

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14905

研究課題名(和文) 木材腐朽および環境浄化に資する細菌移動戦略 ファンガルタクシー

研究課題名(英文) Interaction between wood-rotting fungi and co-existing bacteria - movement of bacterial cell, enhancement of fungal growth and wood degradation by co-cultivation -

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では白色腐朽菌と共存細菌との相互作用に着目し、木材腐朽時における細菌の移動、共培養による木材腐朽への影響、共存細菌が生産する化合物の3点に着目した。木片上の細菌の移動実験では、不安定ではあるものの菌糸の伸長に伴う細菌細胞の拡散を明らかにすることが出来た。木材腐朽に与える影響としては、組み合わせる菌と細菌の種類に依存して、木材腐朽の度合いが変化した。細菌が木材腐朽菌の菌糸伸長に影響を与える物質を生成していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, interactions between wood-rotting fungi and co-existing bacteria such as the movement of bacteria with fungi, the effect of co-cultivation for wood-rotting, and the chemicals which are produced by co-existing bacteria were focused. The bacterial cells were transferred with the growth of wood-rotting fungi on chip of wood, however, this phenomenon was unstable in reproducibility. Some bacterial strains improved the wood degradation by rotting fungi. It was proved that the bacteria which improve the growth of fungi produce some chemicals as signal.

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：白色腐朽菌 共存細菌 微生物間相互作用 木材腐朽 シグナル分子

### 1. 研究開始当初の背景

自然環境では微生物と微生物が様々な相互関係を維持しながら共存し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。また腐生性糸状菌とその共存細菌については相互作用し細菌が糸状菌と共に移動することが報告されているが、木材腐朽菌と共存細菌の共生関係や相互作用についてはほとんど分かっていない。我々の過去の研究で、対峙培養させることにより木材腐朽菌の菌糸伸長促進が確認された菌株・細菌株の組合せが複数あることが示された。たとえば、白色担子腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F 株とその菌糸伸長促進効果を持つ共存細菌 *Curtobacterium* sp. TN4W-19 株の組合せを見出している。しかし、共存細菌が存在することで木材腐朽菌の菌糸伸長が促進される要因は分かっていない。

### 2. 研究の目的

一般に糸状菌である木材腐朽菌は難分解性ポリマーであるセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる木材の固体表面上に菌糸を伸ばして移動し、菌体外に放出する酸化還元酵素や加水分解酵素で各ポリマーを分解しながら木材を腐朽する。一方、腐朽木材中には細菌類も存在し、単独でセルロースや低分子リグニンなどを分解することが知られていた。しかしながら、一般に単細胞生物である細菌は含水率の低い固体表面を移動することが困難であるとされる。では、どのようにして細菌は腐朽木材中に拡散するのか。申請者は細菌の戦略的拡散に糸状菌との相互作用が存在するのではないかと考えた。そこで、本研究の目的として

- (1) 腐朽菌による木材の腐朽時に、細菌との共培養がどのような影響を与えるか
- (2) 木片上で木材腐朽菌が生育する際に、共存細菌が菌糸とともに移動するか。
- (3) 共存細菌が木材腐朽菌の菌糸伸長促進物質を生産・分泌しているか

の3点を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 供試菌株：白色腐朽菌 *Trametes versicolor* TN6F 株およびその共存細菌 44 株 (TN6W-strains) を用いた。また、*Phlebia brevispora* TN3F およびその共存細菌株である TN3W-14 株を用いた。さらに、白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F およびその共存細菌株である *Curtobacterium* sp. TN4W-19 を用いた。いずれの白色腐朽菌株および共存細菌株共に宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター 田野演習林にて採取した。

### (2) 木粉の腐朽試験

宮崎大学田野演習林内の腐朽材から採取された白色腐朽菌 *P. brevispora* TN3F および *T. versicolor* TN6F 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 に植菌し、25 °C、暗所で 30 日間培養した。培養後、サンプルの重量減少率・リグニン分解率・マンガンペルオキシターゼ活性・ラッカーゼ活性・Filter Paper 活性を測定した。

