



窒素固定エンドファイトの窒素固定活性に与える異なる炭素源の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 宮崎大学農学部 公開日: 2014-07-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川上, 明子, 谷田, 将人, 矢野, 翼, 城, 惣吉, 佐伯, 雄一, 山本, 昭洋, Kawakami, Akiko, Tanida, Masato, Yano, Tsubasa, Shiro, Sokichi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/4904">http://hdl.handle.net/10458/4904</a>

研究論文

## 窒素固定エンドファイトの窒素固定活性に与える異なる炭素源の影響

川上明子・谷田将人・矢野 翼・城 惣吉・佐伯雄一・山本昭洋

宮崎大学農学部応用生物科学科

(2014年1月17日 受理)

### Effect of carbon sources on nitrogenase activity of diazotroph endophytic bacteria

Akiko KAWAKAMI, Masato TANIDA, Tsubasa YANO, Sokichi SHIRO, Yuichi SAEKI,  
Akihiro YAMAMOTO

Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

**Summary :** Endophytic diazotrophic bacteria exists internal tissues of higher plant without causing damage to their hosts. Host specificity between higher plant and endophyte is lower than that of legume-rhizobium symbiosis. This is desirable trait as microbial inocula, which may be used for the cultivation of a wide range of plants. However, it was reported that the inoculation effects of endophytes were not stable and continuous. This study focused on carbon source which is one of the important factors for nitrogen fixation and investigated the different utilization of carbon source, and the effect of carbon sources on nitrogenase activity. Carbon source utilization of five endophytes (*Herbaspirillum* sp. B501, *Enterobacter* sp. No. 35, *Klebsiella* sp. No. 38, *Burkholderia* sp. No. 25, *Pantoea* sp. No. 18) were investigated using Biolog plate. These were incubated in modified LGIP medium including selected different carbon-sources, and confirmed growth rate and acetylene reduction activity. Some endophytes utilized citric acid, iconic acid, malic acid, sucrose, and showed nitrogenase activity that was lower than that of sugarcane sugar. Furthermore, by combined use of sucrose and other carbon source, nitrogenase activity of all endophytes, except *Pantoea* sp. No. 18, were increased. These results show that endophytes had different utilization of carbon sources, and nitrogenase activity was affected by their carbon sources.

**Key words :** Carbon source, Nitrogenase activity, Nitrogen-fixation bacteria, Utilization

### 緒 論

作物生育において窒素は重要な栄養素であり、これまでの農業では化学窒素肥料の施肥により作物への窒素源供給を行ってきた。しかし近年では、過剰な化学窒素肥料による地下水汚染や温室効果ガスの発生が問題視されるようになり、現代農業はこれまでのエネルギー多投型の農業から、自然

循環機能を利用し少量のエネルギーを効率よく投入する農業である「環境保全型農業」への転換が求められている(農林水産省 2006)。この環境保全型農業には、農薬や肥料の適正な使用や稲わらや家畜排せつ物などの有機物の有効利用による土づくり、そして生物学的窒素固定の利用などがある。この生物学的窒素固定とは「大気中の窒素をアン

モニアに変換できる酵素，ニトロゲナーゼを持つ細菌が行う窒素固定」のことで，変換されたアンモニアはアミノ酸として放出され，その微生物の宿主植物に栄養素として利用されることが報告されている（安藤ら 2005）．これまでは，窒素固定を行う微生物としてマメ科植物と共生関係を構築する根粒菌や水田のラン藻が農業上注目されてきた．Cavalcante and Döbereiner (1988) は，ブラジルでサトウキビ茎汁液から単離した *Acetobacter diazotrophicus*（現在の *Gluconacetobacter diazotrophicus*）が，窒素固定能を持つことを発見した．このことにより植物体内に生息する窒素固定細菌（窒素固定エンドファイト）が新たな窒素固定システムとして期待されるようになった．窒素固定エンドファイトはイネ，サツマイモ，パイナップルなどの体内から単離されている（Elbeltagy *et al.* 2001；Weber *et al.* 1999）．また，ブラジルの農業試験場の調査ではサトウキビにおける 0 - 72% の窒素固定寄与率が推定され，農業への有用性が期待された（Yoneyama *et al.* 1997）．

