

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658083

研究課題名(和文)植物常在酵母の葉面接着戦略の解明

研究課題名(英文) Mannosylerythritol lipids is associated with filamentous growth and propagation of phylosphere yeast *Pseudozyma antarctica* on plant surfaces.

研究代表者

北本 宏子 (Kitamoto, Hiroko)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10370652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：葉面常在酵母が、植物表面に接着し、生息域を確保する仕組みは未解明である。本研究では、酵母 *Pseudozyma antarctica* が生産する界面活性を示す糖脂質(マンノシルエリスリトール(MEL))が、*P. antarctica* 自体の細胞の伸張と、葉表面で生息域を広げる役割を持つことを明らかにした。また、*P. antarctica* が、葉の表面で MEL を生産することを示唆する結果も得た。

研究成果の概要(英文)：In this study we found that MELs (mannosyl erythritol lipids) produced by yeast *Pseudozyma antarctica* on plant surfaces could be expected to play a significant role in fungal morphological development and propagation on plant surfaces.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：酵母 植物 接着 拡散

1. 研究開始当初の背景

固体表面への微生物の接着と侵入機構は、細菌のバイオフィーム形成や、病原性酵母では、酵母状から菌糸状への形態変化と組織への侵入等が詳しく調べられているが、葉面常在酵母が葉面に生息域を確保する仕組みはほとんど明らかになっていない。

Pseudozyma 属酵母は、植物表面から単離された報告例が多い。提案者らは、日本各地のイネから、酵母 *P. antarctica* を単離したことから、この種がイネの常在菌と考えている。一方で、*P. antarctica* を液体培養すると、糖脂質（マンノシルエリスリトールリピッド：MEL）を 100g/L 程度と著量生産することが知られている。MEL は、その優れた界面活性や保湿性から、化粧品材料に使われている。しかし、*P. antarctica* 自身の生活における MEL の生態的役割は不明であった。

2. 研究の目的

P. antarctica の植物表面での接着や拡散における MEL の役割を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MEL 非生産株の液体培養における表現形解析

MEL 生産性株 *P. antarctica* T34 と、その MEL 生産に関わる遺伝子破壊株（マンノシルエリスリトール合成酵素遺伝子 *PaEMT1* 破壊株）を MEL 非生産株として用いた。MEL 生産株と非生産株を液体培地で継時的に培養した際の形態変化を観察した。また、MEL 非生産株を培養する際に、人為的に MEL を加えた場合の形態変化も解析した。

(2) MEL 非生産株の固体培養における表現形解析

エタノール固定したタマネギ薄皮上で、MEL 生産株と非生産株の形態を観察した後、植物表面における菌の接着と拡散の解析のため、(1)と類似の操作を、新鮮な植物の切葉（イネ、ムギ、キャベツ）の上で行った。その際、切葉表面の 1 点に菌を接種して静置培養した後、葉を水中で攪拌洗浄し、葉に接着していない細胞を除去した。植物表面に残存する菌をカルコフルオールで染色し、蛍光顕微鏡下で葉表面における菌の状態を観察し、葉面でコロニーが広がった面積を、画像解析装置で評価した。

(3) 植物葉存在下における *P. antarctica* による MEL 生産性の解析

MEL 生産株細胞の水懸濁液に、切り葉を加えた場合と、加えずに静置し、一定時間ごとに有機溶媒で MEL を抽出し、液体クロマトグラフィーで MEL を分離・検出した。また、懸濁液から継時的に RNA を抽出し、MEL 分泌に関わる *PaMMF1* の発現レベルの変化（対 *P. antarctica* アクチン遺伝子比）を調べた。

(4) 植物上の *P. antarctica* による MEL 生産の解析

ポット栽培のコムギ葉に MEL 生産株を接種し、一定時間ごとに植物体ごと RNA を抽出し、MEL 生産の指標である *EMT1* と *MMF1* の遺伝子発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) MEL 非生産株の液体培養における表現形解析