### (3) 木片の腐朽試験

木材腐朽及び菌糸伸長に伴う細菌移動試験として、ホウノキおよびブナの木片を使用した。深底シャーレに 80 ml の PDA 培地を分注し、乾燥庫で 60 °C、2 日間乾燥させ恒量を測定した木片をオートクレーブで 121 °C、15 分間滅菌し培地上に設置した。木材腐朽菌株は 25 °C、3 日間 PDA 培地上で前培養したのち、木片直近の PDA 培地上に接種した。細菌は 30 ml の PD 液体培地中で一晩培養したのち、遠心分離で細菌細胞を回収し、蒸留水中に懸濁した懸濁液 10 µl を木片上に接種した。木材腐朽菌および細菌を所定の場所に接種後、25 °C 暗所で培養し、菌糸の伸長を観察した。また、細菌を接種した地点から離れた位置の菌糸をかきとり、R2A 培地に塗布し、細菌の有無を確認した。また、腐朽試験終了後の木片は表面の菌糸を除去した後、恒量を測定し、重量の減少率を求めた。

### (4) 菌糸伸長促進物質の探索

木材腐朽菌株 *Stereum* sp. strain TN4F とその共存細菌株 *Curtobacterium* sp. TN4W-19 株を用いた。細菌を PD 液体培地で 3 日間培養し、得られた培養液を酢酸エチルを用いて液-液抽出した。抽出物はフィルターペーパーに浸漬させ溶媒を除去し、PDA 培地で木材腐朽菌と共培養し菌糸伸長促進活性を検討した。また酢酸エチル抽出物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて数種類の展開溶媒ごとに分画した。得られた画分は同じようにフィルターペーパーに浸漬させ、菌糸伸長促進活性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 木粉の腐朽に与える共培養の影響

白色腐朽菌と細菌の共培養によって重量減少率が増加する組み合わせを見いだした。特に、*T. versicolor* TN6F 株と共存細菌株の共培養では、重量減少率とリグニン分解率の両方で、TN6F 株のみを培養したときと比べ有意に増加する組み合わせが存在することが分かった (図 1)。そこで、顕著な木材腐朽促進効果を示した細菌株 2 株 (TN6W-26 および TN6W-27) を用いてさらに検討を行った。培養開始 15 日目および 30 日目の重量減少率を測定したところ、いずれの細菌株と共培養

した場合でも、培養初期（15 日目）は、*T. versicolor* TN6F 株のみを培養した場合と比較して、むしろ重量減少率は低下する傾向にあり、培養後期（30 日目）には、細菌株と共培養した木粉の方が重量減少率は増加した（図 2）。一方で、木粉中のリグニンの分解率を測定したところ、培養初期（15 日目）から細菌と共培養した際に、有為が高いリグニン分解率を示し、その傾向は培養後期（30 日目）も維持された。これは、細菌の存在が、培養初期におけるリグニンの選択的な分解を促進している可能性を示唆する。そこで、*T. versicolor* TN6F 株と 2 つの細菌株の共培養条件下での各種酵素活性を測定したところ、TN6F 株のみの培養と比べ、共培養条件下で培養初期のリグニン分解酵素活性値が高いことが示された（図 3）。これは、前述した培養初期における共存細菌によるリグニン分解の促進という考察を支持する。