中村ら (2009) は，窒素固定エンドファイトの有用性を検証するために，窒素固定エンドファイトである *Enterobacter* sp. No.35株および *Herbaspirillum* sp. B501株を用いてサトウキビへの接種試験を試みたところ，接種直後の生育量において旺盛であることが報告された．しかしながら，収穫期においては接種効果が認められず，窒素固定エンドファイトの接種効果は不安定，あるいは非持続的な効果である等の問題が明らかとなった．

その要因の一つには炭素源の資化性の違いが推察された．窒素固定エンドファイトは植物体内の糖や有機酸，アミノ酸といった炭素源を資化し，そのエネルギーをニトロゲナーゼ反応に利用している（安藤ら 2005）．ニトロゲナーゼ反応は 1モルの窒素をアンモニアへ変換する際に 16モルの ATP という多量のエネルギーを必要とする（Burris 1991）．そのため高い窒素固定活性を発現させるためには十分なエネルギー源の供給が必要である．これまでに，菌種により炭素源の資化性が異なり，*Gluconacetobacter diazotrophicus* はスクロースを資化し窒素固定能を発揮するが，*Herbaspirillum seropedicae* はスクロースではなく，アコニット酸を資化することが報告されている（Asis *et al.* 2003）．しかしながら，炭素源の資化

性に関する報告はまだ少ない．

本研究は，植物への窒素固定エンドファイトの接種効果を高めるための知見を得ることを目的として，窒素固定エンドファイト 5 菌株における炭素源の資化性の差異およびその違いが窒素固定活性へ与える影響について解析を行った．

## 材料および方法

### 供試菌株

供試菌株には *Herbaspirillum* sp. B501 株，*Enterobacter* sp. No. 35 株，*Klebsiella* sp. No. 38 株，*Burkholderia* sp. No. 25 株，*Pantoea* sp. No. 18 株の計 5 菌株を用いた．*Herbaspirillum* sp. B501 株は東北大学大学院生命科学研究科の南澤究教授から分与されたものである（Elbeltagy *et al.* 2001）．*Enterobacter* sp. No. 35 株と *Klebsiella* sp. No. 38 株はサトウキビから，*Burkholderia* sp. No. 25 株と *Pantoea* sp. No. 18 株はサツマイモから，著者らの研究グループにおいて単離された菌株である（Tanaka *et al.* 2006）．

### 供試菌株の資化性の調査

供試菌株の資化する可能性のある炭素源は，グラム陰性菌用 GN2 マイクロプレート（BioLog Inc., Hayward, CA, USA）を用いて調査した．対象の 95 種類の炭素源のうち，炭素源が酸化される際に発色試薬が還元されて紫色を呈したものを，資化される可能性がある炭素源とした．各菌株のグリセロールストックを適当に希釈し LB 平面培地に塗布して 28℃ で培養後，出現したシングルコロニーを滅菌した綿棒で掻き取り，GN/GP INOCULATING FLUID に懸濁して透過率 52% となるように懸濁液を調整した．グラム陰性菌用 GN2 マイクロプレートの各ウェルに懸濁液を 100  $\mu$ L ずつ接種した後，28℃ で培養して 24，48 時間後に調査を行った．

### 改変 LGIP 平面培地による増殖の調査

実験で使用する LGIP 培地は，窒素固定細菌の培養に用いられる培地の一つである（Reis *et al.* 1994）．本実験ではキビ糖を炭素源とする LGIP 培地と，グラム陰性菌用 GN2 マイクロプレートの結果（表 1）を基に選抜した炭素源と置き換えた改変 LGIP 培地を作製し，供試菌株が生育できるか