MEL 生産株は、液体培養で細胞が伸張するが、非生産株は、伸張した細胞が少なく、酵母状の細胞が多かった（図 1）。

また、MEL 非生産株は、培養時に MEL を添加したところ、細胞が伸張した。このことから、MEL は細胞の伸張に関与することが示唆された。

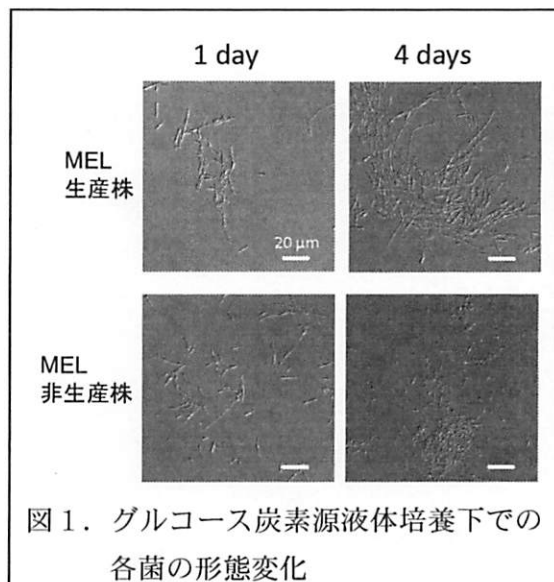


図 1. グルコース炭素源液体培養下での各菌の形態変化

(2) MEL 非生産株の固体培養における表現形解析

液体培養初期の酵母状の細胞（MEL 生産株と非生産株）をタマネギ薄皮上に接種したところ、生産株は細胞が伸張して、薄皮表面全面に隙間無く広がるが、非生産株は酵母状の細胞が多く、伸張した細胞が少なく、増殖の範囲も葉の葉脈近辺に集中していることから、限定的だった（図 2）。

イネとムギ、キャベツの切り葉表面における菌の増殖も同様で、MEL 生産株は葉表面に強固に接着しつつ、偽菌糸成長が盛んで、生息域を拡大した（図 3A）。特に、コロニーの縁で増殖する細胞は、偽菌糸状の形態が発達している様子が観察された。一方で、MEL 非生産株はほとんど接種場所に留まっていた（図 3B）。

