

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05331

研究課題名(和文)代謝物を介した土壌での多糖分解微生物の共存機構の解明と微生物制御への利用

研究課題名(英文)Coexisting mechanism of polysaccharide-degrading microorganisms in soil via metabolites and its use for microbial control

研究代表者

齋藤 明広 (Saito, Akihiro)

静岡理工科大学・理工学部・教授

研究者番号：50375614

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)：畑土壌での生体高分子分解をめぐる微生物間相互作用の一端を明らかにすることを目的とし、キチンを生体高分子のモデルとして、その分解の初期に増加するStreptomyces属放線菌とその後に増加するLysobacter属細菌の関係性に注目して研究を遂行した。その結果、多くのLysobacter属細菌がコバラミン要求性をもつことを見出し、また、その遺伝的背景を明らかにした。Streptomyces属放線菌と同様にキチン分解活性を持つにもかかわらず、Lysobacter属細菌の方がキチン添加土壌で遅れて増加した要因の一つは、Lysobacter属細菌のコバラミン要求性にあることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lysobacter属細菌は、植物生長促進作用を持つ微生物、また、植物病原微生物を制御する微生物としての報告が数多くされている有用微生物であり、土壌のもつ発病抑止性の強さに比例して土壌に多く存在することも知られている。本研究では、Lysobacter属細菌の多くが栄養要求性をもつことを発見した。土壌等から分離された有用なLysobacter属細菌株を接種することでの利活用が検討されているが、接種した有用微生物株が定着しなかったという報告もある。本研究の成果は、栄養要求性に注目して土着のLysobacter属細菌を活用するための新たな方法を開発するための基盤的知見となる。

研究成果の概要(英文)：Analyzed were the relationships between two chitinolytic bacteria: Streptomyces actinomycetes, which increased early in the chitin degradation process in an incubated soil, and Lysobacter, which increased later in the soil. (1)The growth of methionine (Met) -requiring Lysobacter strains isolated from chitin-treated incubated soil was complemented by adding cyanocobalamin to the medium instead of Met. These methionine-requiring Lysobacter strains were suggested to be cobalamin (Cob) -requiring strains. (2) Whole-genome sequencing of Lysobacter sp. 5-21a of the Met/Cob-requiring Lysobacter isolates suggested that 5-21a does not have a Cob-independent Met synthase gene (metE), but only a Cob-requiring Met synthase gene (metH), and therefore shows a Met/Cob requirement. (3) Since most Lysobacter species have only methH, it is considered that they also show Met/Cob requirement. (4) Strain 5-21a was proposed as a new species, *L. auxotrophicus*.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：キチン 土壌 Streptomyces Lysobacter 栄養要求性 メチオニン コバラミン ビタミンB12

1. 研究開始当初の背景

土壌環境の維持において、生物遺骸に含まれる生体高分子の分解は欠かせない。生体高分子の分解過程に関する知見は、土壌管理の技術向上や環境負荷低減技術開発の知的基盤となる。本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「農耕地土壌での生体高分子の分解に関わる異種微生物の共存の仕組みと意義」である。土壌管理技術の向上と環境負荷低減、さらには土壌病害の抑止・低減を目的とした土壌微生物制御技術の開発を目指し、異種微生物の共存の仕組みを解明する。これまで、未利用バイオマスの有効利用等の観点から、個々の土壌微生物の生体高分子分解機構が分子レベルで研究されてきた。例えば、セルラーゼなどの多糖分解酵素では、立体構造に基づく詳細な反応触媒機構や、それらの遺伝子の構造や発現制御機構の他、酵素生産の誘導物質や一分子の酵素の挙動が解明されてきた。一方、環境中の核酸の情報に基づく分子生態学的解析により、放線菌や糸状菌の他、土壌での生体高分子分解に関わる微生物や、中心的役割を果たす「コア微生物」も示されてきた。しかしながら、個々の微生物に関する研究や環境から抽出した核酸の配列情報だけでは、物質を介した微生物間の相互作用を詳細に観察・解明することは難しい。堆肥の製造工程等で観察される微生物群集の遷移についても、温度等の物理的環境の変化や、物質の変化に関わることが知られているが、微生物間相互作用については不明な点が多い。これらの点については、複合培養系でのセルロース分解やメタン発酵等のプロセスの研究において、鍵微生物に関する詳細な解析と分子生態学的研究、さらには分離微生物株を用いた再構築複合培養系による研究を加えた多面的アプローチによって、鍵微生物とその他の微生物の共存・競合現象やその仕組みが解析されてきた。一方、土壌生態系においては、再現性や複雑性、試料保存法の問題もあり、このような多面的なアプローチによる研究はほとんど行われて来なかった。同一の生体高分子を分解する異種微生物どうしの関係を含め、生体高分子の分解に関わる異種微生物の共存・競合を含めた棲み分けの生理・生態的な仕組みと意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、生体高分子のうち、キチンをモデルとし、①化学物質の動態解析と分子生態学的解析、②キチン分解能をもつ異種微生物の対峙あるいは混合培養による生理学的解析、および③キチン分解微生物株のゲノム情報解析、の多面的な解析によって、キチン分解に関わる異種微生物間の棲み分けの仕組みと意義を解明し、それらの知見を農耕地土壌の管理技術の向上に資することを目的とする。キチン添加土壌での非栄養要求型キチン分解細菌（*Streptomyces* 属）からメチオニン要求性キチン分解細菌（*Lysobacter* 属）への遷移について、①その一要因が土壌に存在する VB₁₂ または Met 栄養要求性にあること、②先行して増加する非栄養要求性キチン分解細菌が VB₁₂ などの微量増殖因子の供給源となっていること、を仮説とし、実験的に検証し、証明する。微生物株の分離と物質動態解析を起点として多面的に研究を展開し、総合的に土壌での多糖分解過程を観察・解明し、その利用を図る。キチン以外の多糖やその他の生体高分子に適用可能な、異種微生物間ネットワークモデルを提唱する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム情報の取得と解析：キチン添加培養畑土壌から分離された 6 株の Met/VB₁₂ 要求性キチン分解細菌株（*Lysobacter* 属）のうちの 5-21a 株（Iwasaki ら 2020）について、MiSeq（研究分担者の所属機関に設置）と PacBio（委託分析）を用いて完全ゲノム解列を決定した。Met と VB₁₂ の生合成に関わる情報を解析して Met/VB₁₂ 要求性の遺伝的背景を明らかにした。

