

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06252

研究課題名(和文) 木材腐朽菌 - 細菌モデル共生系の構築とその相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Construction of a model symbiotic culture system of wood rot fungi and bacteria, and elucidation of its interaction mechanisms

研究代表者

森 智夫 (mori, toshio)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：80536516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：木材の腐朽に関する木材腐朽菌と細菌の微生物間相互作用機構を解明するために、細菌叢の多様性を減じた腐朽菌-細菌モデル共培養系の構築を目指し検討を行った。腐朽菌床に共存可能な細菌叢を混入させ、木粉上で継代を繰り返すことにより、腐朽菌単独の場合よりも安定的に優れた木材分解特性を示すモデル共培養系の構築に成功した。木材分解に強く木の影響を及ぼす糸状菌の増殖を抑え、十分な培養期間を選択する事が重要であった。最終的に、木材腐朽菌純粋培養系よりも常に高いリグニン分解率を示すモデル共培養系を得ることに成功し、メタゲノムを用いて腐朽木粉抽出物に応答するバクテリア遺伝子の探索を行っている。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidation of interaction mechanisms between wood-rot fungi and bacteria during wood decay, we aimed to construct of fungi-bacteria model co-culture systems with lower bacterial diversity. Firstly, bacteria that can coexist with a wood rot fungus were penetrated into the fungal bed from natural environment. Then, a model co-culture system showing superior wood decay characteristics than in the case of pure fungal culture was obtained, by repeating subcultivation of contaminated fungal beds. Suppression of filamentous fungi growth that negatively affects wood decay, and sufficient cultivation period were important for construction of a model culture system.

Finally, a model co-culture showing stably superior lignin degradation was obtained. Furthermore, we are searching for the bacterial genes replying to the fungal metabolites extracted from the pure fungal culture by using metagenomic techniques.

研究分野：応用微生物学

キーワード：木材腐朽菌 細菌 相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 自然界において木材腐朽菌によって腐朽が進行している木材中では、様々な微生物が共存し、密接に影響しあっている事が知られている(引用文献; 例えば、 )。申請者のこれまでの研究成果においても、一部の木材腐朽菌では土壌細菌との共存下において難分解性芳香族化合物の分解力が向上するといった現象を見出しており(引用文献; )、木材腐朽菌が細菌との相互作用により発現する未知機能を保持していることを推測している。

(2) しかしながら、木材腐朽菌の木材腐朽機構に関する研究は、多くの場合で純粋培養系による検討であり、現状では腐朽菌-細菌複合系の研究報告例は極めて少ない。これは、不安定で多様すぎる細菌叢や難培養性細菌が要因となり、再現性が著しく低く、解析が極めて困難であるためであると考えられる。近年ではメタゲノム法を利用した検討が幾つか行われている(引用文献; 例えば、 )が、これらの研究は細菌叢や細菌酵素遺伝子の解析などが中心で、木材腐朽菌と細菌群との相互作用によるリグニン等木材成分の変動にまで言及した研究は限られている。

### 2. 研究の目的

(1) 自然界より得た腐朽木中の木材腐朽菌-細菌間相互作用機構は、分子生物学的に細菌叢や細菌酵素遺伝子の解析などが行われているが、背景でも述べた通り、成分変動など現象面を把握することは難しい。相互作用を正確に把握するには、木材成分に対する分解活性や代謝生成物を化学的に分析する必要があるため、菌叢を安定化し多様性を低減化した、高い木材分解活性を有する木材腐朽菌-細菌モデル共生系の構築が必要となる。

(2) 従って、第一の目的として安定化した木材腐朽菌-細菌モデル共生系の構築を行うこととした。次いで、得られたモデル共生系に特異的な代謝産物あるいは遺伝子発現を見出すことにより、腐朽菌-細菌間相互作用による木材分解機構の一端を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 純粋培養された白色腐朽菌の木粉菌床を不織布で包み、これを様々な土壌中に埋めることにより菌床内へ細菌を侵入させ、人為的に木材腐朽菌-細菌共培養系を作出した。不織布から取り出した菌床の表面を削り取り表面に付着した土壌などを取り除き、菌床内部に侵入した細菌と木材腐朽菌の共培養菌床を、木粉と水のみからなる培地に摂取し、所定期間培養した後に、重量減少率、リグニン分解率、多糖分解率などを測定した。この木粉培養による継代を繰り返し行った。対照区として、純粋な木材腐朽菌床を用いた。

