

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580365

研究課題名（和文）酸性土壌に適応した植物・微生物共生の解析

研究課題名（英文）Plant-microbe symbiotic systems adapted to acidic soils

研究代表者

砂入 道夫（SUNAIRI MICHIO）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906

研究成果の概要（和文）：

強酸性環境に自生する抽水植物の酸性土壌適応に重要な役割を果たす共生微生物群で優占種として高いアルミ耐性を示す*Acidocella*属細菌を単離した。そのゲノム解析を進め酸性土壌適応機構を検討した。その結果、不溶性リン酸アルミニウム塩を可溶化する物質を同定し、その物質の合成遺伝子群の単離・解析を行った。また、機能が異なる複数のアンモニア輸送チャンネルタンパク質を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The draft sequences of *Acidocella* spp. genomes were determined, and the genes responsible to the solubilization of aluminum phosphate salt and ammonium channel proteins were identified. The bacteria possess multiple ammonium transporter genes (*amt*), which showed different functions when they were cloned into the *amtB*-minus *E. coli* mutant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：環境農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：酸性硫酸塩土壌、アルミニウム耐性、*Acidocella* 属細菌、植物・微生物共生系、*Eleocharis dulcis*、不溶性リン酸塩可溶化、ゲノム、*Panicum repens*

## 1. 研究開始当初の背景

地球上に 1,080 万ヘクタール、アジア地域に 500 万ヘクタール存在すると推定される酸性硫酸塩土壌は、土地開発、灌漑等による表土の流失に伴って、還元状態にあったパイライト ( $\text{FeS}_2$ ) が露出し、 $\text{FeS}_2$  1 モルあたり 2 モルの硫酸が生成することにより、土壌および周辺水域が pH 2～4 の強酸性を示す。このような酸性土壌環境では、低 pH 以外にも、

その強酸性により起こる各種金属類の可溶化による金属過剰、土壌中のリンが金属塩として不溶化することによる低リンストレスなど、複合的な環境ストレスにさらされることで、植物の生育が阻害される。可溶化する金属類の中でも特にアルミニウム(Al)は作物植物に対して強い毒性を持ち、 $\mu\text{M}$  レベルの濃度であっても根の伸長阻害などを引き起こし、作物植物の生育阻害を起こすことが知

られている。これら酸性硫酸塩土壌は農業利用可能な地帯と重なることが多く、ひとたび酸性化すると、酸感受性の農作物をはじめ在来の植生の回復は困難となり、特に人口密集地であるアジア地域では食糧生産の観点からもその対応が問題となっている。対策として、石灰の散布や酸性物質の洗脱などが行われているが、環境負荷や経済的な面での問題がある。そこで、酸性硫酸塩土壌に生息する植物の根圏に存在する微生物の環境適応機能を活用するバイオレメディエーションが、経済的かつ環境に対する負荷の少ない手法として有効であると考えられる。植物に対する生育促進技術として、植物生育促進能を持つ微生物 (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) を利用する方法が考えられており、PGPB として報告されている菌株も多数存在する。しかし、従来の PGPB は中性付近の環境で生育するものがほとんどであり、酸性硫酸塩土壌のような強酸性環境に適応するには実用的ではない。そのため、従来の方法とは異なり酸性硫酸塩土壌環境に適応した微生物を活用する新しい手法が必要であると考えられる。一般的に、植物表面や根圏には多種の微生物が存在し、微生物同士、あるいは微生物と植物の間で各種の相互作用が起こっている。このことから、酸性土壌環境に生育する植物根圏から、現地環境で問題となる低 pH や金属塩に対する耐性を持つ微生物や、リン酸塩の可溶化能を持つ微生物、酸性環境における窒素固定が可能な微生物などを取得し、これら酸性土壌に適応した微生物を組み合わせた微生物群集を作成して植物に接種することにより、効果的な作物増産技術が開発できると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでの研究において、ベトナム、タイの酸性硫酸塩土壌地帯の pH 2~3 を示す強酸性の湿地、池、水路などに生育する水草が検索され、周辺環境を中性化する植物と酸性のまま生育する植物があることが明らかにされた。酸性状態の中で生育する植物の代表である *Eleocharis* 属植物および *Panicum* 属植物は酸性土壌環境において可溶化する金属類の中でも特に問題となる Al を 3 mM 以上含む酸性池に繁茂しており、Al を 10 mM 含む水耕液中でも生育が可能であった。これらの植物は酸性のみならず、Al に対する高い耐性を持っていることが示された。このことから、これら植物の表面に共生する微生物もまた、強酸性に対する耐性と高い Al 耐性を持っていることが考えられた。植物表面の微生物叢を PCR-DGGE 法で検討したところ、 $\alpha$ -proteobacteria に属する *Acidocella* 属細菌の優占化が認められた。さらに、Al を含む pH 3.0 の硫酸酸性培地を用いて微生物を単

