

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580060

研究課題名（和文） 土壌生態系における藻類—細菌共存系の相互作用と機能の解明

研究課題名（英文） Interaction and function of an algal-bacterial consortium in soil ecosystem

研究代表者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10313074

研究成果の概要（和文）：クロレラ属緑藻と土壌細菌の混合培養系から10種の細菌を分離した。ブレブディモナス属細菌の分離株は、クロレラ培養株の生存期間を有意に延ばした。また、ビタミンB12要求性の緑藻モノマスティクスにビタミンB12を供給する細菌が分離され、そのうちエンシファー属細菌について遺伝子解析を行った。この細菌がビタミンB12合成に関わる全22個の遺伝子を持つことが示され、またそれらの塩基配列全長が解読された。

研究成果の概要（英文）：Ten species of bacteria were isolated from mixed cultures of *Chlorella* (green algae) and soil bacteria. A *Brevundimonas* isolate significantly elongated the culture lifetime of *Chlorella*. Bacteria that supply vitamin B<sub>12</sub> to a vitamin B<sub>12</sub> auxotrophic green alga, *Monomastix*, were isolated, one of which, *Ensifer* sp., was subjected to a molecular genetic analysis. The presence of 22 genes involved in vitamin B<sub>12</sub> synthesis in this bacterium was revealed, and the full sequences of the genes were determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌生物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 土壌微生物の重要な機能の1つに物質循環がある。その物質循環機能には土壌の種類や環境変化等に左右されにくい緩衝力があり、そこには土壌微生物やその相互作用の多様性が大きく貢献していると考えられる。

(2) 水圏の微細藻類と細菌の相互関係に注目した数少ない研究例として、細菌と淡水産藻類との相互関係や、海産藻類と共存細菌の相互作用に関する報告がある。細菌から藻類へ

のビタミン供与や藻類から細菌への基質の供与といった相互作用が見出されるなど、藻類—細菌共存系の生態系における重要性は高いと予想される。

## 2. 研究の目的

上記の背景を元に、本研究では、土壌藻類と土壌細菌との共存関係に注目した。土壌藻類と共存した状態で分離・培養される土壌細菌の多様性、共存細菌が土壌藻類の生育に与え

る影響などを明らかにすることにより、土壤生態系におけるこれらの微生物の多様性と相互作用が果たす役割を解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 土壤から土壤生息性の藻類の1種、クロレラ (*Chlorella* spp.) を分離し、無菌化せずに土壤由来の細菌が混入したまま培養した。また、国立環境研究所よりクロレラ

(*Chlorella vulgaris* NIES-227 株) の純粋培養株の分譲を受け、その培養液 (無機塩類培地) に土壤を接種し、藻類と細菌 (複数種混合) の人工的な共存系を構築した。

(2) それらの共存系から細菌を分離した。それらの16SリボゾームRNA (rRNA) 遺伝子の塩基配列を解読し、系統解析を行って、細菌の同定を行った。

(3) 分離株を個別にクロレラの純粋培養株に接種し、共存細菌がクロレラの生育に与える影響を試験した。細菌を共存させて培養したクロレラからエタノールによりクロロフィルを抽出し、分光光度計でクロロフィルの吸光度を測定し、その値をもってクロレラの生育量を表した。

(4) 微生物系統保存機関より複数の淡水藻類を取り寄せ、ビタミンB12を含まない塩類培地にて培養し、ビタミンB12要求性の藻類をスクリーニングした。

(5) ビタミンB12要求性の藻類に、上記の分離株を個別に接種し生育試験を行って、ビタミンB12要求性藻類にビタミンB12を供与できる細菌をスクリーニングした。

(6) ビタミンを合成し菌体外に分泌する細菌分離株の1つについて、(他の研究助成と合わせて) 全ゲノムのドラフト解析を行って塩基配列の詳細な解析を行い、ビタミンB12合成系遺伝子を特定した。

(7) ビタミンB12要求性藻類が共存している状態と、共存していない状態とで、ビタミンB12供給細菌の *cobT* (ビタミンB12合成のキーポイントに関わる遺伝子) の発現量に差があるか試験した。まず、両条件下で培養された細菌株からRNAを分離し、逆転写を行ってcDNAを作成、それを鋳型としてリアルタイムPCRを行い、発現量を定量した。