(2) 非栄養要求性キチン分解微生物の Met と VB₁₂ の産生能：*Streptomyces* およびその他の代表的な細菌株について、培養上清液中の L-Met と VB₁₂ を検出・定量し、産生能を調べた。

(3) ビタミン B₁₂ (VB₁₂) の動態解析：キチン添加培養畑土壌試料について、VB₁₂ を検出・定量し、細菌群集構造との関連を解析し、VB₁₂ の産生と利用に関わる微生物群を推定した。VB₁₂ の検出と定量は食品等に適用される *Lactobacillus lactis* を用いた方法で行った。

4. 研究成果

(1) キチン添加培養畑土壌から分離した Met 要求性のキチン分解細菌 *Lysobacter* sp. 5-21a 株（Iwasaki ら 2020）が、VB₁₂ 要求株であることを明らかにした（Saito ら 2023）。また、同株の全ゲノム塩基配列を決定することで、5-21a 株が Met および VB₁₂ 要求性を持つ遺伝的背景を明らかにすることができた（Saito ら 2023）。すなわち、5-21a 株は VB₁₂ 非依存的な Met 合成酵素の遺伝子（*metE*）は持っておらず、VB₁₂ 要求性の Met 合成酵素遺伝子（*meth*）しか持たないために Met/Cob 要求性を示すことが示された。

(2) 5-21a 株について分類学的な検討を進め、*Lysobacter* 属の新種 *L. auxotrophicus* として提唱することができた（図 1）（Saito ら 2023）。また、5-21a 株で見出された微量増殖因子要求性の性質は、*Lysobacter* 属の他の種にも観察される性質であることを示した（Saito ら 2023）。

(3) 対峙培養によって、5-21a 株の増殖を促進する効果を示す細菌株について、VB₁₂ の生産性について、代表的な土壌細菌と比較解析を行った結果、特定の属に属する細菌株において、当該微量増殖因子の生産量がケタ違いに高いことが判った（中村と齋藤 2023, 日本土壌微生物学会年次大会）。一方、土壌における VB₁₂ 定量方法を確立し、キチン添加培養畑土壌での VB₁₂ 含量の継時

的变化を調べた。その結果、キチン添加培養畑土壌での VB_{12} 含量の変化と *Lysobacter* 属個体群の消長を調べ、土壌中の VB_{12} 含量と *Lysobacter* 属の相対存在比の間に正の相関があることを見出した（中村ら 2023, 日本微生物生態学会年次大会）。

