

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19199

研究課題名(和文) 内生細菌を操ることで腐生菌であるMortierella属菌を共生菌に変える！

研究課題名(英文) By manipulating endobacteria, saprophytic Mortierella spp. can be transformed into symbiotic fungi!

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)： 内生細菌(BRE)保有株および除去株を含むMortierella属菌18菌株をトマトに接種した結果、13菌株が対照区と比較してトマトの地上部乾燥重量を増加させた。地上部乾燥重量を増加させた13菌株のうち5菌株では葉の褐変や根の生育不良などの病徴を生じた。病徴を生じた5菌株にはBRE保有株1菌株、BRE非保有株2菌株およびBRE除去株2菌株が含まれていたが、トマトを健全に生育させた8菌株のうち6菌株にはBREが存在していた。これらのことから、BREはトマトの生育促進に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Mortierella属菌を対象として、同菌に内生する細菌を制御することで腐生菌を共生菌に変える革新的な挑戦を行なった。菌類単独の能力とされていた諸形質を細菌が操っているという新事実がもたらされた。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、今までの菌学の概念を覆し、新たな生物共生系の存在を示す強いインパクトをもたらすと考えられる。さらに、腐生菌を農業上有用な共生菌に変えることが出来る可能性も示唆した。

研究成果の概要(英文)： As a result of inoculating 18 isolates of Mortierella sp. harboring a Burkholderiaceae-related endobacteria (BRE) and BRE free isolates on tomato plant, 13 isolates increased the dry weight of the plant as compared to the control. The five isolates among the 13 isolates showed symptoms such as poor root growth and browning leaf. These five isolates that developed the symptoms included one BRE-harboring and 4 BRE-free isolates. From these results, it was suggested that BRE is involved in tomato plant growth promotion.

研究分野：農学

キーワード：内生細菌 Mortierella属菌 植物生育促進 共生 病原性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物間の共生関係は、今までに多くの生物種で見出され、互いの生存・繁殖に不可欠である。菌類と内生細菌も相互に様々な影響を及ぼし合っていると考えられており、菌類-細菌を複合系として捉え、その生理、生態を理解することは極めて重要である。当研究グループでは、菌類体内には普遍的に細菌が存在し、相互依存の関係にあるという仮説を他に先駆けて提唱している。今までに、イネ苗立枯病菌 *Rhizopus microsporus* による毒素生産を内生細菌 *Burkholderia rhizoxinica* が制御することが示されているが、大部分の菌類では、その相互作用までは明らかになっていない。

2. 研究の目的

この内生細菌は、今までに3門4亜門7綱21目36科41属約73種148系統の菌類より報告されており、その中でも、本研究で対象とする *Mortierella* 属菌を含むケカビ門菌類での報告が多く、同菌類は相互作用解明のために最適である。

本研究の目的は、土壤菌類として知られる *Mortierella* 属菌を対象に、その内生細菌を操ることで腐生菌を作物生産に利用可能な植物共生菌に変えることである。

3. 研究の方法

(1) *Mortierella*属菌-内生細菌コレクションの拡大

植物組織や土壤等を分離源とし、異なる気候帯より *Mortierella* 属菌を分離する。特に嫌気、微好気、あるいは高温条件で分離を行い、選択的に“内生細菌を保有する菌株”を獲得する。

(2) 内生細菌のゲノム情報の解析

ゲノム解析から、内生細菌 *Mycoavidus cysteinexigens* は、システインとグルタチオンの合成系及びシステイン輸送系等を欠いており、そのことが内生細菌の純粋培養分離を困難にしていることが分かった。そこで、システインを添加した培地で増殖を試みたところ、純粋培養に成功した。このことより、内生細菌は、生存の一部を宿主菌類に依存していることが確認された。そこで、菌株によっては、さらなる培養系の修正を加え、*Mortierella* 属菌に内生している細菌の培養菌株の確立を目指す。

(3) *Mortierella*属菌に内生する細菌の有用形質付与の評価

当研究グループでは、単孢子や菌類の生理活性が低下する条件で抗生物質処理を行い、細菌フリー菌株の作出に成功し、上述の培養菌株確立により内生細菌の宿主菌類に関する影響を検証することが可能となった。本研究でも内生細菌フリー *Mortierella* 属菌株を効率良く作出し、培養した内生細菌とストレス条件で共存培養することで再導入を試みる。あるいは、細菌のマニピュレーション導入も試みる。さらに、同菌株を供試し、生物検定法を用い、植物の生育への内生細菌の関与を検証する。