### 4. 研究成果

(1) クロレラと土壤細菌の共存系の中に生育している細菌の組成を、16S rRNA 遺伝子のV3領域DGGEとクローニング、および塩基配列解読を経て、系統解析により調査した (=分離・培養を伴わない細菌組成解析)。また、平板培地上でそれらの細菌の分離を行い、16S rRNA遺伝子全長の塩基配列に基づく系統解析により (図1) 同定を行った。分離株は、以下の属の細菌と同定された。

カウロバクター (*Caulobacter*) 属  
エンティシシア (*Emticicia*) 属  
ポラロモナス (*Polaromonas*) 属  
ブレブندیモナス (*Brevundimonas*) 属  
アミノバクター (*Aminobacter*) 属  
シネラ (*Shinella*) 属  
クルビバクター (*Curvibacter*) 属  
エンシファー (*Ensifer*) 属  
バチルス (*Bacillus*) 属  
ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属

バチルス属細菌以外の9属は、分離・培養を伴わない細菌組成解析においても検出されていたが、バチルス属細菌は検出されていなかった。よって、バチルス属細菌は共存系において優占していないと考えられた。

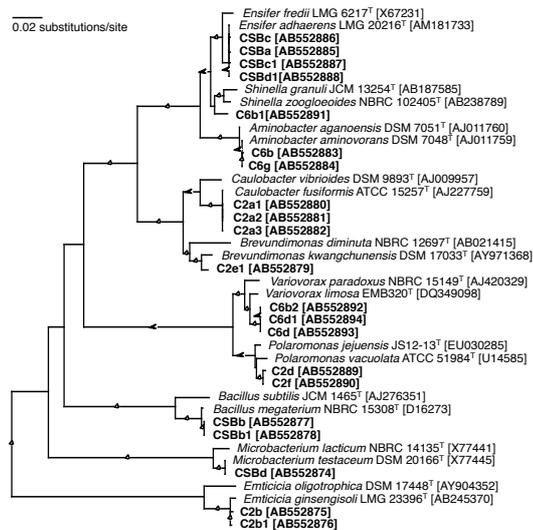


図1. 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列に基づく分離株と近縁種細菌を含む近隣結合系統樹。[ ]内は遺伝情報に関する国際データベース DDBJ/EMBL/GenBank にデータを登録した際の登録番号 (アクセション番号)。

(2) 共存細菌が藻類の生育に与える影響を調べるため、共存培養を均等に懸濁してから一部の培養液を回収し、そこに含まれるクロロフィル含量を測定することによって、藻類の生長具合の指標とした。

しかし、細菌10属のうちシネラ属は、粘性が高いため藻類の細胞を巻き込んで凝集してしまう特性があった。よって、シネラ属と藻類との共存培養を均等に懸濁することができず、藻類の生育を測定できなかった。よって、残りの9属について、藻類の生育に与える影響を検討したところ、ブレブندیモナス属細菌がクロレラの生育期間を有意に延ばす効果を持つことが明らかとなった (図2)。なお、他にもう1属、クロレラの生育期間を延ばす効果を示したものがあったが、再現性を確認するため実験を繰り返したところ、有意水準が0.95を下回ったため、

この属については有意な効果はないと判断した。

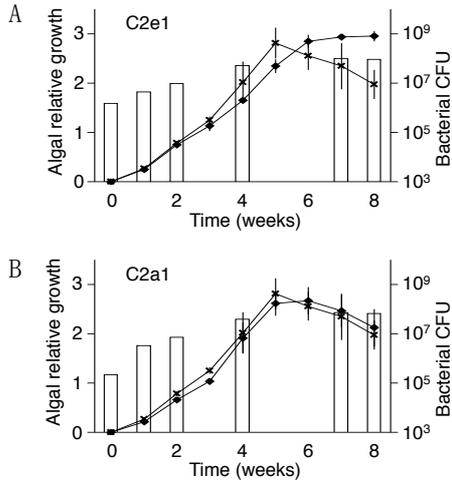


図 2. 共存細菌がクロレラの生育に与える影響。折れ線グラフはクロレラの増殖（◆が細菌と共存しているとき、×が細菌と共存していないとき）をクロロフィル量による相対値表し、棒グラフは細菌の増殖をコロニー形成数で表している。A のグラフは、プレブディモナス属細菌 C2e1 株とモノマスティクスの共存培養、B のグラフは、カウロバクター属細菌 C2a1 株とモノマスティクスの共存培養を示す。