**Table 1.** Utilization patterns of GN2 Microplate for Gram-negative bacterium in five endophytes.

Carbon source	Genus				
	H	E	K	B	P
Acetic acid	+	+	-	-	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	+	+	+	-
cis-Aconitic acid	+	+	+	+	+
L-Alaninamide	-	-	-	-	+
D-Alanine	+	+	+	+	+
L-Alanine	-	+	+	+	+
L-Alanylglycine	+	+	+	+	+
$\gamma$ -Amino butyric acid	+	-	-	-	+
2-Aminoethanol	+	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	-
D-Arabitol	+	+	+	+	-
L-Asparagine	+	+	+	+	+
L-Aspartic acid	+	+	+	+	+
Bromosuccinic acid	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	-
Citric acid	+	+	+	+	+
Dextrin	-	+	+	-	-
Formic acid	+	+	+	+	-
D-Fructose	-	+	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	+	-
Galacturonic acid	+	+	+	+	-
Gentiobiose	-	+	+	+	-
Glucuronamide	-	-	+	+	-
D-Gluconic acid	+	+	+	+	+
D-Glucosaminic acid	+	+	+	+	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Glucose-1-phosphate	-	+	+	+	-
D-Glucose-6-phosphate	+	+	+	+	-
D-Glucuronic acid	+	+	+	+	-
L-Glutamic acid	+	+	-	-	+
Glycerol	-	+	+	+	-
D,L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	-	+	+	+	-
Glycogen	+	+	-	-	-
Glycyl-L-aspartic acid	-	+	+	-	+
Glycyl-L-glutamic acid	+	+	-	-	+
Histidine	-	-	-	-	+
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+	-	-	-	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+	-	-	-	+
p-Hydroxy phenylacetic acid	-	-	-	-	+
Inosine	-	+	+	+	-
myo-Inositol	-	-	+	-	-
Itaconic acid	+	-	-	-	+
$\alpha$ -Keto glutaric acid	+	-	-	-	-
D,L-Lactic acid	+	+	+	+	+
L-Leucine	-	-	-	-	+
Malonic acid	+	+	-	-	-
Maltose	-	+	+	+	-
D-Mannitol	+	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	-
$\beta$ -Methyl-D-glucoside	-	+	+	+	-
L-Phenylalanine	-	-	-	-	+
Phenylethyl-amine	-	-	-	-	+
L-Proline	+	-	-	-	+
Propionic acid	+	-	-	-	+
D- Psicose	-	+	+	+	-
L-Pyroglytamic acid	+	-	-	-	+
Pyruvic acid Methyl Ester	+	+	+	+	+
Quinic acid	+	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	+	+	+	-
D-Saccharic acid	+	+	+	+	-
Sebacic acid	-	-	-	-	+
L-Serine	-	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	+	+	+	-
Succinamic acid	+	-	-	-	+
Succinic acid	+	+	+	+	+
Succinic acid mono-methyl ester	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	+	+	-
Thymidine	-	-	+	+	-
D-Trehalose	-	+	+	+	-
Turanose	-	+	+	+	-
Uridine	-	+	-	-	-
Urocanic acid	-	-	-	-	+

Genus of five endophytes indicates the initial of H; *Herbaspirillum* sp. B501, E; *Enterobacter* sp. No.35, K; *Klebsiella* sp. No.38, B; *Burkholderia* sp. No.25, P; *Pantoea* sp. No.18. Plus sign indicates utilization of carbon sources, minus sign indicates non utilization of carbon sources.

確認した。

LGIP平面培地は、蒸留水 1 Lにつき、 $K_2HPO_4$  0.2 g,  $KH_2PO_4$  0.6 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.02 g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.002 g,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.01 g, キビ糖 100 g (Nissin Sugar Co., Ltd., Tokyo, Japan; 糖度 94 - 98°, 還元糖 2 % 以下, 100 gあたり炭水化物 98.8 g, ナトリウム 10 - 30 mg, カルシウム 10 - 35 mg, カリウム 142 mg, マグネシウム 3 - 20 mg, リン 1.1 mg, 鉄 0.15 - 0.45 mg, 銅 0.05 - 0.30 mg), 寒天末 18 g を加え, さらに 0.2 M KOH で調整した 0.5% BTB 溶液を 5 mL 加えて混合した。その後 1 N NaOH で pH 6.8 に調整した。改変 LGIP 平面培地では, 選抜した炭素源であるスクロースは 10% (w/v), クエン酸, *trans*-アコニット酸, コハク酸, グルコン酸, イタコン酸, DL-リンゴ酸, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸をそれぞれ 0.1% (w/v) となるように添加した。

