

水生植物由来 PGPB の作用機構と農作物への利用可能性

Mechanisms of Aquatic Plant Growth-promoting Bacteria and Their Potential Use for Crop Production

森川正章*, Rahul Jog, 三輪京子
MASAAKI MORIKAWA*, RAHUL JOG and KYOKO MIWA

北海道大学大学院地球環境科学研究院環境生物科学部門 〒060-0810 札幌市北区北10条西5丁目

* TEL & FAX: 011-706-2253

* E-mail: morikawa@ees.hokudai.ac.jp

Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, N10-W5, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan

キーワード: 水生植物, *Lemna minor*, 植物成長促進細菌 (PGPB), *Acinetobacter calcoaceticus* P23, 植物成長促進因子 AC23 (PGFAC23)

Key words: aquatic plants, *Lemna minor*, plant growth-promoting bacteria (PGPB), *Acinetobacter calcoaceticus* P23, plant growth-promoting factor AC23 (PGFAC23)

(原稿受付 2017年4月2日/原稿受理 2017年4月16日)

1. はじめに

ある試算によると、地球に棲息する細菌の総数はおよそ 10^{30} 個と見積もられている。これは重さにして 5×10^{17} g にもなる。一方、現在の地球には 74 億人の人間が住んでおり、その総重量は 4×10^{14} g に留まる。つまり、細菌の方が人間よりも 1,000 倍も重いということであり、「地球は細菌の惑星である」といっても過言ではない(服部正平, 日経サイエンス 2012年10月号)。ヒトのからだに目を向けて見ても体表から口腔や腸内などさまざまなところに常在菌は棲息しているが、その数はおよそ 100 兆から 1,000 兆個にもおよぶと推定されていて、ヒト細胞の数約 60 兆個よりもはるかに多い。このように膨大な数を有し、かつ 38 億年の歴史をもった地球の先住人である細菌の威力はまだ私たちの理解が及んでいないところが多い。

2003年にヒトの全遺伝子配列(いわゆるヒトゲノム)が解読されたことに象徴されるようにバイオの研究は格段に進歩した。その後、ポストヒトゲノム解析のひとつとしてヒト腸内細菌叢や体表細菌叢を網羅的に調べて、健康と微生物との関係を明らかにしようとする研究の潮流がある(ヒトマイクロバイーム解析)。例えば、ピロリ菌は胃がんや胃潰瘍のリスクを高めることで知られているが、米国で退役軍人 92 名を対象とした実験によると、抗生物質治療によってピロリ菌を除菌したグループは除菌しないグループに比べて体重が増加する肥満の傾向が見られた。また別の研究によってピロリ菌を除菌するとグレリンという食欲ホルモンの濃度が食後に低下しないことが報告されている。つまり、ピロリ菌は食後にヒトが満腹感を感じさせるために重要な役割をし

ている可能性がある。さらに、アフリカ人の体表細菌叢を調べた研究からは、マラリア蚊に刺されやすい体質のヒトの表皮に棲息している細菌と、刺されにくいヒトに見られる細菌とはそれぞれ違うグループであることが分っていて後者の細菌が蚊の嫌う揮発性物質を放出していることが予想されている。乳酸菌やビフィズス菌など善玉腸内細菌の整腸作用や免疫賦活活性は古くから知られているが、最先端医療技術のひとつとして糞便移植が最近話題となっている。すなわち、健康者の糞便スプーンを潰瘍性大腸炎などの患者の腸内へ注入するとその症状が劇的に改善することが報告されている。このような身近で見えない小さな細菌がもつ大きな力に関する研究は今ホットで注目すべき分野となっている。ゴルフ場の土壌細菌が生産する抗生物質を改良した予防薬メクチザンによって寄生虫による失明から 10 億人を救ったとされる大村智博士(北里大学特別栄誉教授)らに 2015 年度ノーベル医学生理学賞が授与されたことは記憶にも新しい。そこで本稿ではささやかではあるが、世界に先駆けて発見した、水生植物であるコウキクサの成長を格段に促進する細菌とその利用価値について紹介する。

2. 世界初の水生植物の成長を加速する微生物

動物に限らず植物もまたその表層や内部に共生する微生物を保持している。動物と同様に微生物にとって、植物と共生することには光合成作用でつくりだされる栄養分を享受できる利点がある。一方、植物にとって病原菌は困り者であるが病原菌を排除してくれるものや、成長を助けてくれる作用をもった細菌も根粒菌をはじめ多く知られている。しかしこれまでの植物にまつわる共生の

研究は食用野菜や穀物あるいは樹木など土壌植物を対象とするものがほとんどであった。私たちは、北海道大学植物園に自生しているコウキクサの表層から植物の成長速度をおよそ2倍に加速する付着細菌 (Plant Growth-Promoting Bacteria: PGPB23, 学名 *Acinetobacter calcoaceticus* P23) を発見した (図1)¹⁾。植物では「生長」という語を用いることもあるが、コウキクサのような浮遊性の水生植物では多くの陸生植物のように地上部の背丈は高くないので、葉 (葉状体) の枚数や大きさおよび個体の重量の増大を総合して「成長」として扱う。