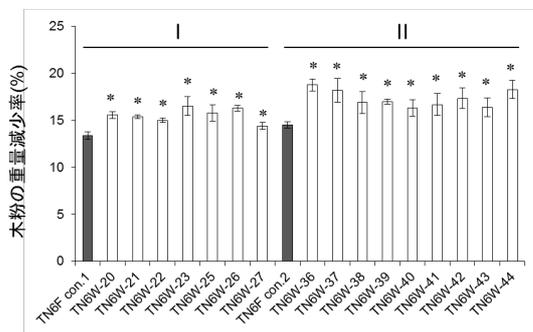


図 1 細菌の共培養が白色腐朽菌 *T. versicolor* による木粉の重量減少灰色のバーは白色腐朽菌単独で培養した時の値を示す。

細菌株 TN6W-26 および TN6W-27 それぞれの種を推定するために、16S rRNA 遺伝子の配列を解析した。その結果それぞれ、TN6W-26 は *Cupriavidus* 属細菌、TN6W-27 は *Enterobacter* 属細菌であることが示唆された。また、今回供試した 44 株の細菌のうち 11 株をランダムに選び、その 16S rRNA 遺伝子配列を解析したところ、8 株が *Enterobacter* 属細菌であることが示唆された。過去の報告で、*Enterobacter* 属細菌が *T. versicolor* による木材腐朽を促進し、その現象が *Enterobacter* 属細菌による窒素固定によるものではないかという報告がある。一方で、木材成分のリグニン分解を促進する結果を報告したのは本研究が初めてである。培養初期にリグニンを選択的に分解することで、その後のセルロース等の炭水化物の加水分解を容易にできたのではないかと考えられた。

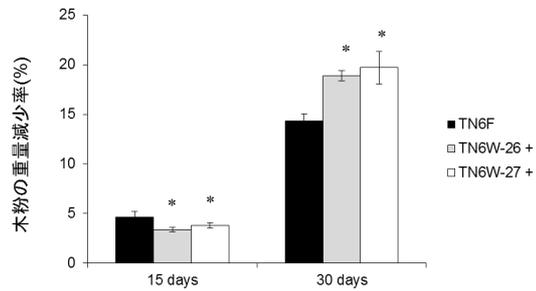


図 2 木粉の分解における細菌共培養の経時的影響 TN6W-26 および TN6W-27 をそれぞれ共培養した場合と、腐朽菌 TN6F のみを培養した場合を比較した。

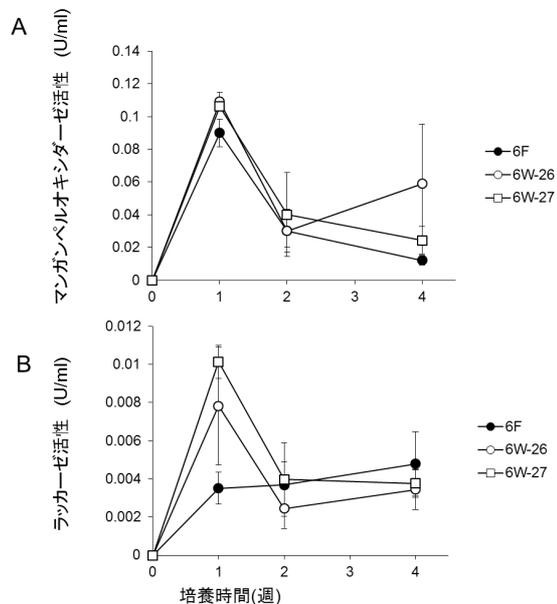


図 3 木粉の分解時におけるリグニン分解酵素生産に与える細菌共培養の影響 A：マンガンペルオキシダーゼ、B：ラッカーゼ

### (2)木片の腐朽における共存細菌の影響

白色腐朽菌 *P. brevispora* TN3F とその共存細菌株である TN3W-14 株、また白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F とその共存細菌株である *Curtobacterium* sp. TN4W-19 をそれぞれセットで用いた。

ホウノキ木片を 30 日間腐朽試験に供した際の状態を図 4 に示す。ホウノキ木片上では、細菌の共存下において、腐朽菌単独で培養した時よりも旺盛な菌糸伸長が確認されえた。一方で、ブナ木片を用いた際には、腐朽菌単独でも十分旺盛な菌糸伸長を示し、細菌共培養の効果を見ることはできなかった。