培地はオートクレーブ滅菌 (121 °C, 20分) を行い, クリーンベンチ内で滅菌シャーレに 15 mL 程度分注し固化させて保存した。接種剤の調製は, まず各菌株のグリセロールストック 50  $\mu$ L を LB 液体培地 50 mL に接種して 28 °C で半日から 1 日程度培養し, 培養液を 25 °C, 10分, 2,500  $\times$  g で遠心分離してペレットを得て, 滅菌蒸留水で再懸濁し, この操作をもう一度繰り返した。懸濁液は血球計算盤で菌数を測定し, 適当に希釈して  $2 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> に調整した。異なる炭素源を含む LGIP 培地に調製した菌懸濁液 50  $\mu$ L をクリーンベンチ内で無菌的に塗布して 28 °C で 2 日間から 5 日間培養した。

#### 改変 LGIP 半流動培地による窒素固定活性の調査

本実験では, 同様様にキビ糖を炭素源とする LGIP 培地とキビ糖を選抜した炭素源と置き換えた改変 LGIP 半流動培地を作製し, アセチレン還元活性 (Acetylene reduction activity; ARA) を調査した。LGIP 半流動培地は, LGIP 平面培地の組成から寒天末を 2 g に変更して調製した。改変 LGIP 半流動培地では, 選抜した炭素源であるスクロースを 10% (w/v), クエン酸, *trans*-アコニット酸, コハク酸, グルコン酸, イタコン酸, D,L-リンゴ酸, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸をそれぞれ 0.1% (w/v) となるように添加した。さ

らに、スクロースと有機酸またはアミノ酸を組み合わせた2種類の炭素源を併用した場合のARAを比較するために、スクロース5% (w/v) に加え、クエン酸、アコニット酸、コハク酸、グルコン酸、イタコン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸のいずれかを0.1% (w/v)、リンゴ酸を1% (w/v) 含むように調整した培地を作製した。

LGIP半流動培地は45 mL容積の平底試験管に15 mL程度入れてオートクレーブ滅菌を行った。接種剤となる菌懸濁液の調製方法はと同様で、各菌株をLB液体培地で培養したものを集菌、洗浄して調製した。懸濁液は希釈して $2 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>に調整した。異なる炭素源を含んだLGIP半流動培地に調製した菌懸濁液100  $\mu$ Lをクリーンベンチ内で無菌的に置床して28 $^{\circ}$ Cで6日間培養した。培養後、ヘッドスペースの10% (v/v) をアセチレンガスで置換しさらに24時間培養した。その後Porapak N (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) を充填したステンレスカラムと水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ (GC-8A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いて注入口温度100 $^{\circ}$ C、カラム温度50 $^{\circ}$ C、検出器温度100 $^{\circ}$ Cでエチレン生成量を測定した。なお、窒素固定活性は試験管あたりのエチレン生成量で算出した。

### 統計処理

実験結果の差の検定には、Tukey HSD testsまたは $t$ -testsを用いた (KaleidaGraph 4.11, Synergy Software, Reading, PA, USA)。

## 結果

### 供試菌株の資化性と炭素源の選抜と生育

供試菌株が資化する炭素源は、グラム陰性菌用GN2マイクロプレートを用いて調査した。表1はグラム陰性菌用GN2マイクロプレートの発色パターンを示した。なお、いずれの菌株においても発色が見られなかった23種類の炭素源は、結果から除外した。供試した5菌株全てが資化すると考えられたのは、検定に用いた95種類の炭素源のうち14種類であった。以降の実験では14種類のうち、アコニット酸、クエン酸、コハク酸、グルコン酸、アスパラギン酸を用いる炭素源として選抜した。また、*Enterobacter* sp. No. 35株、*Klebsiella* sp. No. 38株、*Burkholderia* sp. No. 25株の3菌株が資化すると考えられた15種類の炭素源からスクロース、*Herbaspirillum* sp. B501株、*Pantoea* sp. No. 18株が資化すると考えられた7種類の炭素源からイタコン酸を選抜した。また、窒素固定の際に重要な炭素源とされるリンゴ酸 (Elbeltagy *et al.* 2001) や他のアミノ酸およびタンパク質合成の重要な基質となるアミノ酸のグルタミン酸 (Postgate 1988) も供試する炭素源として選抜し、計9種類の炭素源を以降の実験において用いた。