すなわち、一旦無菌化したコウキクサなどのウキクサ植物に PGPB23 を付着共生させると無菌コウキクサに比べて葉状体の数がどんどん増えて行く (図2)。また、葉状体の大きさもわずかに大きくなる傾向が見られる。当初この細菌は水質浄化作用を目的に高性能なフェノール分解菌として選抜してきたものであり、コウキクサと共生することで外部から栄養を与えなくても光照射条件下において持続的に分解活性を発揮できることを報告している²⁾。そしてその後、PGPB23 を表層に付着優占化したコウキクサが下水二次処理水や河川水など環境水中

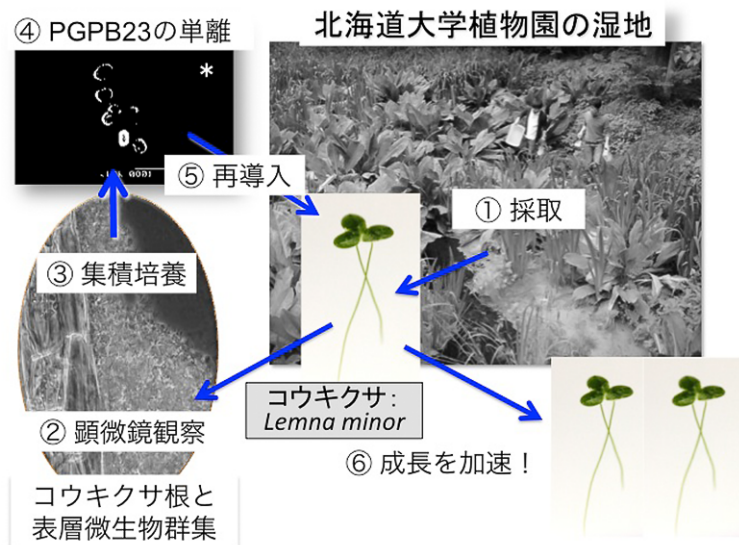


図1. ウキクサ成長促進細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 (PGPB23) の取得方法。

植物園に自生しているコウキクサを採取し、表層に多数の付着細菌を確認した。フェノールを単一炭素源とする培養条件下で集積培養し *Acinetobacter calcoaceticus* P23 を取得した。あらかじめ無菌化したコウキクサに PGPB23 を付着させ、培養した結果その成長速度は約2倍に加速されることを見出した。*PGPB23 の走査型電子顕微鏡観察。約 $0.7 \times 0.8 \mu\text{m}$ の短桿菌。細胞外多糖から構成される繊維状構造体で細胞同士が連結している。そのためコウキクサなどへの付着能力および凝集能力が高い。

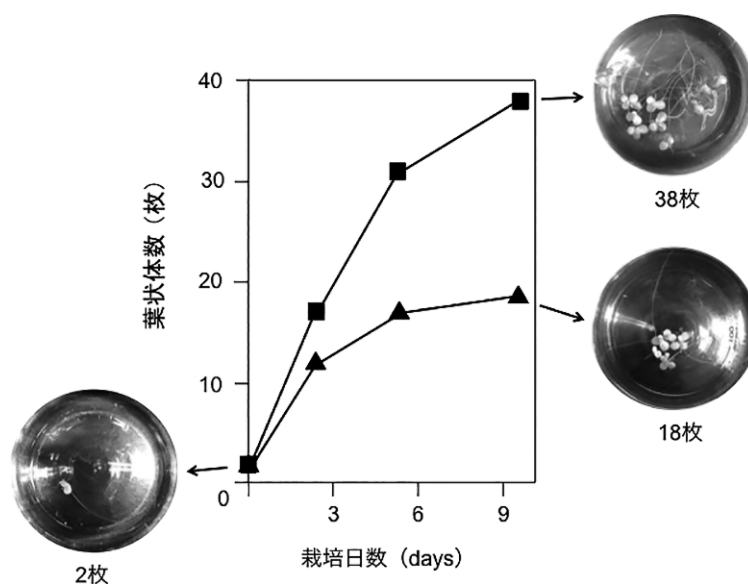


図2. PGPB23 によるコウキクサの成長促進効果。

無菌コウキクサに PGPB23 を3日間予備付着させたものを10日間栽培したときの成長の様子 (■)。対象区は無菌コウキクサ (▲)。無菌コウキクサは10日間で2枚から18枚に増えるのに対して、PGPB23 共生系コウキクサは38枚にまで増え成長速度が加速されている。PGPB23 付着コウキクサの葉状体のサイズはひとまわり大きく緑色も濃くなっている。

においても良好に生育し、野生コウキクサに比べて一定の期間は2倍程度のコウキクサバイオマス生産速度や水質浄化速度を示すことをJST-ALCAプロジェクト研究「共生微生物を活用した水生バイオマスの効率生産」(平

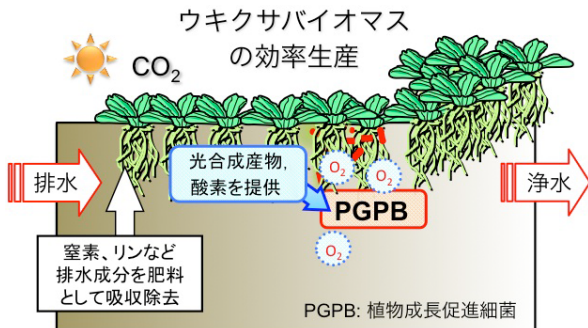


図3. 植物成長促進細菌 PGPB を活用した水生バイオマス効率生産のイメージ。

ウキクサや藻類などの水生植物は下水処理水や工場排水で栽培することによって、その中に含まれる窒素化合物やリンなどの汚染物質を肥料として吸収して生育することができる。また光合成産物や酸素が周辺の微生物群を活性化し有機物も分解可能である。すなわち、従来型の活性汚泥法による下水・排水の浄化に伴う電気エネルギーを太陽光エネルギーに代替することができる。ただし、水生植物の成長速度が制限要因となり排水処理技術としての利用はまだまだ限定的である。そこで、自然に共生する植物成長促進細菌 PGPB を選択的に優先化することで水生植物の成長速度を加速することが可能となり、水処理速度およびバイオマス生産速度も同時に向上する。

