

	さいとう あさみ
氏名（本籍地）	齋藤朝美
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第101号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	植物に内生する偏性嫌気性窒素固定 <i>Clostridium</i> 属細菌に関する研究
博士論文審査委員	（主査）教授 南 澤 究 教授 東 谷 篤 志 助教授 佐 藤 雅 志

序

地球規模の窒素の循環は、大気中の窒素ガスを固定する窒素固定とその逆反応である脱窒のバランスにより成立っている。窒素固定は、自然界の放電や工業的製造などによる非生物的窒素固定と原核生物（真正細菌および古細菌）による生物窒素固定に大別されるが、後者の方が地球規模の窒素循環への寄与が大きい（横山 2003）。人類は工業的窒素固定により生産される窒素肥料を用い食料生産を支えてきたが、そのために膨大な化石燃料を消費してきた。持続可能な食料生産と地球環境の保全のためには、生物窒素固定をより理解し、利用する道を探索する必要がある。

マメ科植物は、根粒菌との共生関係により効率的に共生窒素固定を行う能力を獲得してきた。一方、イネ科植物など非マメ科植物体内にも窒素固定細菌（窒素固定エンドファイト）が生息し、窒素固定を行う可能性が指摘されている。このような中、私の所属する研究室ではイネ科植物から新規の微生物共同体「嫌気窒素固定コンソーシアム: Anaerobic nitrogen-fixing consortium (ANFICO)」を見出した (Minamisawa *et al.* 2004)。この共同体は、好気性あるいは通性嫌気性の非窒素固定細菌が呼吸により酸素を消費し周囲の酸素分圧を低下させることにより、偏性嫌気性窒素固定細菌の生育が可能となり培地中で窒素固定活性を発現する（図 1）。16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析より植物から分離した嫌気性窒素固定細菌は全て *Clostridium* 属細菌であり Group I, II, III, IV, V の 5 つに分かれた（図 2）各 group は酸素抵抗性や非窒素固定細菌依存的な窒素固定活性などで異なる特徴を示した。その後ススキから多数の *Clostridium* 属細菌が分離された。

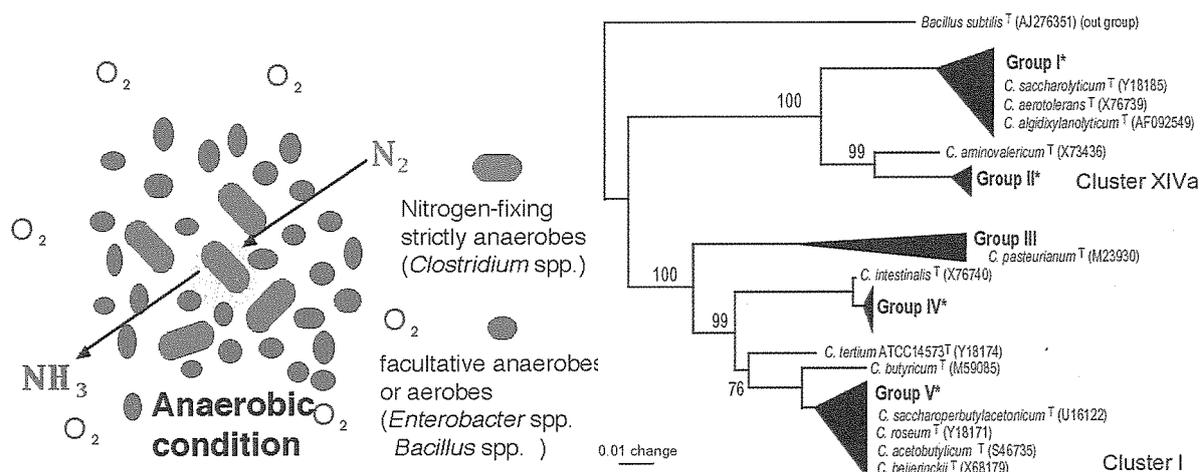


図 1 嫌気窒素固定コンソーシアムの概念モデル 図 2 植物から分離した *Clostridium* 属細菌の分子系統樹

これまでの窒素固定エンドファイトの研究では、植物体内における窒素固定能の発現や複数のエンドファイトによる機能発現についての報告はほとんどない。そのため、窒素固定細菌を利用

した作物生産は、これからの減農薬農業・環境保全上、大変重要であると考えられるものの、まだ実用段階には至っていない。また、海外の研究を含め、従来分離された窒素固定エンドファイトの窒素固定は極めて低いことが分かっており、植物が獲得する生物窒素固定量に比較してその貢献度は低く、窒素固定の主要な原因エンドファイトが不明な状態である。

