

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16236

研究課題名（和文）バイオフィームによるアマモ葉への窒素供給メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of how the biofilm supplies nitrogen source to leaves of seagrass (*Thalassia hemprichii*)

研究代表者

土屋 雄揮 (TSUCHIYA, Yuki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10636806

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）：本研究ではアマモ葉表面バイオフィーム（biofilm; BF）によるアマモへの窒素供給メカニズムを解析した。COVID-19の影響で本アマモ（*Zostera marina*）が採取できなかったため、リュウキュウスガモ（*Thalassia hemprichii*）を実験室で栽培して実験に用いた。分離培養法およびメタゲノム解析により、BF内では同化的硝酸還元やアミノ酸代謝のポテンシャルが高いこと、および殺藻細菌やオーキシン生産菌が存在することが確認できた。藻類の溶菌により得られる窒素化合物からNH₄⁺やオーキシンが生産され、植物の成長が促進されている可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リュウキュウスガモを含めたアマモ類は沿岸域生態系において水浄化や生物多様性維持などの重要な役割を担うとともに、ブルーカーボンの一部として地球温暖化防止の鍵を握る植物である。陸上植物においてはその成長への微生物の関与がよく研究されており、実際に微生物を植物の栽培に応用している例があるが、水中植物についてはまだ報告が少ない。本研究の結果は、陸上植物の根でよく見られるような植物微生物間相互作用が、アマモの場合は葉でも起こり得ることを示す。これは、水中植物の生態に関する新しい知見となるだけでなく、近年急激に減少しているアマモ群落の維持、再生に葉表面の微生物が応用できる可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed the mechanism of nitrogen supply to seagrass (*Thalassia hemprichii*) by biofilm (BF) formed on the surface of seagrass leaves. The seagrasses planted in the aquarium were used for microbial isolation and metagenomic analysis in the BF. The genetic and physiological analyses of the microbial strains and the pathway analysis of the metagenomic sequence revealed 1) the potential activities of assimilatory nitrate reduction and amino acid metabolism and 2) the presence of algicidal bacteria and auxin-producing bacteria in the BF. The results suggest that microbes in the BF supply seagrass leaves with NH₄⁺ and auxin, derived from algal lysis and/or transformations of nitrogen compounds, leading to promoting plant growth.

研究分野：微生物生態学

キーワード：バイオフィーム リュウキュウスガモ 窒素源 植物ホルモン 殺藻細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アマモは、沿岸域の海水中にしばしば見られる種子植物の総称で、*Alismatales* (オモダカ) 目に分類される植物のいくつかが含まれる。アマモは海底に張った根から栄養を得ているが、陸上の植物とは異なり、葉からも多くの栄養を取り込む種類が存在することが解っている。アマモ表面には多くの微生物が棲息しており、淡水中の抽水植物の表面でも見られるような微生物の共同体「バイオフィーム (以下、BF)」が形成されている。予備的にアマモの BF 中の DIN 濃度を測定したところ、興味深いことに、海水中では μM オーダー以下という低濃度であったのに対し、BF 内では比較的高濃度 (数百 μM ~ mM オーダー) であることが解った。また、アマモ表面 BF のショットガンメタゲノム解析を行った結果、窒素固定能を持つ藍藻が検出され、藻類分解菌やアミノ酸を利用する細菌なども存在していることが解ってきた。これらの実験データから、葉表面の微生物とそれらが形成する BF が、(1) 水中に含まれる窒素を固定、(2) DON (微生物細胞も含む) を分解、(3) DIN を変換・保持というフローによって、アマモへ窒素を供給していることが推測された。

2. 研究の目的

これまで堆積物を介した微生物とアマモの関わりが主に研究されてきた。アマモの窒素吸収に葉表面の微生物が関わる可能性については近年報告があるが (Tarquinio, F. et al., *The ISME Journal*. 2018; doi.org/10.1038/s41396-018-0218-6) 微生物による窒素の変換、あるいは (物理化学的な) 濃縮や保持というようなメカニズムに関する直接的な証拠まではまだ示されていない。そこで本研究では、葉から窒素吸収できることが解っているアマモに着目し、葉表面の BF によるアマモへの窒素供給メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

