

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681011

研究課題名(和文)水生植物の根圏機能を高度に活用した水環境汚染化学物質の効率的浄化法の開発

研究課題名(英文) DEVELOPMENT OF EFFECTIVE PURIFICATION METHOD FOR WATER ENVIRONMENT POLLUTED BY CHEMICAL SUBSTRATES HIGHLY APPLYING RHIZOSPHERE EFFECT OF AQUATIC PLANTS

研究代表者

清 和成 (SEI, KAZUNARI)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80324177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：水生植物の根圏における微生物集積、定着メカニズムを遺伝子レベルで推定することを目的として、ウキクサ根圏から分離された *Sphingobium fuliginis* OMI株と水生植物との共生時における遺伝子発現解析を実施した。

OMI株は、ウキクサ/コウキクサとの共生下では、化学走化性に関する遺伝子群を高発現させることでウキクサ/コウキクサ根圏へ移動し、IV型線毛合成に関する遺伝子群を高発現させることで、ウキクサ/コウキクサの根面に付着するメカニズムが推定できた。この成果は、水生植物-根圏微生物共生系の活用による水質浄化システムの効率化や高度な制御につながる基礎的知見となるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Gene expression analyses of *Sphingobium fuliginis* OMI, isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza* (giant duckweed), were performed using DNA microarray to clarify the mechanism of specific enrichment of this microbe in the rhizosphere of duckweeds.

Although most of the strongly expressed genes of strain OMI were related to metabolisms of substrates and transcriptional regulators, the genes related to synthesize chemotaxis protein and type IV pilus were unique during the symbiotic cultivation with duckweeds. The type IV pilus is reported to act as an anchor to attach to a surface of a certain host. Thus, one of the possible mechanisms for the selective enrichment of strain OMI by duckweeds is the induction of genes to synthesize chemotaxis protein, which allows strain OMI to move to the rhizosphere of duckweeds, and the induction of genes to synthesize type IV pilus, which allows strain OMI to attach onto the root surface of the duckweeds.

研究分野：生物環境工学

キーワード：環境保全技術 根圏浄化法 水生植物 根圏微生物 発現解析 微量汚染化学物質

1. 研究開始当初の背景

水生植物を用いて水域の浄化を行う、植生浄化法は外部からのエネルギー投入が不要な、極めて経済的な技術であると同時に、環境適合性を持った省資源・省エネルギーの21世紀型水質浄化・保全技術といえる。経済産業省から提示されている技術戦略マップでは、バイオテクノロジー活用による環境対応として環境中の有害物質の除去が挙げられており、ここでは、2010年から2025年にかけて、一般環境中の重金属と化学物質等による汚染に対して、植物と(根圏)微生物を組み合わせたハイブリッドバイオレメディエーションシステムの確立と実用化が謳われている¹⁾。

研究代表者らはこれまで、水生植物(ウキクサ: *Spirodela polyrrhiza* やボタンウキクサ: *Pistia stratiotes* L.)の存在下で環境水中や底質中の各種芳香族化合物の分解が促進されることを明らかにしてきており^{2,3)}、これが、水生植物と根圏微生物の共生作用によってもたらされること、特に水生植物がその根圏に芳香族化合物の分解能に長けた特殊な微生物を選択的かつ高密度に集積する能力を有していること^{2,3)}などを示してきた。

これらの知見を基に、2009~2011年度にかけて実施させて頂いた科研費若手研究(A)(21681010)では、水生植物は、その根圏にこれまで知られていなかったような特殊な微生物を集積させ、活性化する能力を有しており、自身が置かれた条件に応じて根の分泌物成分を変化させることによって、根圏に集積させる微生物を選択している可能性を示した。このような水生植物の能力を最大限に発揮させ、活用することができれば、水生植物-根圏微生物の共生系による新規水質浄化システムをより高度に制御でき、効率的な水質浄化システムへとブラッシュアップすることが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では、水生植物が根圏にどのような機能を有する微生物群を集積させ、活性化させようとしているのか、また、微生物群がそのはたらきかけにどのように応答しているのかについて、遺伝子レベルで明らかにし、目的に応じて人為的に根圏微生物群を制御した効率的な水質浄化技術開発につなげるための知見の集積と制御因子の解明を目的として、研究を実施した。

