得た。つまり、植物の内部にはヒトの腸内と同じように数多くの微生物が生息しており、その中にはPOPsのような難分解性有機化合物を分解できる微生物も存在していることが明らかとなった。これにより、これまで課題とされてきた分解菌を汚染現場に定着させ安定的に機能を維持させるという難題を、分解菌を接種し保持させた植物を汚染現場に適応することで解決できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried the approach from the academic question, “Does it possible for remediation by constructing a plant-microbial complex system?” Cucurbitaceae plants that specifically uptake POPs were used in this study, and we revealed endophytic bacterial community in Cucurbitaceae plants. On the other hand, although we explored DDT and PCP-degrading bacteria from the endophytic bacteria living in Cucurbitaceae plants, unfortunately we could not find any DDT-degrading bacteria. However, we succeeded in identifying PCP-degrading bacteria, and it was clarified that PCP was converted to more hydrophilic unknown metabolite. We identified the unknown metabolite as PCP-phosphate using an advanced single crystal X-ray diffraction measurement. PCP phosphate is a novel metabolite and terminal compound. There have been no reports of POPs degradation by endophytic bacteria to date, and this is the first achievement all over the world.

研究分野：土壤微生物学

キーワード：植物内生菌 新規PCP分解菌 新規分解代謝物 単結晶X線構造解析法 残留性有機汚染物質(POPs) 汚染土壌修復

1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 (POPs) は、環境中で高い残留性や生物濃縮性、長距離移動性、毒性を示すことから世界中でその製造・使用が禁止され、早急な無害化処理が求められている。DDT (2001 年登録) については現在でも抗マラリア剤としての使用が一部地域で許容され、汚染が進み続けている。一方、殺菌・除草剤として使用され世界中に汚染現場が存在する PCP は 2015 年に追加登録された。POPs 汚染を除去するには化学・物理的処理を用いることが多いが、大型施設を必要とするなど高コストであるだけでなく、低濃度で広域に広がる汚染への対応は困難である。そのため、微生物によるバイオレメディエーションに期待が集まっている。微生物分解に関する基礎的知見はかなり蓄積されてきているが、現場で効果的に汚染物質の分解除去する技術には至っていない。一方で植物を利用するファイトレメディエーションは、汚染物質の除去に時間がかかる上、汚染物質を吸収した植物体の後処理が問題となっている。また、POPs を吸収する植物種は極めて少ない。一般に、疎水性が高い化学物質ほど植物根への取り込みは増大するが、根から茎葉部への移行性はオクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) が 1.8 付近で極大となる (Briggs, 1982)。そのため POPs など $\log K_{ow}$ 値が高い (>5) 化学物質は根に吸収されるが茎葉部への移行性は極めて小さい。しかし、ウリ科植物は POPs を積極的に吸収し、高濃度で茎葉部や果実に移行・蓄積することが明らかとなり、POPs のファイトレメディエーションへの応用が期待されている (White 2003, Hülster 1994, 大谷 2011)。

2. 研究の目的

本研究は植物 - 微生物のハイブリッドレメディエーションの構築を目的とする。これまでも植物と根圏微生物を組合せたレメディエーションは研究されてきたが、土壌中での定着に問題があり現場での利用は困難であった。本申請は植物内生分解細菌を組合せる点でこれまでの研究とは全く異なる新しいアプローチとなる。POPs を吸収できるウリ科植物の内生菌から DDT および PCP 分解菌を選抜することで、これまでのバイオレメディエーションとファイトレメディエーションの抱える難点、すなわち微生物分解および分解菌の生育が環境に影響されやすいこと、汚染物質吸収植物の処理の問題などが一気に解決できる。

3. 研究の方法

本申請では、科学的証拠に基づく新技術を構築するために、以下の課題を設定し、植物と微生物のハイブリッド系から汚染現場で使用可能なレメディエーションの構築を目指した。

(1) ウリ科内生細菌、土壌細菌による DDT および PCP 分解と分解代謝経路の解明

申請者らは DDT 分解菌として、*Streptomyces* 属菌を DDT 汚染土壌から分離したが、分解代謝経路は不明だったため、本申請で明らかにした。方法は、パキスタンから輸入した土壌でキュウリを栽培し、根圏土壌から根圏細菌 24 菌株を分離した。分離菌株の DDTs 分解能を確認するため、DDT と DDD をそれぞれ 5 mg/kg となるように添加したポテトデキストロース液体培地 (pH7) で 14 日間振とう培養した。培養後、アセトニトリルを等量添加し、前処理後に HPLC 分析に供した。また、培養液は酢酸エチルでも抽出し、濃縮後に GC-MS 分析に供した。得られたピークの分子量、さらにはマススペクトルのフラグメントパターンと既報情報から分解代謝物を推定した。一方で、PCP 分解内生細菌は分離出来ていなかったため、本研究でキュウリから分離及びスクリーニングを試みた。

(2) 次世代シーケンサーを用いた分解遺伝子の網羅的探索

植物内生細菌における DDT 代謝遺伝子群の同定は、DDT 代謝の基礎的な知見となるだけでなく、植物体内での活性測定や局在解析といった応用研究の基盤となり、植物 - 微生物

