

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660282

研究課題名(和文)多様な温室効果ガスの大気圏からの消費に植物圏微生物が果たす新規生態系機能の発見

研究課題名(英文) Experimental verification of the contribution of plant-associated bacteria as a sink for greenhouse gases

研究代表者

菅野 学 (Kanno, Manabu)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10462847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物圏に生息する微生物が温室効果ガスの消費に寄与しうるかを検証するため、間接的温室効果ガスの水素を取り込む植物共生微生物に着目して研究を実施し、以下を明らかとした。高親和性水素酸化酵素の大サブユニットをコードするhhyL遺伝子が多様な植物種から検出され、高親和性水素酸化細菌が環境中の植物に広く存在することが示唆された。植物体内から分離した145株から、hhyL遺伝子を有する7株のStreptomyces属細菌が大気濃度以下にまで水素を酸化することを確認した。無菌植物に分離株を接種したところ、植物体内の局在が確認され、植物中と土壤中で細胞あたり同等の水素酸化能を示した。

研究成果の概要(英文)： In order to verify whether microbes living in plants contribute to the uptake of greenhouse gases, we focused on plant-associated bacteria possessing the ability to consume atmospheric hydrogen (H<sub>2</sub>), which acts as an indirect greenhouse gas. First, we detected the gene hhyL - encoding the large subunit of high-affinity [NiFe]-hydrogenase - in various plant species, suggesting that high-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing plant-associated bacteria are widely distributed. Among 145 endophytic isolates, 7 Streptomyces strains were shown to possess hhyL gene and exhibit high- or intermediate-affinity uptake activity, reducing H<sub>2</sub> concentration to less than ambient level. Inoculation of sterilized seedlings with selected isolates resulted to endophytic colonization visualized by FISH analysis. Cell-specific H<sub>2</sub> uptake activity displayed by the plant tissues was comparable to the activity measured in soil, demonstrating the ability of plant-associated streptomycetes to consume atmospheric H<sub>2</sub> in situ.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物 植物共生細菌 放線菌 水素 一酸化炭素 生物地球化学 大気物質循環 地球温暖化

## 1. 研究開始当初の背景

地球上には、動物や植物の総バイオマスを凌ぐ量の微生物が存在し、多様な物質の分布や反応に関与して、地球上の物質循環をコントロールすることが知られている。これら微生物の働きを漏れなく理解することは、生物圏地球化学における主要な関心事であり、環境価値を正しく評価して議論するうえで避けて通れない課題である。特に、二酸化炭素以外の、水素や一酸化炭素、メタンといった直接的・間接的な温室効果ガスが大気圏から消費される過程に関わる生物機能については、知見が極めて限られているのが現状である。最近になって、大気中に極めて希薄に存在するこれらガスを、好気的環境で高親和に直接取り込んで消費する微生物および酵素が相次いで発見され、地球化学的循環において主要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、従来の研究は土壌や海洋表層の微生物のみが研究対象とされており、同じく好気的環境である植物圏に生息する微生物が果たす役割に関する視点が欠落していた。

植物体内は通気組織の発達した好気的環境であり、植物 1g あたり約  $10^7$  個もの微生物が内生しているにも関わらず、これら微生物の生態系機能を検証した報告は、植物の生育調整や植物遺骸の分解、大気窒素の固定を除けばほぼ皆無である。

間接的温室効果ガスである水素を例に挙げると、大気水素の約 80% は陸圏との界面で消費されることが知られている。近年になって、大気濃度レベルの希薄な水素ガスを酸化しうる高親和性水素酸化酵素を持つ微生物群が土壌から発見され、土壌表面における大気水素の消費に主要な役割を担う可能性が示唆された。一方で、地球上の陸地表層の 50% 以上を占める植物圏においても大気水素

の消費が観測されているものの、それを担う微生物については明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

「植物圏に生息する微生物の活動によって多様な温室効果ガスが消費される」との新しい生態学的原理の提案を最終目標に掲げ、本研究では、モデルケースとして、間接的温室効果ガスである水素を消費する植物共生微生物に着目した研究を行った。具体的には、まず、分子生態学的解析や分離培養法によって、植物試料から遺伝子情報や微生物を網羅的に収集することを目的とした。さらに、植物接種試験とガス分析を組み合わせることで、大気水素の取り込みに関わる植物共生微生物の生態系機能の実証を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物試料

