

## ダンチクの成長に関するバクテリアの探究

著者	長浴 晃
発行年	2019-03
その他のタイトル	A survey of Bacteria involved in the growth of Arundo donax
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10173/00002082">http://hdl.handle.net/10173/00002082</a>

平成 31 年度 卒業論文

ダンチクの成長に関する微生物の検出

A Survey of Bacteria

involved in the growth of *Arundo donax*

高知工科大学

環境理工学群

1190247 長浴 晃

指導教員 堀澤 栄 教授

# 概要

温暖な地域に分布するダンチクは、光合成速度が大きいことから、バイオ燃料の原料として注目が集まっている。植物が成長する条件の中に窒素の獲得があるが、個体の大きさと光合成速度からダンチクは窒素供給手段を確保する必要があると考えられる。本研究では根から吸い上げる他の窒素供給器官の可能性の検討の1つとして、葉において窒素固定に関与する細菌が存在するかどうか探索することとした。

高知県香南市海岸で採取したダンチクより、地上凡そ3~4mの葉鞘部分の表面及び組織内部のより環境微生物のDNAを抽出し、細菌を検出同定するための16s rDNA遺伝子をPCR増幅させた。クローンライブラリー法によって優先する種の同定を行った。また、ニトロゲナーゼの配列のPCRによる検出も試みた。

# 目次

第1章	緒言
	2.1 研究の背景
	2.2 研究の目的
第2章	実験内容
	3.1 ダンチクの採集
	3.2 ダンチク表面および組織内部の細菌群の DNA 抽出
	3.3 DNA の PCR 増幅
	3.4 クローニング及びシーケンス
	3.5 NGS による細菌群の解析
	3.6 nif H の検出
第3章	結果
第4章	考察
第5章	結論
	謝辞
	参考文献

## 第2章 緒言

### 2.1 研究の背景

近年、バイオエタノールによるエネルギー生産が着目されている中、その原料となるダンチク (*Arundo donax*) に注目が集まっている。着目される理由としては、光合成効率の高さと食糧生産に競合しない点があげられる。

ダンチクはイネ科多年草で一般的には亜熱帯地域の沿岸部に多く自生しており、背丈は4 m程度に達する。中には、人の手による移植、例えば土木工事などの際に土砂に紛れて運ばれ、内陸部でも見かけることもある。そして、光合成効率はC3植物の中では大変優れている。1-1図は、

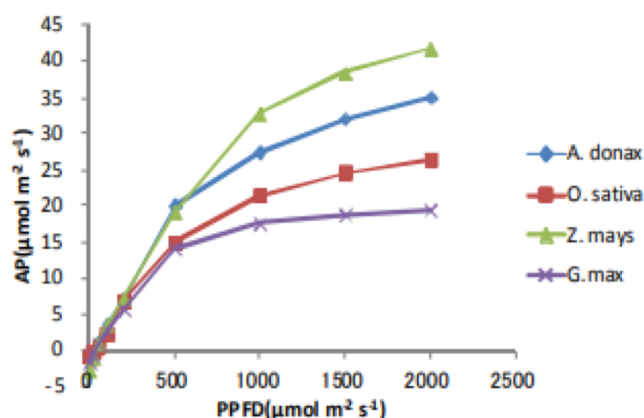
ダンチク、トウモロコシ、イネ、ダイズの光合成速度を示している(1)。C4植物であるトウモロコシには至らないものの、C3植物であるダンチクからすれば、同様なイネ、ダイズと比較しても大変効率の大きいものである。従って繁殖力がとても大きく、世界侵略的外来種に指定されている。ダンチクは穂をつけるが種子は不稔であ

り、増殖方法はもっぱら腋芽による栄養生殖である。葉鞘の基部より発生した腋芽を落とし、親株の近隣で新たな個体として増殖する。そして、水によって漂流し、運ばれた先で発根、増殖する方法をとる。ダンチクは耐塩性を有することから海水で輸送されても生育可能で、沿岸部でも旺盛に増殖する。しかし沿岸部の土壌は栄養豊富とは考えにくく、特に窒素の獲得は問題となる。窒素は根から土壌中の窒素化合物を水と同時に取り入れるか、あるいは、植物組織中や表面上に存在する共生菌などによって空気中の窒素( $N_2$ )を窒素化合物に変換し、それを受け取るかによって獲得する。また、窒素はタンパク質を構成するアミノ酸の生成に必要となるため、成長に直接関与する。さらに、ダンチクは背丈が大きく、貧栄養の土壌から栄養を獲得し、旺盛な増殖に見合うだけの窒素量を地面から遠く離れた穂先まで供給するには特別なメカニズムがあるのではないかと考えられる。たとえば、ダンチク植物体の上部に窒素固定に関与する共生菌が生息している可能性が考えられる。樹高が20~30 mに達する樹木では、葉に窒素固定菌が共生しているという報告がある(2)。

