

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21301

研究課題名（和文）内生細菌が腐生性Mortierella属菌に共生能を付与するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms by which endobacteria give symbiotic ability to *Mortierella* spp.

研究代表者

成澤 才彦（Narisawa, Kazuhiko）

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90431650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：Mortierella humilis S2のBREであるMycoavidus sp. S2-EBを培養することに成功した。同細菌はプラスミドを保持していた。M. verticillata YTM181BF1+Mycoavidus sp. S2-EBの対峙培養を行った。元来M. verticillata YTM181に内生するBREはGroup Cに属しているが、対峙培養後に検出されたのは、再導入法に用いたGroup Aに属するBREであった。この結果は、BREのMortierella属菌への再導入に成功した可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、菌類-内生細菌を共生系としてとらえ、内生細菌を操る手法の開発を目的としている。この技術は、菌類の腐生性を共生に変え作物生産へ利用することへつながる。我々が菌類として認識していた生物が、いわば菌類と細菌の共生体であるという、これまでの菌類学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在を示すことが可能となる。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in culturing Mycoavidus sp. S2-EB, which is the BRE of *Mortierella humilis* S2. Mycoavidus sp. S2-EB was found to carry 2,575,677 bp chromosomes and 99,085 bp plasmids. Confrontation culture of *M. verticillata* YTM181BF1 + Mycoavidus sp. S2-EB was performed on LCA medium. Originally, the BRE endogenous to *M. verticillata* YTM181 belongs to Group C, but what was detected after the confrontation culture was the BRE belonging to Group A used in the reintroduction method. This result indicates the possibility of successful reintroduction of BRE into *Mortierella* spp.

研究分野：農学

キーワード：内生細菌 Mortierella属菌 共生 植物生育促進

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

農耕地土壌から頻りに分離される *Mortierella* 属菌は、一般的には腐生性であり、植物生育に対してはマイナスに働く。しかし、対照区や共生菌として知られるエンドファイト処理区以上に植物の生育を促進する菌株が見つかった。この *M. humilis* S2 株には、特徴的な Burkholderiaceae 科に属する細菌が内生しており、同細菌の植物生育への関与、すなわち、*Mortierella* 属菌が示す共生能は、この内生細菌が制御していることが示唆された。

そこで、この *M. humilis* S2 株から抗生物質処理により内生細菌を除去した *M. humilis* S2BF2 株を同様にトマトに接種したところ、根部の生育不良や葉の褐変などが認められ、腐生性あるいは病原性を示すようになり、内生細菌が *M. humilis* S2 株の植物との共生的な働きを操っていることが示唆された。以上より、菌類として認識していた生物が、菌類と細菌の共生体であるという菌類学の概念を覆す新たな生物共生系の存在を示す材料の獲得に成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、*Mortierella* 属菌を対象に、植物-菌類-内生細菌の相互作用を解明し、さらにその内生細菌を操ることで腐生菌を植物共生菌に変え、作物栽培利用へとつながる基礎的な知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Mortierella* 属菌とその内生細菌が様々な植物の生育に与える影響の解析

4 菌種 8 菌株の *Mortierella* 属菌を用いた。まず、供試菌株に内生細菌が存在するかを確認した。16SrRNA 遺伝子を標的とした PCR を行い、1.5% アガロースゲルでの電気泳動およびゲルレッドでの染色後 UV 照射下で増幅産物の確認を行った。

内生細菌の確認後、*Mortierella* 属菌が様々な植物の生育にどのような影響を与えるかを調べるために植物接種試験を行った。供試植物は、トマト、キャベツ、およびホウレンソウの3種である。それぞれの植物種子を表面殺菌後、1.5% 寒天培地で無菌的に発根させた。OM 培地 (有機態窒素 : 無機態窒素 = 1 : 1) に 2mm 角に切り出した供試菌株を置き 5 日間培養後、発根した種子を播種し、23°C、明期 16 時間で 3 週間培養した。培養後、葉や根の形態観察を行い、その後植物体の回収を行い、乾燥重量を測定した。

#### (2) *Mycoavidus* sp. S2-EB のゲノム解析

*Mortierella humilis* S2 の BRE である *Mycoavidus* sp. S2-EB を使用した。ジーンベイ (<http://genebay.co.jp/>) にて、BCYE- $\alpha$  寒天培地で 23°C で 46 日間培養後 ACES buffer (pH6.9) で懸濁した *Mycoavidus* sp. S2-EB を PowerSoil (QIAGEN) を用いて酢酸抽出を行い、GridION X5 による nanopore シーケンシングおよび MiSeq による illumina シーケンシングを行った。得られた nanopore シーケンシングおよび illumina シーケンシングのリード配列を用いたハイブリッドアセンブリー解析は Unicycler v0.4.8 により行った。

