

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22151

研究課題名（和文）微生物のシデロフォアが関与するヨシの鉄プラーク形成機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of mechanism of iron plaque formation in *Phragmites australis* via microbial siderophores

研究代表者

山路 恵子（YAMAJI, Keiko）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00420076

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ウラン鉱山の鉱さいせき場で自生している湿生植物のヨシは根の周囲に鉄プラークを発達させ、鉄、マンガン及びウランを蓄積している。細菌の産生する代表的なシデロフォアにはカテコール骨格を有するものが多く存在するが、カテコール骨格を有する化合物はFeと沈殿を生じることが知られている。鉄プラークの形成に内生細菌のシデロフォアが関与する可能性を考え、内生細菌のシデロフォア産生能を確認したところ、分離された837菌株のうち88.6%に相当する742菌株がシデロフォア産生能を有していた。また、細菌の代謝産物がFeとの沈殿を形成させることが明らかとなり、シデロフォアと考えられるフェノール性化合物も検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉱山跡地で生育する植物と微生物の複合共生系における元素吸収機構を総合的に解明する研究事例は、国内においてはほとんどなく国際的にも決して多いとは言えない。ヨシは水質浄化能力が高い植物として知られるが、根に形成される鉄プラークが重要な役割を果たしていることが知られている。実際の現場に生育するヨシの根に生息する内生細菌がシデロフォアを産生し、鉄プラークの形成に関与する可能性を示した本成果は、実際の現場における植物を用いた浄化処理技術の発展に利用できると考える。

研究成果の概要（英文）：*Phragmites australis*, a wetland plant native to uranium mine tailings sites, developed iron plaques around their roots and accumulated Fe, manganese, and uranium. Many typical siderophores produced by bacteria have a catechol skeleton, but compounds with a catechol skeleton are known to precipitate with Fe. Considering the possibility that endophytic bacterial siderophores may be involved in the formation of Fe plaques, we confirmed the siderophore-producing ability of endophytic bacteria and found that 742 strains, or 88.6% of the 837 strains isolated, had the ability to produce siderophores. It was also found that bacterial metabolites precipitated with Fe, and phenolic compounds thought to be siderophores were also detected.

研究分野：環境生態化学

キーワード：ヨシ 鉄プラーク 内生細菌

1. 研究開始当初の背景

日本列島は豊かな鉱物資源に恵まれ、日本各地では多数の鉱山開発が行われてきた。長年に渡り日本の経済発展に貢献してきたが、高度経済成長期に次々と閉山した。現在も鉱山跡地には坑水や鉱さいに高濃度の重金属が存在するため、浄化処理が連綿と続けられている。しかし、化学的な浄化処理技術には多大なコストがかかるため、長期的な浄化を視野に入れると、植物や微生物を利用した浄化方法が環境負荷低減策としては有効と考えられており、国内・海外で注目されている。

現在、植物を利用した浄化方法で期待されている植物の一つにヨシ *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. がある。ヨシは重金属やウランを吸収するという報告 (Peverly et al., 1995; 荻野ら, 2001; Shitaka et al., 2002; Weis and Weis, 2004; Wang and Dudel, 2017; Rezanian et al., 2019) が多数あり、水質浄化を行うことが可能な植物種であることが報告されてきた。ヨシのウラン・重金属蓄積機能を明らかにするためには、植物の元素吸収機構において寄与度が高い微生物を考慮に入れ、植物単体ではなく微生物との共生系を考慮する必要がある。原子力研究開発機構の人形峠環境技術センター内にある鉱さいたいせき場に自生するヨシを対象としたこれまでの研究により、1) ヨシの根にはウランや重金属元素が高濃度蓄積していること、2) 根に生息する細菌がつくるシデロフォア (鉄と錯形成をする有機化合物) によってヨシ根圏で鉄プラークが形成される可能性があること、が判明した。重金属元素を吸着する性質がある鉄プラークの形成機構を明らかにすることは、ヨシを水質浄化に利用する際に重要な知見を提供すると考える。

2. 研究の目的

原子力研究開発機構の人形峠環境技術センター内にある鉱さいたいせき場に自生しているヨシの根から分離した内生細菌を使用して、内生細菌が産生するシデロフォアによる鉄プラークの形成を解析することにより、ヨシにおける重金属やウランの蓄積要因となる鉄プラークが微生物の関与により形成される可能性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヨシにおけるウラン及び重金属の蓄積特性