成 23 年度～) において実証している (図 3)³⁾。

種々検討した結果、PGPB23 が生産する水生植物の成長を促進する微生物因子: PGFAC23 は、さまざまな土壌微生物が生産するインドール酢酸やシデロフォアなど従来の植物成長促進因子とは異なっていることが判明した。すなわち、多くの環境細菌は植物表面などさまざまな固体表面に付着する際に、いわば接着剤のように機能する高分子の細胞外多糖を分泌生産するが、PGPB23 が分泌するこの細胞外多糖のひとつが PGFAC23 であった。その分子量は 5 kDa 以上あるため植物細胞には取り込まれずに、なんらかの表面レセプターを刺激して成長促進しているのではないかと予想している (図 4)。精製した PGFAC23 は 1 mg/L 程度以上で活性が見られ、培地中に 5 mg/L の PGFAC23 を添加するとコウキクサの成長速度はおよそ 1.8 倍加速した (図 5A)。さらにゲノム解析の結果見いだした PGFAC23 合成遺伝子群 (*pgfac23*) をプラスミドベクター pBBR1-MCS2 によりクローニングした。非 PGPB である *Acinetobacter baylyi* ADP1 さらには *E. coli* DH5 α をこの *pgfac23* 組換えプラスミドで形質転換すると、確かにコウキクサ成長促進活性を獲得することも確認した (図 5B)^{4,5)}。長い生命の歴史においてコウキクサと表層付着細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* P23 (PGPB23) 相互にどのようなやりとりがあって、ユニークな PGFAC23 の構造にゆきついたのでかなどまだまだ興味はつきない。また、いまのところほとんどの細菌は表層に付着しており、いわゆるエンドファイトのような内部共生しているものは見つかってい

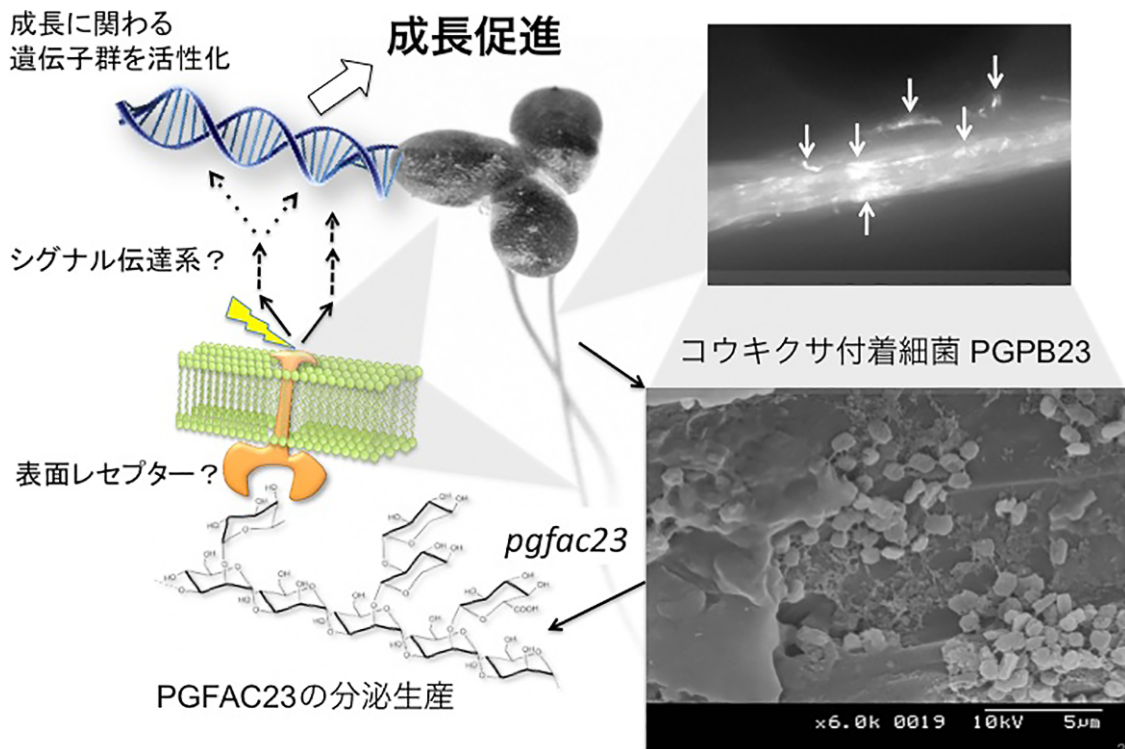


図4. PGPB23 によるコウキクサ成長促進機構予想図。

コウキクサ根に付着した PGPB23 細胞群を矢印で示した (右上写真)。走査型電子顕微鏡でさらに高倍率で観察すると PGPB23 細胞の付着の様子と細胞外多糖分泌生産の様子が観察できた (右下写真)。この細胞外多糖のうちのひとつが植物成長促進活性を有する PGFAC23 である。PGFAC23 合成酵素は 4 つの遺伝子クラスター (*pgfac23*) によってコードされている⁹⁾。PGFAC23 はコウキクサ表面に存在すると考えられるレセプターを刺激して、コウキクサの成長を活性化していると予想される。