### 2.2 研究の目的

本研究では、ダンチクの上層部の葉鞘部に栄養の受け取りに関与するバクテリアがいるのでは

図 2-1 ダンチク、トウモロコシ、イネ、ダイズにおける光合成光子束密度あたりの光合成速度



ないかと考え、当部の表面及び組織内に生息するバクテリア群相を 16s rDNA 領域の塩基配列をサンガー法、及び次世代シーケンサー(NGS)を用いた方法により明らかにすることを試みた。更に、窒素固定に関する遺伝子群 *nif H* の検出と NGS による同定も試みた。

## 第3章 実験方法

### 3.1 ダンチクの採取

2018年7月下旬に高知県香南市夜須町手結山 536 (33.5202, 133.7604)にてダンチクを採集した。採集する際は、上層部の1年生～2年生の部分で採集した。

### 3.2 ダンチク表面および組織内部の細菌群の DNA 抽出

ダンチク葉鞘をハサミで裁断し、Tween80 (0.05%) に浸漬して超音波洗浄を行い、表面の付着物を収集した。ダンチク葉鞘を取り除き、付着物懸濁液を遠心分離した。その沈殿物に細菌が含まれると考え、沈殿物を 1.5 ml チューブに移し、NucleoSpin®Tissue XS (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて DNA 抽出を行った。

一方、洗浄後のダンチクを 1 mm 程度に刻み、2.0 ml チューブに適量入れた。これにジルコニアビーズφ 5.0 mm を 1 個、φ 0.2 mm をスパーテル 1 杯加え、TissueLyser (Qiagen, Venlo, the Netherlands)を用いて、25 H、5 分間粉碎した。その後、ISOPLANT II (ニッポンジーン, Tokyo, Japan)を用いて、組織内部の DNA 抽出を行った。

### 3.3 DNA の PCR 増幅

此度の研究では細菌を検出する際、リボソーム DNA の 16s 部分領域の塩基配列を PCR によって得た。PCR kit は MightyAmp®Polymerase ver.3 (Takara Bio)、サーマルサイクラーは GeneAmp®System 9700 (Applied Biosystems, CA, US)を用いた。DNA が微量であると考えて、収量増加のために nested PCR を行った。1st PCR では 27F (5'-AGA GTT TGA TCT GGC TCA G-3')と 1492R (5'-TAC GGT CC TTG TTA CGA CTT -3')<sup>(3)</sup>を使用した。温度プログラムは 98°Cで 2 min を 1 サイクル後、98°Cで 10 sec、60°Cで 15 sec、68°Cで 1 min を 30 サイクル後、68°Cで 5 min を 1 サイクルとした。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。その後、2nd PCR として、一般細菌検出用として 341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')と 907R (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')のプライマーペア<sup>(3)</sup>、そして、嫌気性細菌検出用として 984F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3')と 1378R (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3')のプライマーペア<sup>(4)</sup>で 1st PCR 産物をテンプレートとして PCR を行った。温度プログラムは 1st PCR と同様である。

### 3.4 クローニング及びシーケンス

得られた 2nd PCR 産物を Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio)を用いて溶液を調製し、4°Cでライゲーションを行った。これを *E.coli* JM109 Competent Cells (Takara Bio, Shiga) と合わせ、0°Cまたは氷上で 1 h、そして、42°Cで 40 sec 加熱処理した。そこに、SOC 培地を適量加え、37°Cで 1 h 培養した。Ampiciline、IPTG、X-gal を塗布した LB 寒天培地に培養した大腸菌懸濁液 100 μL をコンシラ棒で塗布した。その後、37°Cで一晩培養した。

次いで、培養した大腸菌をブルーホワイトスクリーニングによって形質転換を選別した。選別した大腸菌を GoTaq®Green Master Mix (Promega, WI, US)を用いてコロニーPCR を

行い、インサート DNA の確認を行った。LB 液体培地を用いて形質転換体を培養した。この培養液中の大腸菌から、PureYield™ Plasmid MiniprepSystem (Promega)を用いてプラスミド DNA を抽出した。サンガー法によってインサート DNA の塩基配列の解析を行い、得られた配列情報を GenBank/DDBJ/EMBL の生物情報データベースを用いて相同性の高い配列情報から種の同定を行った。

### 3.5 NGS によるバクテリア群の解析

3.3 で得られた 16s rDNA の部分配列に TruSeq DNA PCR-Free (illumina, CA, US)を用いてシーケンスのための tag 配列とアダプターを付加した。Miseq v2 Reagent Kit 300 cycle PE (illumina, CA, US) をシーケンス試薬とし、Miseq (illumina, CA, US)を用いて配列を解析した。

