

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688041

研究課題名(和文)複合微生物系構築ならびに微生物間相互作用に基づいた担子菌機能の最大化

研究課題名(英文) Maximization of basidiomycete function based on the mixed microbe system construction and the interaction between the microbes

研究代表者

亀井 一郎 (Kamei, Ichiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90526526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽担子菌は森林生態系における木質バイオマスの主要な分解者であるが、腐朽材中の白色腐朽菌とその他の微生物との相互作用についてはほとんどわかっていない。本研究では、腐朽木材中から木材腐朽菌と共存細菌をそれぞれ分離し、網羅的に解析を行った結果、ある種の細菌が木材腐朽菌の菌糸伸長を促進するという新規な現象を明らかにした。多くの相互作用を見出したが、たとえば白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F の菌糸伸長は、共存細菌 *Curtobacterium* sp. TN4W-19 のコロニーに向かって促進される。白色腐朽菌の生育を促進する細菌の存在は初めての報告であり、今後の詳細な検討が期待される。

研究成果の概要(英文)：White-rot basidiomycetes are the main decomposers of woody biomass in forest ecosystems. Little is known, however, about the interactions between white-rot fungi and other microorganisms in decayed wood. A comprehensive confrontational analysis of natural wood-decaying fungi and coexisting bacteria revealed that some bacteria can promote the growth of fungi. For example, *Curtobacterium* sp. TN4W-19 significantly promoted the mycelial growth of *Stereum* sp. TN4F in the direction of the bacterial colony, without direct contact between the mycelium and bacterial cells. This is the first report of a positive interaction between a white-rot fungus and a coexisting bacterial strain *in vitro*.

研究分野：森林化学、森林微生物学、バイオマス変換

キーワード：木材腐朽菌 微生物間相互作用 リグニン 複合微生物系 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

自然環境では、微生物と微生物とが多様な相互関係を維持しながら共存して複合微生物系を形成している。たとえば、森林の樹木と菌根菌は相利共生的関係にあると考えられているが、この共生関係に関わり菌根菌の生育および菌根形成を助ける細菌の存在が確認されている。しかしながら木材腐朽過程において主な分解者として働く木材腐朽菌については、共存する細菌類との共生関係や相互作用についてはその存在すらほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

全く情報のない木材腐朽菌と細菌との共存関係について網羅的な情報を入手し、木材腐朽菌の能力向上に資する細菌の存在を明らかにすることを目的とした。これまでコンタミネーションとして排除され、純粋培養系でのみ検討されてきた木材腐朽菌研究に、共存細菌の存在という概念を提案する。木材腐朽過程における微生物群集についての基礎的知見が得られるだけでなく、有用腐朽菌の環境中での人為的制御について、複合微生物系再構築などの滅菌操作以外の道が開けると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 木材腐朽菌および共存細菌の採取と相互作用の網羅的解析

宮崎大学田野演習林内の 10 本の腐朽倒木 (TN1 ~ TN10) から、発生している子実体およびその子実体直下の腐朽木材を採取した。希釈平板法を用いて、採取した腐朽木材から細菌の単離をおこなった。子実体から得られた腐朽菌菌糸と、腐朽木材から得られた細菌とを同じ PDA 培地上に接種した後、25 °C の暗黒条件下で対峙培養し、腐朽菌菌糸の伸長速度や形態を測定、観察した。

(2) *Curtobacterium* 属細菌 TN4W-19 株は *Stereum* 属木材腐朽菌 TN4F 株の菌糸伸長を促進する。

木材腐朽菌 TN4F およびその菌糸伸長を促進する細菌株 TN3W-19 株をモデルとして位置づけ、ゲノム上の保存領域の塩基配列を用いた種の推定と、寒天培地上における菌糸伸長促進効果について詳細に検討を行った。