嫌気窒素固定コンソーシアム（偏性嫌気性窒素固定 *Clostridium* 属細菌と非窒素固定細菌）の存在は、植物内生菌は好気性菌であるというこれまでの常識を覆すとともに、ある機能を担う微生物が難培養性である一つの理由が微生物共同体（複合微生物系）であることを示している。そこで本研究では、*Clostridium* 属細菌がイネ科植物体内で窒素固定を行っている主要な窒素固定エンドファイトであるか明らかにするために、アセチレン還元や *nifH* 遺伝子の転写産物を特異的に検出する方法による *Clostridium* 属エンドファイトの植物体内における窒素固定の解明（第一章）、植物への *Clostridium* 属細菌の分布 (TFRLP 法) および植物内生細菌の群集構造解析 (RISA 法) (第二章)、さらに、植物から分離した *Clostridium* 属細菌の系統学的および機能的な分類（第三章）について研究を行った。

第一章 *Clostridium* 属エンドファイトの植物体内における窒素固定能の評価

最初に、ススキ幼植物体 (*M. sinensis*) を用い無菌条件下における接種系を確立した。定着試験の結果から、ススキに最も高く定着する接種菌として、*Clostridium* sp. Kas107-1 株と *Enterobacter* sp. B901-2 株の組み合わせを選抜した。*Clostridium* sp. Kas107-1 株は、自生ススキのシュートから分離された株であり、ススキに親和性が高く全身感染しやすい可能性が考えられた。植物体内窒素固定は、炭素源の非存在下では検出されなかった。炭素源を植物の根から供給した場合、アセチレン還元活性および *nifH* 遺伝子発現により、植物に内生した *Clostridium* 属細菌の植物体内窒素固定が観察された。炭素源供給後、接種植物体内の *Clostridium* sp. Kas107-1 株の *nifH* 転写産物と同様に、16S ribosomal RNA もまた増加した。したがって、供給した炭素源により、接種植物体内における *Clostridium* sp. Kas107-1 株のアセチレン還元活性、*nifH* 遺伝子発現および 16S ribosomal RNA の増加を顕著に誘導していることが明らかとなった。これらの結果から、植物の光合成により豊富な炭素源が供給されるなら、植物に内生する *Clostridium* 属細菌が活性化され植物体内で窒素固定する可能性が示唆された。

第二章 *Clostridium* 属エンドファイトの植物分布

作物を含む 12 植物種の 67 植物サンプルを採集し、*Clostridium* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とする TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素末端断片長) 解析により植物内生 *Clostridium* 属エンドファイトの分布を調査した。*Clostridium* 属細菌は、供試したほとんどの植物種から検出され、新たに 4 科 8 植物種：イネ科植物のトウモロコシ (*Zea mays*)、バミューダグラス (*Cynodon dactylon*) およびトールフェスク (*Festuca arundinacea*)、ナス科植物のタバコ (*Nicotiana tabacum*)、マメ科植物のダイズ (*Glycine max*)、およびマングローブ植物であるヒルギ科のメヒルギ (*Kandelia candel*)、オヒルギ (*Bruguiera gymnorrhiza*) およびクマツヅラ科のヒルギダマシ (*Avicennia marina*) に生息していることが明らかとなり、多くの植物種に分布していることが示唆された。特に cluster XIVa に属する group I および II の *Clostridium* 属細菌は、植物の地上部から高頻度に検出され、主要な植物内生 *Clostridium* 属エンドファイトであると考えられた。次に、ITS 領域 (16S-23S rRNA 遺伝子間) を標的とする多型解析 RISA 法をエンドファイト研究に初めて導入し、植物内における微生物の群集構造解析を行った。RISA 解析により、*Clostridium* 属細菌は主要内生菌ではないものの、植物体内の微生物群集は植物の生育ステージや遺伝的形質により変化することが明らかとなった。また、ダイズでは根粒形成がシュート (茎や葉) に内在する *Clostridium* 属細菌の植物内生菌数に影響したことから、根粒菌による感染と植物内生細菌数とは、植物の全身反応を介し、互いに交差反応する可能性が考えられた。

第三章 Cluster XIVa に属する植物由来 *Clostridium* 属細菌の分子系統解析

植物由来の *Clostridium* 属分離株は、16S rDNA 配列に基づく系統樹から、系統学的に 2 ヶ所 (group I および II) に集中しており、他の分離源 (ルーメン、腸内、糞便、シロアリ) から分離されている *Clostridium* 属細菌とは異なる系統に位置し、新たなグループを形成していることが明らかとなった (図 3)。また、植物から分離した *Clostridium* 属菌株は、未検証である *C. xylanolyticum* を除外すると、全て窒素固定細菌であった。系統学的解析により、植物に内生している *Clostridium* 属細菌は他の分離源の *Clostridium* 属細菌とは異なる特徴を持つ可能性が考えられるが、それは窒素固定であるかもしれない。つまり、group I および II に属する *Clostridium* 属細菌は、窒素固定の機能をもつことで感染や増殖が有利となり、植物体内環境で生存できている可能性が考えられる。さらに、group II の Kas107-2 株、Oki N108 株および OkiF101 株の 3 株は、近縁の *Clostridium* 属細菌との相同性が低く、機能的 (非窒素固定細菌依存的な窒素固定) にも異なる特徴を示すことから、新種として分類できると考えられた。