表2は、選抜した炭素源を含む培地上での窒素固定エンドファイトの増殖の有無を示した。*Enterobacter* sp. No. 35株、*Klebsiella* sp. No. 38株、*Burkholderia* sp. No. 25株、*Pantoea* sp. No. 18株においては、イタコン酸以外では増殖が認められた。一方、*Herbaspirillum* sp. B501株においては、他の4菌株では増殖が認められなかったイタコン酸では増殖したが、スクロースでは増殖しなかった。*Enterobacter* sp. No. 35株、*Klebsiella*

Table 2. Growth rate of five endophytes under different carbon sources.

	<i>Herbaspirillum</i> sp. B501	<i>Enterobacter</i> sp. No.35	<i>Klebsiella</i> sp. No.38	<i>Burkholderia</i> sp. No.25	<i>Pantoea</i> sp. No.18
Aconitic acid	++	+++	+++	++	++
Aspartic acid	++	+++	+++	+++	++
Citric acid	++	+++	+++	+++	++
Gluconic acid	+	+++	+++	+++	++
Glutamic acid	+++	+++	+++	+++	++
Itaconic acid	++	-	-	-	-
Malic acid	++	+++	+++	+++	++
Succinic acid	++	+++	+++	+++	++
Sucrose	-	+++	+++	+++	+

Plus sign (+++, ++, +) indicates colonization after 2, 3, and 4 days of incubation respectively, minus sign indicates no growth.

sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株では, 表 1 で示した発色パターンは類似していることに加え, 選抜した炭素源による増殖パターンも類似するなど, 多くの共通点が見られた. 他方, *Herbaspirillum* sp. B501株, *Pantoea* sp. No. 18株のそれぞれの発色パターンは*Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株の3菌株の発色パターンと明らかに異なるものであった. また, 選抜した炭素源のうちグラム陰性菌用GN2マイクロプレートにおいて発色がみられた炭素源はおおむね生育を確認することができたが, 一部生育しないものや発色していないにもかかわらず生育が認められる炭素源もあった. このことはグラム陰性菌GN2マイクロプレートにおける発色にさらに時間が必要であったこと, 増殖確認実験では炭素源以外に培地に含まれる化合物やpHなどの培地条件が異なっていたことなどが考えられる.

#### 異なる炭素源が窒素固定活性に与える影響

LGIP半流動培地および選抜した炭素源を含む改良LGIP培地において, 窒素固定活性の指標であるARAを調査した.

単一の炭素源としてLGIP半流動培地を調製した場合, *Enterobacter* sp. No.35株, *Klebsiella* sp.

No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株の3菌株がスクロースを炭素源とする培地でARAを示し, *Herbaspirillum* sp. B501株においてイタコン酸, クエン酸, リンゴ酸を炭素源とした場合にARAが認められた(表3). またリンゴ酸を炭素源とした場合, *Enterobacter* sp. No. 35株, *Burkholderia* sp. No. 25株でもARAがわずかに認められた. *Pantoea* sp. No. 18株は単一の炭素源による培養ではARAが認められず, キビ糖を用いた場合のみ認められた. すべての供試菌株において, キビ糖を炭素源とした場合に最も高い窒素固定活性を示した.

スクロースと有機酸またはアミノ酸を組み合わせた2種類の炭素源を併用した場合の供試菌株における窒素固定活性の結果を表4に示した. 1種類の炭素源を用いた場合と比較すると, *Pantoea* sp. No. 18株を除くいずれの菌株においても, 窒素固定活性が上昇した. 特にリンゴ酸とスクロースの併用は, キビ糖を単一の炭素源として用いた場合と同程度の高い値を示した. *Herbaspirillum* sp. B501株におけるグルコン酸とスクロースの併用, *Klebsiella* sp. No. 38株におけるグルタミン酸とスクロースの併用もリンゴ酸との併用ほどではなかったが, 他の炭素源に比べ有意に高い値を示した.