(3) カワラタケ TN6F と共存細菌の共培養による木材腐朽促進効果

白色腐朽菌 *Phlebia brevispora* TN3F 株および *Trametes versicolor* TN6F 株と、それぞれの白色腐朽菌が生育していた腐朽材から分離された細菌株を用いた。細菌と腐朽菌は含水率 80 % コナラ木粉 (アルコール・ベンゼン脱脂済) 0.5 g に接種し、25 °C、暗所で 30 日間培養した。培養後、サンプル中の重量減少率、リグニン分解率、マンガンペルオキシターゼ活性、およびラッカーゼ活性を測定した。

(4) *Phlebia brevispora* TN3F と共存細菌の液体共培養

3-1 と同様に PDA 培地上での対峙培養を行うと共に、グルコース濃度を 1% とした PD 液体培地 20 mL を含む 50 mL 容三角フラスコを用意した。PDA 培地上で前培養した白色腐朽菌 TN3F 株を 0.5 mm のコルクボーラーで打ち抜き、1 片を接種した。同時に、細菌株 TN3W-8 または TN3W-14 を白金耳で PD 液体培地に接種し 3 日間、25 °C、120 rpm で振盪培養した。培養後、1G2 ガラスフィルターでろ過し、残渣の乾燥重量を菌糸体乾燥重量とした。

4. 研究成果

(1) 木材腐朽菌および共存細菌の採取と相互作用の網羅的解析

TN2F と共存細菌 26 株、TN3F と共存細菌 27 株、TN4F と共存細菌 24 株、TN6F と共存細菌 44 株、TN9F と共存細菌 27 株、TN10F と共存細菌 14 株、の合計 162 通りの組み合わせで木材腐朽菌及び共存細菌の対峙培養を行い、木材腐朽菌の菌糸伸長を測定した。TN6F と 44 の細菌株 (TN6W-1 ~ 27、TN5W-1 ~ 17) との組み合わせの結果、菌糸伸長が阻害されるもの、菌糸に触れた細菌が菌糸に付着し、共生しているように見えるものが観察された。TN4F と 24 の細菌株 (TN4W-1 ~ 24) との組み合わせの結果、菌糸伸長が阻害されるもの、菌糸伸長が促進されている可能性があるものが観察された。TN3F とその共存細菌の組み合わせでは、多くの組み合わせで菌糸伸長の促進が観察された。すなわち、同一の倒木より分離した木材腐朽菌と細菌は、様々な相互作用を示し、一部の細菌は木材腐朽菌の菌糸伸長を促進することが明らかとなった。

(2) *Curtobacterium* 属細菌 TN4W-19 株は *Stereum* 属木材腐朽菌 TN4F 株の菌糸伸長を促進する。

TN4F 株の 5.8S rRNA gene 配列と、TN4W-19 株の 16S rRNA gene 配列をクローニングし、配列を決定したところ、TN4F は *Stereum* 属木材腐朽菌、TN4W-19 は *Curtobacterium* 属細菌であることが明らかとなった。TN4W-19 を培地の周縁部に接種したときの TN4F 株の菌糸伸長速度が細菌を接種しないものに比べて約 2 倍速くなるという結果が得られた。TN4W-19 を培地の一边に接種して対峙培養をおこなったところ、TN4F の菌糸伸長速度が細菌存在方向に速くなるという結果が得られた (Fig. 1)。また、この組み合わせによる菌糸伸長の促進効果は、菌糸と細菌とが接触していない状態で観察され、菌糸が細菌に近づくにつれて大きくなった (Fig. 2)。これは、TN4W-19 が菌糸伸長を促進する何らかの物質を生産し、TN4F の菌糸伸長を促進する効果を持つことが示

