

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号:35403

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2008 ~ 2011

課題番号:20404023

研究課題名(和文) 東南アジアの微生物共生系による持続的バイオマス生産と生物変換に関する調査研究

研究課題名(英文) Sustainable biomass production by microbial symbiosis and its bioconversion in Southeast Asia

研究代表者

室岡 義勝 (MUROOKA YOSHIKATSU)

広島工業大学・情報学部・教授

研究者番号:60029882

研究成果の概要(和文):日本、タイ、マレーシア、インドネシア、フィリッピンおよびベトナムの科学者が、東南アジア各地域の植物と共生する窒素固定細菌・微細藻類および菌根菌を採取して、持続的バイオマス生産への効果を調査・研究した。共生微生物をバイオコンポストとして用いた結果、イネやマメ科作物などの食糧生産、デンプンやセルロース資源バイオマスの生育促進およびヤシ油・ジャトロファ油の増産を促した。共生微生物によって、エコシステムが構築され化学肥料の削減をもたらした。ここに、持続的食料およびバイオマス資源生産に共生微生物を積極的に利用することを提言する。

研究成果の概要(英文): In Southeast Asia, many species of microorganisms co-grow with plants by symbiotic system. We selected such excellent microbes and applied to use in cultivation of plants and crops by collaboration with scientists from Japan, Thailand, Malaysia, Indonesia, Philippines and Vietnam. These microbial symbioses resulted in increasing the sustainable productions of foods, cellulosic biomass resource and Palm/Jatropha oils with minimal use of chemical fertilizer. Here, we propose that peoples facilitate to use such symbiotic microbes in sustainable production of foods and biomass resources.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	3,300,000	990,000	4,290,000
21年度	3,100,000	930,000	4,030,000
22年度	3,100,000	930,000	4,030,000
23年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野:生物工学

科研費の分科・細目:生物機能・バイオプロセス

キーワード:(1)国際研究者交流・タイ:インドネシア:フィリッピン:ベトナム:マレーシア・バイオマス・環境調和型農林水産・共生工学・バイオ燃料・窒素固定・微生物-植物共生系

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化問題から、従来自然界で行われてきたマメ科植物と土壌細菌との共生によ

る空気中の窒素をアンモニアに変換する窒素固定を、共生のモデルとしてとらえ、日本および世界において基礎研究が盛んとなり、

共生の遺伝分子生物学メカニズムが明らかになりつつある。東南アジアにおいて、共生微生物は痩せた土壌の富肥沃化剤として利用されてきたが、学術的研究は充分でなかった。

研究代表者は、過去 20 年以上、科研費海外学術共同研究などを通して、東南アジア各国の研究者と学術共同研究を行い、生物共生研究ネットワークを構築した。こうした東南アジアにおけるバイオ分野総合調査研究と人的ネットワークが評価され、その国際共同調査研究の再開が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 東南アジアの窒素固定細菌、微細藻類および菌根菌などの共生微生物による持続的バイオマス生産とその効率的バイオ産物変換に関する総合調査を組織的かつ継続的に日本及び東南アジアの研究者が共同調査研究する。(2) こうした共生微生物の利用が化学肥料の消費を抑え、持続的バイオマス生産に寄与し得ることを科学的に評価する。

(3) バイオマスの有効利用技術のあり方を調査研究することにより、今後のエネルギー・食糧供給の方策を提案し、国際学術交流の実をあげることを目的とする。

3. 研究の方法

日本と東南アジアの共生微生物研究者との連携のもと、各地で採集した窒素固定菌の化学・遺伝分類を日本の研究代表者および研究分担者の研究室で実施する。菌根菌については、タイの農林省土壌科学部門の研究センターおよびインドネシアの LIPI-B IOTECH の研究協力者が実施する。(1) 東南アジアに生息する窒素固定細菌、微細藻類、リン溶解菌および植物にリンなどを供給する菌根菌を採集し、それら微生物株を遺伝系統分類し、土壌環境・地力回復とバイオマス生産に及ぼす効果などを調べる。

