

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26310303

研究課題名 (和文) 土壌腐植の恒常性を支える微生物の代謝と生態

研究課題名 (英文) Research of microbial metabolisms that function in soil-humic acid homeostasis

研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50282322

交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000 円

研究成果の概要 (和文)：フミン酸 (HA) は土壌の腐植を形成する主要な物質であるが、HAと土壌微生物の関わりについては、その多くが不明である。本研究では、多くの糸状菌がHAを吸着・代謝し高分子化することを示した。また、HAを高分子化する活性の強い糸状菌 *Aspergillus nidulans* によるHAの化学構造の変化を解明した。さらに、HAが *A. nidulans* のグローバルな遺伝子発現制御を行うこと、本菌の呼吸代謝をシアン耐性呼吸に切替えることによって細胞の増殖を促進させることが示された。これらの結果は、糸状菌と環境中のHAとの新たな相互作用を示すものであり、土壌腐植の恒常性に関する新たな知見である。

研究成果の概要 (英文)：Humic acid (HA) is one of the major components of soil humic substance while little is known about interaction between HA and soil microorganisms. This study indicated that tens of filamentous fungi absorb HA, and metabolize HA to high-molecular weight compounds in laboratory-scale cultures. A culture of the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, which we found efficiently metabolizes HA, converted HA to more oxidized compounds with higher content of phenol and carboxy moieties. Transcriptome of the fungus cultured in the presence of HA indicated that HA altered global transcription of the fungus. Biochemical studies indicated that HA switched the fungal respiration mechanism to cyanide-resistant one, and stimulated cell growth under the culture conditions. These results presented novel examples of physiological interaction between HA and soil microorganisms, and impacts homeostasis of terrestrial HA that is mediated by natural microorganisms.

研究分野：応用微生物学

キーワード：フミン酸 糸状菌

## 1. 研究開始当初の背景

フミン酸は主に土壌、河川、湖水などに含まれる腐植物質の構成成分である。腐植物質は動植物遺体のリグニン、タンニン等が土壌中で微生物的、化学的な作用により複雑に分解、重合を繰り返して生成した物質の総称であり、難分解性高分子有機物である。腐植物質の中でアルカリに溶け、酸に溶けない物質がフミン酸として定義されている。フミン酸の分子量は  $10^3 \sim 10^6$  と幅広く、多環芳香環や脂肪族鎖を骨格とし、キノンやフェノールなどを含んだ構造を持つ (Schulten, H.R. (1995) Fresenius J. Anal. Chem., 65, 501)。

フミン酸は耕作に適した黒土の有機成分、飲料の汚染物質、水質汚濁の基準物質として重要であることから、土壌改良による食糧増産、飲料の安全保障、環境保全にとっても極めて重要である。フミン酸は環境中に豊富に存在する物質であるため、自然界においてフミン酸と糸状菌が作用しあっていることは明らかである。しかしながらフミン酸と糸状菌の関わりに関して明らかになっていることはほとんどなかった。分解に関しては白色腐朽菌や木材腐朽菌がマンガンペルオキシダーゼやリグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼの作用によりフミン酸を分解するとの報告がなされているが、その他の糸状菌類のフミン酸分解能やその作用機構についての多くは未解明であった。

## 2. 研究の目的

土壌におけるフミン酸の形成と分解のメカニズムを明らかとすることは土壌改良を通じた食料増産に直結する重要な課題である。また、一般飲料や清酒醸造に最も大切な「水」が土壌などにより汚染されるとフミン酸濃度が上昇し有機物濃度や呈色を増加させ問題である。このため、飲料水の安全確保のためには水中のフミン酸濃度は適切に管理されている必要がある。環境の水質汚染の指標や有害な有機塩素化合物の発生原因ともされるフミン酸は、水圏環境の保全上も重要である。