成長期の7月及び9月に、ヨシを調査地から採取した。採取した植物体は葉、茎、節根、穂の4部位に分け、水道水と脱塩水を用いて洗浄した後、80℃、48時間乾燥させた。粉碎した乾燥試料は酸分解後、誘導結合プラズマ発光分光分析装置で鉄、マンガンを測定した。また、500℃で灰化させた試料は酸分解後、誘導結合プラズマ質量分析装置でウラン濃度を測定した。また、鉄プラークが付着したヨシの節根については、SPring-8のBL37XUによって鉄およびウランの局在部位を観察した。さらに、鉄の化学形態を明らかにするために、高エネルギー加速器研究機構のBL4Aにおいて鉄プラークのXANESを測定した。

(2) シデロフォアを産生する内生細菌の同定

微生物が産生する化合物の中には、鉄と錯体構造を形成する有機化合物であるシデロフォアが知られている (Varma and Chincholkar, 2007)。CAS アッセイ (Alexander and Zuberer, 1991) により、ヨシの根から分離された内生細菌のシデロフォア産生能を調べたところ、ヨシの根から分離した細菌 837 菌株のうち、60.8%に相当する 509 菌株に顕著なシデロフォア産生能が確認された (図1)。特に産生能が高かった上位 10 菌株については DNA 同定を行い、以下の (3) の実験に使用した。

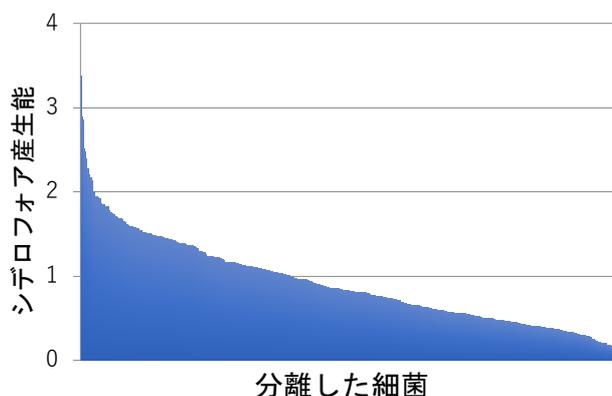


図1 ヨシの根から分離された内生細菌のシデロフォア産生能

(3) 細菌培養濾液による鉄沈殿形成実験

内生細菌の培養にはrhizosphere medium (RSM培地; Buyer et al., 1989) を用いた。シデロフォア産生能が高かった上位10菌株をRSM液体培地で 23 °C、60時間振とう培養した。培養後、滅菌フィルターで培養濾液を濾過し、減圧条件下で濃縮後、4倍濃縮液を調製した。カップ法により、4倍濃縮した培養濾液のシデロフォア活性をCAS-Fe寒天培地上で確認した。その後、4倍濃縮した培養濾液 (500 μL) を2 mM 硫酸鉄 (Fe²⁺) (500 μL in 40 mM MES; pH 5.5) または 2 mM 塩化鉄 (Fe³⁺) (500 μL in 40 mM MES; pH 5.5) と混合した。比較としてFe²⁺及びFe³⁺を含まない40 mM MES (500 μL) と4倍濃縮した培養濾液 (500 μL) を混合したものを準備した。Controlには、4倍濃縮したRSM培養液を使用した。3時間静置後、鉄との沈殿物の有無を確認した。

(4) 内生細菌の代謝産物分析

内生細菌の培養濾液に含まれるフェノール性化合物を高速液体クロマトグラフィー及びダイオードアレイ検出器により測定した (Yamaji and Ichihara, 2012)。4倍濃縮した培養濾液 (10 μL) を HPLC-DAD に導入し、各ピークの 220–400 nm の UV スペクトルを確認した。各ピークの UV スペクトルは本研究室の HPLC システムのライブラリに保存されている catechol, coniferyl alcohol, chlorogenic acid, resorcinol, protocatechuic acid, cinnamic acid, gallic acid, catechins, flavonoids, 及び ellagic acid などの一般的なフェノール性化合物の UV スペクトルと比較した。

4. 研究成果

(1) ヨシにおけるウラン及び重金属の蓄積

鉄及びマンガンは全ての植物部位で検出された。鉄の濃度は節根で有意に高く、マンガン濃度は茎や穂よりも節根で有意に高かった。ウランは主に節根で検出された。鉄プラークが確認された節根では、鉄、マンガン、ウランが検出され、中でも鉄が最も高濃度であった。