(3) 国立環境研究所が保有する淡水性微細藻類の純粋培養株を複数取り寄せ、ビタミン B12 を除いた C 培地（無機塩類培地）での生育試験を行い、要求性の藻類をスクリーニングした。そして、ビタミン B12 要求性緑藻としてモノマスティクス (*Monomastix minuta* NIES-255 株) を見いだした。

まず予備的に、通常（ビタミン B12 が培地に含まれる）培養条件で、モノマスティクスの生育に共存細菌が与える影響を試験した。その結果、バチルス属細菌が共存しているときにモノマスティクスの死滅速度が遅くなる傾向がみられたものの、生育期間の延長効果や生育促進効果は認められなかった（図 3）。

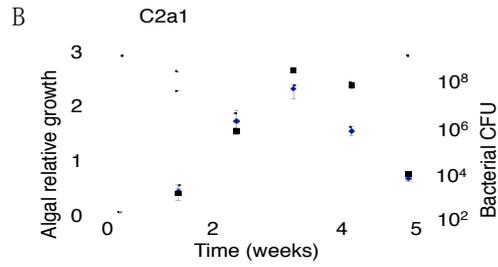
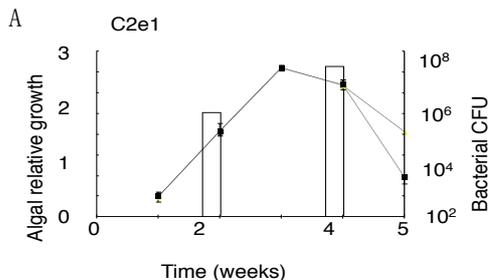


図 3. 共存細菌がモノマスティクスの生育に与える影響。折れ線グラフはモノマスティクスの増殖（■が細菌と共存しているとき、小さな◆が細菌と共存していないとき）をクロロフィル量による相対値表し、棒グラフは細菌の増殖をコロニー形成数で表している。A のグラフは、プレブディモナス属細菌 C2e1 株とモノマスティクスの共存培養、B のグラフは、カウロバクター属細菌 C2a1 株とモノマスティクスの共存培養を示す。

次に、ビタミン B12 を除いた C 培地で同様の試験を行ったところ、バチルス属細菌 (CSBb 株) とエンシファー属細菌 (CSBa 株) が共存するときのみ、モノマスティクスは生育可能であることが示された。つまり、この共存培養では、バチルス属細菌 (CSBb 株) やエンシファー属細菌 (CSBa 株) がモノマスティクスにビタミン B12 を供与し、モノマスティクスはそれらの細菌に光合成産物（有機物）を供与して、相利共生状態になっている。

(4) モノマスティクスとの共存が、ビタミン B12 を供与する細菌のビタミン B12 合成活性に与える影響を試験するため、モノマスティクスと共存しているときと、共存していないときとで、細菌のビタミン B12 合成に関わる遺伝子の発現（転写）量に差があるか試験することにした。そのためには、ビタミン B12 合成に関わる遺伝子の塩基配列情報が必要であった。

2 株のビタミン B12 供与細菌が得られていたが、上述の通り、バチルス属細菌は藻類-細菌共存系において優占しない細菌であったため、これ以降はエンシファー属細菌 CSBa 株を実験試料として用いることにした。

既知の研究論文からビタミン B12 合成に関わる遺伝子を標的とする PCR 用プライマーの情報を得て、エンシファー属細菌 CSBa 株のビタミン B12 合成に関わる遺伝子断片の PCR 増幅を試みた。しかし、増幅産物は得られなかった。そこで、北海道システム・サイエンスへの委託解析を利用して、エンシファー属細菌 CSBa 株のゲノム全体のドラフト解析を行った。エンシファーは高等植物と共生関係をもつこともある細菌の一つであり、また予備的な解析により脱窒反応に関わる遺伝子も有することが明らかになっていた。よって、

この細菌の遺伝子情報は潜在的に有用であると考へた。相同性検索等の結果から、ビタミン B12 合成系の遺伝子が含まれると判断される塩基配列情報を抽出し、さらに厳密に遺伝子解析を行って、実際に発現可能な塩基配列構造を保っているビタミン B12 合成系遺伝子を特定した。結果として、エンシファー属細菌 CSBa 株は好氣的ビタミン B12 合成に関わる 22 個の遺伝子を保有することが判明した。近縁のエンシファー属別種は、嫌氣的ビタミン B12 合成を保有していることが知られているため、この発見は興味深い。また、これまでに好氣的ビタミン B12 合成に関わる全遺伝子の塩基配列が解読されているのはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌の 1 株のみであり、本研究によって解読された好氣的ビタミン B12 合成の全遺伝子群は 2 例目となる。

