

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 30 年度博士課程入学
氏 名 吉留 大輔
指導教員 葛山 智久

論文題目

イネ根圏での窒素固定細菌の細菌間相互作用に応じた機能動態の再現とその応用

第 1 章 序論

アンモニアを主成分とする化学窒素肥料の大量消費に依存した現代農業は、過去に類を見ない量の食糧生産を実現した。稲作では、化学窒素肥料を基肥と追肥の 2 回に分けて大量に投与することで収穫量が最大化されている。しかしこの裏では、Haber-Bosch 法による化石燃料の大量消費に伴う地球温暖化や、水圏の富栄養化などの環境問題が既に顕在化している。

当研究室では、環境負荷の少ない稲作の実現を目指し、異なる炭素源を資化して窒素固定を行う 2 種類の細菌 *Klebsiella oxytoca* NG13（糖を資化）と *Azospirillum lipoferum* FS（有機酸を資化）を混合し、稲作の追肥部分の生物窒素肥料とすることを検討してきた。追肥時期にはイネが分泌する大量の炭素源を利用して、生物窒素肥料としての高い肥効を発揮すると期待される。過去に、水田土壌で栽培したイネに両株を追肥として混合接種することで、籾収量が 2 割程度増大したことから、両株が追肥として順当に機能することが示唆された。しかし、両株の混合接種によってイネ根圏細菌叢全体が示す窒素固定活性がどのように変化したかは不明であった。

そこで本研究では、まずイネ根圏環境を再現する試験管培養系を構築し、これを使用することで、イネ根圏において NG13 株と FS 株がイネや根圏細菌叢と相互作用する中で行う生理機能の動態を明らかにすることを目指した。さらに、炭素源資化性の違いという視点で広範な根圏窒素固定細菌を解析することで、イネ根圏細菌叢が有する高い窒素固定活性の要因の解明と、高活性型の生物窒素肥料の開発に向けた知見の創出も目指した。

第 2 章 イネ根圏を再現する試験管ケモスタット培養系の構築

イネ根圏では、糖を主体に有機酸も含む炭素源が毎日一定量根から分泌され、それらは田面水の垂直方向の流れに乗って失われる。また、根から放出される空気によって、様々な酸素濃度が存在する。これらの特性を試験管で再現するには、細菌叢の定着資材を導入したケ

モスタット培養系が適当であると考え、その条件検討を行った。

定着資材としては、菌体の定着が観察されたロックファイバブロックを採用した。イネ分泌炭素源の供給および田面水による流失については、Lin and You (1989) が報告したイネ分泌炭素源 (3 種類の糖、4 種類の有機酸) を基にした Rice 培地を毎日 10 mL ずつ培養液と交換することで再現した。使用する Rice 培地の最適な炭素源濃度 (145-1450 mg/L) および窒素源としての Yeast Extract 濃度 (0-100 mg/L) の検討を行ったところ、それぞれ 480 mg/L、10 mg/L とすることで、イネ根圏の pH である 6.5 付近を推移し、試行した条件の中で最大の $1.6 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$ 程度の窒素固定活性を長期間発揮したことから、イネ根圏細菌叢に近い細菌叢を構築できたと考える。そこで、この培養系を「イネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系」と命名し、今後の解析に使用することとした。

第 3 章 根圏細菌叢に NG13 株と FS 株を接種した際の窒素固定活性の動態解析

まず、上記培養系で構築した細菌叢における *Klebsiella* 属細菌と *Azospirillum* 属細菌の存在量を調べた。*Azospirillum* 属細菌の存在は 30 サイクルの PCR で明瞭に確認できたが、*Klebsiella* 属細菌の存在は 30 サイクルの PCR でも検出できず、この結果は水田土壌における両株の存在量を調べた過去の解析結果と一致していた。このことから、本培養系で構築する細菌叢はイネ根圏細菌叢の再現として適切であると考えられる。

この細菌叢に、イネの追肥として接種した時と同様に、細菌叢の約 1/100 の菌体量である 10^7 cells の NG13 株と FS 株を接種したところ、14 日間にわたり両株は定着していることが確認され、その間細菌叢のみの窒素固定活性より 3 割程度高い活性が発揮された。イネが追肥から吸収する窒素源の約 9 割は、追肥後 3-9 日間で行われる。したがって、この増強した窒素固定活性が生み出すアンモニアが、NG13 株と FS 株の混合接種が生物窒素肥料として機能した実体であることが強く示唆された。

第 4 章 炭素源資化性の異なる NG13 株と FS 株共存時の窒素固定活性の動態解析

NG13 株と FS 株の混合接種が、イネ根圏細菌叢全体が示す窒素固定活性を増強させた要因の解明を目指すべく、両株の生理機能についての解析を行った。まず、NG13 株と FS 株が窒素固定を行う際に示すイネ分泌炭素源の資化性を調べたところ、過去の知見通り、NG13 株は糖を、FS 株は有機酸を主に資化した。さらに、NG13 株は糖を混合有機酸醗酵することでイネ分泌炭素源には含まれない酢酸を生産しており、FS 株はこの酢酸も窒素固定を行う際の炭素源として利用した。

