

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660045

研究課題名(和文) 内生細菌を利用した糸状菌形質転換体作出技術の開発

研究課題名(英文) Genomic characterization of the fungus-endobacterium symbiotic system for the fungal transformation engineering

研究代表者

太田 寛行(Ohta, Hiroyuki)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：80168947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Mortierella elongate* 23-6 I-B1株に内生する細菌のドラフトゲノム情報を解読して、内生細菌のシステイン要求性を突きとめ、システイン含有培地を用いて内生細菌の分離(B1-EBT株)に成功した。分離株の分類学的解析によって、B1-EBT株がBurkholderiaceae科に属する新属の細菌であること示し、B1-EBT株に対して、新属新種、*Mycophilus cysteinexigens*を提唱した。また、ゲノム解析結果から、B1-EBT株の菌糸侵入は、既知の「型分泌機構とキチン分解酵素を介した菌糸侵入」とは異なる新規のメカニズムであることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The endobacterium harbored in the mycelium of a fungus *Mortierella elongate* 23-6 I-B1 was isolated as a pure culture (strain B1-EBT) by the draft genome information from the endobacterium fraction of the fungal cell homogenate. Morphological, biochemical, and phylogenetic analyses revealed the strain B1-EBT was not classified into known taxa. Therefore, we proposed a novel species in a novel genus, *Mycophilus cysteinexigens*, in the family Burkholderiaceae for strain B1-EBT. From the genome information, strain B1-EBT was found to lack several key genes responsible for cysteine biosynthesis as well as the glycolytic pathway. The strain possesses the type II secretion system but not chitin-degrading enzyme genes, a key factor in the bacterial invasion into the host cell. Therefore, it can be expected that the association of *M. elongate* with *M. cysteinexigens* is established through a new cell-to-cell interaction mechanism.

研究分野：環境毒性化学

キーワード：応用微生物 菌類 細菌 生態学 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

細菌が真核細胞の中に内生する現象は、植物や動物でよく調べられてきた。前者の代表例は、根粒菌-マメ科植物の関係が挙げられる。後者では、昆虫に共生する細菌 *Wolbachia* や *Buchnera* がよく研究されてきた例である。一方、真核微生物と細菌の内生(共生)関係についての理解は、あまり進んでいなかった。その理由の一つは、微生物学の基盤が純粋培養系の確立であり、複数の微生物種の混在はコンタミネーションとして扱われてきた点であろう。研究対象として位置づけられたのは、糸状菌細胞内の「細菌様構造体(Bacterium-like organelles (BLOs))」の認識に始まる。MacDonald & Chandler (1981)は、アーバスキュラー菌根菌である *Glomus caledonius* の胞子や菌糸内に、直径 $0.3 \pm 0.06 \mu\text{m}$ の BLOs を電子顕微鏡で観察した。1980年代以降、菌類に内生する細菌の探索が進み、現在、3門4亜門7綱21目36科41属73種148系統の菌類に内生細菌が存在することが確認されている。

糸状菌-内生細菌の関係は、アーバスキュラー菌根菌(AM菌、*Gigaspora margarita*)とその内生細菌 *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (Bianciotto *et al.* 2003)、イネ苗立枯病の病原糸状菌 *Rhizopus microsporus* と内生細菌 *Burkholderia rhizoxinica* (Partida-Martinez & Hertweck 2005)で詳しく研究されてきた。後者では、内生細菌が病原毒素リゾキシンを生産することが分かっている。また、その内生細菌のゲノム解析がなされ、宿主糸状菌との相互関係が明らかにされている(Lackner *et al.* 2011)。先に、研究代表者らは、このような糸状菌-内生細菌の関係が土壌に普遍的に存在する糸状菌 *Mortierella elongata* にもあることを見出した。その内生細菌は *Burkholderiaceae* 科に属する新属の細菌であり(Sato *et al.* 2010)、糸状菌から内生細菌を除去する手法と内生細菌を物理的に分画する手法を開発して、内生細菌のゲノム解析を準備してきた。応募者らの糸状菌-内生細菌の系は、*R. microsporus* と AM 菌に続く、有用な研究モデルとして期待される。

2. 研究の目的

本研究では、原核微生物が真核微生物に内生する現象の解明とその応用をめざして、研究代表者らが使ってきた「内生細菌を保有する糸状菌 *Mortierella elongata*」を対象として、(1)内生細菌保有株からの内生細菌の純粋分離、(2)内生細菌のゲノム解析、(3)内生細菌の分類学的性状の解析、を目的とする。さらに、(4)内生細菌保有株と除去株の性状比較、(5)糸状菌-内生細菌コレクションの拡大と