3. 研究の方法

根圏微生物が水生植物の根圏に選択的に集積されるにあたり、どのような遺伝子を発現しているのか明らかにすることによってそのメカニズムの推定を試みることにし、水生植物としてウキクサとコウキクサ

(*Lemna minor*)の2種を、根圏微生物として、ウキクサ根圏から分離された *Sphingobium fuliginis* OMI株³⁾を用いて以下の実験を実施した。

(1) 水生植物の根分泌物に対する *S. fuliginis* OMI株の遺伝子発現解析

水生植物の根分泌物が根圏微生物にどのような作用をしているのか、遺伝子発現のレベルで解析を試みた。

研究開始当初の背景でも述べたように、水生植物はその置かれた条件に応じて根の分泌物成分を変化させるため、ウキクサ根圏から分離されたOMI株の特徴的な能力である4-tert-ブチルフェノール(4-t-BP)分解能にも着目し、4-t-BPに曝露させることによって、ウキクサあるいはコウキクサが根分泌物成分を変化させ、その結果としてOMI株の発現遺伝子に変化が認められる可能性を考慮した実験系も作成した。

まず、根分泌物成分液を調製した。具体的には、500 mL容の三角フラスコに、滅菌した植物栽培用のA&H培地を200 mL用意し、ウキクサ20株あるいはコウキクサ40株を植栽した。終濃度5 mg/Lとなるよう4-t-BPを添加した系も別途作成した。人工気象器(28 ± 1 °C, 8,000 lux, 16時間明/8時間暗)で3日間静置栽培した後、滅菌超純水で洗浄し、200 mL容の三角フラスコに用意した50 mLの滅菌超純水に植栽し、人工気象器で1日間静置培養した。この水相全量を各水生植物の根分泌物の水溶画分として回収した。また全ての根を切断後、試験管に用意した10 mLの滅菌超純水に回収し、超音波処理(42 kHz, 40 W, 15 min, 4 °C)(ASU-2, アズワン)とボルテックス処理(1 min)を交互に3回行った後、フィルター(Durapore Membrane Filter, 0.22 µm, GV, Millipore)を用いて濾過したものを、根分泌物の根付着画分として回収した。水溶画分と根付着画分を混合し、凍結乾燥機を用いて濃縮乾固させたのち、元の根分泌物濃度の100倍となるよう、600 µLのアセトニトリルに転溶し、根分泌物成分濃縮液とした。

続いて、調製した根分泌物成分濃縮液をOMI株に曝露し、遺伝子発現解析を実施した。あらかじめOMI株を5 mMグルコースを単一炭素源とした無機塩培地にて前培養したものを5 mg/Lトリポリリン酸ナトリウム溶液を用いて2回遠心洗浄後、適宜同溶液に懸濁し、OMI株菌体濃縮液を作製した。50 mL容のバイアル瓶に用意した20 mLの無機塩培地に対し、上述の根分泌物成分濃縮液を終濃度100 mg-TOC/Lとなるよう添加し、OMI株菌体濃縮液を菌体濃度がOD₆₀₀=0.3となるよう植種し、120 rpm、28 °Cで12時間回転培養した。それぞれの実験系の水相全量を遠心分離(10,000 × g, 4 °C, 5 min)に供し、OMI株の菌体を回収した。回収した菌体は、illumina RNAspin Mini RNA Isolation