当初の計画では本アマモ (*Zostera marina*) をターゲットにサンプリングおよび実験をすることを想定していたが、アマモの定期的なサンプリングが、COVID-19 の拡大に伴う社会的および組織的な制約により困難となってしまった。そのため、葉からの栄養吸収が確認されており、水槽で栽培できることが知られているリュウキュウスガモ (*Thalassia hemprichii*) を購入し、研究室で海水水槽を立ち上げて栽培した。栽培できたリュウキュウスガモ (以下、スガモと略す) の株数や葉表面 BF の形成量を考慮し、分離培養法による窒素代謝関連微生物の探索、およびメタゲノムによる窒素関連パスウェイの解析の 2 つのアプローチで主に研究を進めた。以下にそれぞれの方法を記載する。

分離培養法による窒素代謝関連微生物の探索

(1) 希釈平板法による微生物の分離と遺伝子解析

栽培したスガモの葉表面 (約 5 mm x 30 mm) から BF を滅菌したスポンジでこすり取り、滅菌人工海水に懸濁した。この懸濁液を段階希釈し、従属栄養菌用の Marine Broth 培地 (MB 培地)、光合成微生物用の BG11 培地および C 培地、窒素固定微生物用の LGPT 培地にそれぞれ塗布して培養した (25°C、暗所)。形成されたコロニーを画線培養で分離した。比較対照として砂と海水についても同様の実験を行い、それぞれ分離菌株を得た。

得られた分離菌株 (合計約 200 菌株) のコロニーを 16S rRNA 遺伝子用のプライマー (27F、1401R) を用いたダイレクト PCR に供した。増幅された DNA のシーケンスを 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で決定した。得られた塩基配列を NCBI の BLASTn プログラムで同源性検索し、MEGA で Neighbor-Joining tree を作成した。

(2) 分離菌株による IAA 生産能の解析

分離菌株をトリプトファン (最終濃度 0.1%) を添加した液体培地で対数増殖期まで培養し、培養液を遠心分離 (12,500 x g, 4°C, 30 min) した後、上清に含まれるインドール-3-酢酸 (IAA) 濃度を Salcowski 法で測定した (Gordon, S.A., et al., *Plant Physiol.* 1951; 26:192-195.)。

(3) NH_4^+ の取り込み能および生産能の解析

人工海水中に分離菌株をそれぞれ懸濁 ($\text{OD}=0.1$) し、そこへ 100 μM になるように NH_4^+ を添加した。4°C 暗所の条件下で懸濁液を攪拌しながら経時的 (0~90 min) に懸濁液上清中の NH_4^+ 濃度をインドフェノール青法により測定した。濃度の減少から物理的な NH_4^+ 取り込み速度を算出した。菌株の代わりに BF が形成された葉とスポンジで BF を剥がした葉についても同様の実験を行った。一方、各分離菌株を MB 培地で培養し、経時的に培養液上清中の NH_4^+ 濃度をインドフェノール青法により測定した。菌を接種していない培地をコントロールとし NH_4^+ の濃度増加から生産能を調べた。

メタゲノムによる系統解析と窒素関連パスウェイ解析

スガモの葉表面の BF 懸濁液から DNeasy PowerBiofilm ki (Qiagen) で DNA を抽出し、Nanopore PCR barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies) でライブラリーを調製後、MinION (Oxford Nanopore Technologies) でロングリードシーケンスを行った。得られた塩基配列をロングリード用のアセンブルソフト Flye (Kolmogorov, N., et al., *Nature Methods*. 2020; doi:s41592-020-00971-x) によってアセンブルし、作成されたコンティグ (約 11,000 contigs, 約 34 Mbp, $N50=2,937$ bp) をメタゲノムアサインソフトの CAT (Von Meijenfeldt, F.A. et al. *Genome biology*. 2019; 20:1-14.) およびパスウェイデータベース KEGG を使用して系統アサインと機能アサインを行った。スガ