新規内生細菌の探索についても研究の展開を図った。糸状菌が内生細菌を保有する意味の解明や、細菌の糸状菌内生に関わる因子の特定は、微生物学の新知見であり、内生細菌を利用して糸状菌を形質転換する新たな技術開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

- (1)内生細菌の分離：当研究室が保有する *M. elongata* 23-6 I-B1 株の懸濁液を調製し、ガラスビーズで菌糸を破碎し、遠心分離によって菌糸残渣を除いた後、上清を孔径の異なる2種類のメンブレンフィルター(8.0 μm 孔径と3.0 μm 孔径)で2段階のろ過を行い、内生細菌の粗分画液を得た。この粗分画液中に含まれる糸状菌のDNAをDNaseで分解した後、Nycodenzを用いた密度勾配遠心を行い、内生細菌画分を分取した。内生細菌画分はBCYE- α 培地に接種して培養した。
- (2)内生細菌のゲノム解析：上述の内生細菌画分を用いて、通常法でドラフトゲノム解析を行った。また、純粋分離菌株についても、同様にゲノム解析を行った。
- (3)内生細菌分離株の分類学的性状解析：細胞形態はネガティブ染色法で電子顕微鏡観察し、グラム染色、生理生化学的性状等は既報にしたがった。化学分類学的性状として、菌体脂肪酸分析、キノン分析、DNAのG+C含量測定を行った。系統学的解析は、16S rRNA 遺伝子のシーケンスを決定して行った。
- (4)糸状菌の培養と内生細菌の検出は、細菌16S rRNA 遺伝子を対象としたPCR法、Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes)を用いた蛍光顕微鏡での観察で行った。

4. 研究成果

(1) 内生細菌の分離

M. elongata 23-6 I-B1 株から、方法の項目で述べた内生細菌画分を用いて、DNAを抽出し内生細菌のゲノム解析に供した。その結果、内生細菌の推定ゲノムサイズは約2.8 Mb、推定ORF数は約2,300個であり、システイン合成系と輸送系に関する遺伝子群を欠いていることが推定された。近年、一部のマメ科植物と根粒菌において共生の場である根粒内で、宿主植物がシステインリッチペプチドを生合成して、根粒菌のバクテロイド化を促すことが報告されている。その他にも、体内の共生器官に細菌を内在させているアブラムシも、共生器官でシステインリッチペプチドが存在することが報告されており、植物や動物に共通してシステインリッチペプチドが細菌との共生を維持させるために重要であるという指摘がされている。糸状菌-細菌共

生では同様の現象は明らかになっていないが、糸状菌の内生細菌がシステイン合成系や輸送系の遺伝子群を欠くという発見は興味深い点である。

システイン要求性と糖の利用性がないという代謝特性を持つ細菌の一つに、アメーバなどの共生細菌である *Legionella* 属菌がある。*Legionella* 属は、システイン要求性を示し、糖の利用性がないため、システイン要求性を満たす専用の分離用培地（例えば BCYE- α 培地）が用いられている。そこで、前述の通りに分画した内生細菌を BCYE- α 培地に接種したところ増殖が認められ（図 1）、内生細菌 B1-EB^T 株の純粋培養に成功した。

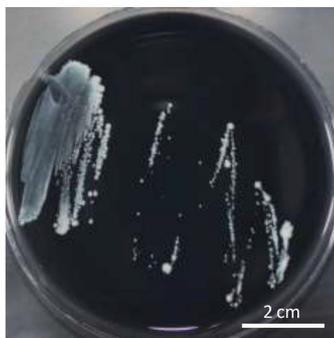


図 1 *M. elongata* 23-6 I-B1 株から調製した内生細菌画分を BCYE- α 培地に接種・培養して生じた B1-EB^T 株のコロニー

(2) 内生細菌のゲノム解析

糸状菌 *M. elongata* 23-6 I-B1 株から分離した内生細菌である B1-EB^T 株のゲノムサイズは、2,795,004 bp、推定遺伝子数は 2,317 であり、プラスミドはなかった。rRNA オペロン数は 2、transposase 遺伝子数は 118 (5.0%) であった。