のハイブリッドレメディエーションの構築に大変重要である。しかし、微生物による好氣的 DDT 分解の遺伝子群に関する基礎的研究は DDT 分解産物であるジクロロジフェニルトリクロロエチレン(DDE)が *bph* 遺伝子群によって代謝される事例が唯一の研究例である (Nguyen et al., 2011, 2013)。また、細菌から同定される芳香族化合物の代謝オペロンは親化合物や中間産物によって誘導される場合が多いことから (Master 2001, Urata 2004, Tropel 2004)、本研究では DDT 存在下、非存在下における DDT 分解菌株の遺伝子発現変動を RNA-seq によって網羅的に比較し、DDT 依存的に発現する遺伝子の選抜を試みた。ドラフトゲノム及び RNA-seq データの取得は外部機関に委託した。

4. 研究成果

パキスタンの DDT 汚染土壌で栽培したキュウリの根圏土壌から、培養 14 日間で DDT が 84.5%、DDD が 48.6% 分解する菌株を見出した。16S rRNA 解析の結果、本菌は *Streptomyces* 属菌であることが確認され、885 株と名付けた。885 株は DDT を分解し、DDOH, DDA, DBP を経て更なる下流まで分解することが明らかになった(図 1)。 *Streptomyces* 属菌による DDT 分解経路の解明は本研究が初めてである。一方で、ウリ科内生細菌の DDTs 分解については、これまでおよそ 600 菌株以上を分解試験に供したが、分解能を有する菌株の選抜には至らなかった。しかし、2015 年に POPs に登録されたペンタクロロフェノール (PCP) に関しては、ウリ科植物内生細菌から PCP 分解能を有する菌株を見出した。本菌株は、PCP を培養 2 日間でほぼ全て分解し、未知代謝物を蓄積することが確認された(図 2a)。16S rRNA 解析の結果、*Bacillus* 属菌であることが確認され、15 株と名付けた。この代謝物を同定するために UPLC-MSMS での分子組成情報の取得と単結晶 X 線構造解析の結果から、新規代謝物の PCP リン酸であることが明らかとなった(図 2b)。植物内生微生物による POPs 分解事例は本研究が初であり、微生物による PCP 分解経路として PCP リン酸への変換も本研究で初めて明らかになった。DDT 分解菌 885 株については、RNA-seq の結果から、885 株の細胞内で DDD 依存的に発現量が増加した遺伝子がいくつか見出された。これらの遺伝子の DDT 又は DDD 分解活性を異種発現系で調べた。異種発現系では *Rhodococcus erythropolis* L88 を宿主とし、DDD 依存的に発現量が増加した遺伝子を導入し分解試験に供した。まず発現系の構築では 9 つの候補遺伝子のうち 6 つを CBB 染色で確認できるレベルで可溶性画分に発現させる組換え体を各々作製した。次にこれらの生菌体もしくは粗酵素抽出液を用いて DDT および DDD 分解試験を行ったが、いずれも分解活性は見られなかった。従って、DDD 存在下で発現量が増加したと思われた遺伝子が、実際は当該化合物の有無とニュートラルであったと考えられる。