**Table 3.** Effect of different carbon source condition on nitrogenase activity in five endophytes.

	Citric acid	Itaconic acid	Malic acid	Sucrose	Sugarcane Sugar
<i>Herbaspirillum</i> sp. B501	0.058 ± 0.016 <sup>b</sup>	0.134 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.319 ± 0.060 <sup>b</sup>	ND	2.36 ± 0.103 <sup>a</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. No.35	ND	ND	0.008 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.032 ± 0.025 <sup>b</sup>	4.45 ± 0.059 <sup>a</sup>
<i>Klebsiella</i> sp. No.38	ND	ND	ND	0.093 ± 0.040 <sup>b</sup>	2.46 ± 0.028 <sup>a</sup>
<i>Burkholderia</i> sp. No.25	ND	ND	0.009 ± 0.001	0.141 ± 0.048 <sup>b</sup>	2.95 ± 0.112 <sup>a</sup>
<i>Pantoea</i> sp. No.18	ND	ND	ND	ND	2.89 ± 0.121

Data are presented as  $\mu\text{mol tube}^{-1}$  and means  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values labeled with same letters between carbon sources are not significantly different ( $p = 0.05$ ). ND; not detected.

**Table 4.** Effect of combined application sucrose with other carbon sources on nitrogenase activity in five endophytes.

	Aconitic acid	Aspartic acid	Citric acid	Gluconic acid	Glutamic acid	Itaconic acid	Malic acid	Succinic acid
<i>Herbaspirillum</i> sp. B501	0.583 ± 0.049 <sup>bc</sup>	ND	0.688 ± 0.025 <sup>bc</sup>	1.240 ± 0.356 <sup>ab</sup>	ND	0.244 ± 0.082 <sup>c</sup>	1.97 ± 0.035 <sup>a</sup>	0.632 ± 0.018 <sup>bc</sup>
<i>Enterobacter</i> sp. No.35	0.840 ± 0.071 <sup>b</sup>	0.024 ± 0.002 <sup>d</sup>	ND	0.286 ± 0.017 <sup>d</sup>	0.799 ± 0.073 <sup>bc</sup>	0.273 ± 0.026 <sup>d</sup>	2.45 ± 0.184 <sup>a</sup>	0.354 ± 0.041 <sup>cd</sup>
<i>Klebsiella</i> sp. No.38	0.730 ± 0.069 <sup>c</sup>	0.015 ± 0.002 <sup>d</sup>	0.206 ± 0.080 <sup>cd</sup>	0.464 ± 0.036 <sup>cd</sup>	1.470 ± 0.205 <sup>b</sup>	0.161 ± 0.131 <sup>cd</sup>	2.36 ± 0.183 <sup>a</sup>	0.688 ± 0.128 <sup>cd</sup>
<i>Burkholderia</i> sp. No.25	0.908 ± 0.040 <sup>b</sup>	0.029 ± 0.003 <sup>c</sup>	ND	0.289 ± 0.020 <sup>bc</sup>	0.823 ± 0.057 <sup>b</sup>	ND	2.56 ± 0.276 <sup>c</sup>	0.413 ± 0.071 <sup>bc</sup>
<i>Pantoea</i> sp. No.18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Data are presented as  $\mu\text{mol tube}^{-1}$  and means  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Values labeled with same letters between carbon sources are not significantly different ( $p = 0.05$ ). ND; not detected.

