

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07695

研究課題名(和文) 内生細菌共生維持機構を利用して微生物に潜在機能を付与する技術の開発

研究課題名(英文) Technological development to give potential functions to microbes by utilizing the endobacterial symbiosis mechanism

研究代表者

西澤 智康(Nishizawa, Tomoyasu)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：40722111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果は、Mortierella属菌の菌糸細胞に内生するBurkholderiaceae科細菌(BRE)を分離培養し、そのゲノム解析から宿主糸状菌における内生細菌の相互作用・機能との関係を解明したことである。内生細菌を保有するM. parvispora E1425株から新たにMycoavidus属B2-EB株を分離培養することに成功し、B2-EB株の全ゲノムを解読した。他のBREとの比較ゲノム解析から、B2-EB株は、分離培養可能なMycoavidus属細菌の中で最小のゲノムサイズをもつ新種と同定し、宿主糸状菌内での内生維持に必要な特異的機能が残されていると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌糸状菌Mortierella属の菌糸細胞に内生するMycoavidus属細菌を共生系の新奇研究モデルとし、本研究で新たに分離培養に成功したMycoavidus属の新種内生細菌のゲノム解読と既知のBREとの比較ゲノム解析から、糸状菌-内生細菌の共生関係、特に共生微生物間の相互作用と機能との関係を解明した。微生物間共生現象の研究から、自然界での微生物の生態の実態がより深く理解され、微生物の生理生態的特徴の一つの物質循環の理解の深化や微生物間相互作用の応用技術へのさらなる開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Endofungal symbiotic bacteria are well characterized in the family Burkholderiaceae in class Betaproteobacteria, and these frequently occur in the fungal genus Mortierella, which is one of the largest genera in the phylum Mucoromycota. A culturable Burkholderiaceae-related endobacterium (BRE), Mycoavidus sp. B2-EB, present in the fungal host M. parvispora E1425, was obtained successfully in this study. Its complete genomic sequence was newly determined, and the results indicated genomic reduction occurring in the genome of B2-EB (1.88 Mb). Comparing with other known Mycoavidus and BRE genomes, the strain B2-EB genome was characterized by the loss of genes involved in signal transduction, transcription, energy production, and conversion, as well as carbohydrate and amino acid metabolism. This work allowed us to understand the genome evolution of the BRE, revealing that the strain B2-EB genome represents the smallest genome among cultured endofungal bacteria.

研究分野：土壌微生物生態

キーワード：土壌微生物生態 微生物間相互作用 内生細菌 細菌ゲノム解読 比較ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物に細胞内共生する細菌は、自由生活型の近縁な細菌と比較すると縮小したゲノムを保有することが知られている。しかし、そのゲノム縮小化のメカニズムについては未解明な部分が多い。先行研究において、畑地から分離した土壌糸状菌 *Mortierella elongata* の菌糸細胞に *Betaproteobacteria* 綱 *Burkholderiaceae* 科に属する細菌が内生することが明らかとなり、その内生細菌のドラフトゲノム情報からシステイン輸送系が欠失していることを見出した。この結果に基づき、システイン含有の BCYE α 寒天培地を用いることで新属・新種の内生細菌 *Mycoavidus cysteinexigens* B1-EB^T 株を分離培養することに成功した。そこで、糸状菌 - 内生細菌の共生関係、特に共生微生物間の相互作用を明らかにするため、分離培養した *M. cysteinexigens* B1-EB^T 株の全ゲノムを解読 (2.79M bp) し、植物病原性菌類 *Rhizopus microsporus* に内生する *Paraburkholderia* (現在は *Mycetohabitans* と名付けられた) *rhizoxinica* HKI454^T 株のゲノム配列 (3.75M bp) とアメリカの森林土壌から分離された *Mortierella* 属菌の内生細菌 AG77 (未分離) のゲノム配列 (2.63M bp) との比較ゲノム解析により、*M. cysteinexigens* 株におけるゲノム改変の可能性が示唆された。