ところが MEL 非生産株に人工的に MEL を滴下したところ、MEL 生産株と同様に偽菌糸状の形態変化が起こり、葉表面での生息域が拡大した（図 4）。

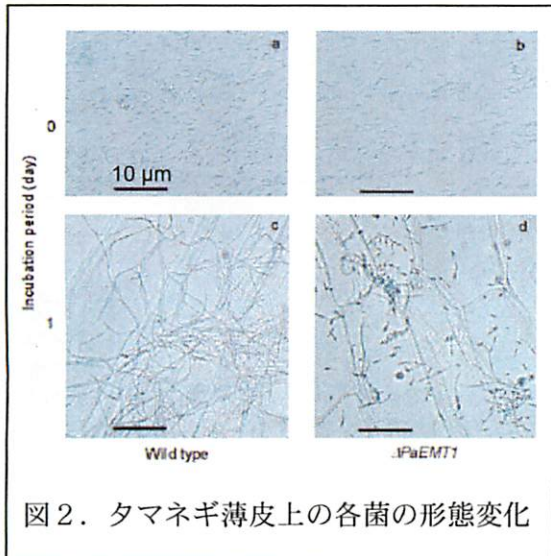


図2. タマネギ薄皮上の各菌の形態変化

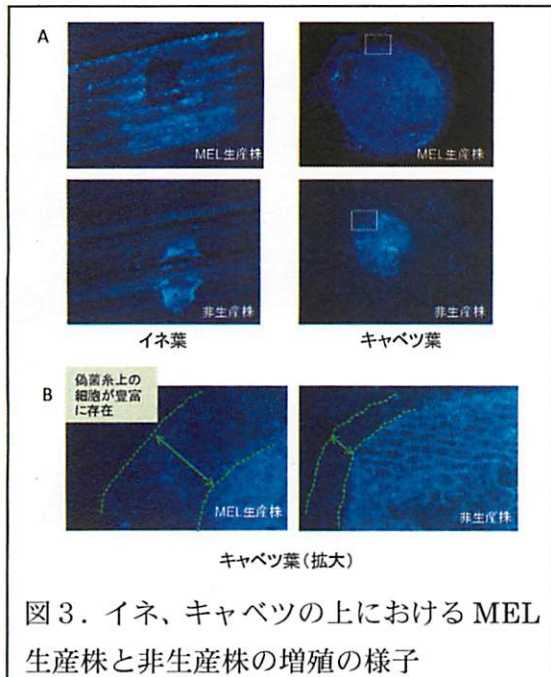


図3. イネ、キャベツの上における MEL 生産株と非生産株の増殖の様子

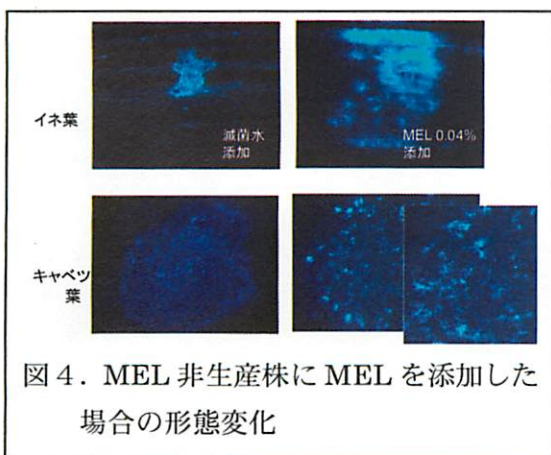


図4. MEL 非生産株に MEL を添加した場合の形態変化

(3) 植物表面における *P. antarctica* による MEL 生産性の解析

切り葉を加えた細胞懸濁液中では、培養 4

日目の懸濁液中に、顕著に多く MEL が検出された。一方で、切り葉を入れない細胞懸濁液では、MEL の生産量が少なかった。切り場のみでは MEL は検出されなかった。培養過程における MEL の分泌に関わる遺伝子発現は、MEL の量にリンクしていた (図5)。

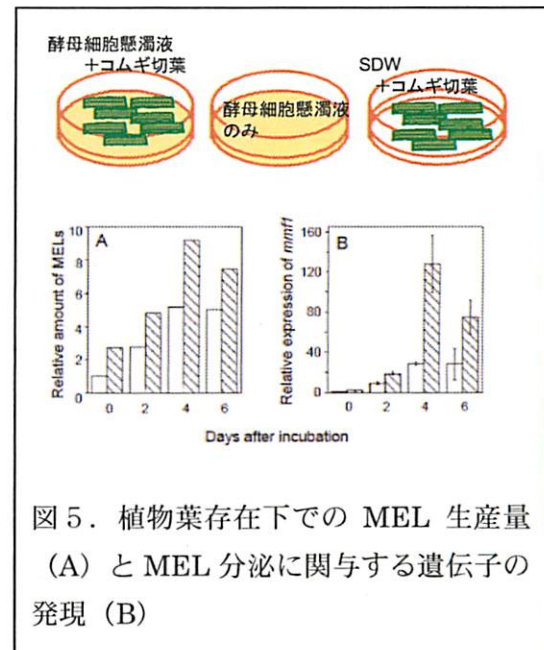


図5. 植物葉存在下での MEL 生産量 (A) と MEL 分泌に関与する遺伝子の発現 (B)

