

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏名 岸本 高充

指導教員名 正木 春彦

論文題名

イネのエンドファイトとして単離した窒素固定能を有する複合細菌系の解析

20 世紀初頭にハーバー・ボッシュ法が開発された以後、農業は化学窒素肥料に依存する体質となっている。たとえば、日本の稲作ではヘクタール当り 50 kg-N の化学窒素肥料が投入されている。しかし、大量の化学窒素肥料の投入は農地から流出した窒素による環境汚染をまねいており、しかもハーバー・ボッシュ法は大量の化石燃料を消費するプロセスである。

上記の問題点への対応策として、当研究室では、化学窒素肥料の使用量を抑制しつつ現在の収量を維持する方法として、イネと共存する窒素固定細菌を生物窒素肥料として活用する研究を行っている。ただし、イネと生物窒素固定との関係には、*Klebsiella* や *Azotobacter* による根圏や根表面での窒素固定、*Azospirillum* による根の細胞間隙での窒素固定、*Herbaspirillum* による地上部組織内での窒素固定など、多様な様式があることが知られている。そこで、本研究では、エンドファイト窒素固定細菌に着目した。この生物窒素固定には、固定された窒素の植物外への拡散が無いこと、また、窒素固定細菌と競争関係にある細菌が根圏よりは少ないため窒素固定細菌は植物からのエネルギー源供給を優先的に受けられることなどの利点が考えられる。

既知のエンドファイト窒素固定細菌である *Azospirillum* と *Herbaspirillum* には、窒素

固定を行う際の特徴として微好気条件あるいは嫌気条件を好むことが知られている。したがって、好気条件で窒素固定を行う細菌を新たに見つけ、上記の窒素固定細菌とはイネ体内の異なるニッチで窒素固定を行なわせることで、生物窒素肥料としての可能性をひろげることを目指した。

1. イネ体内からの好気性窒素固定細菌の分離

農環研の對馬らにより、コシヒカリ体内より分離される好気性細菌としては *Microbacterium* と *Sphingomonas* が優占することが報告されていた。また、当研究室では、イネ根圏から分離された *Sphingomonas azotifigens* Y39 (*Sphingomonas paucimobilis* Y39 を 2005 年に東大分生研の横田らが新種として再分類) が窒素固定能を有することを確認していた。そこで、コシヒカリより *Sphingomonas* を分離し、その中から窒素固定能を有するものをスクリーニングすることとした。

最初のスクリーニングとして、登熟期のコシヒカリの止葉を表面殺菌後摩砕し、その摩砕液を NY (肉エキス培地) プレートに塗布して培養した。*Sphingomonas* のスフィンゴリピッドの色である黄色のコロニーを 234 個釣菌し、細菌同定検査キット (API 20 NE) での解析や 16S rDNA の解析を行った。その大部分は *Pantoea* と考えられた。*Microbacterium* と考えられた 2 株に関して詳細に解析したところ、イネへの感染性は確認できたが、アセチレン還元能 (ARA) は確認できなかった。

そこで新たなスクリーニングを行った。登熟期のコシヒカリの止葉の葉身と葉鞘を細分化し、表面殺菌後摩砕した。その摩砕液を 4 種の炭素源を含む無窒素培地である改変 Rennie 培地 (MRM) プレートに塗布して培養した。現れた全てのコロニーを釣菌し 1505 株を取得した。それらの ARA を高層軟寒天培地法 (気相は、空気 85%、アセチレン 15%) で測定したところ、再現性をもって ARA を示したのは 1 株 (F-I-50) のみであり、その生育は培地表面でのみ起きた。16S rDNA 解析を行ったところ、*Sphingomonas* と *Ralstonia* という 2 種の配列が得られた。F-I-50 株はこれらの細菌の複合系なのだろうか。もしそうだとすると、*Ralstonia* にも窒素固定遺伝子 (*nifH*) の存在の報告があるので、どちらの細菌が窒素固定能を担っているのだろうか。以後、この解析を行った。

2. F-I-50 の解析

F-I-50 をあらためて NY プレートでシングルコロニー化した。当初は生じるコロニーに違いが認められず F-I-50 は単一の細菌なのではないかと考えられたが、試行を繰り返すうちに形状の異なるコロニーが生じるようになり、最終的に安定して分離できる細菌は *Microbacterium*、*Sphingomonas*、*Variovorax* であった。F-I-50 の保存株は、当初取得したものを何回か継代しているため、その間に構成する細菌の種類、存在比などが変わってしまった可能性が考えられる。しかし、上記 3 種の細菌が分離できる段階の F-I-50 でも ARA が維持されていたので、窒素固定能を担う細菌には変化がないものと判断して、その細菌の特定を試みた。