唆された。

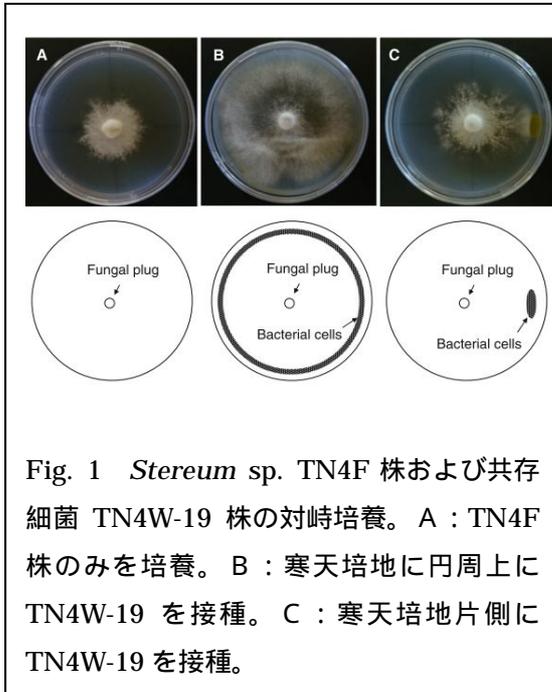


Fig. 1 *Stereum* sp. TN4F 株および共存細菌 TN4W-19 株の対峙培養。A : TN4F 株のみを培養。B : 寒天培地に円周上に TN4W-19 を接種。C : 寒天培地片側に TN4W-19 を接種。

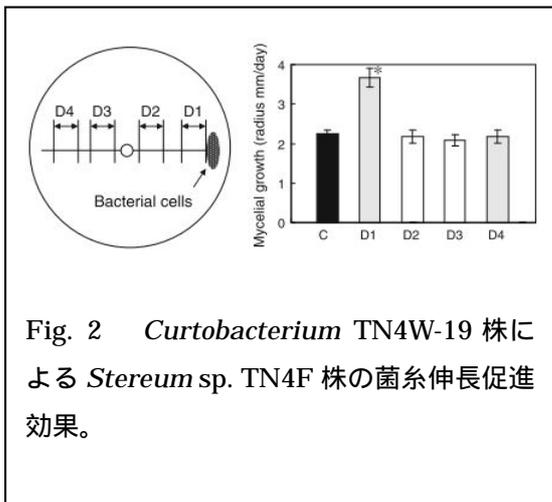


Fig. 2 *Curtobacterium* TN4W-19 株による *Stereum* sp. TN4F 株の菌糸伸長促進効果。

(3) カワラタケ TN6F と共存細菌の共培養による木材腐朽促進効果

TN6F と細菌株数株を PDA 培地上で共培養したところ、TN6F 菌糸伸長速度には有意な影響を与えなかったものの、菌糸の形態が変化し、菌叢が厚くなる現象が複数観察された (Fig. 3)。木材腐朽について検討したところ、TN6F 株と細菌株の組み合わせでは、木粉の重量減少率が有意に増加した (Fig. 4)。更に、重量減少率の増加は各細菌株により異なっていた。このことから、白色腐朽菌と細菌の共培養による木材腐朽促進効果は共培養する細菌種によって異なることが示唆された。また、共培養条件下では、培養初期のリグニン分解率および、リグニン分解酵素活性値が TN6F 株のみを培養したときよりも高いことから、木粉培地上で白色腐朽菌と細菌

を共培養すると、細菌の存在により多くのリグニン分解酵素が白色腐朽菌から分泌され、リグニンが分解される可能性が示唆された。これらの研究から、PDA 培地上での細菌による白色腐朽菌の菌糸伸長促進効果のみならず、細菌の存在が白色腐朽菌のリグニン分解活性を促進する可能性が示唆された。今後、更なる検討が必要だが、詳細なメカニズムに興味を持たれる。