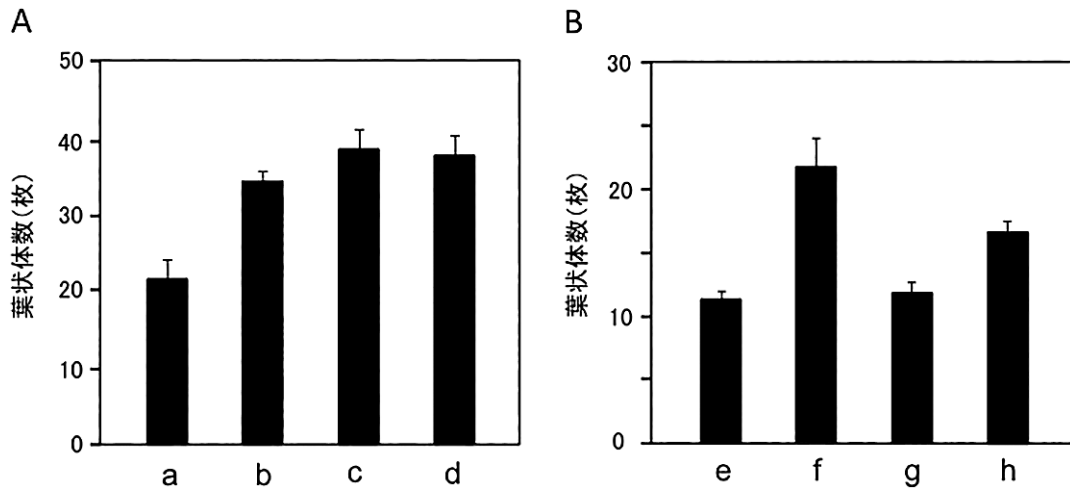


図5. PGFAC23によるコウキクサ成長促進活性。

A. 精製したPGFAC23を培地に添加したときのコウキクサの成長促進。B. 各種遺伝子組換え細菌付着コウキクサの成長比較。
 a. 添加なし b. 1 mg/L PGFAC23 添加 c. 5 mg/L PGFAC23 添加 d. 10 mg/L PGFAC23 添加 e. ADP1 (pBBR1-MCS2 vector only) 付着 f. ADP1 (pBBR1-MCS2-pgfac23) 付着 g. *E. coli* DH5 α (pBBR1-MCS2 vector only) 付着 h. *E. coli* DH5 α (pBBR1-MCS2-pgfac23) 付着。

B. の試験区では抗生物質 kanamycin を培地に添加しているため、ウキクサの成長は全体に抑制される。

ない。一方では、細菌種によって主に根部に付着するもの、主に葉状体に付着するもの、そのいずれにも同様に付着するものなど違いが見られる。例えば、P23は根部よりも圧倒的に葉状体に多く付着していた。

3. なぜ水生植物コウキクサなのか

3.1. 水質浄化剤として

すべての植物は大気中の二酸化炭素および水分と光エネルギー以外に、窒素、リン、カリウム、ホウ素などのミネラルを生育に必要とする。従って、作物や穀物を収率よく栽培するためにいわゆる肥料としてこれらのミネラルを与える必要がある。ところが、水生植物は水の中にとけ込んでいるミネラルを吸収利用しながら生育している(図3)。このミネラルや有機物が多く溶け込んだ水がいわゆる生活排水(下水)や工場排水であり、コウキクサなどの水生植物は排水中から窒素(アンモニアや硝酸)およびリンやカリウムを栄養ミネラルとして除去できることから植物成長に伴った水質浄化処理作用、これを植生浄化作用という、を有する訳である。そして、そこに必要なインプットエネルギーは太陽光のみである。通常、下水や排水処理には活性汚泥微生物を活性化するための曝気に多大な電力コストとエネルギーを要しており、これが化学工業プロセスからの温暖化ガス排出の間接的な一因となっている。つまり、速度の点でまだまだ活性汚泥法には遠く及ばないが、水生植物の栽培を排水処理工程に組み込むことができれば低炭素化のメリットが期待できる。さらに、植物による光合成は太陽エネルギーをほぼ最大のエネルギー収率で利用し、大気中の二酸化炭素をデンプンなどさまざまな有機物に固定および再資源化できる利点を有するために、再生可能エネルギーや有用バイオマス生産法としての活用が期待されている。この点について以下に述べる。