上記 3 種の細菌に対して PCR とサザンハイブリダイゼーションにより *nifH* 遺伝子の有無を解析したところ、*Microbacterium* にその存在が示唆され、*Sphingomonas* と *Variovorax* には示唆されなかった。しかし *Microbacterium* を単独で培養した場合には ARA が確認できず、また残りの 2 種の細菌と混合培養（共培養）しても ARA は確認できなかった。

そこで、まだ分離できていない好気性窒素固定細菌が F-I-50 に存在するのではと考え、NY プレート、MRM プレート、あるいは炭素源改変 MRM プレート、アンピシリン含有 NY プレートで分離を行った。その結果 *Bacillus* が見つかったが、それ以外はすべて既出の細菌であった。ところが、この *Bacillus* も単独培養ならびに共培養ともに ARA を示さなかった。

以上のように、分離した細菌を共培養しても F-I-50 の窒素固定能を再現することができなかった。そこで、F-I-50 の ARA そのものをあらためて確認した。この複合系の ARA は高層軟寒天培地法でのみ発揮され、培地表面の 2~3 mm 下に菌体の層が見える。なお、液体振盪培養では ARA 発揮されないが、菌体の増殖そのものは濁度として確認できる。また、高層軟寒天培地法でも気層をアルゴンに置換して嫌気条件にすると ARA はなくなり、菌体の増殖もなくなってしまう。以上のことから、F-I-50 が窒素固定活性を発揮するには、複合系中に存在する嫌気性細菌からの作用が必要なのではないのかと考えた。つまり、液体振盪培養（強い好気条件）では嫌気性細菌が増殖できないため、*Microbacterium* 属細菌に対する作用が無くなり ARA を発揮できず、嫌気条件では *Microbacterium* の生育が阻害され、やはり ARA が観察できない、という現象なのではないかと考えた。

そこで、上記の嫌気性細菌を探る目的で、まずは F-I-50 の ARA を最も強く発揮する状態のものを取得することとした。F-I-50 を高層軟寒天培地法により複数連で培養し、その ARA を計測する。ARA が最高値を示したものを、さらに新しい数十本の培地に植菌し、同様の操作を行う。これを二度繰り返し、安定的に高い ARA を示す複合系 (F-I-50S) を確保した。念のために F-I-50S を構成する好気性細菌をプレーティング法や限界希釈法により確認したところ、既出の細菌しか存在しなかった。そこで、この F-I-50S を NY プレートに塗布し嫌気条件で培養して嫌気性細菌の分離を行った。その結果、*Anaerospora* を得ることができた。*Anaerospora* 属は、新種の *Anaerospora hongkongensis* のみを含む Clostridiales、Veillonellaceae の属として 2005 年に提唱されたものである。

3. 複合細菌系の再構築

獲得した *Anaerospora* を *Microbacterium* と共培養したところ、上記の予想どおり ARA が確認できた。ところが、*Anaerospora* を *Sphingomonas*、*Bacillus*、*Variovorax* と共培養しても、予想に反して ARA が確認された。

そこで *Anaerospora* に対してサザンハイブリダイゼーションにより *nifH* 遺伝子の有無を調べたところ存在が示唆されたので、nested PCR により約 300 bp の配列を増幅して解析したところ、*Clostridium* の *nifH* と相同性の高い *nifH* であった。

以上のことより、F-I-50 において窒素固定能を担っていたのは、当初の予想の *Microbacterium* ではなく、*Anaerospora* であると考えざるを得なくなった。

Anaerospora は、単独培養では好気条件でも嫌気条件でも ARA を示さないのに対し、共培養では、気層が空気の場合に ARA を発揮し、アルゴン置換すると ARA を発揮しない。この特徴は、F-I-50 の示す ARA の特徴と完全に一致する。

Anaerospora が単独培養でも ARA を示す条件を探索するために、共存細菌の Conditioned Medium での培養、炭素源やアミノ酸を添加した MRM での培養、オートクレーブなどにより調製した共存細菌の死菌を添加した培地での培養を試みたが、今のところいずれの場合でも ARA を確認できていない。

本研究では、当初の目的である好気性窒素固定細菌を得ることはできなかった。しかし、新規に発見した嫌気性窒素固定菌は、好気性非窒素固定菌との共存が窒素固定に必要であるという非常に興味深い性質を持っていることが見出された。