エンシファー属細菌 CSBa 株が保有する好氣的ビタミン B12 合成系遺伝子は、合成反応に関わる順番に以下の通り。なお、遺伝子名は、シュードモナス属細菌の該当遺伝子の名前から同定した。

*cobF, cobG, cobH, cobI, cobJ, cobK, cobL, cobM, cobS, cobT, cobU, cobV, cobD, cobC, cobB, cobA, cobE, cobO, cobN, cobW, cobP, cobQ*

上述のシュードモナス属細菌、本研究で解析されたエンシファー属細菌 CSBa 株、それぞれの好氣的ビタミン B12 合成系遺伝子群の配置は図 4 に示す通り。22 個の遺伝子が、シュードモナス属細菌では 2 つのクラスターに分かれてゲノム上に存在しているが、エンシファー属細菌 CSBa 株では 3 つのクラスターに分かれていた。しかし、遺伝子の順序は保存性が高く、また塩基配列の相同性も高かった。よって、これらの異なる細菌が共通して保有する好氣的ビタミン B12 合成系遺伝子群は、まとまって水平伝播される可能性が示唆される。

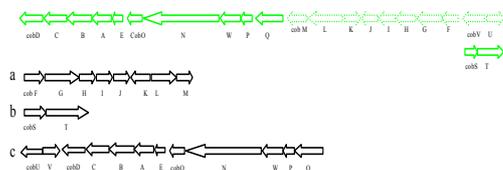


図 4. 好氣的ビタミン B12 合成系遺伝子群の並び順。上 (緑色) がシュードモナス属細菌の、下 (黒色) がエンシファー属細菌 CSBa 株のもの。

(5) ビタミン B12 合成系遺伝子群のうち、ビタミン B12 の基本構造の形成に関わる重要な遺伝子 *cobT* を対象として、その転写量の定量を行った。まず、モノマスティクスと共存および非共存の状態 で培養されたエンシファー属細菌 CSBa 株から RNA を抽出し、*cobT*

の転写産物 (メッセンジャー RNA) の量を逆転写リアルタイム PCR によって測定した。その結果、モノマスティクスとの共存は、エンシファー属細菌 CSBa 株の *cobT* 転写活性に影響を与えていないことが示された。

(6) 以上、本研究により、藻類と土壤細菌の共存培養系を構成する細菌組成が明らかになり、その一部には藻類培養株の生育期間を延ばす作用が認められた。また、ビタミン B12 を生産して菌体外に分泌することによって、ビタミン B12 の生育を支えることができる細菌の存在が示された。その細菌の 1 つについて、好氣的ビタミン B12 合成に関わる 22 の遺伝子群が特定され、全塩基配列が解読された。本研究以前には、好氣的ビタミン B12 合成に関わる遺伝子群の全塩基配列解読は 1 例しかない。藻類と細菌の共存により、それらの共生を支える機能が活性化されると予想されたが、少なくとも細菌が藻類に与えるビタミン B12 の合成量は、両者の共存によって活性化されていないことが示された。本研究では、土壤微生物の相互作用の姿を明らかにすることはできなかったが、相互作用の様態に関する貴重な知見が得られたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Hoan Thi Vu, Shigeto Otsuka\*, Hiroyuki Ueda, Keishi Seno, *Cocultivated bacteria can increase or decrease the culture lifetime of *Chlorella vulgaris** Journal of General and Applied Microbiology, 査読有、56 巻、2010、413-418

[学会発表] (計 2 件)

① Hoan Thi Vu, 大塚重人、妹尾啓史、*「Effect of Co-cultivated Bacteria on the Growth of Microalgae」*、日本微生物生態学会 2010 年度 つくば大会 (2010 年 11 月 24 日~26 日、筑波大学)

② Hoan Thi Vu、大塚重人、妹尾啓史、*「Bacteria can supply vitamin B12 for green algae」*、日本農芸化学会 2010 年度 京都大会 (2011 年 3 月 25 日~28 日、京都女子大学) (東日本大震災のため大会は中止されたが、要旨集は発行されたため、学会から「要旨集への掲載により学会発表されたものと見なす」との連絡を受けた)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚重人 (OTSUKA, Shigeto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
准教授  
研究者番号：10313074

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
妹尾啓史 (SEN00, Keishi)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
教授  
研究者番号：40206652