次に、イネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系で両株それぞれを単独培養し、イネ根圏で想定される両株の動態を解析した。NG13 株はロックファイバブロックの表面にバイオフィームのような状態で定着し、 $1.2 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$ 程度の高めの窒素固定活性を発揮した。この時の培養液中の酢酸濃度は 0.15 g/L を推移したが、これはイネ分泌炭素源に含まれる有機酸濃度の 2.5 倍に相当する。一方、FS 株はロックファイバブロックにほとんど定着し

ておらず、 $0.2 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$ 程度の低めの窒素固定活性を発揮した。酢酸を介して相互作用することで FS 株の窒素固定活性が強化されるかが注目された。そこで、イネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系を用いて両株を混合培養したところ、両株をそれぞれ単独培養した時の窒素固定活性の合計値 ($1.24 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$) より高い活性 ($1.52 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$) が発揮された。この時の培養液中の酢酸量は、NG13 株単独培養時より 0.05 g/L 程度減少しており、これはイネ分泌炭素源に含まれる有機酸の量に相当した。

以上の結果より、NG13 株と FS 株を混合接種時にイネ根圏細菌叢全体が示す窒素固定活性増強の要因として、第一に高めの窒素固定能を有する NG13 株がイネが分泌する多量の糖を資化して行う窒素固定、第二に FS 株が行う窒素固定が、NG13 株が供給する多量の酢酸によって強化されること、が考えられる。

第 5 章 炭素源資化性の異なる広範な窒素固定細菌の応用

酢酸による窒素固定活性の強化は、イネ根圏細菌叢に存在する多種多様な窒素固定細菌に対しても起こると予想され、このことが NG13 株と FS 株の混合接種時の細菌叢全体の窒素固定の増強にも寄与すると考えられる。そこで、炭素源資化性の違いという視点で広範な根圏窒素固定細菌の解析を行った。

まず、イネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系で構築した平均 $1.9 \mu\text{mol}/4\text{h}/\text{tube}$ 程度の高い窒素固定活性を発揮した細菌叢から、RiceC1 培地でコロニーを形成する 959 株を単離し、それぞれを RiceC10 液体培地でバッチ培養することで、窒素固定活性を有する 251 株を選別した。さらに、16S rDNA の配列を基に、最終的に 15 属 26 種類の窒素固定細菌を取得した。次に、これらの窒素固定細菌が、生理機能の面から NG13 株と FS 株のどちらに類似するかを RiceC10 液体培地を用いたバッチ培養後の pH を基に分類した。NG13 株同様培地 pH が低下した 8 種をタイプ N、FS 株同様培地 pH が変化しなかった 18 種をタイプ F とした。

各窒素固定細菌をイネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系を用いて、イネ根圏環境で発揮する窒素固定活性のポテンシャルを測定すると、タイプ N の細菌は NG13 株と同様に高めの窒素固定活性を示し、タイプ F の細菌は FS 株と同様に低めの窒素固定活性を示した。さらに、タイプ N の窒素固定細菌の酢酸分泌について調べると、そのほとんどがイネが分泌する有機酸の総量を上回る量の酢酸を生成していた。また、タイプ F の窒素固定細菌のほとんどが酢酸を資化して窒素固定を行った。

そこでまず、酢酸で窒素固定を行ったタイプ F の窒素固定細菌をイネ根圏再現型試験管ケモスタット培養系で NG13 株と共培養したところ、いずれの場合も相加的以上の窒素固定活性が発揮された。その培養液中の酢酸濃度は、NG13 株単独培養時のものより有意に減少していた。さらに、NG13 株に代えてタイプ N の窒素固定細菌と共培養しても同様の結果が得られ、NG13 株と FS 株の組合せ以上の窒素固定活性を発揮した組合せも数種類存在した。

以上の結果より、イネ根圏細菌叢を構成する酢酸生成や資化を行う多様な窒素固定細菌が酢酸を介した相互作用をすることが、イネ根圏細菌叢が有する高い窒素固定活性の要因の一つであると示唆された。

第6章 総括

以上の結果を基に、イネ根圏細菌叢の機能を考察する。自然状態のイネ根圏細菌叢の大部分は非窒素固定細菌が占め、その中には糖を資化して酢酸を含む有機酸を生成するものが存在する。この有機酸が加わることで、タイプFの窒素固定細菌の機能は、イネ分泌有機酸のみに頼る時よりも増強されている状態になるのだろう。ここにNG13株とFS株が混合接種されると、酢酸を介する窒素固定細菌間の相互作用が増強され、イネ根圏細菌叢は自然状態では成し得ない高い窒素固定活性を達成できると考えられる。

本研究で取得した窒素固定細菌の中には、NG13株以上にイネ分泌炭素源資化時の窒素固定活性が高い株、FS株以上に酢酸資化時の窒素固定活性が高い株が見出されている。今後これらの組合せについて詳細に解析を進めることが、高活性型生物窒素肥料の開発につながると期待する。

参考文献

Lin Min and You Chongbiao (1989) Root exudates of rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with *Alcaligenes faecalis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 22(6), 6-12.