その重要性にもかかわらず、フミン酸の恒常性の詳細はほとんど明らかとなっていない。本研究では、現代の土壌学と微生物学のニッチとなっているフミン酸の地球上での恒常性の維持と生態系での役割の解明を目指した。具体的には、リグニン等の芳香族化合物の分解に関わる白色腐朽菌を含む菌類(糸状菌)に着目し、糸状菌の腐食恒常性の維持への役割の解明を目指した。この過程でフミン酸の代謝活性が強いことが明らかとなった糸状菌 *Aspergillus nidulans* をモデルとして、糸状菌によるフミン酸の分解様式およびフミン酸による糸状菌の生理活性調節の分子機構を解明することを試みた。本研究は、食料の生産・安全に加えて、土壌微生物の生育制御をとおした食料循環研究に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株、培養方法

理研 BRC 由来糸状菌および *A. nidulans* A26 (FGSC 由来) 株を用いた。フラスコ培養: 500 ml 容の三角フラスコに最少培地またはフミン酸を終濃度 0.1% となるように溶解させた最少培地 100 ml を添加し、*A. nidulans* の分生子を  $1.0 \times 10^8$  個を加え 37、120 rpm で培養した菌体を吸引濾過により回収した。試験管培養: 大試験管に上記の培地 10 ml を添加し、*A. nidulans* の分生子を  $1.0 \times 10^7$  個を加え 28、280 rpm で培養した。

### (2) フミン酸の精製

三角フラスコに 0.1 M NaOH 200 ml に 2 g のフミン酸 (Sigma-Aldrich) を溶解させ、フラスコの気相を窒素で置換し嫌気状態にし、室温で一晩振とうした。3000 × g で 5 分間遠心分離し、沈殿を取り除いて得られる上清に濃塩酸を加え、さらに pH を 1.0 ~ 1.5 に調整し、30 分間攪拌した。3000 × g で 5 分間遠心分離し、上清を取り除き、沈殿に 0.1 M NaOH 200 ml を加え、嫌気条件下で 3 時間振とうした。3000 × g で 5 分間遠心分離し、沈殿を取り除いた。上清に濃塩酸を加え、pH を 1.0 ~ 1.5 に調整し、30 分間攪拌した。3000 × g で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿を 0.01 N HCl 溶液 100 ml に懸濁し、直ちに 3000 × g 5 分間で遠心分離した。上清を取り除き、沈殿にアンモニアを約 0.5 ml 加え、凍結乾燥し、乳鉢ですりつぶした。

### (3) 全 RNA の抽出および cDNA の調製

湿重量 100 mg の凍結菌体から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、説明書に従って全 RNA を抽出した。RNA 量は 260 nm の吸光度により算出した。得られた RNA 10 μg、oligo dT20 1 pmol を混和し、70 で 2 分間保温した。得られた溶液を 2 分間氷冷した後、Reverse Transcriptase XL を用い、42 で 90 分間逆転写反応を行い、cDNA 溶液を得た。

### (4) トランスクリプトーム解析

*A. nidulans* の分生子を最少液体培地中で振とう培養した。これにフミン酸溶液を添加し、更に 3、8、16、24 時間培養した。培養後の菌体を液体窒素を用いて凍結後、(3) と同じ方法を用いて全 RNA を抽出した。DNA マイクロアレイは、当研究室が設計したカスタム GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いた。この GeneChip は、*A. nidulans* の 10,701 遺伝子 (version 3; The Broad Institute, Cambridge, MA, USA) をカバーしており、各遺伝子当たり perfectly matched および mismatched を含めた 23 ペアのプローブを含んでいる。各プローブは ORF の 3' 末端から 500 塩基以上離れた領域に設計したものである。cDNA および cRNA の合成およびハイブリダイゼーション、洗浄、染色について

は、GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を用い、その説明書に従った。シグナルは GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) を用いてスキャンし、GeneChip® Command Console Software (AGCC) (Affymetrix) を用いてデータを標準化した。

