

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：34428

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658076

研究課題名(和文)非マメ科植物への窒素固定細菌定着機構の解析による窒素肥料低依存農業の確立

研究課題名(英文) Infection mechanism of nitrogen-fixing bacteria to nonlegume and its application to construction of agriculture independent on chemical nitrogenous fertilizers

研究代表者

村田 幸作 (Murata, Kousaku)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：90142299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：化学窒素肥料には、コストや環境汚染などの諸問題がある。そこで、植物に窒素源を与える手法として窒素固定細菌の応用を考え、共同的窒素固定細菌に分類される酢酸菌 *Gluconobacter diazotrophicus* (Gdi と略) に着目した。サトウキビから分離された本菌は、宿主特異性が緩やかで、多様な非マメ科植物体内に棲息可能である。そこで、Gdi の生育特性を検討した。その結果、Gdi は高濃度(28mM以上)のリン酸を含む固体培地で培養した場合に粘性の高い多糖を菌体外に分泌産生することを見出した。レバンと同定されたこの多糖が、Gdi の作物への感染や自己防御に機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Due to the increasing cost of chemical nitrogenous fertilizer and concerns about contamination of soil and water, there is a need to reduce usage of chemical fertilizer. Plant-associated microorganisms containing nitrogenases have attracted attention as alternative biofertilizers, since nitrogenase catalyzes a reaction referred to as biological nitrogen fixation. Among endophytic nitrogen-fixing bacteria, we selected *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gdi) and analyzed the function as the biofertilizer. We found that, depending on the phosphate concentration in the medium, this bacterium produces copious amount of polyssaccharide levan, a D-fructofuranosyl polymer, as an exopolysaccharide essential in the infection of the bacterium to the plants and in the protection of invasion of other bacteria in the environment.

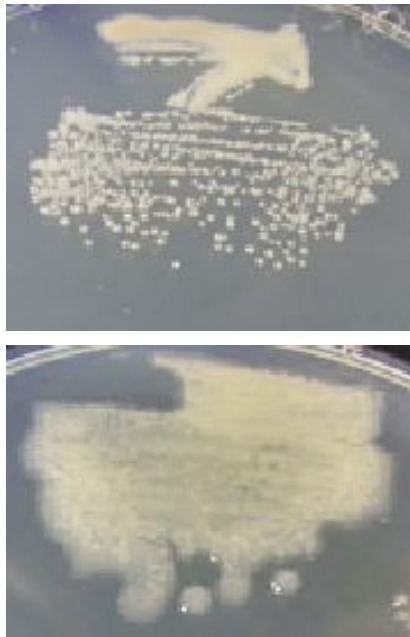
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

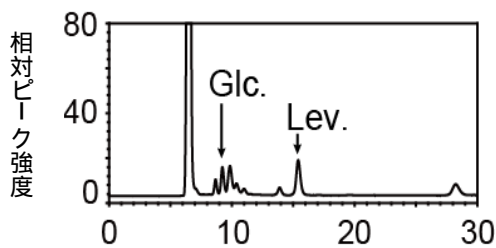
キーワード：nitrogen fixation biofertilizer levan phosphate concentration *G.diazotrophicus* endophytic bacteria

## 1. 研究開始当初の背景

根粒菌-マメ科植物間の共生関係よりも緩やかな共生関係を示す窒素固定 *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gdi)は、サトウキビやサツマイモ内に共生する細菌(エンドファイト)であり、窒素ガスの固定能や植物成長促進作用を示す。そのため、Gdiの非マメ科主要作物栽培への応用が期待されている。実際、2009年にゲノム配列(Bertalan *et al.* 2009)が決定され、その遺伝学的解析(Lery *et al.* 2008など)が進展すると共に、モデル植物であるシロイヌナズナの根へのGdiの定着例も報告されている(Cocking *et al.* 2006)。しかし、Gdiを非マ



保持時間(分)



**図1. リン酸濃度に依存したレバンの産生**  
上：リン酸 7.0mM; 中：リン酸 28mM  
下：リン酸 28mM でのレバン(Lev)の同定

メ科主要作物へ安定的に定着させ、植物成長促進作用を發揮させるに足る十分な知見は

得られていないのが現状である。

これまでに、低窒素化合物及び高リン酸存在下で誘導される細胞外多糖の生産が、植物への定着に重要な因子である可能性や細菌と植物の共生にはクォーラムセンシングが深く関与する(Rinaudi, 2009など)ことが部分的に報告されているが、Gdiにおけるこれら諸因子の関与は明らかではない。そこで、これらの因子を基準にして、Gdiの窒素態アンモニア供給能力の解析を多面的に進めた。