このように土壌に生息する糸状菌に *Burkholderiaceae* 科に属する内生細菌 (*Burkholderiaceae*-related endobacteria, BRE) が報告され、本研究チームでは、これまでに計 305 の *Mortierella* 属菌株を分離し、そのうち 66 菌株に *Burkholderiaceae* 科に属する内生細菌を検出し、カルチャーコレクションを作製した。内生細菌を保有する *M. elongata* 以外の *Mortierella* 属糸状菌における内生細菌の分布とその多様性を 16S rRNA 遺伝子領域に基づく分子系統で解析した結果、内生細菌は *Glomeribacter-Mycoavidus* クレードに位置し、3つのサブクレードを形成することが明らかになった。これまでに確立した手法を用いて、糸状菌 *M. parvispora* 株から B1-EB^T 株と系統的に異なる内生細菌 *Mycoavidus* 株の分離に成功し、生理生態的に特徴付けるための遺伝子同定解析を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、*Mortierella* 属に内生する *Mycoavidus* 属細菌を研究モデルとし、新たに分離培養に成功した *Mycoavidus* 属の新種内生細菌のゲノム解読と比較ゲノム解析から、糸状菌 - 内生細菌の共生関係、特に共生微生物間の相互作用とその機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

BRE group A の B1-EB^T 株とは異なるクラスターに位置する *M. parvispora* E1425 株 (Fig. 1) の菌糸体から内生細菌画分を調製し、BCYE α 寒天培地で培養することにより、*Mycoavidus* 属細菌の新種と考えられ

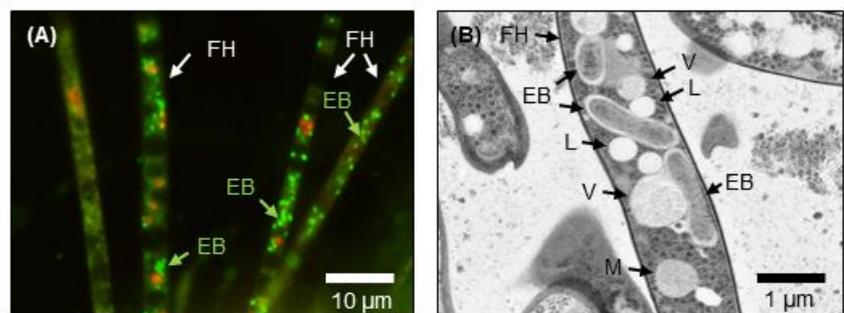


Fig. 1. Microscopic observations of BRE dwelling in the hyphae of *M. parvispora* E1425. (A) fluorescent microscopic observation of endobacteria within hyphae stained by a LIVE/DEAD™ BacLight™ bacterial viability kit, and (B) transmission electron microscopic observation of endobacteria within rapid-freezing and freeze-substituted hyphae. Abbreviation: FH, fungal hyphae; EB, endobacterium-like structures; L, lipid bodies; V, vacuoles; M, mitochondria.

る B2-EB 株の分離培養に成功した。この B2-EB 株から DNA を抽出し、Pacbio RS II と HiSeq2500 でシーケンスを行い、SPAdes を用いたハイブリッド・アセンブリ解析により全ゲノムを解読した。糸状菌 - 内生細菌の微生物間相互作用機序を推定するため、*Mycoavidus* 属細菌を含む BRE との比較ゲノム解析を行った。さらに、内生細菌保有糸状菌と非保有糸状菌の比較トランスクリプトーム解析で宿主への内生細菌の内生化条件を検討した。