3.2. 石油代替バイオマス原料として

ウキクサ亜科植物は分類学上はサトイモ科に分類され、デンプンをはじめとする炭水化物を豊富に含む。野生コウキクサの炭水化物含量はおよそ50%でそのうち20%程度をデンプンが占める⁶⁾。その一方で、リグニンやセルロースなど難分解性化合物の含量はわずかに2.4%であり、エネルギーバイオマスとしての利用が期待されている稲わらや麦かんのリグニン含量12~20%に比べるといかに利用しやすいソフトかつ高品質なバイオマスであるかが分かる。またウキクサは環境に応じて成分が大きく変化する植物でもある。つまり栄養を含まない水道水などに移して一週間程度放置すると、タンパク質含量は30%から11%程度にまで低下し、それに呼応するかのようデンプンの蓄積量が上昇することがわかっている(表1)。興味深いことに水道水は栄養ミネラルを低濃度でしか含まないにもかかわらず、ウキクサのバイオマス量は一週間で約1.5倍(湿重量)から約3倍(乾燥重量)にも増加している。そのほか5°C程度の低温ストレスを与えることによってもデンプン含量が増加することが知られている。このようにニーズに応じてタンパク質含量を高めたり、デンプン含量を高めたりすることもウキクサの魅力のひとつと言える。

米国大手化学会社であるデュポンなどはトウモロコシデンプンからグルコースを生産してヒドロキシメチルフルフラールや1,3-プロパンジオールに変換後さまざまな化成品が合成できることを示し、脱石油化学:グリーンケミストリーを精力的に推進している。しかし、トウモロコシは可食作物のため食糧と拮抗するために真に持続可能社会を実現するために最適な植物とは言えない。一方、年間を通じて温暖な気候と十分な日射量を得られた場合、コウキクサバイオマスの年間生産収率は1ヘクタールあたりおよそ30~100トンと試算されている。このうち、最大40%程度がデンプンとして回収できる計

表 1. 一週間水道水でウキクサを栽培した場合のタンパクおよびデンプン含量の変化。

栽培時間 (h)	0 h	24 h	48 h	96 h	120 h	168 h
湿重量 (g)	0.5	0.52	0.58	0.67	0.64	0.72
乾燥重量 (g)	0.05	0.07	0.08	0.11	0.12	0.14
乾物含量 (%)	10.1	12.6	14.3	15.8	18.5	19.9
タンパク質含量 (%)	29.6	22.1	19.1	14.8	12.4	11.3
デンプン含量 (%)	3.0	18.3	25.9	36.2	42.4	45.4

Dr. Hai Zhao ら第 2 回国際ウキクサ会議 (2013) 発表資料

算になる。トウモロコシの生産収率は 1 ヘクタールあたり年間およそ 30 トン (植物体として) であることから、PGPB23 や PGFAC23 を用いてコウキクサの成長を安定に促進できれば、デンプン原料としてコウキクサを実用生産することは現実的であると私たちは考えている。米国ノースカロライナ州立大学のグループは嫌気消化処理した養豚排水でウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) を栽培し、年間 1 ヘクタールあたりのデンプンの生産性が 9.4-ton であったと報告している。さらにこれを酵素カクテルによる糖化処理とつづく発酵プロセスによって最終的に年間 1 ヘクタールあたり 6.4-kL のエタノールが生産可能と試算している。このエタノール生産収率はトウモロコシを用いたエタノール生産に比べて 50% 程度高かった⁷⁾。

バイオマス生産におけるコウキクサのさらなる利点は、なんといっても収穫のしやすさである。つまり、水の表面をアミあるいはベルトコンベアですくい取るだけである。バイオマス生産収率では微細藻類はダントツに優位 (およそ年間 1 ヘクタールあたり 180 トン) であるが、生産コストを押し上げる要因の一つとしてメッシュが小さく目詰まりし易い回収用フィルターであるといわれている。豊富なデンプン含量と高価なフィルターが不要であることは、コウキクサを起点とするデンプン生産技術の実用化にとって有利である。米国エネルギー省では、既にウキクサ植物を微細藻類に替わる次世代のバイオ燃料材料として注目しており、高デンプン含量遺伝子組換えウキクサの開発などを進めている。

3.3. 家畜飼料として

ウキクサの英語名はアヒルがついばむクサ : Duckweed と呼ばれていることから分かるように、食糧として栄養価の高いことが知られている。すなわち、炭水化物と共にタンパク質含量は乾燥植物個体あたりで 20~30% もあり (表 1)、トウモロコシの 10% より多く、大豆の 36% に近い。実際に、家畜用大豆飼料の 50% をウキクサに置き替えて 3 ヶ月間ニワトリを飼育した場合、体重および産卵総数 (約 60 個) は変わらなかった⁸⁾。また卵の栄養価については、コレステロール、ビタミン A、ビタミン E、ベータカロチンは変わらず、オメガ 3 脂肪酸が 1.6 倍に増加していた。さらに興味深いことに、卵黄の色については 14 段階評価で大豆飼料では 7 であったのに対してウキクサ配合飼料の場合は 11 にまで向上していた。一方、日本では昔からウキクサ (特にミジンコウキクサ : 仁丹藻) は錦鯉や金魚 (らんちゅう) の色揚げ用の生エサとしても使われている。コイを飼っていた池からウキクサを撤去したところオレンジ色だった体

色が白くなってしまったという話もある。これは、ウキクサがクロロフィル以外にもルテインやベータカロチンなどカロチノイド化合物を多く含んでいるからであろう。私たちが発見した PGPB23 を与えるとコウキクサの成長とともにクロロフィルおよびカロチノイド化合物の含量も大幅に増加することを確認している⁹⁾。その他に、野生コウキクサに含まれる脂質含量は 3.1%、脂肪酸含量は 0.8% 程度とそれほど高くはないが、脂肪酸のうち 72% が不飽和脂肪酸であり α リノレン酸とリノール酸が 58% を占めていることは栄養学的にも興味深い。また、ニトロソアミンの生成を抑えて胃がんのリスクを減らすといわれているクマル酸も 0.015% 程度含まれていることが分かっている。このように、ウキクサは高付加価値を有する家畜飼料でもある。