現在、細菌類の農業への応用は、基礎研究段階、或いは経験に基づく使用に留まっている。主要非マメ科作物(イネ、コメ、サツマイモなど)栽培への細菌類の応用は著者らが知る限りにおいて実用化には至っていない。従って、本研究により、遺伝子組換え細菌を用いない新しい農業形態が確立する可能性がある。最終的には、窒素肥料及びリン肥料依存しない農業の確立に寄与すると期待される。

特に、ここ数十年は、化石燃料の大量消費による化学肥料の大量合成、並びに大量施肥により、農産物の生産性は右肩上がりに向上し、増え続ける地球人口を支えて来た。現在でも地球人口は増え続けており、化学肥料への需要も年々高まっている。一方で、耕作可能な土地面積には限りがある。化学肥料の大量消費は土壌や地下水の汚染を引き起こす。化学肥料の国際価格も高騰傾向であるため、農家への経済的負担は年々増大傾向にある。

これは、特に発展途上国において深刻である。かかる現状を考え併せると、Gdiの様な有用細菌を非マメ科作物栽培に有効利用する原理、並びに方法論の確立に寄与する本研究は、窒素肥料とリン肥料に頼らない(これら肥料、並びにその合成に要する化石燃料の大量消費を必要としない)非マメ科作物栽培法の確立に寄与すると云う卓越した成果が期待される。更に、本法は不毛地帯における非マメ科主要作物の栽培への適用も可能で

あり、世界的な食糧問題解決の一助になることも期待されよう。

## 2. 研究の目的

本研究では、非マメ科植物(特にサトウキビ)内に定着し、窒素ガス固定による窒素化合物の供給、不溶性リン酸や不溶性金属(亜鉛など)の可溶化、抗菌作用、並びに植物ホルモン分泌の様な、宿主植物に好影響(植物成長促進作用)を及ぼすエンドファイティック窒素固定細菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gdi)に焦点を当て、窒素化合物濃度とリン酸濃度の制御による、本菌の宿主植物への定着と共生を可能にする分子基盤の解明を目的とした。

既に、予備的な実験により、培地中の窒素化合物(アンモニア塩)濃度及びリン酸濃度の組み合わせが、Gdiの生育特性(生育性、窒素固定能、細胞外多糖生産、不溶性リン酸及び不溶性亜鉛金属の可溶化)に重要な役割を果たすことを明らかにした(筆者ら、図1)。一方、レバン合成酵素(gumD 遺伝子産物)が関与した細胞外多糖の生産が、植物(イネの根)への定着に不可欠である(Meneses *et al.* 2011)ことが知られている。

そこで、リン酸濃度、レバンの機能、クォーラムセンシング機構、活性酸素種(ROS)の機能を総合的に解析し、有用窒素固定細菌を効果的に非マメ科主要作物に定着させることによる、窒素肥料及びリン酸肥料に依存しない非マメ科植物栽培法の実現に寄与する。

## 3. 研究の方法

窒素化合物濃度とリン酸濃度の制御による、Gdiの宿主非マメ科植物への定着と共生を可能にする分子基盤を明らかにするため、以下(i)~(iii)の3項目、即ち(i) 窒素化合物濃度及びリン酸濃度の組み合わせとGdiの生育特性の関係、(ii) Gdiにおけるクォーラムセンシング支配下の全遺伝子の同定、並びに

(iii) 窒素化合物濃度とリン酸濃度及びクォーラムセンシングのGdiの植物定着への影響、(IV)作物が発生させるROSのGdiへの影響の解明を行う。

## 4. 研究成果

### (1) リン酸応答と細胞外多糖(EPS)生産

窒素源非存在下(-N)では、Gdiは高リン酸濃度(高P: 1.25 g/l = 8.8 mM 以上)によりEPSの生産を伴う旺盛な増殖を示し、低リン酸濃度(低P: 0.2 g/l = 1.5 mM 以下)では増殖が抑制される(図2)。一方、窒素源(1.0 mM 硫酸アンモニウム)存在下(+N)では、高リン酸濃度(高P: 6.25 g/l=44 mM 以上)で生育が完全に抑制され、低リン酸濃度(低P: 5.0 g/l = 35.2 mM 以下)では生育し、リン酸濃度が低下するにつれて旺盛に生育する傾向を示す(図2)。つまり、EPSの生産は窒素濃度と密接に連携した現象であることを明らかにした。そして、生産されるEPSがレバンであることを明らかにした(図1)。