4. 研究成果

(1) *Mortierella*属菌-内生細菌コレクションの拡大

広葉樹実生根部あるいはイネ科植物根部から洗浄法によって *M. humilis* S2、*M. elongata* S3、*M. alpina* S4、*M. alpina* S8、*M. gemmifera* S10 および *M. gemmifera* S11 の分離に成功した (表 1-1)。また、全ての供試菌株について、BRE が存在することが確認されており、Takashima *et al.* (2018) に従って分類し表 1-1 に示した。さらに、*M. humilis* YTM36、*M. humilis* YI11、*M. verticillata* YTM226、*M. verticillata* CBS130.66、*M. verticillata* YTM222、*M. verticillata* YTM181、*M. verticillata* CBS131.66 および *M. chienii* NBRC32831 を供試し、内生細菌の有無を調査した。結果を表 1-2 に

示す。

表 1-1. 内生細菌 (BRE) が認められた *Mortierella* 属菌およびその BRE の類別

種名	菌株名	BRE*	分離源	分離場所
<i>M. humilis</i>	S2	A	広葉樹実生根部	阿見 (茨城)
<i>M. alpina</i>	S4	A	広葉樹実生根部	阿見 (茨城)
<i>M. alpina</i>	S8	C	広葉樹実生根部	阿見 (茨城)
<i>M. elongata</i>	S3	A	イネ科植物根部	阿見 (茨城)
<i>M. gemmifera</i>	S10	A	広葉樹実生根部	阿見 (茨城)
<i>M. gemmifera</i>	S11	A	広葉樹実生根部	阿見 (茨城)

*BRE の類別は Takashima *et al.* (2018) に従った。

表 1-2. 内生細菌の有無を調査した *Mortierella* 属菌

種名	菌株名	BRE*	分離源	分離場所
<i>M. humilis</i>	YTM36	A	クロマツ樹下土壌	虫鳴山 (栃木)
<i>M. humilis</i>	YI11	A	ブナ根部	駒止湿原 (福島)
<i>M. verticillata</i>	YTM226	—	ブナ根部	駒止湿原 (福島)
<i>M. verticillata</i>	CBS130.66	A	森林土壌	イギリス
<i>M. verticillata</i>	YTM222	—	ブナ根部	駒止湿原 (福島)
<i>M. verticillata</i>	YTM181	C	ハリモミ樹下土壌	鳴沢氷穴 (山梨)
<i>M. verticillata</i>	CBS131.66	—	森林土壌	イギリス
<i>M. chienii</i>	NBRC32831	—	シラカシ樹下土壌	つくば (茨城)

*BRE の分類は Takashima *et al.* (2018) に従った。— は BRE が検出されなかったことを示す。

(2) 内生細菌のゲノム情報の解析

Takashima *et al.* (2018) により *Mortierella* 属菌 44 種 234 菌株のうち 16 種 49 菌株から BRE が検出され、*Mortierella* 属菌の BRE は 3 つのグループに類別できることが報告されている。*Mortierella* 属菌の BRE で培養に成功しているのは *M. elongata* FMR23-6 から分離された *Mycoavidus cysteinexigens* B1-EBT および *M. basiparvispora* E1425 から分離された *Mycoavidus* sp. B2-EB の 2 菌株のみで、ともに Group A に属する。両菌株とも、*Legionella* 属細菌の培養に使用される BCYE- α 培地を使用することで培養に成功している。*Mortierella humilis* S2 の BRE は Group A に属し、トマトの生育に影響を及ぼす可能性があり、BRE 単体のトマト生育への影響を検討する必要がある。また *M. humilis* S2 の BRE のゲノム解析を行うことで、宿主菌類および植物生育への相互作用が解明されると考えられたことから、はじめに *M. humilis* S2 の BRE の培養を試みた。

11週間培養後のコロニー形成確認数を表2に示し、出現したコロニーを図2に示した。コロニーが確認されたのは23°Cで培養した*M. basiparvispora* E1425s1の1シャーレ、*M. humilis* S2の1シャーレ、30°Cで培養した*M. elongata* FMR23-6の2シャーレであった。

また、*M. humilis* S2のBREを11週間培養後BCYE- α 培地上に出現したコロニーからDNAを抽出しシーケンスした結果、Query length 509 bpで*M. cysteinexigens* B1-EBに相同性98.82%だった。このことから、このBREを*Mycoavidus* sp. S2-EBとした。*Mortierella humilis*からのBREの人工培養の成功は初めての報告となる。