4. ウキクサ成長促進細菌 PGPB23 の作物への効果

4.1. レタスに対する効果

PGFAC23 が果たしてウキクサ以外の植物にも作用するのかについて試験した。対象植物はチンゲンサイ [学名 *Brassica rapa* var. *chinensis*], ハツカダイコン [学名 *Raphanus sativus* L. cv. *Raphanus sativus*], レタス [学名 *Lactuca sativa* L. cv. *Great Lakes*] を用いた。植物の栽培は水耕栽培法により行い Hoagland 培地を基本として、10 倍 (1/10 H 培地), 100 倍 (1/100 H 培地) 希釈したものも使用した。植物種子はあらかじめ、0.05% 次亜塩素酸ナトリウム + 0.02% TritonX-100 (界面活性剤) 水溶液で 3~5 分間滅菌したあと、滅菌水中で静置する作業を 5 回繰り返して表面洗浄した。1/10 H 固形培地上で 3~5 葉まで発芽した植物体を 1.5 リットルの H 培地を入れたプラントボックスに移植した。また別途、一晚培養しておいた PGPB23 および対照区として *E. coli* DH5 α を 0.3 OD₆₀₀ となるように培地に懸濁したものも調製した。それぞれ温度 25°C, 湿度 70%, 光量 5000 Lux, 長日条件 (16h 明-8h 暗) にて一週間培養し、それぞれの細菌を根表面に付着させた。滅菌水で軽く洗浄した後それぞれ植物体を新しい培地に移植し、さらに一週間栽培した。

その結果、チンゲンサイおよびハツカダイコンに対する影響は観察されなかった。一方で、PGPB23 が付着したレタス (以下、レタス/PGPB23) では成長速度に顕著な違いは見られなかったものの、葉の緑色が明らかに濃くなっていた。さらにその違いは貧栄養条件 (1/100 H 培地) において顕著であった (図 6A)。これは PGPB23 が栄養枯渇ストレスを軽減する作用を有することを示唆する。実際に、植物体の第 8 葉からエタノール

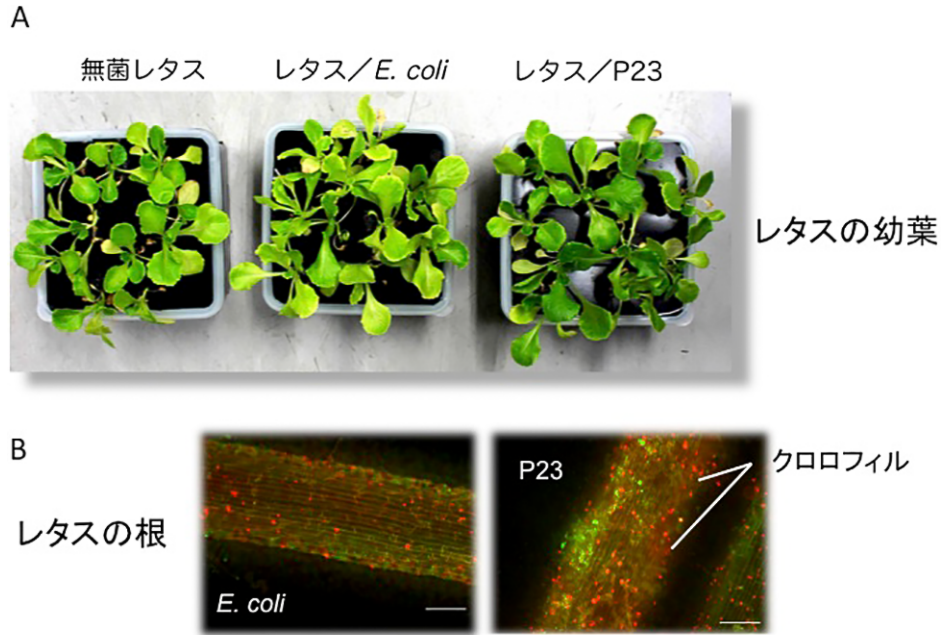


図6. P23のレタスへの影響評価。A. 各種細菌を含む1/100 H培地にて7日間水耕栽培したものを、無菌の1/100 H培地に移植してさらに7日間水耕栽培したときの様子。細菌非添加区(左)と比較して*E. coli* DH5 α 付着レタス(中)の幼葉が黄色く、PGPB23 付着レタス(右)の幼葉は濃緑色になっていることが観察された。B. *E. coli* 付着レタスおよびPGPB23 付着レタスの根の蛍光顕微鏡観察結果。PGPB23 付着レタスにおいて、細胞内のクロロフィルのスポットが増加していることがわかる。