4. 研究成果

(1) ゲノム改変の特徴

本研究において分離培養に成功した B2-EB 株のゲノムサイズは約 1.88 Mb であり、これまでに分離培養されている BRE の中で最小サイズであった。この内生細菌 B2-EB 株の種を同定するため、5 種のシングルコピー遺伝子 (*atpD*, *gyrB*, *lepA*, *recA*, *rpoB*) による MLSA 法で分子系統解析を行い、RAxML を用いた最尤系統樹の結果から、B2-EB 株が *Mycoavidus* 属細菌に属するが、最も近縁の標準株である *M. cysteinexigens* B1-EB^T 株と比較して平均相同性は 93.2% であり、異なる分岐を示した (Fig. 2A)。また、B2-EB 株 - B1-EB^T 株間の全ゲノム相同性検索 (Whole-genome Average Nucleotide Identity, ANI; %) は 88.6% であったことから、B2-EB 株を *Mycoavidus* 属の新種と判断した (Fig. 2B)。さらに、ゲノム解読された *Mycoavidus* 属細菌間で比較ゲノム解析を行った結果、B2-EB 株のゲノムは、*M. cysteinexigens* B1-EB^T 株と比較してシステイン輸送系の欠失だけでなく、有機物代謝や転写・RNA プロセシング制御、シグナル伝達などに関わる遺伝子群が欠失していることが見出された。*Mycoavidus* 属細菌のゲノム解析から 7.2 - 11.5% 程度のトランスポゾンやプロファージなどの可動遺伝因子領域が見つかった。B2-EB 株ではシグナル伝達に関与する遺伝子が欠失しているが、DNA 修復系遺伝子のほとんどが保存されていたことから、ゲノム崩壊に至らないゲノム縮小化が起きたと考えられる。よって、B2-EB 株には宿主内での内生維持に必要な特異的機能が残されていると推察された (Fig. 3)。

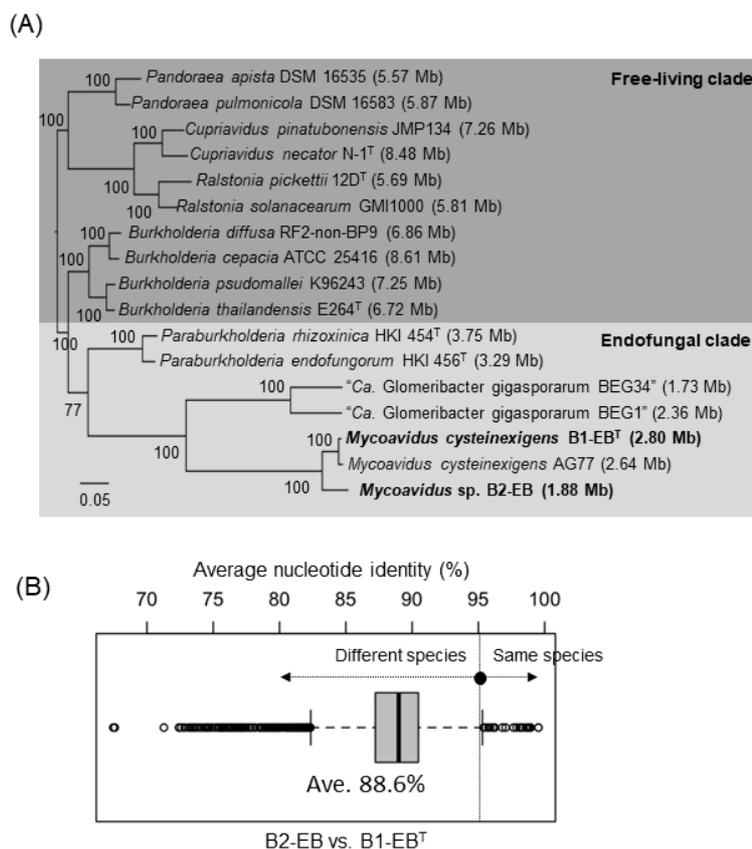


Fig. 2. Phylogenetic identification of *Mycoavidus* sp. strain B2-EB according to (A) an unrooted maximum likelihood phylogenetic tree constructed by RAxML based on a concatenated sequence (11,460 positions in total) of the five housekeeping genes, and (B) a boxplot of whole genome average nucleotide identity between strain B2-EB and *M. cysteinexigens* B1-EB^T. The horizontal lines in (A) show genetic distance, which are support values estimated with 100 bootstrap replicates.