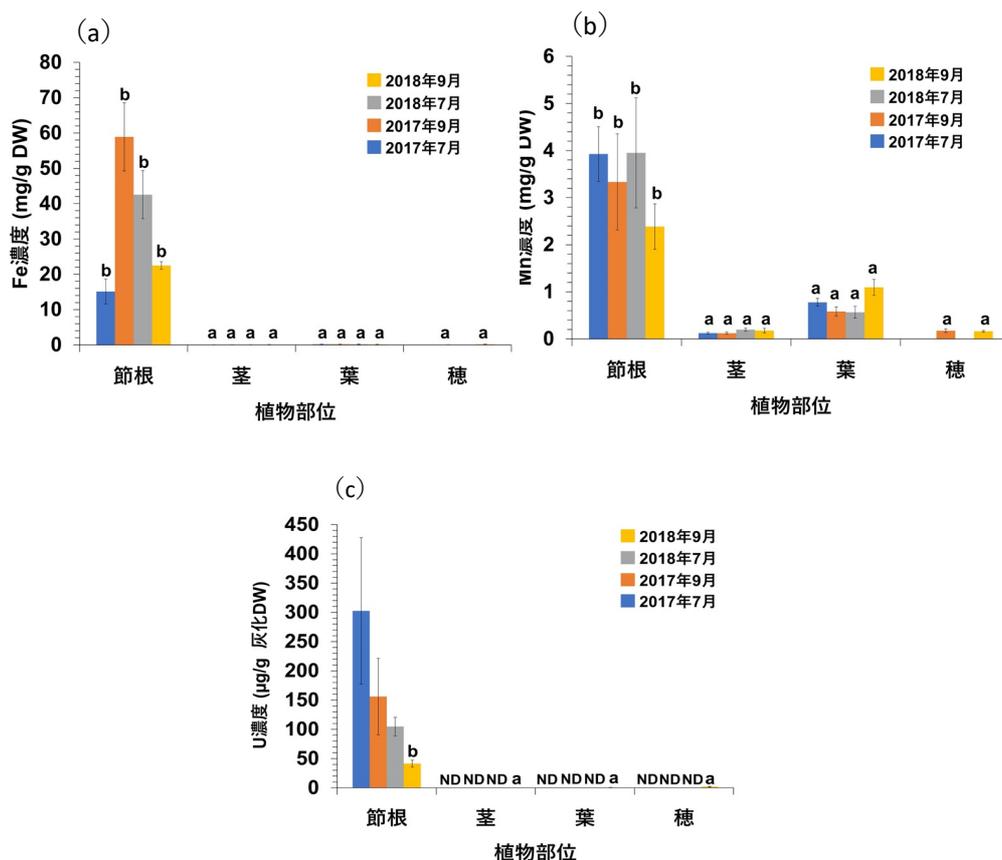


図2 ヨシの各組織における鉄、マンガン及びウランの分析結果

(a) 鉄濃度 (b) マンガン濃度 (c) ウラン濃度

エラーバーは標準誤差を示す。図中のアルファベットは月ごとの各部位における one-factor ANOVA (Sheffé 法) による検定を行った結果を示す (p < 0.05 n = 5)。定量下限未満の結果については ND として示した。

SPring-8 の BL37XU によってヨシの鉄プラークにおける鉄およびウランの局在部位を観察した結果、鉄プラークには鉄と共にウランやマンガンが局在していることが確認された。鉄プラークが付着したヨシの節根の XANES を測定した結果、約 90%が ferrihydrite であった。Ferrihydrite 等の水酸化鉄は金属に対する親和性が高く、金属を吸着する能力を有することが知られている (Greipsson and Crowder, 1992; Tripathi et al., 2014) ことから、節根において鉄プラークはマンガン及びウランを高濃度に蓄積する場所として機能していると考えられた。

(2) シデロフォアを産生する内生細菌の同定

内生細菌の DNA 解析より、高いシデロフォア産生能を示した上位 10 菌株は、*Pseudomonas* 属、*Herbaspirillum* 属及び *Rhizobium* 属細菌と同定された。特に *Pseudomonas* 属細菌にはシデロフォア産生に関する報告が多く報告されている (Varma and Chincholkar, 2007)。

(3) 細菌培養濾液による鉄沈殿形成細菌及び内生細菌の代謝産物分析

Pseudomonas 属細菌及び N1-76, *Rhizobium* 属細菌の培養濾液において、鉄を添加した際に沈殿が確認された。シデロフォア活性を示した内生細菌の代謝産物を HPLC-DAD で分析した結果、対照区と比較して2つのフェノール性化合物のピークが確認された。本研究室のライブラリデータの一般的なフェノール性化合物のUVスペクトルとは一致しなかったため、シデロフォアを単離・精製し、機器分析による同定が必要である。