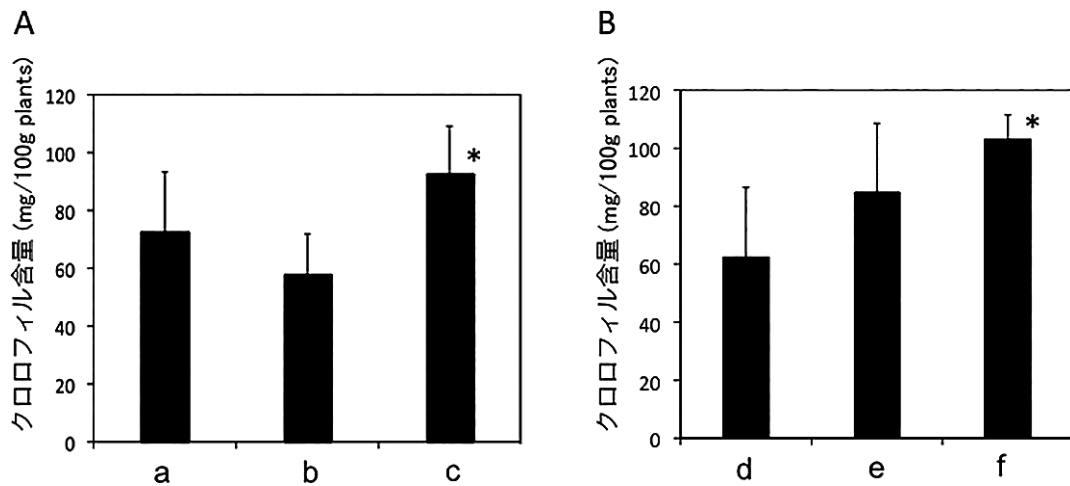


図7. レタスおよびコウキクサのクロロフィル量の比較。a. 無菌レタス b. *E. coli* DH5 α 付着レタス c. PGPB23 付着レタス d. 無菌コウキクサ e. *E. coli* DH5 α 付着コウキクサ f. PGPB23 付着コウキクサ。A. レタスは7+7日後、B. コウキクサは10日後のクロロフィル量。エラーバーは標準偏差 (A. n=10, B. n=3)。レタスは第8葉についてクロロフィル量を測定し、コウキクサはフラスコごと全個体のクロロフィル量を測定した。

* $p < 0.05$ (対, 無菌レタスおよび無菌コウキクサ)。

抽出したクロロフィル量を測定した結果、3個体の平均値として無菌レタスでは0.70 mg クロロフィル/g 湿重量であったのに対して、レタス/PGPB23では0.93 mg クロロフィル/g 湿重量であり有意にクロロフィルが増加していることが分かった(図7A)。一方、レタス/DH5 α では0.58 mg クロロフィル/g 湿重量に減少しており葉の一部が黄変していた。この結果は、単に死滅した細菌より漏出する含窒素有機物などによってクロロフィル量が増加したのではないことを示唆している。また、蛍光顕微鏡観察からはPGPB23が実際にレタスの根表面に付着

してコロニーを形成していること、およびクロロプラストが増加していることが判明した。

そこで再度、PGPB23がコウキクサに対しても成長促進と共にクロロフィル量に影響を及ぼすのかについて検討した。実験の方法は、レタスと同様にして行なった。ただし、表面洗浄コウキクサへの細菌付着は3日間で行ない、移植後のPGPB23を付着させたコウキクサ(コウキクサ/PGPB23)および無菌コウキクサの栽培は2葉状態から開始し10日後に葉状態数、植物体重量およびクロロフィル量を測定した。その結果、コウキクサ/

PGPB23 の葉状体数は 164 枚、湿重量 60.5 mg、乾燥重量 3.34 mg であり、無菌コウキクサの葉状体数は 102 枚、湿重量 31.3 mg、乾燥重量 1.69 mg であった。すなわち図 2 に置いて示した通り、およそ 2 倍の成長促進効果が確認できた。次に、それぞれの植物体についてクロロフィル量を測定したところ、コウキクサ/PGPB23 では 1.03 mg クロロフィル/g 湿重量、無菌コウキクサでは 0.62 mg クロロフィル/g 湿重量であり、やはり P23 による顕著な増加が見られた (図 7B)。以上の結果から、PGPB23 は単子葉植物であるウキクサ科植物だけではなく、貧栄養環境下では双子葉植物であるキク科植物レタスのクロロフィル量を増加させる能力を有することが示された⁹⁾。クロロフィル量増加の分子機構と植物成長促進との関係については今後の検討課題である。

5. おわりに

本稿では、陸生植物に比べて根圏微生物に関する研究が遅れている水生植物 (特に、浮遊植物ウキクサ) に関する最近の知見を紹介した。*Acinetobacter* 属細菌は主要な土壌細菌群の一つであり、これまでに、*A. calcoaceticus* SE370 は植物ホルモンであるジベレリンを生産すると共に、有機酸生産によるリンの可溶性活性を有し、キュウリ、チンゲンサイおよびシュンギクの成長を約 1.5 倍促進することが報告されている¹⁰⁾。また、*Acinetobacter rhizosphaerae* BIHB 723 にもやはり主としてリン可溶性活性によるとされるエンドウやトウモロコシなどの成長促進が報告されている¹¹⁾。しかし、微生物由来の細胞外多糖がここで示したような植物のクロロフィル量を増加したり成長を促進するという報告例は他になく、*A. calcoaceticus* P23 および PGFAC23 とコウキクサは植物-微生物相互作用解明の新しい切り口となる可能性がある。一方、玉木秀幸博士 (産総研) と田中靖宏博士 (山梨大) の研究によると、水生植物からは未培養細菌が取得できる割合が高く、新門レベルの新規細菌にも成功したことが報告されている¹²⁾。実際、抽水性水生植物からでも P23 よりもさらに活性の高い新たな成長促進細菌も見つかってきている^{13,14)}。このような、水生植物と表層細菌との良好な共生関係を開拓し、その微生物群を再構成することによって遺伝子組換えによらない植物の増産技術が可能になると期待される。ウキクサは食糧と拮抗しないリグニン含量の低い次世代バイオ燃料の原料、石油代替化成品原料としてのデンプン原料、あるいは大豆と同等のタンパク含量から家畜飼料としての利用が欧米で注目されている。2009 年に米国エネルギー省のバイオフェーエル開発・環境浄化対策用植物としてウキクサが取り上げられ、その後第一回国際ウキクサ会議が 2011 年に中国科学院、第二回会議が 2013 年に米国ラトガース大学で開催され、2015 年 6 月には第三回会議が京都大学で開催された。現在のところ、水生植物の表層共生微生物に関する研究は、我が国が世界をリードしており^{5,15)}、ごく最近では、石澤秀紘氏、黒田真史博士、池道彦教授 (大阪大学) が、15ヶ所の池や河川水から取得したコウキクサの成長を促進する細菌群と抑制する細菌群についてさまざまな組み合わせで共存実験を行っている。その結果、複数の抑制細菌に対して高