表 2. 23°Cおよび 30°Cでの BRE 培養 11 週間後のコロニー形成確認数。

宿主菌株	23°C	30°C
<i>M. elongata</i> FMR23-6	0/2	2/2
<i>M. basiparvispora</i> E1425s1	1/2	0/2
<i>M. humilis</i> S2	1/2	0/2

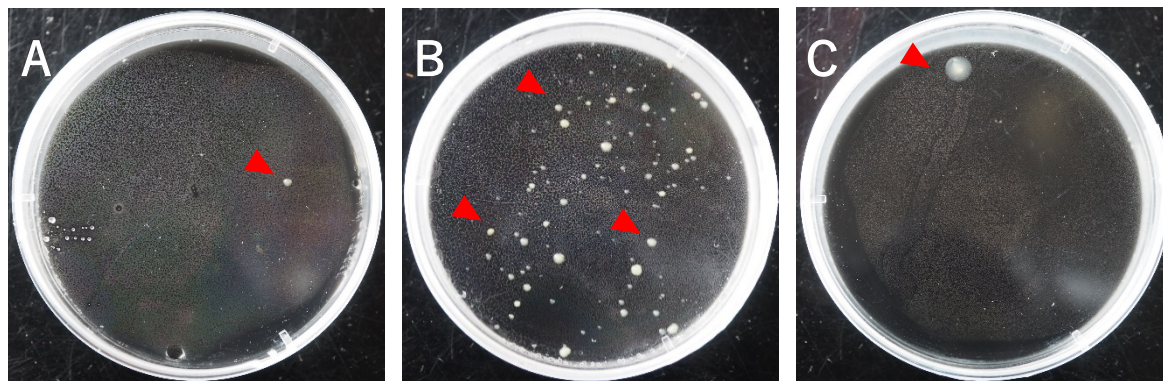


図 2. 23°Cあるいは 30°Cで 11 週間培養後に BCYE- α 培地上に認められた BRE のコロニー。BCYE- α 培地上に白色あるいは淡黄色のコロニー (矢頭) が認められた。A : 23°Cで培養した *M. humilis* S2 の BRE のコロニー。B : 30°Cで培養した *M. elongata* FMR23-6 の BRE のコロニー。C : 23°Cで培養した *M. basiparvispora* E1425s1 の BRE のコロニー。

(3) *Mortierella*属菌に内生する細菌の有用形質付与の評価

図 3 には本研究に供試した *Mortierella* 属菌とその BRE のトマト生育へ影響を示した。トマトの地上部乾燥重量を増加させた菌株は生育促進に、減少させた菌株は生育阻害として示した。

「地上部生育促進」には *M. humilis/verticillata* complex が多く、8 菌株中 6 菌株だった。また 6 菌株は Group A の BRE を保有する菌株であり、*M. humilis/verticillata* complex にはトマトの生育を促進する菌株が多く含まれること、および Group A の BRE はトマトの生育促進に関わることが示唆された。また、「地上部生育促進」を示したが、「病徴」を生じる菌株も認められ、その菌株には Group C の BRE を保有する 1 菌株、BRE 非保有株 2 菌株および BRE 除去株 2 菌株が含まれていた。以上より、BRE が存在しない菌株では宿主菌類の病原性が抑制されず、また Group C の BRE は宿主菌類の病原性を抑制しないことが示唆された。「地上部生育阻害」でさらに「病徴」を示した菌株には *M. elongata* S3、*M. alpina* S8、*M. gemmifera* S11、*M. gemmifera* S11BF3 および *M. chienii* NBRC32831 が含まれ、*M. humilis/verticillata* complex は含まれなかった。トマトの地上部乾燥重量を増加させた *M. humilis* S2 から抗生物質処理により BRE を除去して作出した *M. humilis* S2BF2 を接種したトマトでは葉の褐変および根の生育不良が認められた個体が増加したことから、BRE が宿主菌類の植物への病原性を抑制していることが示唆された。以上より、*Mortierella* 属菌に BRE が存在することが植物生育に影響することが示唆された。