リグニン量の定量は、クラークソン法を用い、残存糖成分の定量は、酸加水分解後に生じた単糖の定量により行った。

(2) 共培養系および純粋培養系菌床から、アセトン・メタノールを用い、低分子画分を抽出し、HPLCにて代謝産物の比較を行うことで、共培養系に特異的な代謝産物の検出を試みた。

(3) 共培養系よりメタゲノムの抽出を行った。また、木粉を炭素源とした最小培地を用いて細菌叢の集積培養を行った後にメタゲノムの抽出も行った。メタゲノムの抽出は、Zhou 等の方法(引用文献; )に準じて、CTAB-SDS 緩衝液を用いて、細菌を溶菌・ゲノム抽出した後に、クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、アガロースゲル電気泳動などを経て精製した。

(4) メタゲノム中に含まれる、木材腐朽菌ゲノム量は定量 PCR を用いて、internal transcribed sequence 領域の増幅により推定した。

(5) 得られた精製メタゲノムは *Sau3A1* により部分消化し、オペロントラップ *gfp* 発現ベクター(引用文献; )を用いてメタゲノムライブラリを作製した。作製したライブラリは大腸菌に形質転換し、白色腐朽菌純粋培養で木材分解した際の、代謝・分解産物にตอบสนองする細菌遺伝子の選抜を行っている。

### 4. 研究成果

(1) 静岡大学内の林地内土壌やリター、農場などの土壌に菌床を埋設し、一定期間ごとに回収した。ここから得られた細菌混入菌床を、新たな木粉培地に摂取し、2週間後に再度木粉に継代した。2度の継代を経て、腐朽菌純粋培養系に比して高い木材分解特性を示した腐朽菌-細菌共培養系が得られた。この結果は、培養条件を設定することができれば、木材分解特性が向上したモデル共生系を培養することが可能なこと示唆している。よって、さらに2週間毎に継代を継続することとした。

(2) 全ての共培養系で木粉の分解率は継代を繰り返す間に、大きく低下する現象が頻発した。その原因を探索したところ、木材腐朽菌以外の糸状菌の増殖により、木材分解性が劇的に低下することが明らかとなった。この糸状菌の由来を探索したところ、培地に用いた木粉由来などではなく、共培養菌床に混入している土壌由来糸状菌である可能性が予想されたため、担子菌である木材腐朽菌への影響が小さい、抗真菌薬であるチアベンダゾールで菌床を予め処理した後に、継代を行うことで糸状菌の増殖を抑えることに成功した。また、チアベンダゾールの影響が、2週

間毎の継代では木材重量減少率が徐々に低下する傾向が見られた。そこで培養期間の検討を行ったところ、4週間の培養であれば木材重量減少率が維持されることが明らかとなり、2週間の培養期間では木材腐朽菌が十分に増殖していない可能性が示唆された。

(3) チアベンダゾール処理を行い、4週間毎の継代に変更し、継代培養を繰り返して行った。その結果、純粋培養よりリグニン分解率のみが向上した培養系を得ることが出来た。この培養系は、木粉の重量減少率は殆ど変動しないにも関わらず(図1A)、4週毎の継代を繰り返しても腐朽菌純粋培養の場合よりも高いリグニン分解率を維持していた(図1B)。また、この木材分解特性は高い再現性を示したため、安定的な木材腐朽菌-細菌モデル共生培養系を構築できたと考えた。