離したところ、*Acidocella* 属細菌のみが単離された。このことから、このような高濃度 Al 存在下において生育する植物の表面では *Acidocella* 属細菌が優占化していることが示唆された。本研究では、上記 Al 耐性 *Acidocella* 属細菌について、作物増産技術としての利用を考える際に必要となる種の同定を行うための分類学的知見、および酸性硫酸塩土壌環境の改良への応用を目指した環境適応機構解明の基礎的知見を得ることを目的とし、各種検討を行った。併せて新たに酸性土壌適応植物 *Eleocharis dulcis* から多くの共生微生物を単離し、植物・微生物共生系の酸性土壌適応に関連する多糖の構造と機能に検討を加えた。

## 3. 研究の方法

ゲノム配列は Roche 454 FLX を用いて決定した塩基配列を Newbler によりアセンブリーし、アノテーションには MiGap を使い、その他 Glimmer を CDS 推定に、tRNAscan-SE と ARAGORN を tRNA の推定に、rRNA の推定には Blast を用いた。CDS のクラスト化には BLASTCLUST を用いた。トランスポゾン突然変異株作成には EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit を用いた。大腸菌での発現には国立遺伝学研究所の大腸菌の遺伝子破壊株コレクションから、大腸菌アンモニウムトランスポーター遺伝子の欠失変異株を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) *Acidocella* 属細菌の分類学的検討

これまでに得られた Al 耐性 *Acidocella* 属細菌のうち、31 株について 16S rDNA 遺伝子の配列を解析した。単離菌の DNA を抽出し、細菌の 16S rDNA の全長(約 1500 bp)を増幅し、シーケンス解析に供した。得られた塩基配列の相同性検索を NCBI の BLASTN プログラムにより行った。さらに、得られた 16S rDNA の全長配列のうち、15 株分を用いて系統樹を作製した。結果、解析した株全てが *Acidocella* 属と高い相同性を示す 2 つの *phylotypes* に別れた(図 1)。そのうち *A. facilis* に近いグループに属する AL46 株は 16S rDNA 塩基配列の相同性が *A. facilis* NCCB86038<sup>T</sup> に対し 99.4% であったが、系統樹上で *A. facilis* と離れた位置にあり、新種の可能性が示唆されたため、さらに分類学的な検討を行った。

生理・生化学試験、および化学分類試験の結果、AL46 はグラム陰性の好気性細菌であり、16S rDNA 塩基配列の相同性からも *Acidocella* 属に属することが示された。また、主要キノンは Q-10、GC 含量は 65.6% であり、*Acidocella* 属と一致した。しかし、各種の酵素活性、抗生物質耐性、および細胞膜脂質の脂肪酸組成など生理生化学的性質が異なり、

AL46株が*Acidocella*属基準株2株とは別種であることが示唆された。そこで、AL46株と*Acidocella*属基準株2株が別種であることを証明するため、DNA-DNA相同性試験を行った。その結果、AL46株と*A. facilis* NCCB86038<sup>T</sup>および*A. aminolytica* JCM8796<sup>T</sup>との相同性はそれぞれ40%であった。以上のことから、AL46株は*Acidocella*属基準株2株とは別種の菌株であることが明らかとなったため、*Acidocella*属の新種*A. aluminidurans* AL46として公表した。