### 3.6 nif H の検出

ダンチク葉鞘から表面及び組織内部の DNA 抽出液を、Pol F(5'-TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3')と Pol R(5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA)のプライマー(5)で MightyAmp® Polymerase ver.3 (Takara Bio)を用いて PCR を行った。温度プログラムは(3.3)と同様とした。得られた PCR 産物も同様に NGS によって塩基配列を解析し、さらにデータベースから相同性の高い配列を検索した。



## 第4章 結果

16s rDNA 採集箇所と細菌検出プライマーと塩基配列解析の組み合わせから計 8 つの Table で表した。なお、検出された種はアルファベット順に並べた。検出数は今回の実験過程にてクローニングにより形質転換が行えたもののみの総数となっており、種が同じのもので Accession No. が違うものも総数に含めた。また、NGS の結果では得られた配列の内、葉緑体やミトコンドリアを除いた総数を分母としたものを特定した種で割った占有率から、比較的数字の大きなものを表した。

Table 4-1-1 ダンチク葉鞘表面由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (341F-907R) のクローンライブラリー法によって推定されたバクテリア種。検出数は解析したクローン中で検出された数を示す。

種または属名	Accession No.	検出数
<i>Acidovorax</i> sp.	KJ210358, KJ210355, KJ210335, NR_102856	3/15
<i>Acinetobacter soli</i>	MK370561	2/15
<i>Burkholderia gladioli</i>	MK419120	1/15
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	KR055028	3/15
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	JF733142	1/15
<i>Mydooides odoratus</i>	MK168622.1	1/15
<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_157778, MH021844, NR_136501, LT009706	2/15
<i>Serratia</i> sp.	NR_044385, N R_036886	2/15

Table 4-1-2 ダンチク葉鞘表面由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (341F-907R) を NGS によって推定されたバクテリア種。

種または属名	Accession No.	占有率(%)
<i>Acidovorax</i> sp.	CP002521, JF505947, HE589809	14.67
<i>Acinetobacter</i> sp.	JF309168, LC055607, JN990101	3.66
<i>Diaphorobacter</i> sp.	KF548244, EU735750	3.18
<i>Lachnoclostridium</i> sp.	KM494506, AB601075	5.34
<i>Myroides</i> sp.	AB517709, EU998999, CP013690	5.6
<i>Pseudomonas</i> sp.	KC179076, DQ158110, GQ417862	9.14
<i>Serratia</i> sp.	CP013046, CP014474	14.79
<i>Sphingomanos</i> sp.	JX978266, DQ532222, JN886869, AJ438177	7.9

Table 4-2-1 ダンチク葉鞘表面由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (984F-1378R)のクローンライブラリー法によって推定されたバクテリア種. 検出数は解析したクローン中で検出された数を示す.

種または属名	Accession No.	検出数
<i>Acidovorax avenae</i>	JF94745.1,MH087471.1,CP1028288.1	4/5
<i>Serratia</i> sp.	MK241850.1	1/5

Table 4-2-2 ダンチク葉鞘表面由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (984F-1378R)を NGS によって推定されたバクテリア種。

種または属名	Accession No.	占有率(%)
<i>Acidovorax</i> sp.	DQ088795. KU514668. HQ011394	3.55
<i>Acinetobacter</i> sp.	JN379058, FJ192829.KF003204. FJ192829	6.38
<i>Enterobacter</i> sp.	JQ885543. EU124827. JQ918028. JN091872	9.85
<i>Klebsiella</i> sp.	JN969366, AYIV01000007. GQ416081	3.36
<i>Ottowia</i> sp.	KC295706. AY512827	8.86
<i>Pantoea</i> sp.	EF179832, DQ195523	2.88
<i>Pectobacterium</i> sp.	JQ013482. CP003415. JQ410811	3.25
<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ014642, JQ218895. JN561148. JQ218895	12.91
<i>Serratia</i> sp.	KT029501. KP142412. JN381531. KU529281	9.25
<i>Sphingomonas</i> sp.	KU515005. HQ904161. JN886869. JQ629555	2.19
<i>Vibrio</i> sp.	HE584780. KF601967. KP183078	6.06

Table 4-3-1 ダンチク葉鞘組織内由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列(341F-907R)のクローンライブラリー法によって推定されたバクテリア種. 検出数は解析したクローン中で検出された数を示す.

種または属名	Accession No.	検出数
<i>Clostridium algidixylanolyticum</i>	KR055028	1/5
<i>Propionibacterium</i> sp.	MG697065.1. JF733297	2/5
<i>Sphingomonas</i> sp.	MH769369.MK318599	2/5

Table 4-3-2 ダンチク葉鞘組織内由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (341F-907R)を NGS によって推定されたバクテリア種。

種または属名	Accession No.	占有率(%)
<i>Acidovorax</i> sp.	CP002521. HE589809. KF841203. JF505947	5.08
<i>Acinetobacter</i> sp.	JF309168. LC055607. JF309168	9.01
<i>Lachnoclostridium</i> sp.	KM494506. JF309168	13.77
<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ716022. LC055581. KU324317. JF500996	15.07
<i>Sphingomonas</i> sp.	JX978266.JQ678575. DQ532222. JN886869	20.88

Table 4-4-1 ダンチク葉鞘組織内由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (984F-1378R)のクローンライブラリー法によって推定されたバクテリア種. 検出数は解析したクローン中で検出された数を示す.