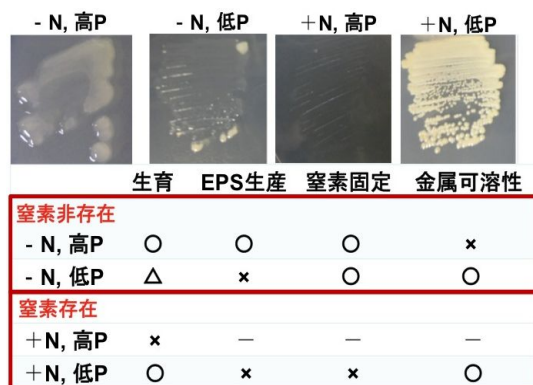


図2. 窒素化合物(N)とリン酸(P)濃度が決定するGdiの生育特性

レバンは、100以上のフルクトース分子からなるホモ多糖で、食品や化粧品、医薬品などへの応用が期待されている多糖である。Gdiのレバン合成酵素遺伝子破壊株を作製し、野生株と生育を比較した。その結果、破壊株は、リン酸が高濃度の条件でもGdiの粘性は極めて弱く、リン酸高濃度培地で培養したGdiが生じる粘性物質はレバンであることが

遺伝子破壊株を用いた実験でも示された。

## (2) 活性酸素種(ROS)耐性と EPS

植物に感染し、定着する際に重要となるのは、細胞外多糖の他に活性酸素(ROS)耐性が挙げられる。Gdi が植物に侵入すると、植物は免疫反応として ROS を産生するため、Gdi の ROS 耐性を欠損させるとスムーズに侵入できなくなる。

細胞外多糖には、Gdi を乾燥や浸透圧から守る役割がある。同様に、植物体内に生息する Gdi の ROS 耐性がレバンにより向上しているのではないかと予想した。サトウキビ搾汁液中のリン酸濃度を生理的なリン酸濃度とみなし、レバンの合成と ROS 耐性に関係があるかを調べた。

その結果、過酸化水素を 1.5mM 含む培地では、どのリン酸濃度条件においても、野生株は破壊株よりも生育が良好で、破壊株よりも高い過酸化水素耐性を有していた。従って、レバンの合成により、ROS 耐性が高められると示唆された。

## (3) クォーラムセンシングとレバン

*Erwinia* 属細菌などの病原性細菌や根粒菌など(グラム陰性細菌)にとって、クォーラムセンシングは植物との相互作用に重要な役割を果たす(Loh *et al.* 2002)。クォーラムセンシングとは、菌体密度が増加すると生産されるオートインデューサー分子(例:AHL)によって各種遺伝子群の転写が誘導される現象である。Gdi も AHL 合成酵素遺伝子

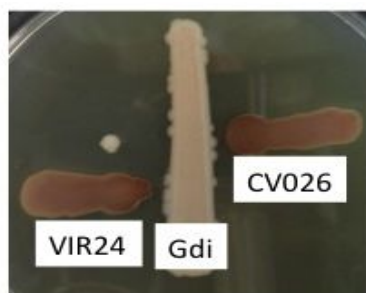


図 3. Gdi による AHL 生産

VIR24 と CV026 の着色により AHL 生産が検出できる。

(Gdi2836)をゲノム上に唯一つ有し、AHL を生産する(図 3)。本遺伝子と植物への定着、並びに植物成長促進作用との関連性が示唆されているが、その詳細は不明である(Bertalan 2009)。そこで、Gdi 株の本遺伝子欠損株(*gdi2836* 株)を作製し、本欠損株、並びに Gdi 株を液体培養し、対数期(AHL 合成抑制)及び定常期(AHL 合成)における RNA を抽出し、マイクロアレー解析を行い、AHL で誘導される遺伝子群を明らかにした。しかしながら、GDi の感染と定着にクォーラムセンシングが機能しているか否かは明瞭ではなかった。

従来の窒素固定細菌の研究では、リン酸濃度は全く考慮されていなかった。従って、本研究で明らかにしたように、窒素化合物濃度及び「リン酸濃度」の「組み合わせ」が Gdi の生育特性を決定する現象(図 2)の分子基盤を明らかにした点は大きい。これは、Gdi、並びに他の有用窒素固定細菌を非マメ科植物に定着させて成長促進作用を発揮させるために必要な重要な知見である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nao Idogawa\*, Ryuta Amamoto\*,  
Kousaku Murata, Shigeyuki Kawai:  
Phosphate enhances levan production  
in the endophytic bacterium  
*Gluconobacter diazotrophicus* Pal5  
*Bioengineered*, in press (2014).

〔学会発表〕(計 2 件)

2013 年 12 月 14 日

第 4 回リン化合物討論会(第 31 回 C-P 化合物研究会)植物内生窒素固定細菌のリン酸に依存した細胞外多糖レバン合成とその生理的意義

井戸川奈生、村田幸作、河井重幸(京大院・農)(滋賀大学、大津市)講演要旨集, p. 16

2012 年 10 月 25 日

日本生物工学会平成 24 年度大会(第 64 回)  
植物内生窒素固定酢酸菌

*Gluconacetobacter diazotrophicus*が合成する細胞外多糖様物質  
井戸川奈生、河井重幸、村田幸作（京大院農）（神戸国際会議場、神戸市）講演要旨集，p. 137

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕 なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

村田幸作（Murata, Kousaku）  
摂南大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：90142299

### (2)研究分担者：なし