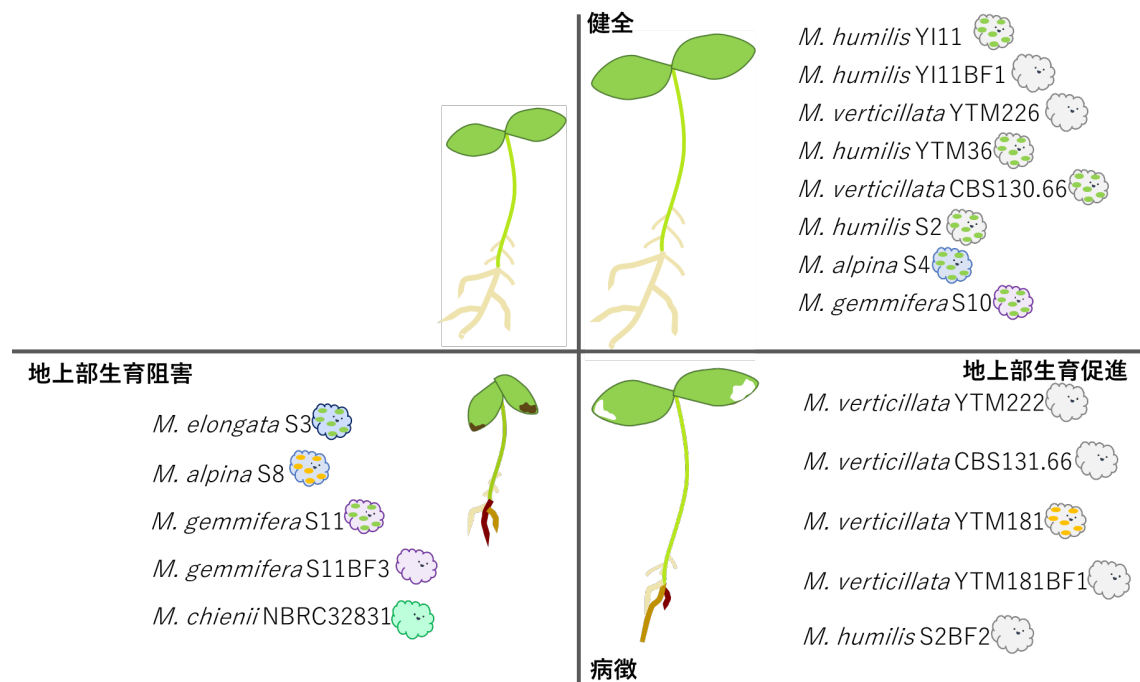


図 3. 本研究に供試した *Mortierella* 属菌およびその BRE がトマト生育に及ぼす影響。「健全・地上部生育促進」には *M. humilis/verticillata* complex の菌株が多く、Group A の BRE を保有する菌株が多く含まれた。「健全・地上部生育阻害」に該当する菌株は認められなかった。「病徴・地上部生育促進」には Group C の BRE を保有する菌株、BRE 非保有株および BRE 除去株が含まれた。「病徴・地上部生育阻害」には *M. humilis/verticillata* complex ではない菌株が含まれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashima Y, Degawa Y, Narisawa K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Mortierella oedorhiza, a new species forming a dichotomously branched rhizoid at the sporangiophore base.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 361-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.myc.2019.06.007	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 Takashima Y, Seto K, Degawa Y, Guo Y, Nishizawa T, Ohta H, Narisawa K.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takashima Y, Guo Y, Degawa Y, Nishizawa T, Ohta H, Narisawa K.
2. 発表標題 Aposymbiosis of an endofungal bacterium impacts on sexual reproduction of its fungal host.
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guo Y, Takashima Y, Narisawa K, Ohta H, Nishizawa T.
2. 発表標題 Comparative genomics highlights extreme genome reduction in a newly-cultured Mycoavidus-related endofungal bacterium dwelling in Mortierella parvispora.
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 郭 永、高島勇介、Dilruba Sharmin、佐藤嘉則、成澤才彦、太田寛行、西澤智康
2. 発表標題 Mortierella 属糸状菌に内生するMycoavidus属細菌のゲノム縮小化
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2019年度大会
4. 発表年 2019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 高温および有機態窒素条件における Mortierella humilis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2019年度大会
4. 発表年 2019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 humilis/ verticillata complexとその内生細菌のトマト生育への影響について
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashima Y.
2. 発表標題 Prevalence and phylogeny of endofungal bacteria associated with species of Mortierella.
3. 学会等名 Japan-Taiwan International Joint Symposium and Workshop [The 33rd Symposium of the Kanto Branch of the Mycological Society of Japan] (国際学会)
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

〔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	西澤 智康 (Nishizawa Tomoyasu) (40722111)	茨城大学・農学部・准教授 (12101)	