#### (3) *Mortierella humilis* への細菌再導入と植物生育への影響評価

*Mortierella* 属菌と BRE の相互作用を検討する上で、宿主菌類および BRE の組み合わせを操作することが必要である。そこで BRE の入れ替え実験を行うことを目標とし、*Mycoavidus* sp. S2-EB を用いて *Mortierella* 属菌への再導入を検討した。供試菌株は *M. humilis* S2BF2、*M. humilis* YI11BF3、*M. verticillata* YTM181 および *M. verticillata* YTM181BF1 の 4 菌株と、2 か月以上 BCYE- $\alpha$

培地で培養した *Mycoavidus* sp. S2-EB を使用した。

90 mmシャーレに作成したLCA培地の中央に滅菌ストローでくりぬいた菌類菌株を静置し、LCA培地の1点をストローでくりぬき、*Mycoavidus* sp. S2-EBをBCYE- $\alpha$ 培地ごとストローでくりぬいて、1点は空いた培地の穴に、もう1点はあけた穴の対角線上のLCA培地の上に移植した。23°Cのインキュベータに入れ、暗条件で6日間培養した（図1）。

培養後6点から菌体を切り出し、滅菌したセロファンを敷いた1/2 CMMY培地に植菌した。23°Cで1週間培養後、菌体からDNAを抽出し、PCR反応後増幅産物を確認した。電気泳動による増幅産物の確認の結果、バンドが薄かったサンプルについては精製PCR産物をテンプレートとして10F-907Rのプライマーセットを用いてsemi-nested PCRを行い、増幅が確認されたサンプルについてシーケンスを行い、NCBIのblastnを用いて相同性検索を行った。

相同性検索の結果、BREが検出された菌株については1/2 CMMY培地で培養していた菌糸を使用してLIVE/DEAD染色による蛍光顕微鏡観察を行った。

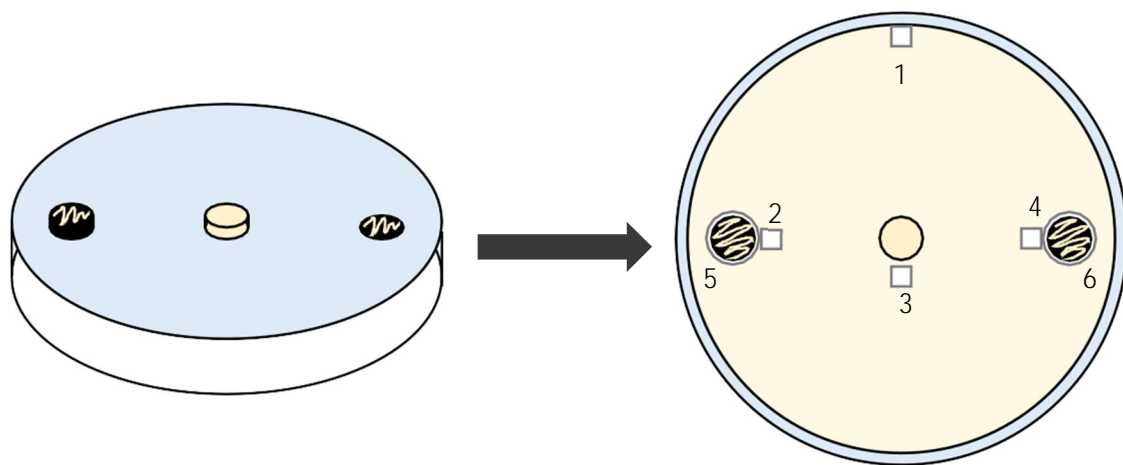


図 1. LCA 培地上での対峙培養の概略図。

90 mm シャーレに作成した LCA 培地の中央に菌類菌株を静置し、LCA 培地の 1 点をストローでくりぬき、*Mycoavidus* sp. S2-EB を BCYE- $\alpha$  培地ごとストローでくりぬいて、1 点は空いた培地の穴に、もう 1 点はあけた穴の対角線上の LCA 培地の上に移植した。23°C のインキュベータに入れ、暗所で 6 日間培養した。培養後は 6 点から菌体を切り出した。1：静置した 2 点の *Mycoavidus* sp. S2-EB の垂直線上の菌糸先端部分。2 および 4：静置した *Mycoavidus* sp. S2-EB から約 5 mm 中央側の部分。3：菌類菌株から約 5 mm の部分。5 および 6：*Mycoavidus* sp. S2-EB が生育している BCYE- $\alpha$  培地とその外側約 1 mm を含む部分。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Mortierella* 属菌とその内生細菌が様々な植物の生育に与える影響の解析