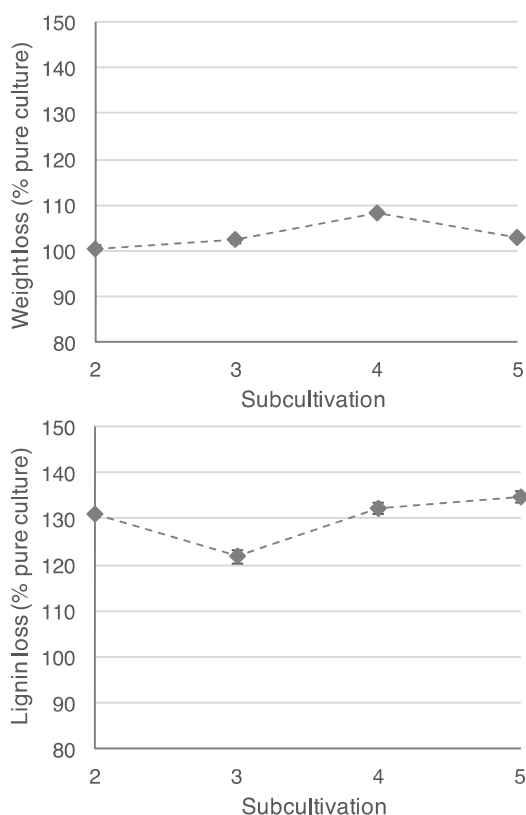


図1. 選抜した木材腐朽菌-細菌モデル共生培養系における木粉重量減少率(A)およびリグニン分解(B)の木材腐朽菌純粋培養系(pure culture)との比較

(4) しかしながら、純粋培養系、モデル共生系の木材分解産物をHPLC分析したところ、微量の産物が多数検出されHPLC上での比較は難しいことが分かった。よって代謝分解産物の比較は今後の課題とした。腐朽木材残渣中の高分子成分の分析を行うと、モデル共生系と腐朽菌純粋培養系との比較では、ホロセ

ルロース分解率は有意な差がなく、リグニン分解率のみでモデル共生系が有意に高い分解率を示した。また、リグニン分解率の向上は、酸可溶性リグニンではなく、クラートンリグニンの分解に主に起因していた。酸可溶性リグニンの主要な成分はシリングルリグニン由来であるとされており、クラートンリグニン量が低下した原因として、酸中で縮合するリグニン骨格、例えばグアイアシルリグニンの分解が進行した可能性が考えられる。

(5) モデル共生系に特異的な低分子産物の特定が困難であったため、モデル共生系木粉培養系より細菌メタゲノムライブラリの作成を試みたところ、菌床中の細菌数は僅かであり、充分量の細菌ゲノムが得られなかった。顕微鏡観察で共棲培養系の細菌叢の観察を行ったところ、モデル共生系では他の共培養系とは異なり、細菌数が大幅に少ないことが明らかとなった。これはモデル培養系では細菌叢の多様性が、他の共培養系と比較して大幅に低下した結果であると考えた。

(6) 木粉を炭素源とした最少培地による細菌叢の集積培養を行ったところ、充分量のメタゲノムが得られた。現在は、このメタゲノムを用いて、木材腐朽菌による木材分解時の産物に反応する細菌遺伝子を特定すべく、メタゲノムライブラリの作成・スクリーニングを行っている。

#### <引用文献>

- Blanchette RA, Shaw CG (1978) Associations among bacteria, yeasts and basidiomycetes during wood decay, *Phytopathology*, 68; 631-637
- Valášková V, de Boer W, et al. (2009) Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood, *ISME J.*, 3;1218-1221
- Purunomo AS, Mori T, et al. (2011) Basic studies and application of DDT: A review, *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 65:921-930
- Herve V, Le Roux X, et al. (2015) Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay, *Environ. Microbiol.*, 16:2238-2252
- Hoppe B, Kahl T, et al. (2014) Network analysis reveals ecological links between N-fixing bacteria and wood-decaying fungi, *Plos one*, 9:e88141
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 316-322.
- Uchiyama T, Abe T, et al. (2005) Substrate-induced gene-expression

screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes, Nature Biotechnol., 23, 88-93.

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

松村 真輝、森 智夫、河岸 洋和、平井 浩文、白色腐朽菌と細菌間相互作用による木材分解機構の解明の試み、第 69 回日本生物工学会(2017年9月11-14日)、早稲田大学西早稲田キャンパス(東京都新宿区)

森 智夫、河岸 洋和、平井 浩文、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株と自然界由来細菌の共培養、第 60 回リグニン討論会(2015年11月5-6日)、筑波大学大会館(茨城県つくば市)

〔図書〕(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森 智夫 (MORI, Toshio)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：80536516