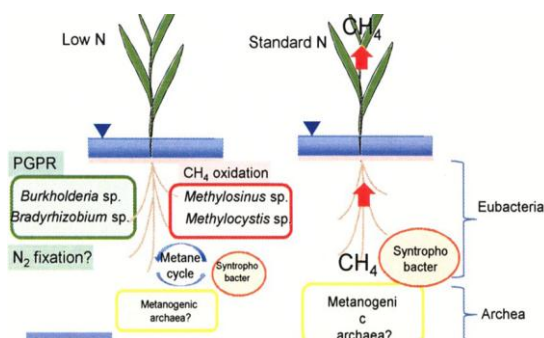
(2) 窒素固定能の優れた菌株および菌根菌を選別し、これらを有機コンポストに接種し、バイオコンポストを育成する。(3) バイオコンポストのコメ収量への影響と化学肥料削減量を試験する。(4) バイオコンポストによるデンプンおよびセルロース資源バイオマス、さらに植物オイルの増産を試験する。(5) タイ、インドネシア、日本、マレーシアにおいて毎年フィールド

調査を実施するとともに、ワークショップを開催し、研究成果の報告、意見交換を行い、技術の共有化を図る。

4. 研究成果

(1) 日本、タイ、マレーシア、インドネシア、フィリピンおよびベトナムの研究者が、それぞれの地域に生息する窒素固定細菌・微細藻類および菌根菌を採取・利用して、土壌環境とバイオマス生産との関係を調査・試験した。(2) これら共生微生物を有機コンポストに接種してバイオコンポストを作り、土壌に加えたところ、イネやマメ科作物などの収量の増加を見た。(3) さらに、デンプンやセルロース資源バイオマス生産およびヤシ油・ジャトロファ油の増大を促し、化学肥料の軽減をもたらすなどの結果を得た。

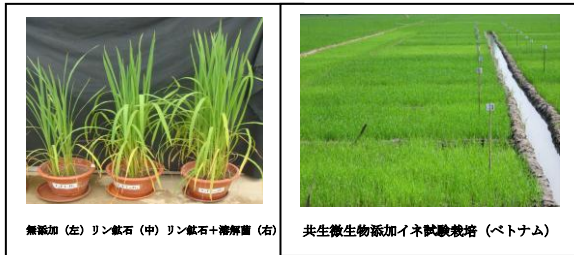
(1) **食糧バイオマス**：①マメ科植物根圏の窒素固定菌およびイネの茎より窒素固定エンドファイトを採取し、遺伝子分類した(研究分担者、南澤、阿部)。②南澤らは、稲田の窒素量が多いとメタン生成菌が増え、窒素量が低いと窒素固定細菌などが増えること、窒素肥料低減によって農地の土壌微生物フロラがよりエコシステムに変化すること



を発見した(上図)。③研究協力者の Drs. N. Teaumroong & N. Boonkerd (Suranaree 工科大) はタイの水田に生息するアゾラなど微細藻類とイネとの共生がコメ生産量を向上させることを実証した(下表)。

パラメーター	従来法	アゾラバイオコンポスト
発芽日数(days)	30	10
収穫時背丈(cm)	120	185
収穫日数 (days)	145	135
1本あたり種子(number)	210	300
穀モミ (%)	14	5
種子重量 (1,000 seeds/g)	23	29
米収量 (kg/ha)	3,600	8,100

④ 研究協力者の Ms. Sukiman (LIPI-BIOTECH)は、インドネシアの試験農場において、ダイズとイネの輪作が生産性向上に有効であることを実証した。⑤研究協力者の Dr. Hiep (ベトナム、カントー大学) はメコン川流域の農業地帯のイネ栽培に、窒素固定菌およびリン溶解菌を利用することにより合成化学肥料を 1/2~1/3 に削減できることを実証した (下写真)。

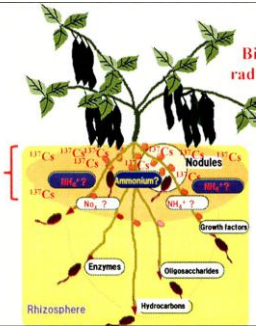


(2) バイオコンポスト、生物農薬：①採取した共生微生物をバイオコンポストにして、タイ、フィリピン、インドネシアにおいて製品化した、食料バイオマスの収量増産を図った (Dr. Boonkard, Dr. Espiritu, Ms. Harmastini)。



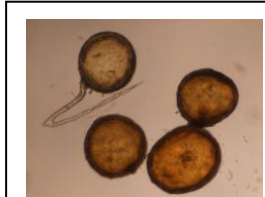
②また研究分担者の山田は、ファージを利用した生物農薬が植物病原菌に有効であることを示した。