モの根表面の砂、水槽の砂、海水についても同様に DNA を抽出後、シーケンスを行った。

4. 研究成果

分離菌株の系統解析

分離できた菌は主に従属栄養性の培地で増殖する細菌であった。窒素源を供給できる微生物を探索するために窒素を含まない培地を用いて嫌気条件や明条件（光合成細菌の存在を考慮して）で分離培養を試したが、どの条件でもほとんどコロニーが形成されず、得られたコロニーについても分離培養すると増殖しなくなったため、窒素固定菌を得ることはできなかった。窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼは通常、酸素によって活性が阻害されるため、多くの窒素固定菌は嫌気性である。ラン藻類の中に一部好気条件でも窒素固定を行えるものが知られている。（スガモの葉には見られなかったが）水槽壁面などにはラン藻類と思われる付着物が見られていたため、窒素固定はスガモの葉以外の場所で行われている可能性がある。

分離できた菌株の 16S rRNA 遺伝子解析を実施し、得られた塩基配列（500bp 以上）から系統樹を作成した（図 1）。葉表面 BF からの分離菌は *Pseudomonadota* 門（ α -および γ -*Proteobacteria* 綱）や *Bacillota* 門（*Bacilli* 綱）に比較的多く見られた。特に *Pseudomonadota* 門 α -*Proteobacteria* 綱に分類された菌については、周辺の海水や砂からはあまり分離されなかったことから、葉表面 BF に特異的に棲息しているグループであることが推測された。

BF からの分離菌の最類似菌株の窒素代謝についてそれぞれ調べた結果、同化的硝酸還元やアンモニア同化を有すると報告されているものが多い傾向が見られた。窒素固定や硝化を行うものは見られなかった。水槽の海水中における NO_3^- 濃度は検出限界以下（10 μM 未満）であったため、実際にこの変換が起こっているかは不明だが、葉表面 BF の懸濁液からは 100 μM オーダー以上で NH_4^+ が検出された。BF 内の微生物によって NH_4^+ が生産され、それが BF 内で保持されることによって植物の成長が促進されていることが考えられた。

直接的には窒素代謝と関係ないが、殺藻細菌として知られているもの（*Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属など）が葉表面と海水から特異的に検出された。これらの細菌が藻類を分解することで BF 内に窒素源が供給されている可能性がある。

BF からの分離菌の一部ではデータベースに登録されている配列と類似度が 97% 程度しかないものが見つかった。特に *Marinomonas* 属の新種と思われる分離菌（O-17 株）については、植物ホルモンの生産能が認められ（後述）、スガモの成長に与える可能性のある新種の菌株を得ることができているかもしれない。