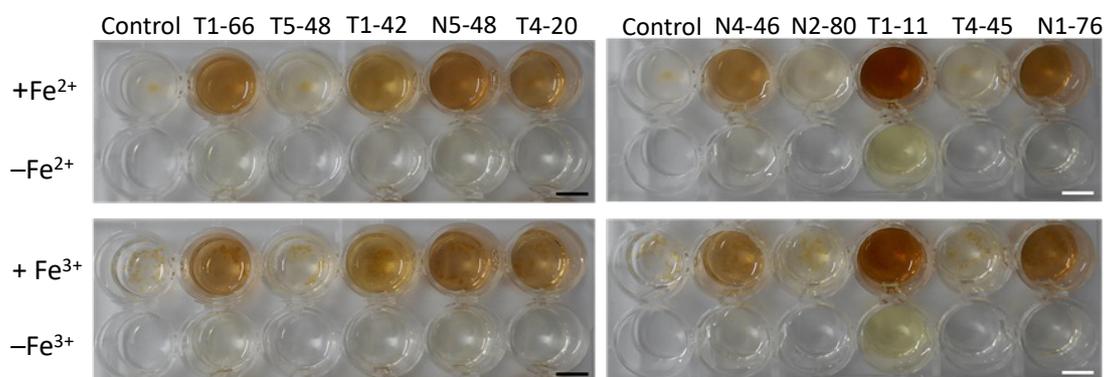


図3 シデロフォア活性を示した内生細菌の培養濾液による鉄沈殿形成
 T1-66、T1-42、N5-48、T4-20、T1-11、N1-76 : *Pseudomonas* 属細菌
 T5-48、N2-80、T4-45 : *Herbaspirillum* 属細菌 N4-46 : *Rhizobium* 属細菌
 Controlには、4倍濃縮したRSM培養液を使用した。

(4) まとめ

ウラン鉱山の鉱さいたいせき場で自生しているヨシは、鉄、マンガン及びウランを蓄積しており、ウランや鉄、マンガンの蓄積部位として根の周囲に鉄プラークが存在していた。調査地のヨシに確認された鉄プラークの形成に内生細菌の産生するシデロフォアが関与する可能性を考え、実験を行った。ヨシの根から分離した細菌837菌株のうち、60.8%に相当する509菌株に顕著なシデロフォア産生能が確認された。DNA解析による同定の結果、高いシデロフォア活性を示した上位10菌株は *Pseudomonas* 属細菌、*Herbaspirillum* 属細菌、*Rhizobium* 属細菌であった。これら上位10菌株の内生細菌が産生するシデロフォアが鉄プラーク形成に寄与するか確認するため、鉄イオン (Fe^{2+} 及び Fe^{3+}) と、内生細菌の培養濾液を混合させると、*Pseudomonas* 属細菌及び *Rhizobium* 属細菌の代謝産物が鉄との沈殿を形成させることが明らかとなった。また、HPLC-DAD 分析の結果、*Pseudomonas* 属細菌4株、*Rhizobium* 属細菌 1株のシデロフォア活性を示した培養濾液からはフェノール性化合物が検出された。細菌の産生する代表的なシデロフォアにはカテコール骨格を有するものが多く存在するが、カテコール骨格を有する化合物は鉄と沈殿を生じるということが知られている (Ejima and Richardson, 2017)。以上のことから、内生細菌が産生するシデロフォアがヨシの鉄プラークの形成に関与する可能性が示唆された。本報告では詳細は示していないが、同じ調査地の上流域に自生するヨシに着目し、同様の調査・実験を行なったところ、同じ調査地でも、酸化・還元状態が多少異なる水環境においては、1) 鉄プラークの発達には顕著な差があること、2) ヨシの重金属蓄積にも差があること、3) 根における微生物相にも差があること、3) などが明らかになった。本結果は、同じ調査地内であってもヨシの生育環境によっては植物の蓄積特性や微生物の機能には差があることを示しており、今後の継続調査が必要とされる。本報告は発表論文 Nakamoto et al. (2021) の成果を基にまとめた。