Kit (GEヘルスケア)を用いて全RNAを抽出し、Invitrogen RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit (for Bacteria) (ライフテクノロジー)を用いてrRNAを除去後、One-Color RNA Spike-In KitならびにLow Input Quick Amp WT Labeling Kit(ともに、アジレント・テクノロジー)を用いてcRNAの合成とCy3ラベル化cRNAの精製を行ったのち、OMI株の全遺伝子を標的としたプローブを搭載したDNAマイクロアレイスライド(北海道システムサイエンスにプローブ配列の設計を委託し、アジレントテクノロジーに作成を委託したもの)上で、アジレントテクノロジーの推奨する手順(Agilent One-Color Microarray-Based Exon Analysis, Low Input Quick Amp WT Labeling Protocol)に従ってハイブリダイゼーション反応を行った。その後、GenePix 4000B BioChip Scanner (Molecular Devices)を用いてDNAマイクロアレイスライド上の各プローブスポットの蛍光強度を測定し、GenePixPro 7.0 (Molecular Devices)によって解析した。得られた結果は、発現強度の高い遺伝子の機能群ごとに分類してまとめた。

(2) 水生植物との共生条件下における *S. fuliginis* OMI株の遺伝子発現解析

(1)の根分泌物成分への曝露によるOMI株の遺伝子発現解析では、根分泌物成分に対するOMI株の応答を推定することはできるものの、実際に水生植物との共生条件下では、単なる根分泌物成分以外の要素の影響を評価できないことが懸念された。また、試験のために用いる根分泌物成分液を必要量確保するためには多くの水生植物を植栽し、根分泌物を回収する必要がある、極めて煩雑であった。そのため、根分泌物成分液を回収するのではなく、OMI株を水生植物と共生させて回収し、その発現遺伝子を解析する方法で、根圏微生物の水生植物根圏への選択的集積のメカニズムを探ることとした。

無菌化したウキクサあるいはコウキクサの適当株数を、滅菌したA&H培地に植栽し、人工気象器(28±1, 8,000 lux, 16時間明/8時間暗)で3日間静置栽培した。新たに作成した滅菌A&H培地100 mLを分注した300 mL容の三角フラスコに、ウキクサ30株あるいはコウキクサ60株を植栽し、ここに5 mM グルコース含有無機塩培地で前培養したOMI株を、初期菌体濃度がOD₆₀₀=0.1となるよう植菌した。また、水生植物を植栽していない滅菌A&H培地にOMI株を植菌した系(コントロール)も作製し、人工気象器(28±1, 8,000 lux, 16時間明/8時間暗)で3日間静置栽培した。この間、実験開始から0(実験系へのOMI株植菌直前のもの)、6、24、72時間目にそれぞれの実験系の水相から1 mLを採取し、遠心分離(10,000 × g, 4, 5 min)によってOMI株の菌体を回収した。

回収した菌体からの全RNA抽出、rRNA除去、cRNAの合成とCy3ラベル化cRNAの精製、OMI株の全遺伝子を標的としたプローブを搭載したDNAマイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーション反応、DNAマイクロアレイスライド上の各プローブスポットの蛍光強度の測定方法については、(1)に準じた。

得られたデータについて、それぞれの時間ごとに、ウキクサあるいはコウキクサと共生させたOMI株から得られた蛍光強度をコントロールのそれと比較し、発現強度比(=蛍光強度比)として1,000倍超となったものを強発現した遺伝子群と定義し、まとめた。また、コントロールの蛍光強度が0で蛍光強度比の計算が不可能なプローブスポットについては、データ全体から発現強度比1,000倍超相当となるのが、マイクロアレイスライド上のネガティブシグナル(ブランク部分)とポジティブシグナルの蛍光強度比(Signal/Noise Ratio: SNR)で100以上であったことから、SNR≥100となった遺伝子群を強発現した遺伝子群として定義した。