(3) 環境浄化：室岡 (研究代表者) および



山下 (研究分担者) は、稻田の緑肥として利用されてきた、窒素固定共生植物のレンゲソウが稻田のカドミウムなどの重金属や放射性セシウムの浄化に利用できることを提案した (左図、レンゲによる Cs 吸収)。

(4) 樹木バイオマス：樹木と共生する菌根菌および窒素固定細菌を探索し、樹木の種類と土壤環境との関連を調査・試験した。①阿部 (研究分担者) や Dr. Nungtagij はタイにおいて、Ms. Sukiman はジャワ島、スマトラ



菌根菌の孢子

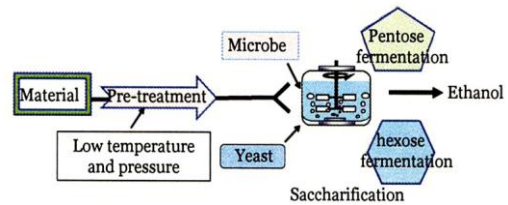


菌根菌接種 (左) 無接種 (右)

島、カリマンタン島において、共生微生物接種が苗木の生育を促進し、森林再生の植樹に有効であることを実証した (左下写真)。②研究協力者の Dr. Najimudin (USM) のグループはマレーシアにおいて、Dr. Espiritu はフィリピンにおいて、熱帯樹木の生育促進やパーム油、ジャトロファ油生産に菌根菌および窒素固定菌を添加したバイオコンポストが有効であることを実証した。



(5) バイオマスの有効利用：アルコール、ジゼル油などバイオ燃料生産の実情調査と技術開発を行った (研究分担者、久松；研究協力者、Dr. Espiritu, Dr. Boonkerd)。久松らは、ソフトセルローズ系バイオマスや廃棄農産物を効率よくエタノールに変換する酸耐性・好熱性でヘキソースやペントースを発酵できる酵母菌を草津温泉から分離し、



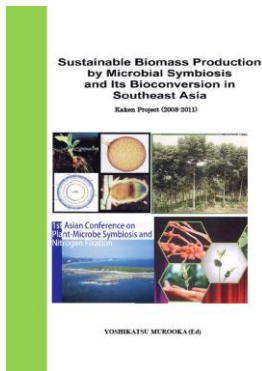
試験研究を行った (上図)。

(6) ワークショップの開催：東南アジアに適したバイオマス資源を策定し、その持続的生産の技術開発について討議した。①タイ、インドネシア、宮崎およびマレーシアにおいて共生微生物利用によるバイオマス生産の



インドネシア、ボゴールにおけるワークショップ (2009年)

フィールド調査を実施した。②また、各国においてワークショップを持ち回りで開催し、科研費研究成果を発表し、技術開発、試験栽培結果などを討議した。毎年、ワークショップの要旨集を編集し、参加者に配布した。



プの要旨集を編集し、参加者に配布した。

(7) 調査研究報告書作成：最終年度に 364 ページからなるカラーの科研調査研究報告書を製本し、国内外の関連機関・関連研究者に配布した。

(8) 調査研究結果からの提言：

日本および東南アジア各地域に生息する窒素固定菌・微細藻類や菌根菌などの植物共生微生物を積極的に利用することにより、合成化学肥料を最小限に抑えた持続的食料生産とバイオマス生産に寄与することが実証された。関連機関は、こうしたエコシステムを推奨されるようここに提言する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び研究協力者には下線)

[雑誌論文] (計 91 件) 全て査読有

1. Naoto Isono, 他 3 名, and Makoto Hisamatsu. A comparative study of ethanol production by *Issate henkia orientalis* strains under stress conditions. J. Biosci., Bioeng., 113 (1):76-78. (2012).
2. Piromyous, P., 他3名, Boonkerd, N., and Teaumroong, N., Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. European J. Soil Biology. 47: 44e54 (2011).
3. Watanarajanapom, N., Boonkerd, N., 他 2 名, Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for citrus growth promotion and *Phytophthora* suppression. Scientia Horticulturae, 128:423-433 (2011).
4. Ikeda S., 他 14 名, and K. Minamisawa. *OsCCaMK* genotype determines bacterial communities in rice

roots under paddy and upland field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 77:4399-4405 (2011).