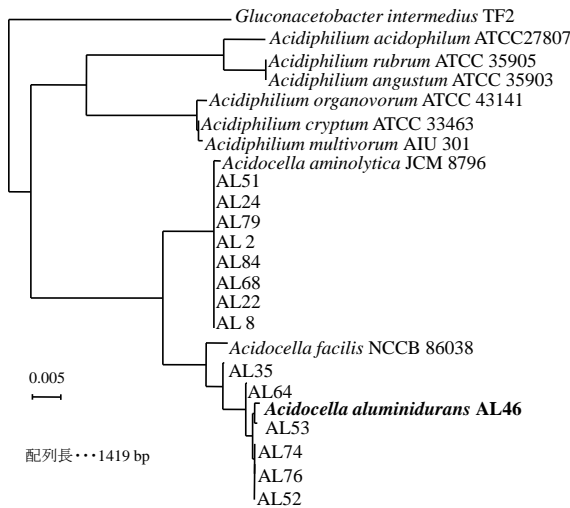


図1.単離菌株の16S rDNA系統樹

(2) *A. aluminidurans* AL46株とその類縁菌の金属耐性能の検討

酸性硫酸塩土壌では、土壌中の金属が可溶化し、生態系に影響を及ぼすことが知られている。特に、AlはpH 4.5以下の環境で生物に対する強い毒性を示すAl<sup>3+</sup>の形をとることが知られている。また、その他の土壌に含まれる重金属類も同様に酸性条件下で可溶化する。酸性土壌環境下で利用可能なPGPBの条件として、このような金属類に対する耐性能が求められる。そこで、*A. aluminidurans* AL46株とその類縁菌AL76株のAl耐性および各種重金属に対する耐性を検討した。AlCl<sub>3</sub>を添加したpH 4.0の0.01% Tryptone培地で培養し、増殖が可能であるかを調べた結果、AL46株およびAL76株は100 mMのAlCl<sub>3</sub>を添加した条件でも増殖が確認された。また、これらの菌株は60 mMから100 mM AlCl<sub>3</sub>を添加した培地において、AlCl<sub>3</sub>を含まない培地で生育させた場合よりも高い生育を示すことが明らかとなった(図2)。さらに、同様の培地において、添加する金属塩をそれぞれ150 mM Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、500 mM MnSO<sub>4</sub>、10 mM NiSO<sub>4</sub>、10 mM ZnSO<sub>4</sub>とした場合においても増殖が可能であった。このことから、これら*A. aluminidurans* AL46株とその類縁菌AL76株が酸性硫酸塩土壌環境で問題となる、Alおよ

び各種の重金属類に対して高い耐性を持つことが明らかとなった。

(3) *A. aluminidurans* AL46株とその類縁菌の不可給態リン酸可溶性の検討

酸性硫酸塩土壌においては、可溶化した金属が土壌中のリン酸と結合することにより、リン酸塩が不可給態化することで植物に対するリン不足が起こることが知られている。

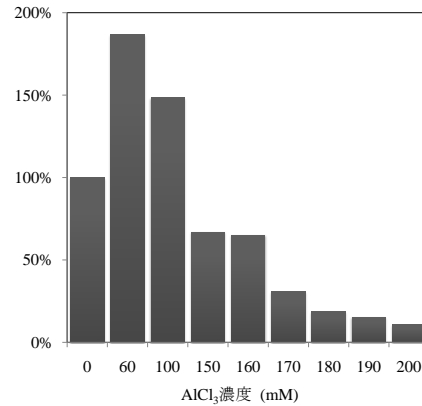


図2. AlCl<sub>3</sub>添加培地におけるAL46株の生育

酸性硫酸塩土壌で問題となるリン酸Alは、pHの変動による可溶化が起こらず、アルカリ性土壌である塩類集積土壌において問題となるリン酸カルシウムと比べ可溶化されにくい。そこで、酸性土壌環境下で問題となるリン酸Alおよびリン酸鉄に対する可溶化能についての検討を行った。リン源を不溶性のリン酸Alとしてのみ加えたpH 4.0の平板培地で*A. aluminidurans* AL46株とその類縁菌AL76株を生育させたところ、不溶性のリン酸Alが可溶化したことによるクリアゾーンが確認された。また、同成分の液体培地で培養試験を行ったところ、培養前ではほとんど含まれていないリン、Alの濃度が上昇していた。このことから、これら*A. aluminidurans*とその類縁菌が酸性環境中において、リン酸Alの可溶化能を持つことが示された。

