

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 12 年度博士課程 入学

氏 名 Damarjaya Dolly Iriani

指導教官 妹尾啓史

論文題目

Phosphate solubilizing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria in aluminum toxic soils

(アルミニウム酸性土壌において植物生育促進根圏微生物として機能するリン溶解細菌に関する研究)

リンは植物の必須元素の一つであり、核酸、リン脂質、NADP、ATP などの構成元素として重要な役割を果たしている。土壌中のリンの形態は pH に左右される。土壌中のリンが可溶性のリン酸として存在し、植物に最も利用されやすいのは pH 6.5 付近である。しかし、リン酸は、pH が低い場合にはアルミニウムや鉄と、また pH が高い場合にはカルシウムやマグネシウムイオンと結合し、いずれも難溶態となる。一方、無機リン肥料の原料となるリン鉱石は近い将来に枯渇することが懸念されている。そのため、土壌中の難溶性リンを可溶化して植物による利用効率を高める方策の確立が望まれている。

植物の根圏に生息する土壌細菌の多くは、ギ酸、プロピオン酸、乳酸、フマル酸などの有機酸を分泌する能力がある。これらの有機酸は難溶性リン化合物のアルミニウム、鉄、カルシウム、マグネシウムと結合し、その結果、リン酸イオンが可溶化して植物が吸収できる。このような土壌細菌はリン溶解細菌 (Phosphate solubilizing bacteria, PSB) と呼ばれている。リン溶解細菌を土壌に接種することにより、土壌中の難溶性リンが可溶化され、作物の生産性が高まる現象が知られているが、これはほとんどの場合、アルカリ土壌で得られた結果であり、対象とされる難溶態リンはリン酸カルシウムに限

定されている。これに対して、東南アジアに広く分布するアルミニウム酸性土壌については、1) 主要な土壌リンの形態がリン酸アルミニウムおよびリン酸鉄であり、これらはリン酸カルシウムよりも難溶性であること、2) 酸性条件下で溶解するアルミニウムによる毒性、のため、有効なリン溶解細菌に関する研究はほとんどなされていない。

土壌からのリン溶解細菌の単離は、通常、リン酸カルシウムを懸濁させた Pikovskaya 寒天培地を用いて行われてきた。この寒天培地上に土壌細菌のコロニーを形成させると、リン溶解能力を有する細菌コロニーの周囲にはリン酸カルシウムの溶解によりハロー (halo-zone) が形成される。このハロー形成の有無とその大きさによって細菌のリン溶解能の検定が行われている。これまで、リン酸アルミニウムを懸濁させた Pikovskaya 寒天培地の作製の困難さから、もっぱらリン酸カルシウムが用いられてきた。このことも、これまでのリン溶解細菌の研究が主にリン酸カルシウムの溶解に集中していた理由である。また、この方法で得られるリン酸カルシウム溶解細菌のほとんどは、リン酸アルミニウムを溶解する能力を持たないか、極めて低いことが報告されている。従って、リン酸アルミニウム溶解能の検定手法を確立した上で、アルミニウム酸性土壌におけるリン溶解能に着目した研究が必要とされている。

このような背景をもとに、本研究では以下の事柄についての検討を行った。

1. 土壌細菌のリン酸アルミニウム溶解能力の検定手法の開発
2. 植物生育促進根圏微生物として知られている *Pseudomonas putida* の難溶性リン酸塩 (リン酸カルシウム、リン酸アルミニウム) 溶解能力の評価と、溶解メカニズムの解析
3. 酸性土壌の植物根圏からのリン溶解細菌の単離・同定と植物生育促進効果の評価
4. 日本とインドネシアの数種の酸性土壌からのリン溶解細菌の単離・同定と、植物生育促進効果の評価
5. リン酸アルミニウム溶解細菌として単離された *Gluconacetobacter* のリン溶解能とアルミニウム耐性能の評価

1. 土壌細菌のリン酸アルミニウム溶解能力の検定手法の開発

これまで、リン酸アルミニウムを均一に懸濁した Pikovskaya 寒天培地の作製は困難とされていたが、乳鉢を用いてパウダー状にしたリン酸アルミニウム粉末を用いることにより、作製が可能となった。また、培地にプロモフェノールブルーを添加することにより、リン酸アルミニウム溶解と微生物が産出する酸性物質との関連が検証できるようにした。