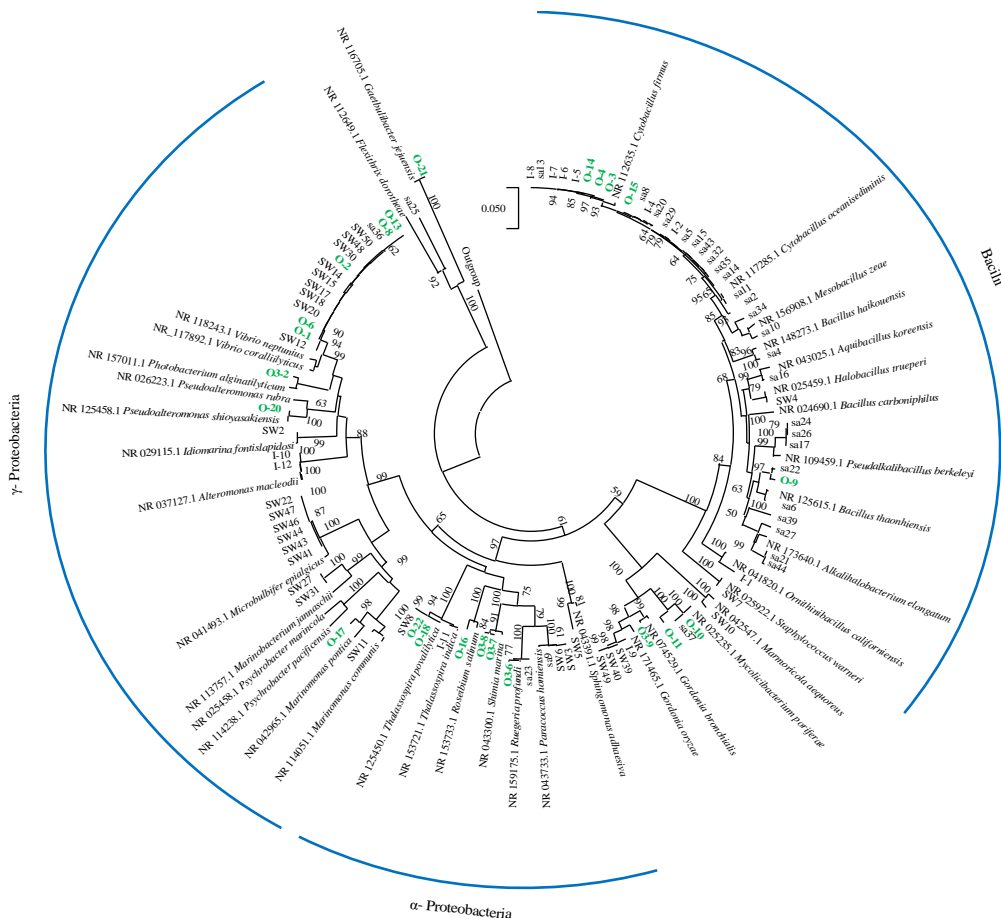


図 1. 分離菌株の 16S rRNA 遺伝子の Neighbor-joining tree.

O: 葉表面 BF からの分離菌（緑文字）、SW: 海水からの分離菌、sa: 砂からの分離菌、I: 葉内部の分離菌（試験的に実施）をそれぞれ表し、それらにつづく番号は菌株の整理番号である。Outgroup としてリュウキュウスガモのミトコンドリアの 16S rRNA 遺伝子を使用した。枝上の数字は Boots strap value (n=500) を示す（60 以上のみ表示）。

葉表面 BF 内微生物のメタゲノム解析

BF から DNA を抽出し、直接 MinION によるロングリードメタゲノムシーケンスに供した。比較対照として根の表面の微生物についても同様に解析した（砂と海水についてはシーケンスの前処理がうまく行えず解析できなかった）。系統アサインでは、葉でも根でも *Pseudomonadota* 門のバクテリアが 60%以上を占めており、続いて *Bacteroidota* 門が 20%程度であった（図 2-a）。残りの割合を占める門は葉と根で大きく異なっていた。

葉と根表面の両方に優占して見られた *Pseudomonadota* 門に着目して属レベルで見ると（図 2-b）（属レベルの解析に対しては MinION のシーケンス精度が低いことに留意）両方で群集構造が大きく異なっており、属レベルでそれぞれ特異的な構成になっていることが明らかになった。葉表面 BF からの分離菌株の遺伝子解析で見られた、殺藻細菌として知られるグループ（*Pseudoalteromonas*）や植物成長促進能を有するとされるグループ（*Marinomonas*）などは特異的に葉に棲息していることが解った。

機能アサインで窒素関連のパスウェイに着目して解析した結果、 NO_3^- から NH_4^+ に変換する経路の遺伝子が BF から揃って検出された（図 3）。窒素固定に関する酵素であるニトロゲナーゼの遺伝子（*niH*, *niD* など）は、葉からは検出されず根表面から検出された。根の表面においては微生物によって固定された窒素が根に供給されていることが考えられた。葉においては N_2 以外の形で窒素が供給されている可能性が高いことが明らかとなった。