(4) *Acidocella*属細菌のゲノム解析

*A. aluminidurans* AL46株のゲノムをドラフト解析した。その情報を基に、不可給態リン酸可溶化の欠損したトランスポゾン突然変異株を解析し、その責任遺伝子を単離・解析を行った。その結果より同菌の生産する不可給態リン酸可溶化物質の同定を行うことができた。また、酸性環境下では同菌が興味深い窒素動態を示すことを発見し、窒素動態で重要な働きをするアンモニア輸送チャネルタンパク質(Amt)を単離し大腸菌で発現・解析したところ、機能が異なる複数のamt遺伝子を持つことを明らかにした。

(5) *Eleocharis dulcis* からの共生微生物系の単離と解析

植物・微生物共生系の酸性土壌適応に関連する機能を更に解析するために *E. dulcis* から多くの共生微生物を新たに単離した。その中には多くの新種微生物が認められ、そのうち 2 種については *Burkholderia* 属の新種 *B. heleia* および *B. acidipaludis* として報告を行った。*B. heleia* は酸性条件でも強い窒素固定能を持つことを示し、酸性土壌における窒素循環に果たす役割について解析考察を加えた。一方 *B. acidipaludis* は 5 mM 塩化アルミニウム存在下でも生育を示す高濃度アルミニウム耐性菌であり、その耐性機構について解析考察を加えた。*E. dulcis* から単離された *Pullulanibacillus acidipaludis* CA42 はアルミニウム感受性作物に接種するとその根圏にバイオフィームを作る。同菌の生産する多糖の構造と機能に検討を加え、糖鎖構造を明らかにし報告した。またこの多糖はアルミニウムイオンを吸着する性質があり、その吸着能は多糖の側鎖構造に依存していることを示した。

#### 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 3 件)

- ① K. Kimoto, T. Aizawa, M. Urai, Nguyen Bao Ve, K. Suzuki, M. Nakajima, and M. Sunairi. “*Acidocella aluminiidurans* sp. nov., an aluminum-tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam.” (2010) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(4):764-768. Society for General Microbiology. 査読有
- ② T. Aizawa, Nguyen Bao Ve, M. Nakajima, and M. Sunairi. “*Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam.” (2010) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(5): 1152-1157. Society for General Microbiology. 査読有
- ③ T. Aizawa, B. V. Nguyen, P. Vijarnson, M. Nakajima and M. Sunairi. “*Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia” (2010) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.60: 2036 - 2041. Society for General Microbiology.

#### 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 佐藤准貴, 相澤朋子, 浦井誠, 砂入道夫. “Al 耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌 CA42 株の生産する Al 吸着性多糖の構造について” 植物微生物研究会第 21 回研究交流会(岡山大学)(2011.9.20-23)
- ② 相澤朋子, 太田裕介, 佐藤淳平, 砂入道夫, 光澤浩. “酸性硫酸塩土壌適応植物より単離された高濃度アルミニウム耐性菌 *Acidocella aluminiidurans* のアンモニウムトランスポーターの解析” 植物微生物研究会第 21 回研究交流会(岡山大学)(2011.9.20)
- ③ 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen Bao Ve, Pissot Vijarnson, 中嶋睦安, 砂入道夫. “酸性問題土壌に生育する植物-微生物共生系のゲノム科学的アプローチによる解析と応用” 第 9 回微生物研究会(東京) (2010. 6. 26)
- ④ 太田裕介, 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫, 光澤浩. “高濃度 Al 耐性菌 *Acidocella aluminiidurans* のアンモニウムトランスポーターの機能解析” 第 9 回微生物研究会(東京) (2010. 6. 26)
- ⑤ 太田裕介, 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫, 光澤浩. “高濃度 Al 耐性菌 *Acidocella aluminiidurans* のアンモニウムトランスポーターの解析” 日本農芸化学会 2010 年度大会(東京)(2010.3.29)
- ⑥ 齋藤史門, 相澤朋子, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫. “新規アルミニウム耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌の解析と応用の検討” 日本農芸化学会 2010 年度大会(東京) (2010.3.29)
- ⑦ 石原弘樹, 相澤朋子, 田口博規, 浅井俊彦, Nguyen Bao Ve, Pissot Vijarnson, 中嶋睦安, 砂入道夫. “アルミニウム耐性菌との混合による窒素固定菌へのアルミニウム耐性付与” 日本農芸化学会 2010 年度大会(東京) (2010.3.29)
- ⑧ 木本健一郎, 相澤 朋子, Nguyen Bao Ve, 中嶋 睦安, 砂入 道夫. “酸性土壌に適応した植物より単離した *Acidocella* 属細菌のリン酸アルミニウム可溶化能 について” 日本農芸化学会 2010 年度大会(東京)(2010.3.29)
- ⑨ 相澤朋子, 石原弘樹, 田口博規, 浅井俊彦, Nguyen Bao Ve, Pissot Vijarnson, 中嶋睦安, 砂入道夫. “酸性硫酸塩土壌に自生する窒素固定菌へのアルミニウム耐性付与” 第 25 回日本微生物生態学会 (広島県広島大学) (2009.11.22)
- ⑩ 齋藤史門, 相澤朋子, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫. “酸性硫酸塩土壌に自生する植物から単離した新規高濃度アルミニウム耐性菌” 第 25 回日本微生物生態学会(広島県広島大学) (2009.11.22)
- ⑪ 相澤朋子, 田口博規, 木本健一郎, 姜東鎮,