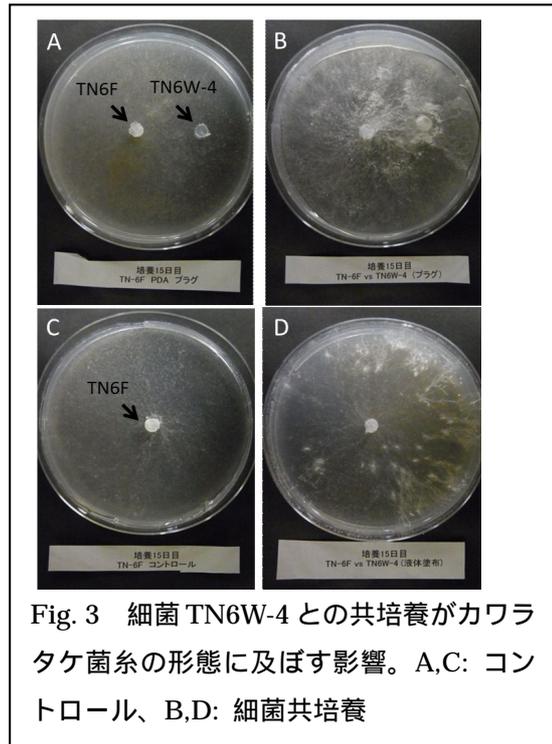


Fig. 3 細菌 TN6W-4 との共培養がカワラタケ菌糸の形態に及ぼす影響。A,C: コントロール、B,D: 細菌共培養

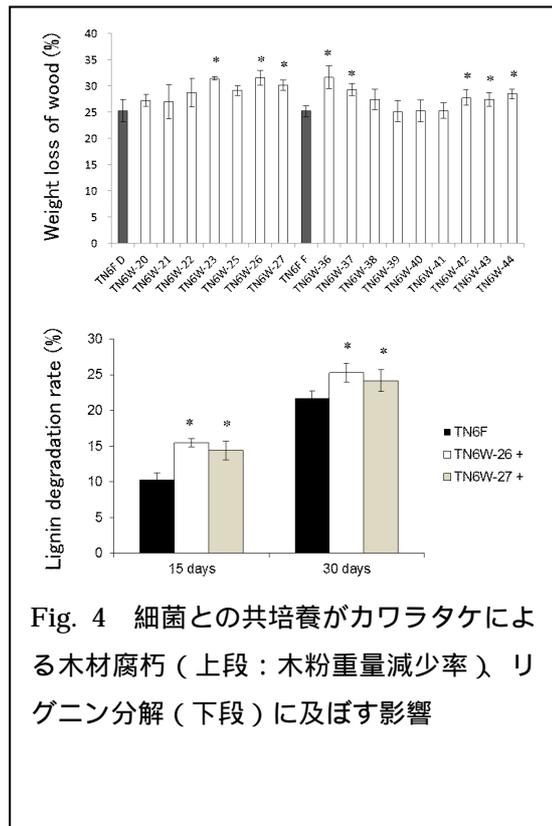


Fig. 4 細菌との共培養がカワラタケによる木材腐朽 (上段: 木粉重量減少率)、リグニン分解 (下段) に及ぼす影響

(4) *Phlebia brevispora* TN3F と共存細菌の液体共培養

PDA 培地上で TN3F 菌糸伸長促進効果が高かった TN3W-8 および TN3W-14 を用いた。グルコース濃度 1%とした PD 液体培地中で培養したところ、細菌と共培養させることで TN3F 単独で培養した時と比べて顕著な菌糸伸長促進が観察され (Fig. 5) 菌糸体乾燥重量が 2 倍以上増加した。また本現象は、培地のグルコース濃度に影響を受けることが明らかとなった。

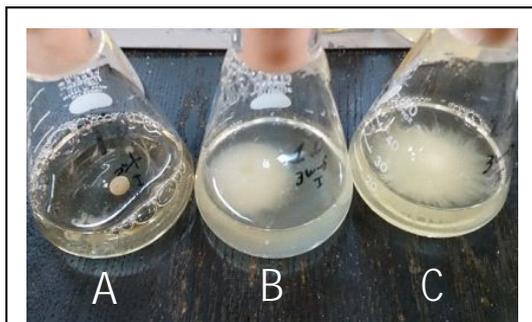


Fig. 5 *Phlebia brevispora* TN3F 株と共存細菌との液体共培養による菌糸伸長促進。A: TN3F 単独培養。B: TN3F と TN3W-8 の共培養。C: TN3F と TN3W-14 の共培養