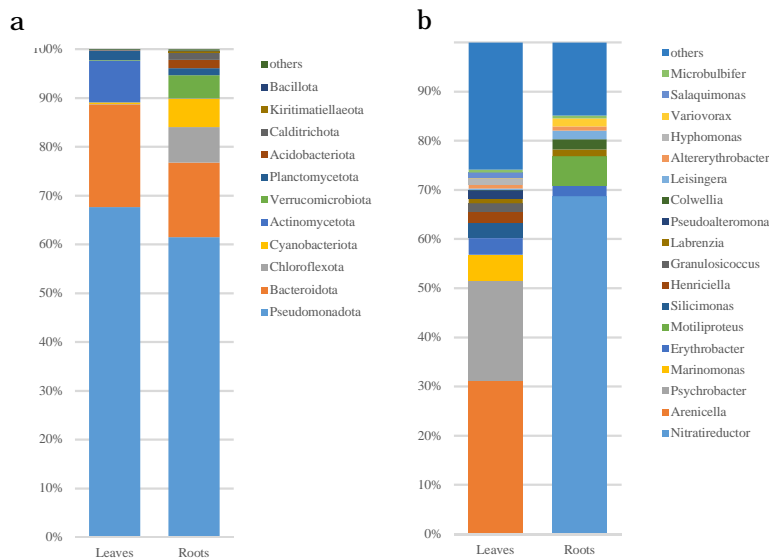
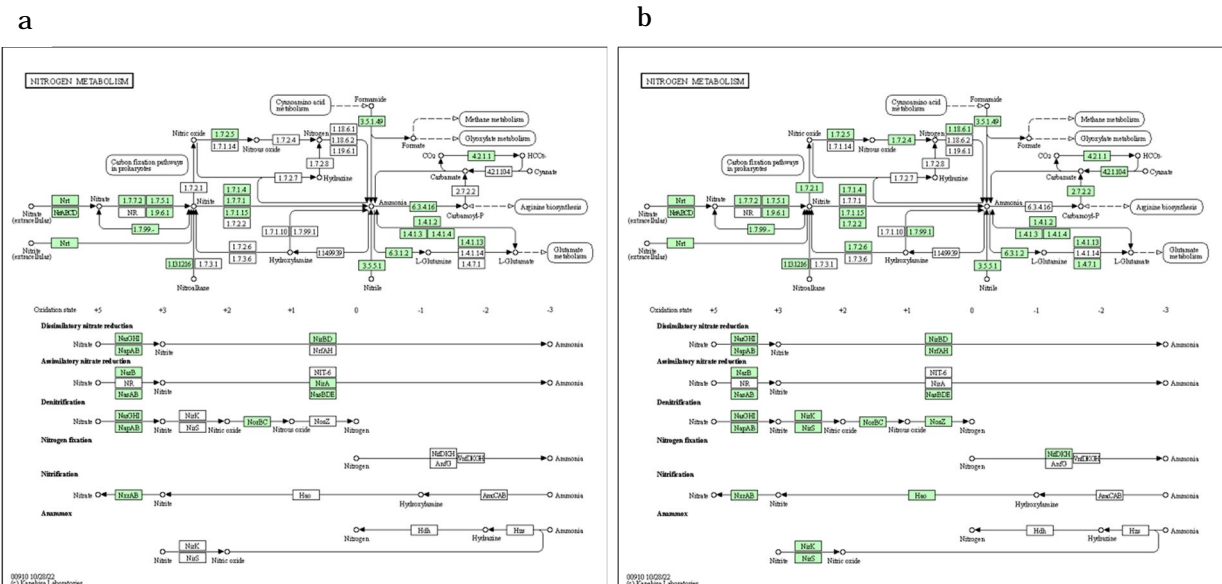


図 2. 葉表面 BF (Leaves) と根表面 (Roots) の微生物の相対存在量 (a; 門レベル、b; *Pseudomonadota* 門の属レベル)



微生物およびBFによるNH₄⁺の取り込み能、生産能の解析

前述したように、窒素固定菌および関連遺伝子が検出されなかったにも関わらず、BF内では海水中よりも高い濃度のNH₄⁺が存在していることが示唆された。(1)BFに海水中からNH₄⁺が取り込まれて濃縮されている可能性、あるいは(2)微生物によりBF内(の細胞外)にNH₄⁺が生産されている可能性が考えられた。そこで、BFや微生物によるNH₄⁺の取り込み能と生産能を解析した。