茨城県つくば市近郊の草地から採取したナズナ、セイダカアワダチソウ、クローバー、宮城県登米市の水田から採取したイネ、宮城県山元町の畑地から採取したネギ、実験室内にて栽培した野生型のシロイヌナズナの計 6 種の草本植物を、(2) の分子生態解析に供試した。実験室系統のシロイヌナズナ (Columbia) およびイネ (日本晴) の種子を (5) の植物接種試験に用いた。

### (2) *hhyL* 遺伝子の分子生態解析

表面を殺菌処理した植物試料から、体内に生息する微生物群のメタゲノムを抽出し、高親和性水素酸化酵素の大サブユニットをコードする遺伝子 (*hhyL*) を PCR 増幅してシーケンスを行った。さらに、*hhyL* 遺伝子の定量 PCR を行った。これにより、*hhyL* 遺伝子を持つ微生物群の多様性、分布、存在量に関する情報を収集した。

(3) *hhyL* 遺伝子を持つ微生物の植物体内からの分離培養

表面を殺菌処理したシロイヌナズナおよびイネを乳鉢を用いて破碎し、その破碎液を R2A 寒天培地上に塗布した。また、*hhyL* 遺伝子を持つ微生物株の約 92% が放線菌に属することが知られているため、TWYE、HV、YECD、スターチカゼインといった放線菌選択分離用の寒天培地上にも塗布した。コロニーを順次継代して純粋分離株を獲得した後、PCR 法を用いて *hhyL* 遺伝子を持つ分離株を選抜した。選抜した分離株の 16S rRNA 遺伝子および *hhyL* 遺伝子の配列を解読した。

(4) ガス分析による大気水素の消費能の検証

微量水素の高感度検出器 RGD を用いて密閉環境における大気水素の減少を分析することで、分離株の水素酸化活性を調べた。



図1 微量還元ガスの高感度検出器 RGD

(5) 植物接種試験

無菌土耕栽培したシロイヌナズナおよびイネに分離株を接種して、接種約 1 ヶ月後の植物体を固定・脱水・テクノビット置換した後に、マイクロームで樹脂包埋切片を作成した。これを放線菌特異的な蛍光プローブを用いた FISH 法 (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼー

ション) に供試することで、植物体内および植物表面における分離株の局在を調べた。さらに、土と植物と分離株から構成される、接種約 1 ヶ月後のマイクロコスム総体の水素消費活性、および植物と土壌の各々のフラクションの水素消費活性を測定した。各フラクションの微生物数をコロニーカウント法により調べて、細胞あたりの活性値を算出することで、植物圏、土圏といった生息場所によって、1 細胞あたりの大気水素の消費量に違いが見られるかを検証した。無菌植物や滅菌土壌の大気水素の消費能も並行して調べた。

4. 研究成果

(1) 分子生態解析

試験した野生植物 6 種の全てから、総 42 クローンの *hhyL* 遺伝子が検出され、*hhyL* 遺伝子を持つ微生物が多様な草本植物に普遍的に存在する可能性が示唆された。シーケンス情報の結果、植物共生微生物群から検出された *hhyL* 遺伝子の多様性は、土壌微生物群で知られる多様性と同等程度であった。定量 PCR の結果、植物新鮮重 1g 中から  $10^5$ - $10^8$  コピーの *hhyL* 遺伝子が検出され、これは土壌乾燥重 1g 中からの *hhyL* 遺伝子検出量と同等であった。

(2) 微生物株の分離と機能解析

シロイヌナズナおよびイネ体内から分離した 145 株から、*hhyL* を有する 7 株を選抜した。16S rRNA 遺伝子の解析結果より、7 株は全て *Streptomyces* 属放線菌であった。植物体内から獲得した分離株の大半 (6 株) は、これまでに土壌から分離され報告された *Streptomyces* 属の高親和性水素酸化細菌株とは別にクラスタリングされた。7 株のうち 4 株が、人工培地上で高親和性の水素酸化活性 ( $K_m$ , < 100 ppmv) を示し、7 株全てで大気濃