5. Eda, S., H. Mitsui, and K. Minamisawa. Involvement of the *SmeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2855-2862 (2011).

6. Ikeda, S., 他 9 名, and K. Minamisawa. Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on the leaf-associated bacterial community in soybeans. Appl. Environ. Microbiol. 77: 1973-1980 (2011).

7. Murakami E, 他 4 名, Abe M., Hashimoto M., and Uchiumi T., Nitric oxide production induced in roots of *Lotus japonicus* by lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti*. Plant Cell Physiol. 52(4): 610-617.(2011)

8. Tharek, M., 他 3 名, and Najimudin, N. Ascending endophytic migration of locally isolated diazotroph, *Enterobacter* sp. strain USML2 in rice. Biotechnology 10: 521-527 (2011)

8. Leelahawng, C., Nuntagij, A., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Pongsilp, N. Characterization of root-nodule bacteria isolated from the medicinal legume *Indigofera tinctoria*. Ann. Microbiol., 60: 65-74 (2010).

9. Wei M, Minamisawa K., 他 8 名, Abe M., Ishii S, Ohwada T. Temperature-dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23(5): 628-637(2010)

10. Van de Velde W, 他 12 名, Abe M., 他 5 名. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. Science, 327(5969): 1122-1126 (2010).

11. Yamaura M, Uchiumi T, Higashi S, Abe M., and Kucho K. Identification of *Frankia* genes induced under nitrogen-fixing conditions by suppression

- subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(5): 1692-1694 (2010).
12. Masuda, S., 他 3 名, and K. Minamisawa. Thiosulfate-dependent chemolithoautotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2402-2409 (2010).
13. Wei, M., K. Takeshima, T. Yokoyama, K. Minamisawa, 他 11 名. Temperature-dependent expression of Type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 628-637 (2010).
14. Sukiman H. I. Endophytes of *Taxus sumatrana* (Miquel) and its potential on Producing Bioactive Compound as Antioxidant Agent. *Berita Biologi Journal* 10(3): 357 – 370, ISSN 0126 -1754 (2010)..
15. Maekawa, T., M. Maekawa-Yoshikawa, N. Takeda, H. Imaizumi-Anraku, Y. Murooka, and M. Hayashi. Gibberellin controls the nodulation-signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 58: 183-189 (2009).
16. Kim, J-H., Sunako, M., H. Ono, Y. Murooka, E. Fukusaki, and M. Yamashita. Characterization of the C-terminal truncated form of amyloppululanase from *Lactobacillus plantarum* L137. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 124-129 (2009).
17. Maekawa-Yoshikawa, M. and Murooka, Y. Root hair deformation of symbiosis-deficient mutants of *Lotus japonicas* by application of nod factor from *Mesorhizobium loti*. *Microbes Environ*, 24: 128-134 (2009).
18. Sudtachat, N., 他 6 名, and K. Minamisawa. Aerobic vanillate degradation and C1 metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5012-5017. (2009).
19. Tominaga A, 他 3 名, Abe M., 他 6 名. Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant enhanced nitrogen fixation1 of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 151(4): 1965-1976, (2009).
20. Shimoda Y., 他 5 名, Abe M., Higashi S, Uchiyumi T. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizoiium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, 57(2):254-263 (2009).
21. T.A.T.P. Thalagala, 他 5 名, and M. Hisamatsu. Study on a new preparation of D-glucose rich fractions from various lignocelluloses through a two-step extraction with sulfuric acid. *J. Appl. Glycosci.* 56:1-6. (2009).
22. T.A.T.P. Thalagala, 他 5 名, and M. Hisamatsu. Study on ethanol fermentation using D-Glucose rich fraction obtained from lignocelluloses by the two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF121. *J. Appl. Glycosci.*, 56:7-11.(2009).
23. Yano, K., 他 13 名, Y. Murooka, M. Kawaguchi, H. Imaizumi-Anraku, M. Hayashi, and M. Parinske. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 105: 20540-20545 (2008).
24. Maekawa, T., 他 4 名, S., Murooka, Y., and Hayashi, M. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicas*. *Molec. Plant-Microbe Interact*, 21: 375-382 (2008).
25. Ike, A., R. Sriprang, H. Ono, Y. Murooka, and M. Yamashita. Promotion of metal accumulation in nodules of *Astragalus sinicus* by the expression of the iron-regulated transporter gene in *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* B3. *J. Biosci. Bioeng.* 105(6): 642-648 (2008).
26. Kim J-H., M. Sunako, H. Ono, Y. Murooka, E. Fukusaki, and M. Yamashita. Characterization of gene encoding amylopullulanase from plant-originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. *J. Biosci. Bioeng.*, 106: 449-459 (2008).
27. Ikeda, S., 他 4 名, and K. Minamisawa. Microbial community analysis of field-grown soybeans with

different nodulation phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 74: 5704-5709. (2008).