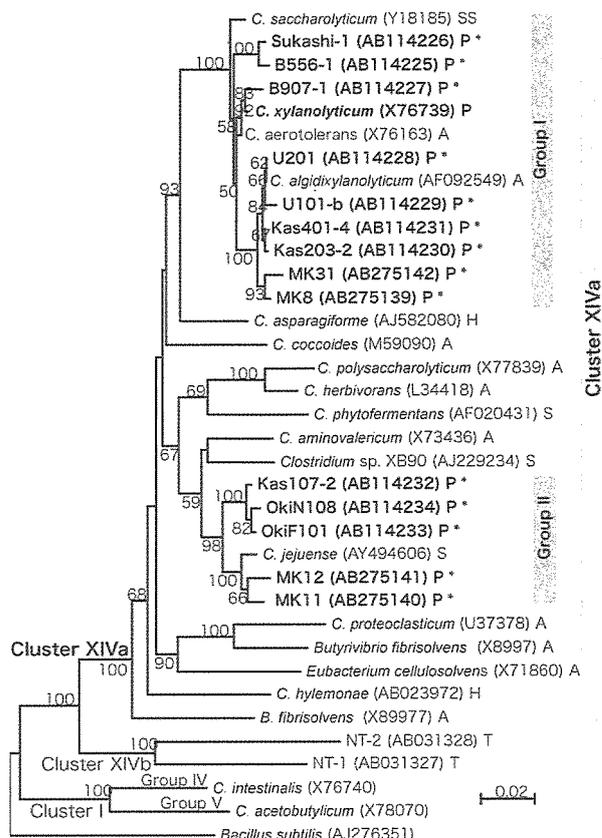


図 3 Cluster XIVa *Clostridium* 属細菌の分子系統樹

本研究により、*Clostridium* 属細菌が植物体内において窒素固定する可能性があること (第一章)、主要な植物細菌ではないものの系統学的に広範囲な植物種に分布していること (第二章)、さらに、植物由来 *Clostridium* 属細菌は系統学的に独自のグループを形成し、共通な特徴として窒素固定能力を保有していることを明らかにした。*Clostridium* 属細菌が植物体内で窒素固定を行っている主要な窒素固定エンドファイトであるという証拠は得られていないが、植物に内生する偏性嫌気性 *Clostridium* 属細菌は新たなタイプの窒素固定エンドファイトであることが分かった。

論文審査結果の要旨

エンドファイトとは、特に病徴を示すことなく植物体内に生息している微生物の総称である。細菌エンドファイトは植物の細胞間隙に定着し、窒素固定・生育促進・耐病性などを与える場合がある。細菌エンドファイトは好気性・通性嫌気性細菌のみが今まで知られていたが、近年、偏性嫌気性窒素固定細菌である*Clostridium* 属細菌がススキなどのイネ科植物から分離された。そこで、本論文では、新規な偏性嫌気性*Clostridium*属エンドファイトの植物への分布と窒素固定能について明らかにすることを目的とした。

作物を含む6科12植物種の67植物試料を採集し、*Clostridium*属細菌の16S rRNA遺伝子を標的とするTRFLP（制限酵素末端断片長）解析により植物内生*Clostridium*属エンドファイトの分布を検討した。*Clostridium*属細菌は供試したほとんどの植物種から検出されたので、多くの植物種に分布していることが明らかとなった。特に、cluster XIVaは主要な植物内生*Clostridium* 属エンドファイトであり、16S rRNA遺伝子に基づいた系統樹の2ヶ所に集中し、ルーメン、腸内、糞便、シロアリ由来の*Clostridium*属細菌とは異なる系統に位置した。

ススキ幼植物体を用い無菌条件下における接種系を確立し、最も高く定着する接種菌として*Clostridium* sp. Kas107-1株を選抜した。炭素源の非存在下では窒素固定能は検出されなかった。炭素源を植物根から供給した場合、植物に内生した*Clostridium*属細菌の窒素固定能（アセチレン還元活性および*nifH*遺伝子発現）が観察された。これらの結果から、光合成などにより豊富な炭素源が供給されるなら、*Clostridium*属エンドファイトが植物体内で窒素固定する可能性が示唆された。

以上のように、本論文は新規な偏性嫌気性の *Clostridium* 属エンドファイトの植物分布と窒素固定ポテンシャルを明らかにしたもので、エンドファイトの生態研究に新たな知見を与えたものである。以上の論文内容は、斉藤朝美氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。そこで、審査員一同、斉藤朝美氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認めた。