まず、BFおよび分離菌株によるNH₄⁺の物理的な取り込み能について解析した結果、分離菌株による取り込みは見られなかった(90 min以内)が、スガモの葉では取り込みが見られ、BFが形成されている葉(約1.1 nmol/min)の方が、BFを取り除いた葉(約0.69 nmol/min)よりも速くNH₄⁺を取り込めることが解った。メカニズムは不明だが葉表面BFがスガモのNH₄⁺の取り込みに間接的に関与している可能性が示された。

次に、分離菌株がNH₄⁺を生産して放出するのかを解析した。MB培地で菌を培養し、培地上清中に出てくるNH₄⁺の量を解析した。その結果、一部の細菌(特に殺藻細菌として知られる*Pseudoalteromonas* 属類似の細菌)から多量のNH₄⁺が放出されることが解った。BF中の栄養状態によるが、自身の代謝に利用した窒素化合物の一部をNH₄⁺の形態で放出し、スガモに供給できることが考えられた。

IAA生産能の解析

分離菌株の系統解析およびメタゲノム解析の結果、有機態窒素(トリプトファン)からIAAを生産する菌として知られるものが葉表面BFに多く見られた。そこで、MB培地で培養した分離菌のIAA生産能を解析した。その結果、BFからの分離菌の約45%(18/40菌株)にも及び割合でIAAを生産できる菌が見つかった。これは、砂(約4%;1/26菌株)よりも明らかに多かった。なお、海水ではBFと同程度の割合(約47%;17/36菌株)のIAA生産菌が見られたが、水槽内の海水(および砂)はあらかじめ滅菌しており、スガモ葉表面の細菌が、栽培している間に海水中に移動したものと考えられる。

BF中にはトリプトファンやIAAは検出できなかったが、IAA生産能を持つ分離菌のいくつかをスガモの葉に接種して栽培し、予備的にその影響を調べたところ、分離菌を接種した株の方が接種していない株に比べ、葉の伸長が速く生え変わりのペースも早い傾向(接種あり;5枚/2 weeks、接種なし;3枚/2 weeks)が見られた。また、接種した株を栽培している水槽の壁面に顕著に藻類が増殖する様子が見られた。栽培後の葉からもIAA生産菌が検出されたことから、葉の表面にIAA生産菌が定着し、IAAを通してスガモや藻類の成長を促進した可能性が示唆された。

まとめ

本研究により、BFによるスガモへの窒素供給と植物成長促進メカニズムについて以下のように推測された。すなわち、(1)スガモの葉表面BF内で微生物が他の微生物(例えば殺藻細菌)によって溶菌されることで窒素化合物が放出される。(2)その窒素化合物がNH₄⁺に変換されてBF内に保持されることでスガモの葉に供給される。(3)BF内では有機態窒素の一部からIAAが生産され、新芽の成長と葉の生え変わりを促進する、というメカニズムが考えられた。

今後、殺藻細菌の活性とそのターゲットとなる藻類、および溶菌時に放出される窒素化合物の種類と量について調べ、葉表面にNH₄⁺がどのように供給されているのか確かめる必要がある。また、スガモの葉は生え変わりが早いいため、BF内の微生物群集がどのようにして形成されているのか解明することで、植物の成長に効果的な微生物の安定的定着と、それによる成長促進を可能にする知見が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山潮、土屋雄揮、中川達功、高橋令二
2. 発表標題 リュウキュウスガモ (<i>Thalassia hemprichii</i>) の葉表面におけるオーキシン生産菌の群集構造と機能の解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋雄揮、横山潮、中川達功、高橋令二
2. 発表標題 リュウキュウスガモ (<i>Thalassia hemprichii</i>) の葉表面に棲息する微生物の機能解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 雄揮 , 村中 優紀 , 中川 達功 , 高橋 令二
2. 発表標題 アマモ葉表面に形成されたバイオフィルム内の微生物群集構造の解析
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 達功 , 石川 直央也 , 須藤 健吾 , 森川 翠 , 宮本 優貴 , 神宮寺 賢 , 富澤 璃乃 , 土屋 雄揮 , 上田 眞吾 , 福井 学 , 高橋 令二
2. 発表標題 ショットガンメタゲノム解析による厚岸湖アマモ群落の底泥における亜酸化窒素還元微生物の 群集構造解析
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------