28. Wei, M., T. Yokoyama, K. Minamisawa, 他 8 名, M. Abe, and T. Ohwada. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. DNA Res. 15: 201-214. 2008.

[学会発表] (計 >100 件)

1. Murooka, Y. Heavy metal bioremediation through symbiotic leguminous plant and potential to decontamination ¹³⁷Cs from accident of nuclear power station at Fukushima. Plant Growth, Nutrition and Environment Interactions. Feb. 20, 2012, Vienna, Austria.

2. Murooka, Y., Minamisawa, K., Abe, Hisamatsu, M., Yamada, T., Yamashita, M., M., Teumroong, N., Boonkerd, N., Sukiman, H., Hiep, N. Najimudin, N. and etc. Sustainable biomass production by microbial symbiosis and its bioconversion in Southeast Asia. Asian Seminar, October 22, 2011, Kuching, Malaysia.

3. Murooka, Y., Minamisawa, K., Abe, M., Teumroong, N., Boonkerd, N., Sukiman, H., Hiep, N. Najimudin, N. Espiritu, B. and etc. Session 6: Applications for sustainable agriculture and environments. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. September 23, 2010, Miyazaki, Japan.

4. Murooka, Y., Minamisawa, K., Yamada, T., Teumroong, N., Boonkerd, N., Sukiman, H., Hiep, N. Najimudin, N. Espiritu, B. and etc. Sustainable biomass production by microbial symbiosis and its bioconversion in Southeast Asia. Kaken Workshop. November 1-2, 2009, Bogor, Indonesia.

5. Murooka, Y., Minamisawa, K., Abe, M., Hisamatsu, M., Yamada, T., Yamashita, M., Teumroong, N., Boonkerd, N., Sukiman, H., Hiep, N. Najimudin, N. Espiritu, B. and etc. Sustainable biomass production by microbial symbiosis and its bioconversion in Southeast Asia. Kaken Workshop. September 12-13, 2008, Nakhon Ratchasima, Thailand.

[図書] (計 3 件)

1. Murooka Yoshikatsu (editor). Hiroshima Inst. Technol. Sustainable Biomass production by Microbial Symbiosis and its Bioconversion in Southeast Asia. 2012, 1-364.

2. Murooka Yoshikatsu, World Scientific, London, Microorganisms in Industry and Environment, 2011, 235-238.

3. Murooka, Yoshikatsu. Springer, Vinegars of the World, 2009, 17-40, 121-134.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室岡 義勝 (MUROOKA YOSHIKATSU)

広島工業大学・情報学部・教授

研究者番号：60029882

(2) 研究分担者

南澤 究 (MINAMISAWA KIWAMU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667

阿部 美紀子 (ABE MIKIKO)

鹿児島大学・理学部・教授、副学長

研究者番号：00107856

久松 真 (HISAMATSU MAKOTO)

三重大学・大学院生物資源研究科・教授

研究者番号：30107099

山田 隆 (YAMADA TAKASHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：40230461

山下 光雄 (YAMASHITA MITSUO)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：40220347

(3) 研究協力者

・ NANTAKORN BOONKERD
SURANAREE UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY, THAILAND, Emeritus
Professor

・ NEUNG TEAUMROONG
SURANAREE UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY, THAILAND, Associate
Professor

・ NAZALAN NAJIMUDIN
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA, Professor

・ NGUEN HUU HIEP
CANTHO UNIVERSITY, VIETNAM,
Assistant Professor

・ HARUMASTINI SUKIMAN
INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES,
INDONESIA, Senior Researcher

・ BAYANI M. ESPIRITSU
UNIVERSITY OF PHILLIPPINE, LOS
BANOS, PHILLIPPINE, Associate Professor