が *Mycoavidus* 属細菌に属するが、最も近縁の標準株である *M. cysteinexigens* B1-EB^T 株と比較して平均相同性は 93.2% であり、異なる分岐を示した (Fig. 2A)。また、B2-EB 株 - B1-EB^T 株間の全ゲノム相同性検索 (Whole-genome Average Nucleotide Identity, ANI; %) は 88.6% であったことから、B2-EB 株を *Mycoavidus* 属の新種と判断した (Fig. 2B)。さらに、ゲノム解読された *Mycoavidus* 属細菌間で比較ゲノム解析を行った結果、B2-EB 株のゲノムは、*M. cysteinexigens* B1-EB^T 株と比較してシステイン輸送系の欠失だけでなく、有機物代謝や転写・RNA プロセシング制御、シグナル伝達などに関わる遺伝子群が欠失していることが見出された。*Mycoavidus* 属細菌のゲノム解析から 7.2 - 11.5% 程度のトランスポゾンやプロファージなどの可動遺伝因子領域が見つかった。B2-EB 株ではシグナル伝達に関与する遺伝子が欠失しているが、DNA 修復系遺伝子のほとんどが保存されていたことから、ゲノム崩壊に至らないゲノム縮小化が起きたと考えられる。よって、B2-EB 株には宿主内での内生維持に必要な特異的機能が残されていると推察された (Fig. 3)。

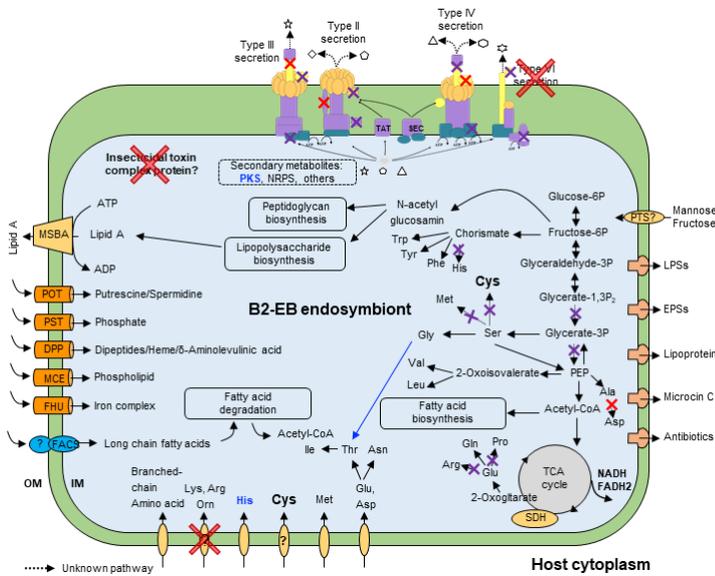


Fig. 3. Model representing metabolic processes and secretion system assumed from *Mycoavidus* sp. strain B2-EB. Purple crosses show the genes responsible for the pathways or proteins deleted in both B1-EB^T and B2-EB genomes, and red crosses show those deleted only in the B2-EB genome.

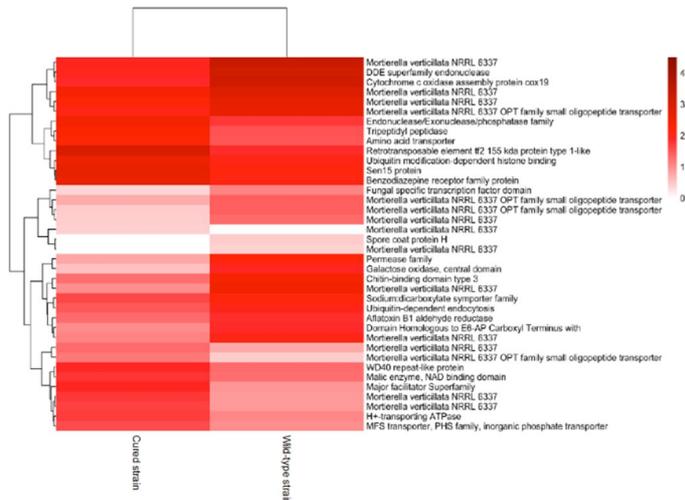


Fig. 4. Heatmap of significantly expressed genes in the presence (wild-type strain) and absence (cured strain) of endobacteria. Graduation bar indicates the expression level (fold).