4. 研究成果

(1) 水生植物の根分泌物に対する *S. fuliginis* OMI株の遺伝子発現解析

OMI株の遺伝子発現解析結果を、発現遺伝子の機能群ごとに表1に示した。

表1 水生植物の根分泌物に対する *S. fuliginis* OMI株の遺伝子発現解析結果

	ウキクサ		コウキクサ	
	4- <i>t</i> -BP曝露	4- <i>t</i> -BP非曝露	4- <i>t</i> -BP曝露	4- <i>t</i> -BP非曝露
機能未知	24	15	2	23
機能既知	31	26	2	18
転写調節	3	2	0	4
物質輸送	3	5	0	2
酸化還元(EC1群)	3	7	0	2
転移(EC2群)	7	3	0	1
加水分解(EC3群)	4	0	0	0
脱離/付加(EC4群)	2	1	2	1
異性化(EC5群)	1	0	0	0
合成(EC6群)	4	0	0	0
その他	4	8	0	8
合計	55	41	4	41

4-*t*-BP に曝露していない水生植物の根分泌物を添加した系では、ウキクサ/コウキクサのどちらを見ても発現数や発現遺伝子群に大きな差は確認されなかった。4-*t*-BP に曝露した水生植物の根分泌物を添加した系では、コウキクサの根分泌物を添加した系よりもウキクサの根分泌物を添加した系で、特に多くの遺伝子群の発現が認められたが、これはOMI株がもともとウキクサ根圏から分離された4-*t*-BP 分解菌であることが影響しているものと考えられる。

ウキクサの根分泌物を添加した系で、4-*t*-BP への曝露の有無で比較すると、4-*t*-BP に曝露していないウキクサの根分泌物を添加した系で顕著な発現が見られた遺伝子群は、酸化還元(EC1群)に関するもの、4-*t*-BP に曝露したウキクサ

の根分泌物を添加した系で発現が顕著であったのは、リン酸化、転移(ともに EC2 群) 加水分解 (EC3 群) 異性化 (EC5 群) 合成 (EC6 群) に関与するものであった。OMI 株が 4-*t*-BP に曝露した根分泌物に反応し、通常時とは異なる遺伝子群がはたらいたことが考えられる。

また、特に発現が顕著だった遺伝子群として、物質輸送・代謝、酸化還元関連、鞭毛の合成・動作に関わるものが挙げられた。これらのことより、水生植物の根分泌物が根圏微生物に及ぼす作用には、ある種の選択性があることが示唆された。また、特にウキクサの根分泌物は OMI 株の運動性や機能の活性化を促していることが考えられた。

(2) 水生植物との共生条件下における *S. fuliginis* OMI 株の遺伝子発現解析

作製した OMI 株の発現解析用 DNA マイクロアレイには、全部で 14,421 遺伝子から設計されたプローブを搭載したが、OMI 株の遺伝子発現解析の結果、コントロール系 (0 時間目) では、転写調節、酸化 / 還元、物質代謝などに関わる 89 遺伝子群 (うち、52 遺伝子群は機能未知) がハウスキーピング遺伝子として発現していた (表 2) のに対し、ウキクサあるいはコウキクサと共生させると、ウキクサとの共生系とコウキクサとの共生系で共通して 6 時間後には 121 遺伝子群 (機能未知: 62 遺伝子群) 24 時間後には 104 遺伝子群 (機能未知: 62 遺伝子群) 72 時間後には 128 遺伝子群 (機能未知: 68 遺伝子群) が顕著な発現を示した (表 2)。

表2 ウキクサ / コウキクサとの共生時に共通に強発現した OMI 株の遺伝子数

	0時間目*	6時間目	24時間目	72時間目
機能既知	37	77 (40)	66 (43)	83 (40)
機能未知	52	44 (22)	38 (19)	45 (28)
合計	89	121 (62)	104 (62)	128 (68)

* 強発現した OMI 株のハウスキーピング遺伝子数
なお、() 内の数値は、発現強度比が計算不能な遺伝子のうち、強発現に相当するもの (= SNR \geq 100)