## 考 察

窒素固定エンドファイトである *Herbaspirillum* sp. B501株, *Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株, *Pantoea* sp. No. 18株, これら 5 菌株についてグラム陰性菌用GN2マイクロプレートを用いて資化できる可能性のある炭素源を選抜した。その結果を基に選抜した炭素源を用いた改変LGIP培地で培養を行い, 菌株の生育の確認と窒素固定活性の指標であるARAの測定を行った。5 菌株全てが資化する炭素源であるアコニット酸やクエン酸, コハク酸, グルコン酸, アスパラギン酸, 特定の菌株から選択的に資化される炭素源であるスクロースやイタコン酸, 窒素固定やアミノ酸代謝の際に重要であるリンゴ酸 (Elbeltagy *et al.* 2001) やグルタミン酸 (Postgate 1988) を選抜した。供試した 5 菌株中 2 菌株が単離されたサトウキビのアポプラスト中に存在する主要な有機酸として, リンゴ酸, クエン酸, アコニット酸があり, その濃度は品種, 植物の生育ステージによって異なるが, リンゴ酸が0.01-0.05% (w/w), クエン酸が0.02-0.12% (w/w), アコニット酸が0.05-1% (w/w) との報告がある (Asis *et al.* 2003)。今回の試験でこれらの有機酸を0.1% (w/v) で窒素固定活性を測定した場合は, 一部の菌株で窒素固定活性が認められた (表3)。リンゴ酸濃度を 2% (w/v) として窒素固定活性を測定したところ, 0.1% (w/v) 時に窒素固定活性が検出限界以下あるいは低い値であった *Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株の 3 菌株において 0.374-0.700  $\mu\text{mol tube}^{-1}$  の窒素固定活性を検出した (データは示さず)。このことからサトウキビ中の含有率を高めることで, 内生する窒素固定エンドファイトの窒素固定活性が向上する可能性が示唆された。その他, 窒素固定活性が認められた炭素源にスクロースがあり *Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株の 3 菌株で認められた。 *Herbaspirillum* sp. B501株および *Pantoea* sp. No. 18株が, スクロースを炭素源として含む培地で窒素固定活性を示さなかったことについては, これらの菌がスクロース分解酵素であるインペルターゼを持っていない可能性が考えられる。 *Herbaspirillum* 属の一種である *H. seropedicae* はスクロースを資化できない (Straub

*et al.* 2013)。また, *H. seropedicae* は *Azospirillum* 属の新種として同定された菌であり, *Azospirillum* 属と似た特性を有している。 *Azospirillum* 属は主に有機酸を資化し, インペルターゼを欠損していることからスクロースを資化できず, またグルコースも資化できない。コハク酸, グルコン酸, アスパラギン酸, グルタミン酸は単独の炭素源としては窒素固定活性が認められないが, スクロースと併用することで窒素固定活性が認められた (表4)。リンゴ酸もスクロースとの組み合わせにより *Herbaspirillum* sp. B501株, *Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株では窒素固定活性が大きく向上した。 *Pantoea* sp. No. 18株はキビ糖を炭素源とするLGIP培地でのみ窒素固定活性が認められたが, キビ糖の94-98% (w/w) を占めるスクロースにおいては窒素固定活性が認められなかった。このことから *Pantoea* sp. No. 18株において, 本試験で用いた炭素源以外のキビ糖中の微量成分が, 窒素固定活性に必要な微量成分として働いている可能性が示唆された。

また, 内生菌の窒素固定活性を引き出すために宿主植物の根に炭素源を供給し, 潜在的な窒素固定能を評価する実験において, 炭素源を添加することでアセチレン還元活性を検出した報告があり, 炭素原を添加する有効性が示されている (Saito *et al.* 2006)。また Oliveira *et al.* (2002) によると 5 種類の窒素固定エンドファイトを組み合わせで接種した試験において, 様々な組み合わせの中で 5 種類の菌株をすべて混ぜた場合の窒素固定寄与率が最も高いという結果が示されており, 混合接種が高窒素固定能を付与するための一つの方法と考えられる。これらのことから, 接種菌の組み合わせを考える際に接種菌の資化性を考慮することは, 効果的な接種を行う上で欠かせないことである。

以上, これら一連の実験から窒素固定エンドファイトが資化する炭素源により, アセチレン還元活性は変動することが明らかとなった。特に一部の菌株を除き, 複数の炭素源の添加により窒素固定活性が顕著に上昇することが示された。今後は, 菌株の増殖速度の差を考慮するために, 試験管あたりの窒素固定活性ではなく, 菌数あたり窒素固定活性の評価を行う必要がある。また, 窒素固定

酵素ニトロゲナーゼの構造遺伝子の発現解析を行うことで、エネルギー源である炭素源がどのようにニトロゲナーゼの生産や活性に関与しているかを明らかにするべきである。そして炭素源の資化性に関するより詳細な研究を行うことで、窒素固定エンドファイトの植物に対する有用かつ確実な接種技術を確立することが可能であると考えられる。