種または属名	Accession No.	検出数
<i>Serratia</i> sp.	MK459492	1/3
<i>Sphingomonas zeae</i>	MK459492	1/3
<i>Propionibacterium</i> sp.	MG697095	1/3

Table 4-4-2 ダンチク葉鞘組織内由来の DNA から増幅した 16s rDNA の部分配列 (984F-1378R)を NGS によって推定されたバクテリア種。

種または属名	Accession No.	占有率(%)
<i>Acinetobacter</i> sp.	AY994046. DQ675074. GU991859	11.48
<i>Lachnoclostridium</i> sp.	AB600542.KM494506. HK555829	10.53
<i>Ottowia</i> sp.	KC295706. KP645123. JF429256	4.13
<i>Propionibacterium</i> sp.	FM874556. FM874157. EF025250	11.79
<i>Sphingomonas</i> sp.	JN886869. KU515005. HQ904161	16.87
<i>Staphylococcus</i> sp.	GQ159049. FM874193. CP013911	2.95

Table 4-5 ダンチク葉鞘組織内部由来の nif H からの同定結果

nif H	Accession No	種または属名	Accession No.	相同率
		<i>Acidovorax avenea</i>	CP028289	94.41
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP028297	97.16
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP028294	92.66
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP028303	96.43
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP028289	94.81
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP002525	94.63
		<i>Acidovorax avenae</i>	CP028289	97.1
○	AY829705	<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i>	CP004121	85.71
○	JQ412988	<i>Clostridium</i> sp.	AB279999	90.79
○	AY829705	<i>Clostridium</i> sp.	CP004121	84.38
○	JQ412988	<i>Clostridium</i> sp.	AB279999	90.79
○	JQ412988	<i>Clostridium</i> sp.	AB279999	92.14
○	JQ412988	<i>Clostridium</i> sp.	AB279999	90.48
		<i>Serratia marcescens</i>	CP027798	96.38
		<i>Serratia marcescens</i>	CP027798	92.05
		<i>Serratia marcescens</i>	CP027798	92.05
		<i>Serratia</i> sp.	CP033504	95.27
		<i>Serratia</i> sp.	CP033504	99.26

## 第5章 考察

表面部と組織内部の両部において、*Clostridium algidixylanolyticum* が検出された。この種はキシラン分解性<sup>6)</sup>をもっており、植物に侵入するシステムを持つ可能性が考えられる。キシランとは糖類で、植物の細胞壁の主成分となっている。また、*nif H* の検出から同定を行った結果からも *Clostridium* 属由来と同定されたため、共生菌として候補に挙げると考えられる。

*nif H* の解析より、*nif H* の配列が未登録であったが、種として *Acidovorax* 属及び *Serratia* 属が検出されたため、同様に共生菌候補として挙げられる。

2016年の調査と比較したところ、検出された部位は異なるが、共生菌として同様の報告例のある *Sphingomanos* 属が検出された。また、こちらのNGS結果から *Pantoea* 属もイネ科の共生菌として同様に検出されたため、それらは共生菌として候補に挙げられると考えられる。

しかしながら、2017年の結果からは *Caulobacter* 属が候補として挙げられていたが、今回の実験からは得られなかった。そのため、更なる解析回数を試みる必要がある。

## 第6章 結論

ダンチク葉部の共生菌として、*Acidovorax* 属、*Clostridium* 属、*Serratia* 属、*Sphingomonas* 属、*Pantoea* 属を候補として挙げる事ができた。

# 謝辞

本研究にあたり直接のご指導を戴いた指導教官である堀澤 栄 教授には深謝します。また、同研究室の各位から日頃に有益な討論、助言を戴いたことも深謝します。



## 参考文献

- (1). 和田義春ら, ダンチク(*Arundo donax* L.)の葉の光合成特性, 第 236 回日本作物学会講演会要旨集, pp.168-169 (2013).
- (2). Andrew B. Moyesl et al. 2016. Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer. *New Phytologist*. 210:657-668.
- (3). Lane, DJ. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom (1991).
- (4). Gillan DC et al. Genetic Diversity of the Biofilm Covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as Evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis and Cloning of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 64(9): 3464–3472 (1998).
- (5). Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* 152: 95–103 (2001).
- (6). Broda D M et al. *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 50. 623-631 (2000)