(4) 植物上の *P. antarctica* による MEL 生産の解析

ポット栽培中の植物体上で *P. antarctica* の MEL 生産に関わる遺伝子の発現レベルは、接種実験を 2 回繰り返し行った結果とも、*PaEMT1*、*PaMMF1* ともに、培養後 4~6 日目に上昇した (図6)。

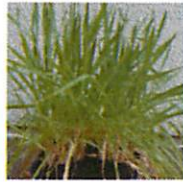
以上の結果から、*P. antarctica* 細胞は、植物の上に接着した後、生息域を拡大するために、偽菌糸状に広がるが、その際に MEL が関与することが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 件)

- ① Yoshida S, Morita T, Shinozaki Y, Watanabe T, Sameshima-Yamashita Y, Koitabashi M, Kitamoto D & Kitamoto H Mannosylerythritol lipids secreted by phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* is associated with its filamentous growth and propagation on plant surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol.* in press
DOI 10.1007/s00253-014-5675-x



温室内
保持

接種1, 2, 4,
6, 8日後に
葉を回収

P. antarctica T-34株の細胞懸濁液
をポット植えコムギにスプレー接種

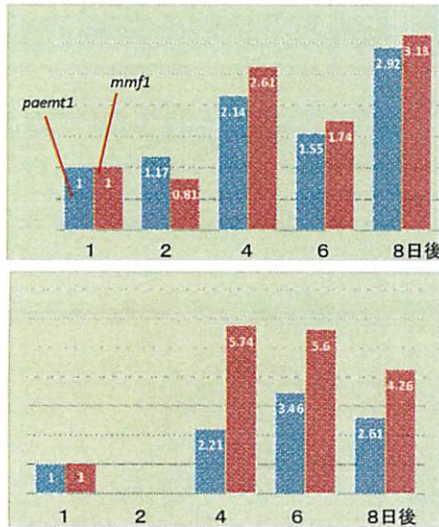


図6. 植物体上における *P. antarctica* の
MEL 生産遺伝子の発現プロファイル

- ②Shinozaki Y, Kikkawa Y, Sato S, Fukuoka T, Watanabe T, Yoshida S, Nakajima-Kambe T, Kitamoto HK (2013) Enzymatic degradation of polyester films by a cutinase-like enzyme from *Pseudozyma antarctica*: surface plasmon resonance and atomic force microscopy study. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 8591-8598. DOI 10.1007/s00253-012-4673-0

- ③Suzuki K, Sakamoto H, Shinozaki Y, Tabata J, Watanabe T, Mochizuki A, Koitabashi M, Fujii T, Tsushima S, Kitamoto HK (2013) Affinity purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from a yeast isolated from the larval midgut of a stag beetle, *Aegus laevicollis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 7679-7688. DOI 10.1007/s00253-013-5454-0

[学会発表] (計3件)

- ①北本宏子, 吉田重信, 森田友岳 (2014)

Pseudozyma 属酵母が植物体上で分泌する糖脂質マンノシルエリトールリピッドは、生息域の拡大に参与する, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2A09p11 明治大学 (東京都)

- ②Kitamoto H, Koitabashi M, Shinozaki Y, Watanabe T, Sameshima-Yamashita Y, Yoshida S (2013) Yeast on plant surfaces break down biodegradable plastics, YEAST (26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology Book of Abstract), S231 フランクフルト大学 (ドイツ)
- ③北本宏子, 小板橋基夫, 渡部貴志, 篠崎由紀子, 山下結香, 鈴木健 (2014) 植物常在菌による生分解性プラスチックの分解促進, 日本化学会 ATP 依頼講演, 日本化学会, 3F5-33 名古屋大学 (愛知県)

[図書] (計 件) なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 件) なし

[その他] なし
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北本 宏子 (KITAMOTO HIROKO)
独立行政法人 農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域 上席研究員
研究者番号: 10370652

(2) 研究分担者

吉田 重信 (YOSHIDA SHIGENOBU)
独立行政法人 農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域 主任研究員
研究者番号: 90354125