## 要約

窒素固定エンドファイトは高等植物に内生する窒素固定細菌である。その緩やかな宿主特異性ゆえに広い範囲の植物種への利用が期待されている。しかしながら、その植物への接種効果は不安定、非持続的であることが報告されている。本研究は、接種菌が窒素固定を行う際に重要な要因の一つである炭素源の資化性に注目し、菌種による炭素源の資化性の差異および炭素源が窒素固定活性へ与える影響について調査し、植物への接種菌株の接種効果を高めるための知見を得ることを目的とした。窒素固定エンドファイト 5 菌株 (*Herbaspirillum* sp. B501株, *Enterobacter* sp. No. 35株, *Klebsiella* sp. No. 38株, *Burkholderia* sp. No. 25株, *Pantoea* sp. No. 18株) が資化できる可能性のある炭素源を Biolog プレートを用いて調査した。その結果を基に選抜した炭素源を用いた改変 LGIP 培地で培養を行い、菌株の生育の確認と窒素固定活性の指標であるアセチレン還元活性の測定を行った。菌株により異なったがクエン酸、イタコン酸、リンゴ酸、スクロースを資化し、窒素固定活性を認めしたが、キビ糖に比べその活性は低かった。また 1 種類の炭素源では窒素固定活性が低い値あるいは検出限界以下であっても、スクロースと併用することにより *Pantoea* sp. No. 18 株を除く全ての菌株において、活性の上昇が明らかとなった。これらの結果より、窒素固定エンドファイトが資化する炭素源により窒素固定活性は変動することが明らかとなった。

キーワード：資化性、炭素源、窒素固定エンドファイト、窒素固定活性

## 謝辞

窒素固定エンドファイト *Herbaspirillum* sp. B501 株を分与して下さった東北大学大学院生命科学研究科の南澤究教授に謝意を表す。また、本研究の一部は農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト「生物機能を活用した環境負荷低減技術の開発」により実施された。

## 引用文献

- 安藤象太郎, 大脇良成, 後藤匡裕, 米山忠克 (2005) エンドファイティック窒素固定 第 3 タイプの植物-微生物窒素固定システム. 化学と生物. 43, 12, 778-794.
- Asis, C.J. Jr., T. Shimizu, M.K. Khan, S. Akao (2003) Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49, 915-920.
- Burris, R.H. (1991) Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* 266, 9339-9342.
- Cavalcante, V.A., J. Döbereiner (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil.* 108, 23-31.
- Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, K. Minamisawa (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5285-5293.
- Postgate, J. (1998) Nitrogen Fixation. Cambridge univ. Press, Cambridge, pp. 4
- 中村和美・谷田将人・園田誠一郎・鶴戸西夏奈・佐伯雄一・赤尾勝一郎・山本昭洋 (2009) 圃場における窒素固定エンドファイト接種サトウキビの固定窒素量の測定. 宮崎大学農学部研究報告 55, 99-108.
- 農林水産省 (2006) (4) 環境保全型農業の推進 平成18年度 食料・農業・農村白書. pp. 141-144.
- Oliveira, A.L.M., S. Urquiaga, J. Döbereiner, J.I. Baldani (2002) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil.* 242, 205-215.
- Reis, V.M., F.L. Olivares, J. Döbereiner (1994)

- Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 401-405.
- Saito, A., K. Minamisawa (2006) Evaluation of the nitrogen-fixing ability of endophytic clostridia based on acetylene reduction and reverse transcription-PCR targeting the *nifH* transcript and ribosomal RNA. *Microbes Environ.* **21**, 23-35.
- Straub, D., M. Rothballer, A. Hartmann, U. Ludewig (2013) The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30<sup>T</sup> identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front. Microbiol.* **4**, 168.
- Tanaka, K., T. Shimizu, M. Zakria, J.P. Njoloma, Y. Saeki, M. Sakai, T. Yamakawa, K. Minamizawa, S. Akao (2006) Incorporation of a DNA sequence encoding green fluorescent protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these bacteria in *Brassica oleracea*. *Microbes Environ.* **21**, 122-128.
- Weber, O.B., V.L.D. Baldani, K.R.S Teixeira, G. Kirchhof, J.I. Baldani, J. Dobreiner (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plant. *Plant Soil.* **210**, 103-113.
- Yoneyama, T., T. Muraoka, T.H. Kim, E.V. Dacanay, Y. Nakanishi (1997) The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil.* **189**, 239-244.