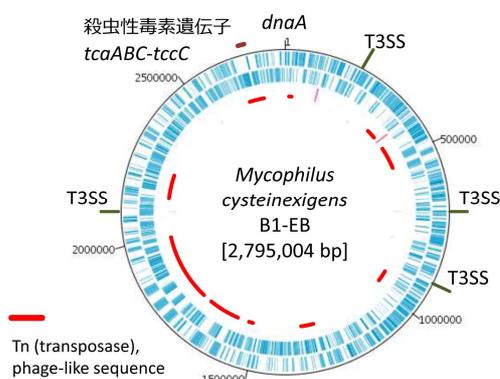


図 2 糸状菌 *M. elongata* 23-6 I-B1 株から分離した B1-EB^T 株のゲノム構造

代謝面での特徴は、システイン、メチオニンの輸送系と合成系が欠損している点、ヘキソキナーゼやピルビン酸キナーゼを欠き、糖を利用出来ない点、分泌系（型、型、型）を持っており、宿主糸状

菌との相互作用物質の分泌が推察される点、である。また、殺虫性タンパク質をコードする遺伝子も検出された（図 2）。

イネ苗立枯病の病原糸状菌 *R. microsporus* と内生細菌 *B. rhizoxinica* の関係では、内生細菌の菌糸内侵入には、型分泌機構で分泌されるキチン分解酵素およびキチン結合タンパクが関与することが明らかにされている。しかし、B1-EB^T 株のゲノムには、キチン分解酵素遺伝子がなく、*B. rhizoxinica* のような菌糸内侵入のメカニズムは持っていないと推察された。

(3) 内生細菌 B1-EB^T 株の分類学的位置

内生細菌画分の 16S rRNA 遺伝子解析から、内生細菌は *Burkholderiaceae* 科に属する新属の細菌であることが推定されていたが、分離した B1-EB^T 株の系統学的解析でも、そのことが立証された（図 3）。さらに、形態学的特徴（図 4）、生理生化学的性状、化学分類学的性質を調べた結果、B1-EB^T 株に対して、新属新種、*Mycophilus cysteinexigens* を提唱した。

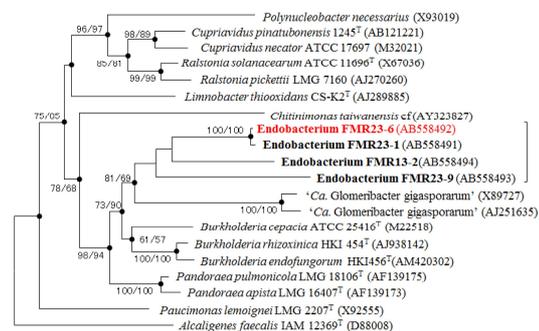


図 3 これまでに知られている糸状菌内生細菌と B1-EB^T 株の 16S rRNA 遺伝子の系統樹

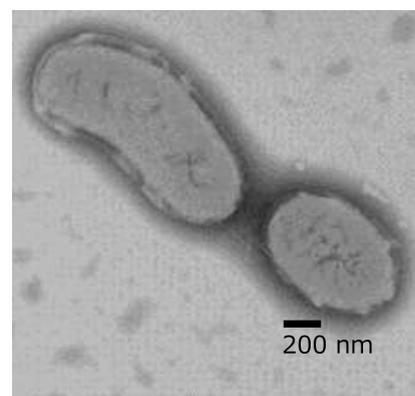


図 4 B1-EB^T 株のネガティブ染色像の電子顕微鏡写真

(4) 内生細菌保有株と除去株の性状比較

糸状菌 *M. elongata* 23-6 I-B1 株について、内生細菌を除去した菌株と保有株の性状比較を行った結果、除去株においては気中菌糸の形成が高まり、両者のコロニー性状が大きく

異なることがわかってきた(図5)。内生細菌が菌糸の成長に及ぼす影響の解明は今後の課題である。



図5 糸状菌 *M. elongata* 23-6 I-B1 株で内生細菌保有株(左写真)と除去株(右写真)のコロニー性状の比較

(5) 糸状菌-内生細菌コレクションの拡大と新規内生細菌の探索

任意に選んだケカビ目菌類 104 菌株について、内生細菌のスクリーニングを行った。その結果、104 菌株中 8 菌株から細菌が分離された: *Burkholderia* 属、5 菌株; *Collimonas* 属、2 菌株; *Pantoea* 属、1 菌株。一方、分離には至らなかったが、糸状菌 10 菌株から、内生細菌の存在を示す PCR 増幅が認められた。それらは、*Burkholderia* 属(2 菌株)、*Rhizobium* 属(1 菌株)、*Ochrobactrum* 属(1 菌株)、そして未同定細菌(6 菌株)であった。このうち、*Burkholderia* 属細菌 2 菌株に関しては、肉エキス培地および酵母マンニトール培地を用いることで分離培養に成功した。これらの *Burkholderia* 属細菌 7 菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、そのうち 5 菌株は、それぞれ *Burkholderia terrae* 近縁種(2 菌株)、*Burkholderia sordidicola* 近縁種(2 菌株)、そして、ナガカメムシ類の腸内細菌として報告されている *Burkholderia* 属細菌近縁種(1 菌株)であった。