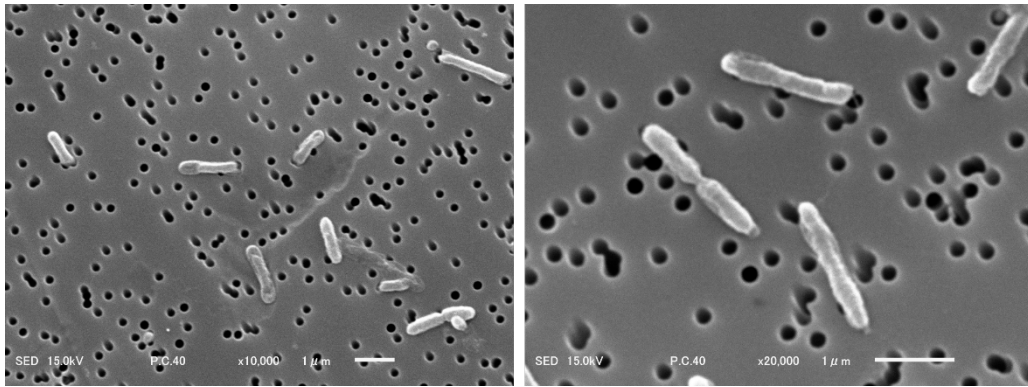


図 1. メチオニン/ビタミン B_{12} (コバラミン) 要求性を特徴とする細菌として新種提唱した *Lysobacter auxotrophicus* 5-21a^T の操作型電子顕微鏡像。各写真内の白線は 1 μm を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Masuda Wataru, Hatanaka Yusuke, Mochizuki Akimitsu, Okazaki Shin, Nanzai Ben, Saito Akihiro | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Isolation and characterization of Bradyrhizobium elkani as a root nodule symbiont of red sword bean <i>Canavalia gladiata</i> var. <i>gladiata</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition | 6. 最初と最後の頁 434 ~ 441 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2022.2078645 | 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 - |
| 1. 著者名 Ootsuka Emi, Iwasaki Yukari, Takagi Kenji, Saito Akihiro | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 LMC60, a material containing low-molecular-weight chitin: degradation and effects on soil microorganisms in incubated upland soil | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition | 6. 最初と最後の頁 389 ~ 399 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00380768.2021.1947734 | 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 - |
| 1. 著者名 Fujimoto Kazuma, Saito Akihiro, Kotsuchibashi Yohei | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Cicada-Wing-Inspired Nanopillar Hydrogels Consisting of Poly(vinyl alcohol) and Poly(methacrylic acid) for Capturing Bacteria through Their Flexibility and Wide Range of | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Macro Letters | 6. 最初と最後の頁 727 ~ 732 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmacrolett.2c00126 | 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 - |
| 1. 著者名 Saito Akihiro, Dohra Hideo, Hamada Moriyuki, Moriuchi Ryota, Kotsuchibashi Yohei, Mori Koji | 4. 巻 73 |
| 2. 論文標題 Physiological and genomic analyses of cobalamin (vitamin B12)-auxotrophy of <i>Lysobacter auxotrophicus</i> sp. nov., a methionine-auxotrophic chitinolytic bacterium isolated from chitin-treated soil | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005899 | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Nishiyama Eiko, Nagata Ryo, Ando Akikazu, Saito Akihiro | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Edible plant oil (EPO)-consumption activity of the isolate <i>Fusarium keratoplasticum</i> EN01 and other relative <i>Fusarium</i> species | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Antonie van Leeuwenhoek | 6. 最初と最後の頁 7 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10482-023-01901-5 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Michihiko, Saito Akihiro, Kobayashi Mariko, Yokoyama Tomofumi, Omiya Shoko, Li Jian, Sugita Kei, Miki Kunio, Saito Jun-ichi, Ando Akikazu | 4. 巻 1868 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of the GH-46 subclass III chitosanase from <i>Bacillus circulans</i> MH-K1 in complex with chitotetraose | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects | 6. 最初と最後の頁 130549 ~ 130549 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2023.130549 | 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 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 坂間涼介, 関島玄太, 齋藤明広 |
| 2. 発表標題 ストレプトミセス属放線菌由来のリゾチームの基質特異性の検討と土壌中のムレイン由来N-アセチルグルコサミンの検出への利用 |
| 3. 学会等名 日本土壤肥料学会中部支部102回例会・中部土壤肥料研究会題112回例会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 飯山 愛理, 齋藤 明広 |
| 2. 発表標題 培養土壌中の植物病原性フザリウムと細菌群集に対するメチオニン添加の影響の評価 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂間 椋介, 齋藤 明広 |
| 2. 発表標題 真菌/細菌バイオマスの新規推定法の確立を目指した <i>Streptomyces griseus</i> IF0 13350の推定N-アセチルムラミダーゼの異種生産系の構築・精製と分解特異性の解明 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤明広, 道羅英夫, 浜田盛之, 森内良太, 小土橋陽平, 森浩二 |
| 2. 発表標題 キチン添加畑土壌から分離されたメチオニン/ビタミンB12要求性のキチン分解新規細菌 <i>Lysobacter auxotrophicus</i> |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村美輝, 道羅英夫, 森内良太, 齋藤明広 |
| 2. 発表標題 キチン添加培養畑土壌でのビタミンB12の消長と細菌群集構造の変化 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 窪田 圭佑, 齋藤 明広 |
| 2. 発表標題 <i>Streptomyces</i> 属放線菌が進化系統の異なるキチン分解酵素を有する意義の逆遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 日本微生物生態学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤明広, 道羅英夫, 森内良太 |
| 2. 発表標題 キチン添加培養畑土壌から分離されたキチン分解細菌Lysobacter sp. 5-21a株のメチオニン/ビタミンB12要求性の遺伝的背景 |
| 3. 学会等名 日本土壌肥料学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村美輝, 齋藤明広 |
| 2. 発表標題 キチン分解細菌Lysobacter sp. 5-21a株のビタミンB12要求性その他の細菌株による増殖促進効果との関連性 |
| 3. 学会等名 日本土壌微生物学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 南澤 究、妹尾 啓史、青山 正和、齋藤 明広、齋藤 雅典 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 講談社 | 5. 総ページ数 192 |
| 3. 書名 エッセンシャル土壌微生物学 作物生産のための基礎 | |

〔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 | 道羅 英夫 (Dohra Hideo) (10311705) | 静岡大学・理学部・教授 (13801) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|