また、ウキクサとの共生系のみで特異的に顕著な発現が確認された遺伝子群は、6 時間後で 52 遺伝子群 (機能未知: 24 遺伝子群) 24 時間後で 57 遺伝子群 (機能未知: 37 遺伝子群) 72 時間後で 62 遺伝子群 (機能未知: 25 遺伝子群) あり (表 3) コウキクサとの共生系でのみ特異的に顕著な発現が確認された遺伝子群は、6 時間後で 58 遺伝子群 (機能未知: 31 遺伝子群) 24 時間後で 48 遺伝子群 (機能未知: 27 遺伝子群) 72 時間後で 55 遺伝子群 (機能未知: 32 遺伝子群) あった (表 4)。

表3 ウキクサとの共生時にのみ特異的に強発現した OMI 株の遺伝子数

	0時間目	6時間目	24時間目	72時間目
機能既知	-	34 (19)	38 (24)	35 (14)
機能未知	-	18 (5)	19 (13)	27 (11)
合計	-	52 (24)	57 (37)	62 (25)

() 内の数値は、発現強度比が計算不能な遺伝子のうち、強発現に相当するもの (= SNR \geq 100)

表4 コウキクサとの共生時にのみ特異的に強発現した OMI 株の遺伝子数

	0時間目	6時間目	24時間目	72時間目
機能既知	-	30 (18)	39 (21)	34 (20)
機能未知	-	28 (13)	9 (6)	21 (12)
合計	-	58 (31)	48 (27)	55 (32)

() 内の数値は、発現強度比が計算不能な遺伝子のうち、強発現に相当するもの (= SNR \geq 100)

これらの遺伝子群から転写調節、酸化 / 還元、物質代謝などの一般的な機能に関わるものを除外しながら解析を行ったところ、6 時間後、24 時間後、72 時間後に共通して IV 型線毛の合成に関与する遺伝子群 (Flp 遺伝子群) が顕著に発現していることが明らかとなった。また、6 時間後のコウキクサとの共生系ならびに 24 時間後の両共生系では、化学走化性に関与する遺伝子群 (methyl-accepting chemotaxis) の顕著な発現が確認された。なお、IV 型線毛はグラム陰性細菌に広く分布することが知られており、その役割としては、表面への付着⁴⁾、twitching 運動 (多方向への間欠的な運動)⁵⁾ などが報告されている。

これらのことから、OMI 株はウキクサあるいはコウキクサとの共生下では、化学走化性に関する遺伝子群を高発現させることでウキクサあるいはコウキクサの根圏へ移動するとともに、線毛合成に関する遺伝子群を高発現させることでウキクサあるいはコウキクサの根面に付着するメカニズムが推定できた。今後、推定された一連のメカニズムに関与する遺伝子群をクローニングし、水生植物根圏への選択的集積能を有しない細菌 (大腸菌などを想定している) を用いた形質転換体や、ほかの根圏微生物による検証が望まれる。

また、以前の研究⁶⁾で明らかにしたように、ウキクサは、自身のおかれた環境 (特に曝露される化学物質種) に応じて根分泌物成分を変化させることから、様々な化学物質に曝露するなど、特殊な条件下で栽培した水生植物との共生条件下において、根圏への集積現象に変化が生じるかを明らかにすることにも興味を持たれる。

<引用文献>

経済産業省 (2007) 技術戦略マップ 2007. 遠山忠, 吉仲賢晴, 清和成, 池道彦, 藤田正憲 (2005) ボタンウキクサと根圏微生物の相互作用を利用した芳香族化合物の分解促進. 環境工学研究論文集 42, 475-486.

Toyama T., Yu N., Kumada H., Sei K., Ike M., and Fujita M. (2006) Accelerated aromatic compounds degradation in aquatic environment by use of interaction between *Spirodela polyrrhiza* and bacteria in its rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(4), 346-353.

Vesper S. J. and Bauer W. D. (1986) Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. *Applied and Environmental Microbiology* 52(1), 134-141.

Mattick J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* 56, 289-314.

Hoang H., Yu N., Toyama T., Inoue D., Sei K., and Ike M. (2010) Accelerated degradation of a variety of aromatic compounds by *Spirodela polyrrhiza*-bacterial associations and contribution of root exudates released from *S. polyrrhiza*. *Journal of Environmental Sciences-China* 22(4), 494-499.