#### (5) 呼吸活性の測定

フラスコ培養後の菌体を吸引る過により回収した。菌体を適量取り、50 mM HEPES で洗浄した。これを同バッファーを用いて希釈し、酸素電極を用いて酸素の消費量を測定した。シアン耐性呼吸の速度を定量する際は反応系に 2 mM シアン化カリウムを添加した。

#### (6) その他の方法

PCR、大腸菌を用いた組換え DNA、高速液体クロマトグラフィーによる化合物の同定、FT-IR、固体 NMR 解析、酸素電極法などは、一般的な方法に従った。その他の実験と詳細は、4 の項を参照。

### 4. 研究成果

#### (1) フミン酸代謝菌の探索

68 株の糸状菌を対象としてフミン酸の代謝活性を有する株のスクリーニングを行った。終濃度 0.1% のフミン酸を含む PD 液体培地 10 ml に各菌株を植菌し、28 280 rpm で 6 日間培養した後、菌体と培養上清に画分し、それぞれからフミン酸を回収し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、44 種がフミン酸を高分子化していた(図 1) 菌体に吸着したフミン酸の方がより高分子化される傾向がみられた。また、これらの 41 株は、フミン酸を単一の炭素源として生育することはできなかった。

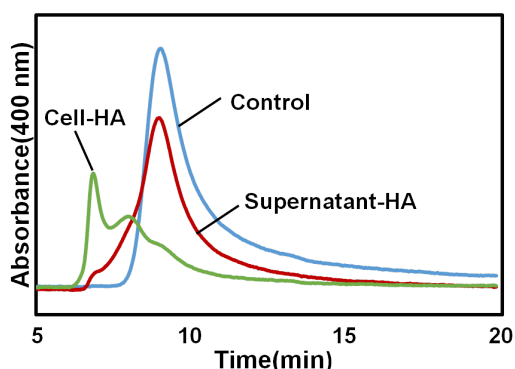
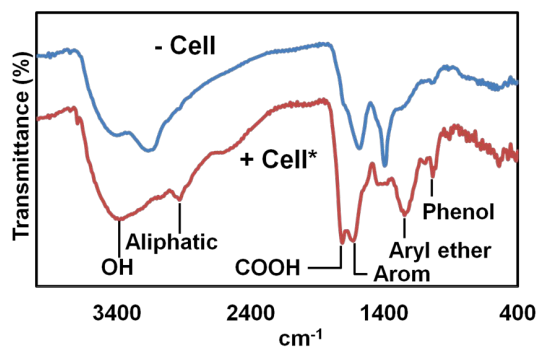


図 1 ゲルろ過クロマトグラフィーによるフミン酸の分析

*A. nidulans* を 48 時間培養した後の培地 (supernatant) および菌体(Cell)画分のフミン酸

(2) *A. nidulans* によるフミン酸の構造変化  
フミン酸の高分子化の活性が最も高かった菌株から *A. nidulans* を選抜し、培養に伴

うフミン酸の構造変化を解析した。FT-IR 解析(図 2)および固体  $^{13}\text{C}$ -NMR 解析によって、培養後のフミン酸では、脂肪族、アリルエーテル、フェノールの含量が他の官能基と比較して増加していると考えられた。また、電位差滴定法による分析結果とあわせて、*A. nidulans* は、培養に伴いフミン酸を酸化しフェノール性水酸基とカルボキシル基の存在量を増加させることが明らかになった。



\* Mixture of 24, 48, 73 h samples

図 2 フミン酸の FT-IR 解析

#### (3) フミン酸による糸状菌の代謝調節

研究開始当初は、糸状菌によるフミン酸の代謝とそれによる構造変化に着目してきたが、この過程で多くの菌株がフミン酸を吸着するとともに、フミン酸により生育が促進されることを見出した。詳細な検討の結果、フミン酸を培地に添加することによって、*A. nidulans* の増殖速度が増加することが明らかになった(図 3)。また、この増加は糖代謝の亢進によるものであることが推察された。なお、フミン酸を固体培地に添加して培養した際には、気菌糸の高さが低くなり、分生子を形成する面積の増加が観察されたが、コロニーあたりの分生子の着生数には変化が見られなかった。