<引用文献>

- Alexander, D. B., Zuberer, D. A. (1991) *Biology and Fertility of Soils* 12: 39–45.
- Buyer, J. S., Sikora, L. J., Chaney, R. L. (1989) *Biology and Fertility of Soils* 8: 97–101.
- Ejima, H., Richardson, J.J. (2017) *Caruso, F. Nano Today* 12: 136–148.
- Greipsson, S., Crowder, A. A. (1992) *Canadian Journal of Botany* 70: 824–830.
- Peverly, J.H., Surface, J.M., Wang, T. (1995) *Ecological Engineering* 5: 21–35.
- Rezania, S., Park, J., Rupani, P.F., Darajeh, N., Xu, X., Shahrokhishahraki, R. (2019) *Environmental Science and Pollution Research* 26: 7428–7441.
- Shitaka, Y., Takayuki, T., Sato, K. (2002) *Journal of Nuclear Science and Technology* 39: 958–961.
- Tripathi, R. D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Kumar, A., Mishra, A., Chauhan, P. S., Norton, G. J., Nautiyal, C. S. (2014) *Metallomics* 6: 1789–1800.
- Varma, A., Chincholkar, S. B. (2007) *Microbial siderophores*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wang, W., Dudel, E.G. (2017) *Environmental Science and Pollution Research* 24: 12185–12194.
- Weis, J.S., Weis, P. (2004) *Environment International* 30: 685–700.
- Yamaji, K., Ichihara, Y. (2012) *Forest Pathology* 42: 1–7.
- 荻野激, 遠藤祐司, 黒沢邦彦. (2001) *北海道立地質研究所報告* 72: 115–120.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamoto Yukihiro, Doyama Kohei, Haruma Toshikatsu, Lu Xingyan, Tanaka Kazuya, Kozai Naofumi, Fukuyama Kenjin, Fukushima Shigeru, Ohara Yoshiyuki, Yamaji Keiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Fe, Mn and 238U Accumulations in Phragmites australis Naturally Growing at the Mill Tailings Pond; Iron Plaque Formation Possibly Related to Root-Endophytic Bacteria Producing Siderophores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Minerals	6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/min11121337	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 Tani Yukinori, Kakinuma Satomi, Chang Jianing, Tanaka Kazuya, Miyata Naoyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Preferential Elimination of Ba ²⁺ through Irreversible Biogenic Manganese Oxide Sequestration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Minerals	6. 最初と最後の頁 53 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/min11010053	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 Tanaka Kazuya, Kozai Naofumi, Yamasaki Shinya, Ohnuki Toshihiko, Kaplan Daniel I., Grambow Bernd	4. 巻 182
2. 論文標題 Adsorption mechanism of ReO ₄ ⁻ on Ni-Zn layered hydroxide salt and its application to removal of ReO ₄ ⁻ as a surrogate of TcO ₄ ⁻	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Clay Science	6. 最初と最後の頁 105282 ~ 105282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clay.2019.105282	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miyu Okuma, Keiko Yamaji, Yukihiro Nakamoto, Kenjin Fukuyama, Yasumichi Tsunashima
2. 発表標題 Elucidation of heavy-metal tolerance mechanism in Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steud. without iron plaque formation
3. 学会等名 INTECOL 2022 Frontiers in Ecology: Science & Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko Yamaji, Yukihiro Nakamoto, Kohei Doyama, Toshikatsu Haruma, Xingyan Lu, Kazuya Tanaka, Naofumi Kozai, Kenjin Fukuyama, Shigeru Fukushima, Yoshiyuki Ohara
2. 発表標題 Heavy-metal accumulations in <i>Phragmites australis</i> naturally growing at mill tailings pond; iron plaque formation related to siderophores by root-endophytic bacteria
3. 学会等名 INTECOL 2022 Frontiers in Ecology: Science & Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中本幸弘、山路恵子、春間俊克、土山紘平、盧星燕、田中万也、香西直文、福山賢仁、福嶋繁、小原義之
2. 発表標題 鉱さいたい積場のヨシにおける重金属元素の蓄積及び鉄ブランク形成へ関与する内生細菌
3. 学会等名 日本生態学会第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春間俊克、土山紘平、田中万也、高橋嘉夫、福山賢仁、小原義之、山路 恵子
2. 発表標題 ヨシの根におけるウラン吸着能および鉄ブランク形成機構の解明
3. 学会等名 日本生態学会第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山路恵子、春間俊克、中本幸弘、土山紘平、盧星燕、野路建太、升屋隼人、田中万也、田村憲司、小川和義、森茂太、黒澤陽子、香西直文
2. 発表標題 鉱山跡地の自生植物と機能性微生物の相互作用の解明
3. 学会等名 第71回コロイドおよび界面化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本幸弘、山路恵子、春間俊克、土山紘平、小原義之、福山賢仁、福嶋繁
2. 発表標題 ヨシ(Phragmites australis)におけるウラン及び重金属(Fe, Mn)蓄積への内生細菌の関与
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021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	田中 万也 (TANAKA Kazuya) (60377992)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究 部門 原子力科学研究所 先端基礎研究センター・研究主幹 (82110)	
研究 分担者	香西 直文 (KOZAI Naofumi) (80354877)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究 部門 原子力科学研究所 先端基礎研究センター・研究主席 (82110)	

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