(2) 内生細菌の内生化条件

3つの *Mycoavidus* 属内生細菌のゲノム解析から宿主糸状菌内でのゲノム改変進行の特徴と宿主内での環境適応能および共生系システムに関する遺伝子群の特徴の差を明らかにした。また、宿主 *Mortierella* 属糸状菌 - *Mycoavidus* 属内生細菌はグリセロールの代謝活性が高かったことから、共生系を確立するためのメカニズムを明らかにするため内生細菌非保有糸状菌を作製して、内生細菌保有/非保有糸状菌のメタ・トランスクリプトーム解析を行った。RNA-seq法でE1425株と内生バクテリア除去株の比較トランスクリプトーム解析から、一次代謝、特にアミノ酸取り込みやエネルギー生産に内生細菌の関与が示唆された (Fig. 4)。本研究で得られたゲノム情報 - 転写解析から、内生細菌は宿主糸状菌の代謝系に関与して、共生体を維持していると推察された。

(3) 共生工学への展開

微生物ゲノムの網羅的な解析技術は、微生物間共生系の研究において、微生物の分離・培養、さらに微生物共生体の相互作用機序の解明に大きく貢献している。真核生物 - 原核生物の共生体を1つのモデル微生物として考えた本研究課題から、自然界での微生物の生態の実態がより深く理解され、微生物の生理

生態的特徴の一つの物質循環の理解の深化や微生物間共生工学技術へのさらなる開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takashima Yusuke, Degawa Yousuke, Nishizawa Tomoyasu, Ohta Hiroyuki, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Aposymbiosis of a Burkholderiaceae-Related Endobacterium Impacts on Sexual Reproduction of Its Fungal Host	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME19167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yusuke, Seto Kensuke, Degawa Yousuke, Guo Yong, Nishizawa Tomoyasu, Ohta Hiroyuki, Narisawa Kazuhiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Prevalence and Intra-Family Phylogenetic Divergence of Burkholderiaceae-Related Endobacteria Associated with Species of Mortierella	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 417 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME18081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sharmin Dilruba, Guo Yong, Nishizawa Tomoyasu, Ohshima Shoko, Sato Yoshinori, Takashima Yusuke, Narisawa Kazuhiko, Ohta Hiroyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Comparative Genomic Insights into Endofungal Lifestyles of Two Bacterial Endosymbionts, Mycoavidus cysteinexigens and Burkholderia rhizoxinica	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 66 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 郭 永・Dilruba Sharmin・高島 勇介・成澤 才彦・太田 寛行・西澤 智康
2. 発表標題 糸状菌内生細菌Mycoavidusの二次代謝産物合成遺伝子の系統解析
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下 紗季・高島 勇介・西澤 智康・太田 寛行・成澤 才彦
2. 発表標題 Mortierella属菌とその内生細菌がトマト生育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yong Guo, Yusuke Takashima, Dilruba Sharmin, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta, Tomoyasu Nishizawa
2. 発表標題 Genomic analysis of a newly-cultured endohyphal bacterium Mycoavidus strain dwelling in the soil fungus Mortierella parvispora
3. 学会等名 第12回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郭 永・高島 勇介・成澤 才彦・太田 寛行・西澤 智康
2. 発表標題 糸状菌に内生するMycoavidus属細菌のゲノム収縮過程
3. 学会等名 つくばサイエンス・アカデミー SATテクノロジー・ショーケース2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 郭 永・小沼 奈那美・高島 勇介・Dilruba Sharmin・佐藤 嘉則・成澤 才彦・真鍋 理一郎・高島 昌子・大熊 盛也・太田 寛行・西澤 智康
2. 発表標題 An EHB Mycoavidus cysteinexigens enhances in vitro carbon utilization by host Mortierella elongata
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Dilruba Sharmin, Yong Guo, Tomoyasu Nishizawa, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta
2. 発表標題 Genome comparison of two endohyphal bacteria from different geographic origin
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 嘉則 (SATO Yoshinori) (50466645)	独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存科学研究センター・室長 (82620)	
研究分担者	太田 寛行 (OHTA Hiroyuki) (80168947)	茨城大学・農学部・理事 (12101)	
研究分担者	成澤 才彦 (NARISAWA Kazuhiko) (90431650)	茨城大学・農学部・教授 (12101)	
研究協力者	郭 永 (Guo Yong)		
研究協力者	高島 勇介 (TAKASHIMA Yusuke)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	シャルミン ディルルバ (Sharmin Dilruba)		
研究協力者	松下 紗季 (MATSUSHITA Saki)		
研究協力者	ヘルラムバング アフリ (Herlambang Afri)		