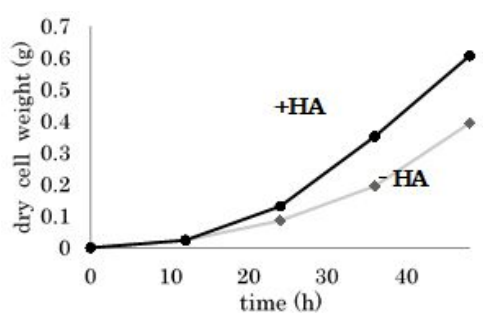


図 3 *A. nidulans* の菌体重量の変化  
最少液体培地 (-HA) にフミン酸を添加した培地 (+HA) では、培養後に得られる菌体重量が増加する

#### (4) トランスクリプトーム解析

一部の細菌が非常にゆっくりとフミン酸を資化して生育するという報告がある。しかし、本研究のように糸状菌がフミン酸によってその生育を旺盛に促進させることは知られていなかった。そこで、この促進機構を明らかとするためにトランスクリプトーム解

析を行った。最少液体培地にフミン酸を添加した際のトランスクリプトームを本菌のカスタム DNA マイクロアレイを用いて経時的に調べた。転写量が有意に変化した遺伝子を抽出し、それらの Gene ontology 解析を行ったところ、フミン酸の添加によってクエン酸回路、解糖系、有機酸代謝にかかわる遺伝子群の発現が上昇することが示された(図4)。特に、コハク酸デヒドロゲナーゼをコードすると予想される AN0896 と *carC*(AN8793)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする *mdhC*(AN6499) の発現が上昇していた。また、炭素の同化に関わるグリオキシル酸経路を構成するイソクエン酸リアーゼをコードする *acuD*(AN5634)、リンゴ酸シンターゼをコードする *acuE*(AN6653) の発現が大きく上昇していた。

これらの代謝は、一般的に生育に必要な細胞構成成分やエネルギーを獲得する中央代謝系を構成するとされている。これは、フミン酸が *A. nidulans* の中央代謝を転写レベルで活性化させ、菌の生育を促進させる機能を持つことが明らかとなった。フミン酸のような不溶性高分子が細胞内の代謝を調節する機構は興味深い。また、土壌中でも同様の現象が起きるかどうかについては、今後の興味深い検討課題である。

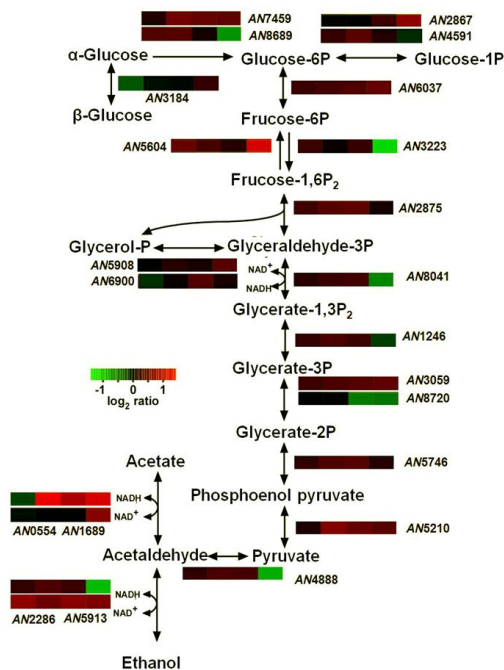


図4 トランスクリプトーム解析(解糖系遺伝子の抜粋)  
最少液体培地にフミン酸を添加した培地で 3、8、16、24 時間培養した結果を heat map として示した。

(5) 呼吸活性の制御

*Trametes maxima* においてはフミン酸存在下で、呼吸活性が増加することが報告されている (Klein, O.I. Isakova, E.P., Deryabina, Y.I. *et al.* J. Chem. Ecol.