Pisoot Vijarnsorn, Nguyen Bao Ve, 中嶋睦安, 砂入道夫. “酸性硫酸塩土地帯の植物より単離した耐酸性窒素固定菌について” 日本微生物資源学会第 16 回大会(大阪、阪大)(2009.6.25)

⑫ 浅井俊彦、相澤朋子、木本健一郎、Vijarnson Pissot, Nguyen Bao Ve、中嶋睦安、砂入道夫. “酸性硫酸塩土地帯の植物より取得した単離菌によるアルミニウム除去について” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑬ 田口博規、相澤朋子、木本健一郎、姜東鎮、Vijarnsorn Pissot、中嶋睦安、砂入道夫 ”タイの酸性硫酸塩土地帯の植物より単離した耐酸性窒素固定菌について” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑭ 木本健一郎、相澤朋子、Nguyen Bao Ve、中嶋睦安、砂入道夫 ”ベトナムの酸性硫酸塩土地帯に自生する植物より単離した重金属耐性・リン酸可溶化能を持つ *Acidocella* 属細菌について” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑮ 相澤朋子、木本健一郎、石原弘樹、Nguyen Bao Ve、Vijarnson Pissot、佐々木恵彦、中嶋睦安、砂入道夫 ”東南アジア酸性硫酸塩土地帯の強酸性湿地に自生する植物とその共生微生物” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑯ 相澤朋子、田口博規、Nguyen Bao Ve、中嶋睦安、砂入道夫 ”酸性硫酸塩土地帯の湿地に自生する *Ludwigia adscendens* 表面から単離した新規 *Frateuria* 属細菌について” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑰ 齋藤史門、相澤朋子、浦井誠、Nguyen Bao Ve、Vijarnsorn Pissot、中嶋睦安、砂入道夫 ”ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸を用いた酸性硫酸塩土地帯に適用可能なアルミニウム吸着剤の開発” 日本農芸化学会 2009 年度大会(福岡)(2009.3.28)

⑱ T. Aizawa, K. Kimoto, Nguyen Bao Ve, Pissot Vijarnsorn, S. Sasaki, M. Nakajima and M. Sunairi. “Waterweeds Adapted to Actual Acid Sulfate Soils (AASS) and Their Associated Microorganisms” The 6th International Symposium on Southeast Asian Water Environment. (Jakarta, Indonesia) (2008.10.30)

⑲ T. Aizawa, K. Kimoto, Nguyen Bao Ve, Pissot Vijarnsorn, S. Sasaki, M. Nakajima and M. Sunairi. “Characterization and application of symbiotic bacteria isolated from waterweeds adapted to actual acid sulfate soils.” ISME12 (Cairns, Australia) (2008.8.21)

⑳ 相澤朋子、木本健一郎、Nguyen Bao Ve, 佐々木恵彦、鈴木健一郎、中嶋睦安、砂入道夫 ”酸性硫酸塩土地帯に生息する植物より単離したアルミニウム耐性菌について” 日本微生物資源学会第 15 回大会(千葉)(2008.7.1)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

砂入 道夫 (SUNAIRI MICHIO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80196906