い抵抗性をもつ *Aquitalea magnusonii* H3 という新規コウキクサ成長促進細菌の取得に成功すると共に、コウキクサ表層細菌の群集構造を最適化することの重要性について指摘している¹⁶⁾。今後、植物と微生物との共生に関する基礎研究および応用技術開発がますます盛んになることを期待したい。

謝 辞

本研究は、(国) 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業・先端的低炭素化技術開発 JST-ALCA バイオテクノロジー分科会ならびに実用技術化プロジェクト (PO 近藤昭彦教授) の一部として推進したものである。また、実験に携わった留学生の研究費の一部は (公財) 小林国際奨学財団より援助を受けた。

文 献

- 1) 森川正章, 鷺尾健司, 山賀文子. 新規水草根圏微生物. 特許第 5303176 号 (2008.4.7. 出願).
- 2) Yamaga, F., K. Washio, and M. Morikawa. 2010. Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. Environ. Sci. Technol. 44: 6470-6474.
- 3) Toyama, T., M. Kuroda, Y. Ogata, Y. Hachiya, A. Quach, K. Tokura, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, and M. Ike. 2017. Enhanced biomass production of duckweeds by introducing a plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 in sterile medium and non-sterile environmental waters. Water Sci. Technol. in press.
- 4) Sugawara, M., A. Hosoyama, A. Yamazoe, and M. Morikawa. 2015. Draft genome sequence of *Acinetobacter calcoaceticus* strain P23, a plant growth-promoting bacterium of duckweed. Genome A. 3: e00026-15.
- 5) 森川正章, ジョグ ラフル, 三輪京子, 菅原雅之. 2015. 植物の生長を促進する方法, 植物生長促進物質を製造する方法及びこれらに利用されるタンパク質. PCT/JP2016/69474 特願 2015-130895.
- 6) Zhao, X., G.K. Moates, N. Wellner, S.R.A. Collins, M.J. Coleman, and K.W. Waldron. 2014. Chemical characterization and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). Carbo. Poly. 111: 410-418.
- 7) Xu, J., W. Cui, J.J. Cheng, and A-M. Stomp. 2011. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. Biosys. Eng. 110: 67-72.
- 8) Anderson, K.E., Z. Lowman, A-M. Stomp, and J. Chang. 2011. Duckweed as a feed ingredient in laying hen diets and its effect on egg production and composition. Int. J. Poultry Sci. 10: 4-7.
- 9) Suzuki, M., M. Sugawara, K. Miwa, and M. Morikawa. 2014. Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). J. Biosci. Bioeng. 118: 41-44.
- 10) Kang, S.M., G.J. Joo, M. Hamayun, C.I. Na, D.H. Shin, H.Y. Kim, J.K. Hong, and I.J. Lee. 2009. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. Biotechnol. Lett. 31: 277-281.
- 11) Gulati, A., P. Vyas, P. Rahi, and R.C. Kasana. 2009. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. Curr. Microbiol. 58: 371-377.
- 12) Tamaki, H., Y. Tanaka, H. Matsuzawa, M. Muramatsu, X.Y. Meng, S. Hanada, K. Mori, and Y. Kamagata. 2011.

- Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61: 1442–1447.
- 13) 鈴木和歌子, 菅原雅之, 三輪京子, 森川正章, 玉木秀幸, 牧野彩花, 鎌形洋一. 2014. 植物成長強化剤及びそれを用いた植物栽培方法. 特願 2014-148483. (2014.7.22. 出願).
 - 14) Toyama, T., T. Ojima, Y. Tanaka, K. Mori, and M. Morikawa. 2013. Sustainable biodegradation of phenolic endocrine-disrupting chemicals by *Phragmites australis*-rhizosphere bacteria association. *Water Sci. Technol.* 68: 522–529.
 - 15) Appenroth, K.J., P. Ziegler, and K.S. Sree. 2016. Duckweed as a model organism for investigating plant–microbe interactions in an aquatic environment and its applications. *Endocytobiosis Cell Res.* 27: 94–106.
 - 16) Ishizawa, H., M. Kuroda, M. Morikawa, and M. Ike. 2017. Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnol. Biofuels.* 10: 62.