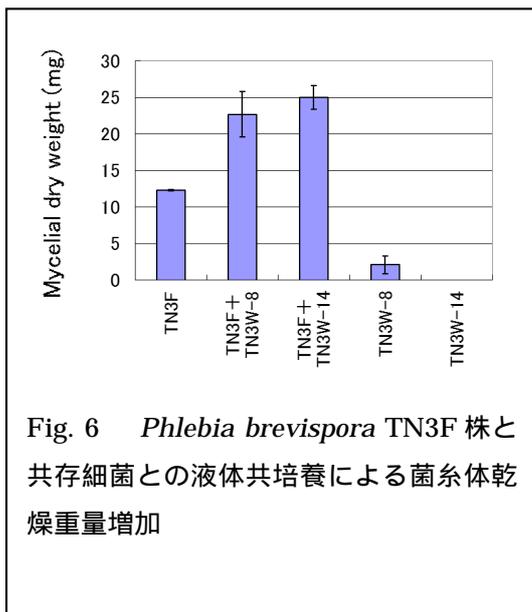


Fig. 6 *Phlebia brevispora* TN3F 株と共存細菌との液体共培養による菌糸体乾燥重量増加

(5) 総括

本研究を通して、これまで全く不明であった木材腐朽菌と細菌との関係の一端を明らかにすることが出来た。木材腐朽菌は細菌が共存することにより様々な恩恵を受けてい

る。本研究分野はまだ黎明期であり、さらに研究を進めることで、多くの新しい科学的発見につながると確信させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ichiro Kamei, Takehiro Yoshida, Daisuke Enami, Sadatoshi Meguro, Coexisting *Curtobacterium* Bacterium Promotes Growth of White-Rot Fungus *Stereum* sp., Vol.64, 2012, 173-178. 査読有
DOI: 10.1007/s00284-011-0050-y
亀井一郎, 木材腐朽菌の機能開発 - 環境浄化とバイオマス変換 -, 木材保存, Vol.38, 2012 査読有
DOI: 10.5990/jwpa.38.144

〔学会発表〕(計 7 件)

續賢史朗, 堀龍司, 駒井祐樹, 亀井一郎, 目黒貞利, 木材腐朽菌 *Phlebia brevispora* TN3F 株と細菌との液体培地における共培養, 第 21 回日本木材学会九州支部大会, 熊本県民交流館, 2014 年 9 月 12 日
小松尾麻衣, 亀井一郎, 目黒貞利, 白色腐朽菌と細菌の共培養による木材の脱リグニン促進効果, 日本木材学会大会, 岩手大学, 2014 年 3 月 13 日
小松尾麻衣, 亀井一郎, 目黒貞利, 白色腐朽菌と細菌の共培養が木材腐朽に与える影響, 日本木材学会九州支部大会, 九州大学, 2013 年 9 月 2 日
榎並大輔, 清松諒平, 堀龍司, 亀井一郎, 目黒貞利, 木材腐朽菌と細菌との相互作用 ~ 細菌と担子菌との共培養が木材腐朽に与える影響 ~, 第 62 回日本木材学会大会, 北海道大学, 2012 年 3 月 15 日
吉田健洋, 亀井一郎, 目黒貞利, 森林内での木材腐朽過程における腐朽菌とバクテリアとの相互作用, 日本きのこ学会第 15 回大会, 2011 年 8 月 31 日
亀井一郎, 目黒貞利, 白色腐朽菌 *Stereum* sp. の生育を促進する *Curtobacterium* 属細菌, 第 18 回日本木材学会九州支部大会, 鹿児島大学, 2011 年 8 月 27 日
吉田健洋, 亀井一郎, 目黒貞利, 木材腐朽菌と細菌との微生物間相互作用 ~ 腐朽菌菌糸伸長を促進するヘルパーバクテリア ~, 第 61 回日本木材学会大会, 京都, 2011 年 3 月 18 日

〔その他〕

宮崎大学農学部森林バイオマス科学研究室
<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/kamei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 一郎 (KAMEI, Ichiro)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号: 90526526