2. *Pseudomonas putida* の難溶性リン酸塩(リン酸カルシウム、リン酸アルミニウム) 溶解能力の評価と、溶解メカニズムの解析

P. putida は植物生育促進根圏微生物として機能することがしばしばあり、そのリン溶解能力に興味を持たれる。*P. putida* の 15 株について、Pikovskaya 寒天培地を用いてリン酸カルシウムおよびリン酸アルミニウムの溶解能力を調べた。15 株のうち 9 株はリン酸カルシウムを溶解したが、リン酸アルミニウムを溶解する株はなかった。リン酸カルシウムを溶解する *P. putida* IAM1050 株についてその溶解メカニズムの一端を明らかにすることを目的として、トランスポゾン挿入変異による溶解能欠失変異株(MPS⁻株)の取得を試みた。その結果、1 株の MPS⁻ 株が得られた。得られた MPS⁻ 株は培地の pH を低下させる能力を欠いていたことから、リン酸カルシウム溶解には菌体が分泌する酸性物質が関与していることが示唆された。IAM1050 株と MPS⁻ 株の液体培養液の HPLC 分析により、この酸性物質はクエン酸であることが示唆された。トランスポゾンの挿入された周辺の遺伝子領域の解析を行ったところ、変異の起こった遺伝子は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の isopropyl malate synthase をコードしている遺伝子に高い相同性を示すことが分かった。この酵素はピルビン酸からのアセチル Co-A 合成の制御に間接的に関わることから、TCA 回路におけるクエン酸合成との関連が興味深い。

3. 酸性土壌の植物根圏からのリン溶解細菌の単離・同定と、植物生育促進効果の評価

リン酸カルシウムまたはリン酸アルミニウムを懸濁させた Pikovskaya 寒天培地上でコロニーの周囲に形成されるハローを指標として、アルミニウム酸性土壌に生育させたクローバー、コムギ、トウモロコシ、ヒマワリの根圏土壌から、リン溶解細菌の単離を試みた。その結果、酸性耐性で、かつアルミニウム耐性のリン溶解細菌 8 株が得られた。16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列決定の結果、これらの株は *Burkholderia* (5 株)、*Pseudomonas* (1 株)、*Ralstonia* (1 株) と推定された。残り 1 株は未同定である。Pikovskaya 寒天培地上でこれらの株の全てがリン酸カルシウム溶解能を示したが、リン酸アルミニウム溶解能を示したのは 1 株の *Ralstonia* のみであった。これらのリン溶解細菌のコロニーの周囲では pH の低下が観察された。アルミニウム酸性培地を用い、これらの単離株を接種してクローバーの生育試験を行った結果、接種することにより植物の生育が促進され、地上部の乾燥重量が増加した。この結果から、これらのリン溶解細菌はアルミニウム酸性土壌において微生物肥料として用いられる可能性がある

ことが示された。

4. 日本とインドネシアの数種の酸性土壌からのリン溶解細菌の単離・同定と、植物生育促進効果の評価

さらに多数のリン溶解細菌を得るために、日本とインドネシアの数種の酸性土壌からの単離を試みた。7 株のリン溶解細菌が単離され、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列から、*Burkholderia* (4 株)、*Pseudomonas* (1 株)、*Gluconacetobacter* (2 株) と推定された。2 株の *Gluconacetobacter* はいずれも Pikovskaya 寒天培地上でリン酸アルミニウムを溶解する高い能力を示した。これらの株をアルミニウム酸性土壌に接種して、トウモロコシの栽培試験を行ったところ、接種することにより植物の生育が促進され、植物地上部の乾燥重量が増加した。酸性土壌から単離されたこれらのリン溶解細菌もアルミニウム酸性土壌において微生物肥料として用いられる可能性があることが示された。

5. *Gluconacetobacter* のリン溶解能とアルミニウム耐性能の評価

酸性土壌から単離された 2 株の *Gluconacetobacter* が高いリン酸アルミニウム溶解能力を示したことから、この 2 株の *Gluconacetobacter* と、比較対照として 3 株の *Gluconacetobacter* 株 (*Gluconacetobacter hansenii* IFO13963, *Gluconacetobacter liquifaciens* IFO12338T, *Gluconacetobacter xylinum* LMG1527T) を用い、16S rRNA 遺伝子の制限酵素断片長ならびに Repetitive PCR DNA fingerprinting に基づく遺伝子型、アルミニウム耐性、リン酸アルミニウム溶解能について比較した。上記の遺伝子型の結果から、今回単離された *Gluconacetobacter* は用いた対照菌株とは遺伝的に異なることが示された。これら 5 株の *Gluconacetobacter* は培地中の 75 mM のアルミニウムに耐性で、Pikovskaya 寒天培地上でリン酸カルシウム、アルミニウムのいずれをも溶解する高い能力を示した。*Gluconacetobacter* はアルミニウム酸性土壌でリン溶解を目的とする微生物肥料として用いられる高い可能性を有していると考えられた。