PCR 反応では 8 菌株中 6 菌株で内生細菌が検出された。植物接種試験では、生育を抑制する菌株が見つかり、中でも *M. alpina* KS.F.3.3.1 はすべての植物で乾燥重量を有意に減少させた。*M. humilis* S2 接種区ではトマトとホウレンソウの乾燥重量を有意に増加させることはなかったが、対照区と同程度生育した。しかし、キャベツでは乾燥重量を有意に減少させた。以上より、菌種や菌株と植物種の組み合わせによって与えられる影響が変わることが示唆された。

##### (2) *Mycoavidus* sp. S2-EB のゲノム解析

*Mycoavidus* sp. S2-EB のアセンブリーの結果、2,575,677 bp および 99,085 bp の配列を得た。また、*Mycoavidus* sp. S2-EB は 2,575,677 bp の chromosome と 99,085 bp のプラスミドを保持していた。同属でプラスミドを保持することは初めての報告である。*Mycoavidus* sp. S2-EB はプラスミドの安定性に関わる遺伝子などを保持しており、今までの同属細菌同様にシステインのトラン

スポーター遺伝子は認められなかった。

*Mycoavidus* sp. S2-EBはGroup Aに属し、*M. cysteinexigens* B1-EBおよび*Mycoavidus* sp. B2-EBとは異なるクレードに属した。このことから、宿主菌類との共生関係においてゲノムの縮小や変異が起きていることが示唆された。現在培養に成功している*Mortierella*属菌のBRE3菌株はすべてGroup Aに属していることから、Group AのBREは培養可能な菌株が他にも存在する可能性がある。

### ( 3 ) *Mortierella humilis* への細菌再導入と植物生育への影響評価

LCA 培地上での対峙培養では *M. humilis* YI11 + *Mycoavidus* sp. S2-EB の 6 および *M. verticillata* YTM181BF1 + *Mycoavidus* sp. S2-EB の 6 において菌糸内に細菌様構造物が認められた。しかし両菌類菌株は抗生物質処理により BRE を除去して作出した菌株であり、菌糸内で認められた細菌様構造物が対峙培養により再導入されたことの確証には至っていない。一方、*M. verticillata* YTM181BF1 + *Mycoavidus* sp. S2-EB の 6 については、元来 *M. verticillata* YTM181 に内生する BRE は Group C に属しているが、対峙培養後に検出されたのは、再導入法に用いた Group A に属する BRE であった。この結果は、BRE の *Mortierella* 属菌への再導入に成功した可能性を示すものであり、さらに BRE の入れ替えにも成功した可能性を示している。

表 1. LCA 培地上での対峙培養後のシーケンス結果

供試菌類菌株	位置	Query length (bp)	Top hit
<i>M. humilis</i> S2BF2	6	485	BRE from <i>M. exigua</i> YTM171
<i>M. humilis</i> YI11BF3	3	501	BRE from <i>M. humilis</i> YTM187
<i>M. humilis</i> YI11BF3	4	476	BRE from <i>M. humilis</i> YTM187
<i>M. humilis</i> YI11BF3	6	440	BRE from <i>M. humilis</i> YTM187
<i>M. verticillata</i> YTM181BF1	5	125	BRE from <i>M. humilis</i> YTM187

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 1件 / うちオープンアクセス 0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/j sme2.ME19167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guo Yong, Takashima Yusuke, Sato Yoshinori, Narisawa Kazuhiko, Ohta Hiroyuki, Nishizawa Tomoyasu	4. 巻 86
2. 論文標題 Mycovirus sp. Strain B2-EB: Comparative Genomics Reveals Minimal Genomic Features Required by a Cultivable Burkholderiaceae-Related Endofungal Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01018-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01018-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Herlambang Afri, Guo Yong, Takashima Yusuke, Narisawa Kazuhiko, Ohta Hiroyuki, Nishizawa Tomoyasu	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-Genome Sequence of Entomortierella parvispora E1425, a Mucoromycotan Fungus Associated with Burkholderiaceae-Related Endosymbiotic Bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 No.1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01101-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関根直人、成澤才彦
2. 発表標題 有機農法水田に自生する植物に定着する菌類叢の解析
3. 学会等名 日本土壌微生物学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 草谷奈津子、晝間敬、成澤才彦
2. 発表標題 高温ストレス条件下でのVeronaeopsis simplex Y34接種トマトのHeat Shock Proteinの発現状態
3. 学会等名 日本土壌微生物学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島勇介
2. 発表標題 クサレケカビ属菌における菌類 - 細菌共生体に関する研究
3. 学会等名 日本菌学会第 65 回大会日本菌学会奨励賞
4. 発表年 2021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	晝間 敬  (Hiruma Kei)  (20714504)	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授   (12601)	
研究分担者	西澤 智康  (Nishizawa Tomoyasu)  (40722111)	茨城大学・農学部・准教授   (12101)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------