(2014))。 *A. nidulans* においても同様の現象が起きるのか確かめるため、液体培地で培養後の *A. nidulans* の呼吸活性を測定した。呼吸活性の測定には酸素電極法を用いた。その結果、フミン酸存在下で培養した菌体の方が、溶存酸素の減少が早くなった。このことから、フミン酸によって *A. nidulans* の呼吸活性が大きくなることを示された。また、フミン酸存在下では、全呼吸活性に対するシアン耐性呼吸活性 (Alternative Oxidase 活性) の比率が大きくなっていることが明らかとなった(図5)。

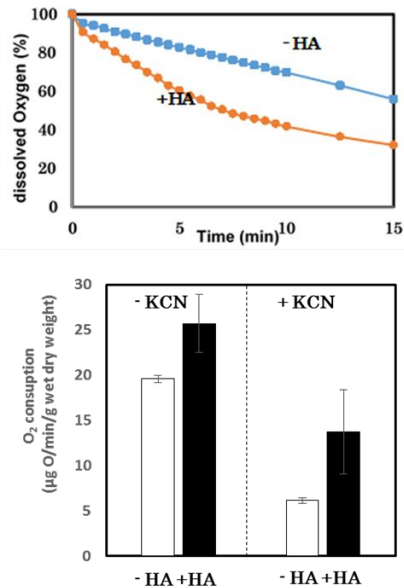


図5 フミン酸による *A. nidulans* のシアン耐性呼吸活性の制御

上、酸素電極を用いた呼吸活性の測定 (2 mM KCN 存在下); 下、フミン酸存在下 (+HA) および非存在下 (-HA) での菌体の呼吸活性

(6) シアン耐性呼吸遺伝子の発現制御

AOX 遺伝子 AN2099 (*aoxA*) 最少液体培地で 48 時間培養して得られた菌体の AOX 遺伝子 (AN2099、*aoxA*) の発現量を定量 PCR を用いて測定した。その結果、*aoxA* 遺伝子の発現が培地にフミン酸を添加することにより誘導されることが示された(図6)。

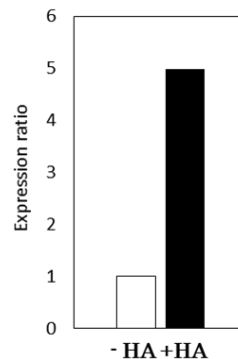


図6 *A. nidulans* の *aoxA* 遺伝子の発現解析  
*A. nidulans* はフミン酸存在下 (+HA) および非存在下 (-HA) で 48 時間培養した。

以上の結果を通して、糸状菌がフミン酸を代謝すること、フミン酸に反応して自らの呼

吸活性を増加させ生育を促進させることが明らかとなった。この結果は、土壌中にも多く存在する糸状菌が土壌環境中において、フミン酸と相互作用しながら棲息する可能性を示すものであり、糸状菌の新たな生理を解明した点で科学的意義が大きい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

大泉太於, 中澤奈美, 高谷直樹: フミン酸による *Aspergillus nidulans* の生育促進の機構解明、微生物研究会、日本大学藤沢キャンパス、神奈川県藤沢市(平成 28 年 11 月 5 日)

中澤奈美, 老沼研一, 高谷直樹: 糸状菌 *Aspergillus nidulans* による土壌フミン酸の構造変化、第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス、東北大学川内北キャンパス、宮城県仙台市(平成 26 年 11 月 15-16 日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dpas.agbi.tsukuba.ac.jp/~microbes/takaya/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高谷 直樹 (TAKAYA, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 50282322