度以下にまで水素の減少が見られた。

### (3) 植物接種試験

接種1ヵ月後の地上部および根の表面や体内において、分離株がFISH法により蛍光検出され、分離株が植物共生能を有することが確認された。ガス分析の結果、マイクロコズムで大気水素の減少が見られた一方、無菌植物や滅菌土壌では見られなかった。また、分離株は植物表面や植物体内においても、細胞あたりで土壌中と同等の水素酸化能を示した。すなわち、植物圏は土圏と同様に、高親和性水素酸化細菌が大気水素を取り込みうる環境であることが推察された。

植物接種試験の結果より、植物種や分離株に関わらず少なくとも植物1gあたり1000 pmol h<sup>-1</sup>の水素消費が見られた。これより、地球規模での陸上植物(約1.8兆トン)の8%を占める草本植物での水素消費量を概算した場合、年間1.1 Tg(毎時約300トン)以上と試算され、植物に共生する高親和性水素酸化細菌の寄与は無視できないものと考えられる。本研究は、植物圏に生息する微生物が水素の地球化学的循環に寄与する可能性を示す初めての研究である。

予備試験において、一酸化炭素やメタンの消費に関与する各遺伝子(*coxL*, *pmoA*)がいくつかの植物種から検出されている。今後は、大気中の一酸化炭素やメタンの取り込みに関与する植物共生微生物の生態系機能についても同様の実証が望まれる。これら知見は、温室効果ガスの地球化学的循環の実体解明に向けた有力な手がかりを提供するとともに、植生地の環境アセスメントや地球温暖化に関する政治的判断を行う際の基盤情報として重要である。

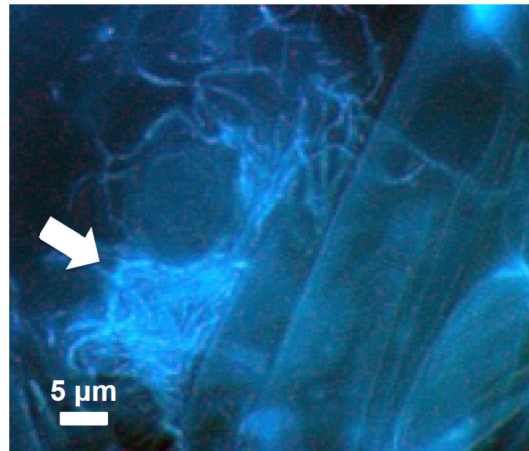


図2 高親和性水素酸化細菌 *Streptomyces* sp. AS13Y 株のシロイヌナズナ根における局在

### 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〕なし

〔学会発表〕(計7件)

菅野学、大気成分の循環に植物共生微生物が果たす新規生態系機能～水素を例に～、環境微生物系合同大会2014 サテライト研究集会、2014年10月25日、クラウンパレス浜松(静岡・浜松)

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、加藤創一郎、鎌形洋一、植物根圏における高親和性水素酸化細菌の生理生態学的特性の解明、環境微生物系合同大会2014、2014年10月22日、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡・浜松)

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、加藤創一郎、鎌形洋一、植物に共生する *Streptomyces* 属放線菌の水素酸化活性に根渗出物を与える影響の解明、第24回植物微生物研究交流会、2014年9月20日、佐賀大学(佐賀・佐賀)

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、鎌形洋一、Detection and isolation of plant-associated bacteria demonstrating high-affinity hydrogen uptake activity、The 15<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology (ISME15)、2014年8月25日、Seoul (Korea)

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、鎌形洋一、水素固定エンドファイト：水素ガスが大気圏から植物圏に取り込まれる過程に関わる微生物の分離と機能解明、第29回日本微生物生態学会大会、2013年11月23日、鹿児島大学(鹿児島・鹿児島)

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、鎌形洋一、大気中の水素ガスを取り込む「水素固定エンドファイト」の発見、第23回植物微生物研究交流会、2013年9月8日、岡崎コンファレンスセンター（愛知・岡崎）

菅野学、Philippe Constant、玉木秀幸、鎌形洋一、高親和性水素酸化活性を有する植物内生 Streptomyces 属放線菌の分離、2013年9月5日、メルパルク広島（広島・広島）

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 学 (MANABU KANNO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10462847

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

鎌形 洋一 (YOICHI KAMAGATA)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域研究戦略部・研究戦略部長

研究者番号：70356814

玉木 秀幸 (HIDEYUKI TAMAKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：00421842