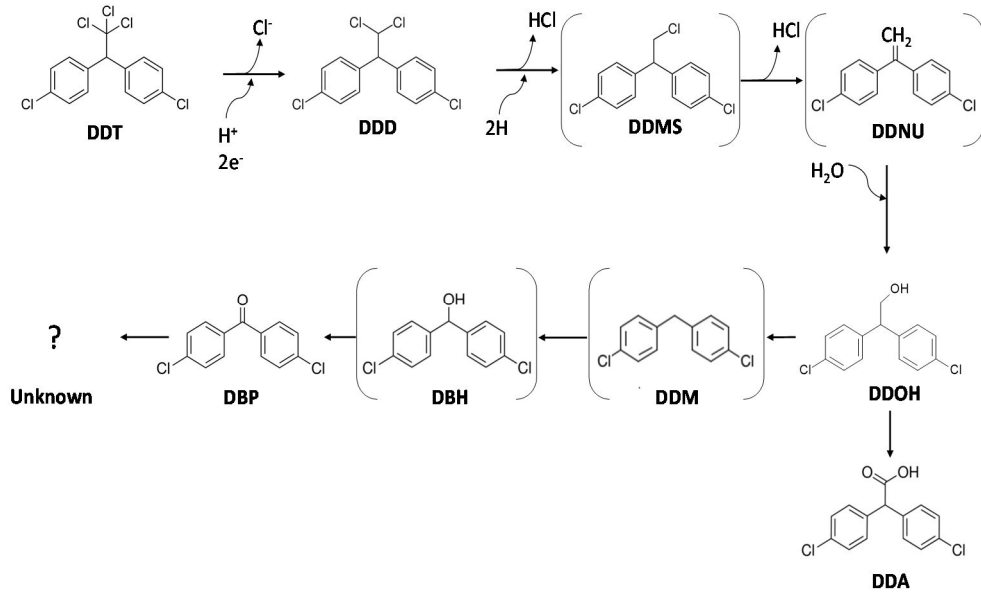


図1 *Streptomyces* 属菌 885 株による DDT 代謝経路

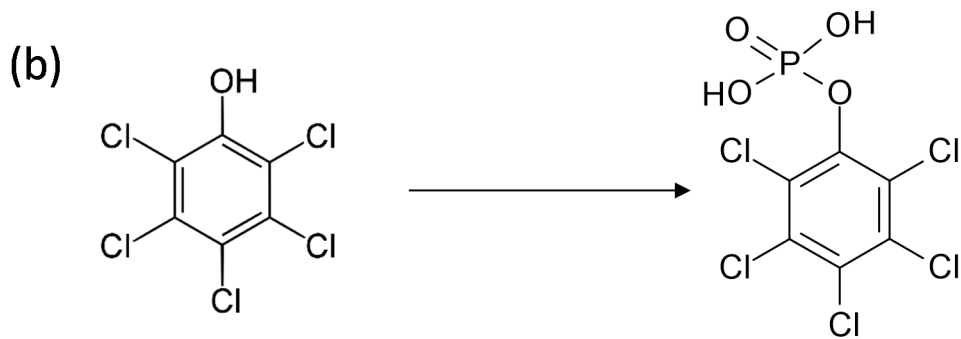
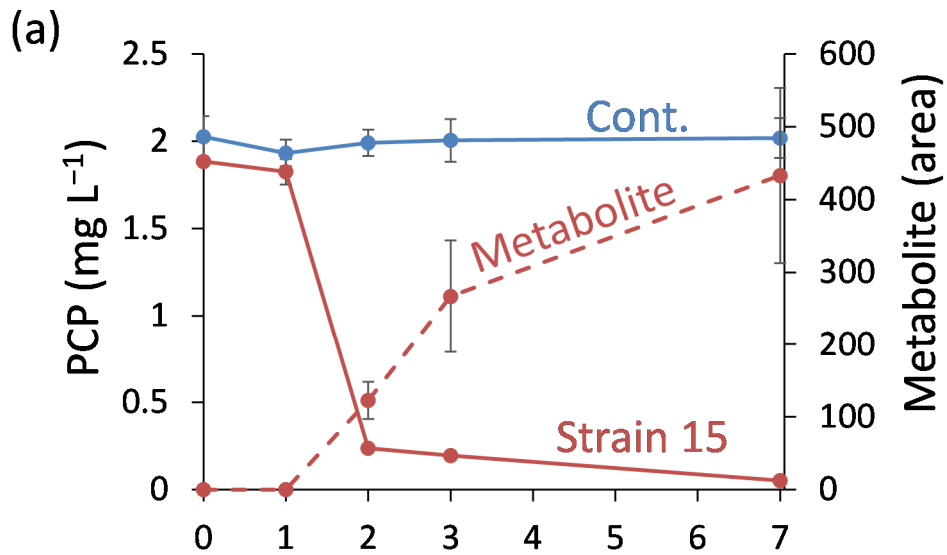


図2 *Bacillus* 属菌 15 株による PCP 分解と分解代謝物

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito K., Takagi K., Kataoka R., Kiyota H., Iwasaki A.	4. 巻 44
2. 論文標題 Dissipation, dehalogenation and denitration of chloroaromatic compounds by Nocardioiodes sp. strain PD653:characterizaiton of the substrate specificity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 171-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D19-024	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 Mahmood A., Takagi K., Ito K., Kataoka R.	4. 巻 35
2. 論文標題 Changes in Endophytic Bacterial Communities During Different Growth Stages of Cucumber (Cucumis sativus L.)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-019-2676-z.	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mahmood A., Takagi K., Ito K., Kataoka R.
2. 発表標題 Temporal Endophytic Bacterial Dynamics of Cucumber; A Culture Dependent and Independent Approach
3. 学会等名 International Soil Congress in Turkey (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito K., Takagi K., Kataoka R., Kiyota H.
2. 発表標題 The substrate specificity of Nocardioiodes sp. PD653 capable of degrading hexachlorobenzene.
3. 学会等名 XIX International Plant Protection Congress(IPPC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takagi K., Kataoka R., Ito K.
2. 発表標題 Bioremediation of hexachlorocyclohexanes (HCHs)-contaminated soil using charcoal enriched with a constructed bacterial consortium.
3. 学会等名 XIX International Plant Protection Congress(IPPC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 虹児, 高木 和広, 片岡 良太, 清田 洋正
2. 発表標題 好氣的HCB脱塩素分解菌Nocardioiodes sp. PD653株の基質特異性と脱塩素酵素の精製
3. 学会等名 第37回農薬環境科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 虹児, 高木 和広, 片岡 良太, 清田 洋正
2. 発表標題 好氣的HCB脱塩素反応に関与するフラビンリダクターゼHcbA3の生化学的解析
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	片岡 良太 (Kataoka Ryota) (00635104)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	清田 洋正 (Kiyota Hiromasa) (30234397)	岡山大学・環境生命科学研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関