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2件)

Yuka Ogata, Shohei Goda, Tadashi Toyama, Kazunari Sei, and Michihiko Ike (2013) The 4-*tert*-butylphenol-utilizing bacterium *Sphingobium fuliginis* OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and *meta*-cleavage pathway. *Environmental Science & Technology* 47(2), 1017-1023. (DOI: 10.1021/es303726h)(査読有)

Yuka Ogata, Tadashi Toyama, Ning Yu, Xuan Wang, Kazunari Sei, and Michihiko Ike (2013) Occurrence of 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of 4-*t*-BP-utilizing bacterium. *Biodegradation* 24(2), 191-202. (DOI: 10.1007/s10532-012-9570-9)(査読有)

[学会発表](計7件)

清和成, 深澤恵, 久保香菜子, 赤池菜, 斉藤利奈, 井上大介, 森川正章 (2015) 遺伝子発現解析によるウキクサ根圏から分離された微生物の根圏への定着メカニズムの推定. 第49回日本水環境学会年会. 金沢大学(石川県金沢市)(2015年3月18日) Tadashi Toyama, Yoshiko Nishimura, Yuka

Ogata, Kazunari Sei, Kazuhiro Mori, and Michihiko Ike (2014) Effects of common reed (*Phragmites australis*) on nitrogen removal and abundance of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in freshwater sediment. 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014). The Crown Palais New Hankyu Kochi (高知県高知市)(2014年11月26日)

Kazunari Sei, Megumi Fukasawa, Kanako Kubo, Shiori Akaike, Rina Saitoh, Daisuke Inoue, and Masaaki Morikawa (2014) Gene expression analysis of *Sphingobium fuliginis* OMI, isolated from the rhizosphere of *Spirodela polyrrhiza*, for the elucidation of symbiotic mechanism. 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014). The Crown Palais New Hankyu Kochi (高知県高知市)(2014年11月25日)

Masaaki Morikawa, Masayuki Sugawara, Kyoko Miwa, Ayaka Makino, Hideyuki Tamaki, Yoichi Kamagata, Tadashi Toyama, Yasuhiro Tanaka, Kazuhiro Mori, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Masashi Kuroda, and Michihiko Ike (2014) Trials for multifunctional aquatic vegetation bioprocess by utilizing symbiotic surface microorganisms. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Rhodes Island (Greece)(2014年7月9日)

黒田真史, 横山高史, 尾形有香, 遠山忠, 清和成, 武尾正弘, 池道彦 (2013) *Sphingobium fuliginis* OMI のアルキルフェノール類分解遺伝子群の解析. 第65回日本生物工学会大会. 広島国際会議場(広島県広島市)(2013年9月20日)

Masaaki Morikawa, Masayuki Sugawara, Kyoko Miwa, Ayaka Makino, Hideyuki Tamaki, Yoichi Kamagata, Tadashi Toyama, Yasuhiro Tanaka, Kazuhiro Mori, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Masashi Kuroda, and Michihiko Ike (2013) Development of multifunctional vegetation bioprocess by utilizing symbiotic microorganisms in the rhizosphere. The Second International Conference on Duckweed Research and Applications (Duckweed 2013). New Jersey (USA)(2013年8月23日)

合田昌平, 尾形有香, 遠山忠, 清和成, 池道彦 (2013) 4-*tert*-ブチルフェノール分解菌 *Sphingobium fuliginis* OMI 株によるビスフェノール類(BPs)の分解特性. 第47回日本水環境学会年会. 大阪工業大学(大阪府大阪市)(2013年3月11日)

[図書](計1件)

山下光雄, 清和成(編著) (2014) 地球を救うメタルバイオテクノロジー - 微生物と

金属資源のはなし - . 成山堂書店. 242 ページ.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

清 和成 (SEI, Kazunari)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：8 0 3 2 4 1 7 7