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 2 件)

高島勇介、太田寛行、成澤才彦、『糸状菌、特にエンドファイトの諸形質を内生細菌がコントロールするのか?』、土と微生物、69、16-24、2015、査読有

Reiko Fujimura, Aymu Nishimura, Shoko Ohshima, Yoshinori Sato, Tomoyasu Nishizawa, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta, “Draft genome sequence of the betaproteobacterial endosymbiont associated with the fungus *Mortierella elongata* FMR23-6”, Genome Announcements, 2, e01272-14, 2014, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

大島翔子、藤村玲子、水上沙紀、佐藤嘉則、西澤智康、成澤才彦、太田寛行、『糸状菌 *Mortierella elongata* に内生する細菌のゲノム特性の解析』、日本土壤微生物学会 2015 年度大会、2015. 5.22、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)。

大島翔子、佐藤嘉則、藤村玲子、西村 歩、西澤智康、成澤才彦、太田寛行、『糸状菌 *Mortierella elongata* に内生する新属新種細菌の性状解析』、環境微生物学会合同大会 2014、2014.10.22-23、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)。

水上沙紀、太田寛行、『一酸化二窒素生成活性を有する土壌糸状菌の内生細菌保有に関する研究』、環境微生物学会合同大会 2014、2014.10.22-23、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)。

高島勇介、出川洋介、成澤才彦、『接合菌類および子囊菌類における菌類内生バクテリアの検出率について』、環境微生物学会合同大会 2014、2014.10.22-23、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)。

松岡 勇人、Rida Khastini、成澤 才彦、『植物根部エンドファイト *Veranoeopsis simplex* とその菌糸圏から分離されたバクテリアの相互作用』、環境微生物学会合同大会 2014、2014.10.22-23、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)。

中西布実子、高島勇介、太田寛行、成澤才彦、『子実体起源 *Pleosporales* sp. および *Mortierella* sp. に内生するバクテリアについて』、環境微生物学会合同大会 2014、2014.10.22-23、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)。

Shoko Ohshima, Yoshinori Sato, Reiko Fujimura, Aymu Nishimura, Tomoyasu Nishizawa, Kazuhiko Narisawa, Hiroyuki Ohta, “Genomic insights into a novel betaproteobacterium associated endosymbiotically with a fungus *Mortierella elongata*”, The 15th International Symposium on Microbial Ecology, 2014. 8. 28, ソウル(韓国)。

大島翔子、佐藤嘉則、西村歩、藤村玲子、木川りか、成澤才彦、太田寛行、『*Mortierella elongata* 内生細菌の分離と性状特性解析』、第 29 回日本微生物生態学会、2013. 11. 23-24、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)。

西村歩、大島翔子、藤村玲子、佐藤嘉則、大島健志郎、服部正平、成澤才彦、太田寛行、『内生細菌が糸状菌 *Mortierella elongata* の性状に及ぼす影響』、日本土壤微生物学会 2013 年度大会、2013. 6. 20、東京農工大

学（東京都・府中市）。

〔図書〕（計 1 件）

太田寛行、佐藤嘉則、西澤智康、シーエム
シー出版、『難培養微生物研究の最新技術
- 微生物の生き様に迫り課題解決へ - （第
12 章糸状菌の細胞に内生する細菌）』、2015、
印刷中。

6．研究組織

(1)研究代表者

太田 寛行（OHTA HIROYUKI）
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：80168947

(2)研究分担者

成澤 才彦（NARISAWA KAZUHIKO）
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：90431650

佐藤 嘉則（SATO YOSHINORI）
独立行政法人国立文化財機構東京文化財
研究所・保存修復センター・研究員
研究者番号：50466645

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

藤村 玲子（FUJIMURA REIKO）
茨城大学・博士特別研究員

大島 翔子（OHSHIMA SHOKO）
茨城大学大学院・農学研究科・修士課程学
生