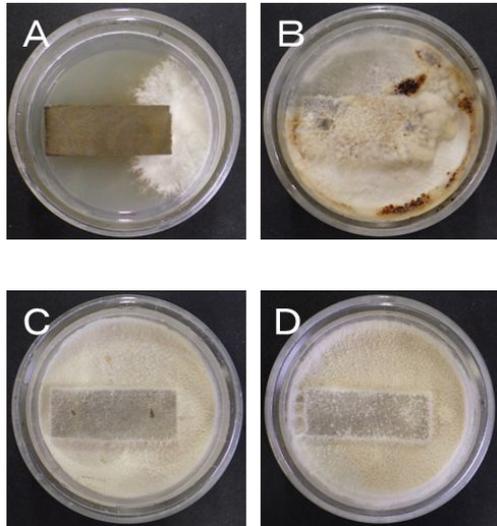


図4 ホウノキを用いた木片腐朽試験(30日間培養後)  
 白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F のみを培養 (A) および TN4F に *Curtobacterium* sp. TN4W-19 を共培養した場合 (B) *P. brevispora* TN3F のみを培養した場合 (C) および TN3F に共存細菌株である TN3W-14 株を共培養した場合 (D) を示している。

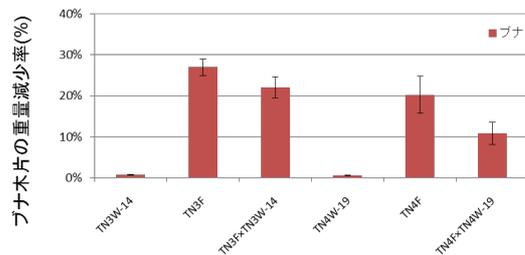


図5 細菌共培養がブナ木片の腐朽腐朽に与える影響(30日間培養後の重量減少)

30日間培養した際の木片の重量減少率を調べたところ、ホウノキは腐朽に強く、ほとんど重量が変化していないことが分かった。一方で、ブナ木片の場合、細菌が存在している際には木片の重量減少はむしろ低下しており、細菌の共培養により、菌糸伸長にはプラスに働くが木材腐朽は阻害される傾向にあった(図5)。

白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F とその共存細菌株である *Curtobacterium* sp. TN4W-19 の研究で、細菌が共存するとリグニン分解酵素等フェノールオキシダーゼの生産が抑えられ、菌糸伸長速度が増加するという結果が得られている。この結果は、細菌の存在が二次代謝系を抑え、一次代謝を活性化する可能性を示しており、本研究における木片腐朽の

阻害は、二次代謝系の抑制にあるかもしれないと考えられた。

#### (4)細菌の移動について

木片の腐朽に伴った菌糸の生長を観察し、細菌を接種した位置から離れた菌糸の先端部をかきとって、R2A培地上に塗布し、細菌の有無を調べた。接種した細菌が接種地点よりも離れた菌糸先端で検出されれば、菌糸の伸長と共に細菌が移動することを示す。しかしながら、本研究では、腐朽時における菌糸先端部に細菌の存在を確認することはできなかった。

本研究で使用した白色腐朽菌および細菌株は、PDAプレートアッセイで白色腐朽菌の菌糸成長促進効果が見られた組み合わせを用いている。結果(1)で示したように、プレートアッセイで菌糸の伸長促進が見られなくても、木粉の腐朽を促進する組み合わせがあることが分かっている。したがって、今後さらに異なる白色腐朽菌と細菌との組み合わせで本研究を継続することで、細菌の移動と糸状菌の関係を明らかにできるものと考えられる。

#### (3)細菌が生産する菌糸伸長促進物質

本研究項目ではすでに、菌糸伸長促進効果が確認されている白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F とその共存細菌株である *Curtobacterium* sp. TN4W-19 を用いた。また、本研究で新たに菌糸伸長促進が明らかとなった白色腐朽菌 *P. brevispora* TN3F とその共存細菌株である TN3W-14 株の組合せを用いた。*Curtobacterium* sp. TN4W-19 の培養液から調製した酢酸エチル抽出画分を用いてフィルターペーパーアッセイに供した結果、明らかな菌糸の伸長促進効果が観察された(図6)。また、白色腐朽菌 *P. brevispora* TN3F とその共存細菌株である TN3W-14 株の組合せにおいても同様の活性が細菌培養液の酢酸エチル抽出物に観察された(図7)。これらの結果はすなわち、酢酸エチル抽出画分に白色腐朽菌 *Stereum* sp. TN4F の菌糸伸長促進物質が含まれていることを明確に示している。

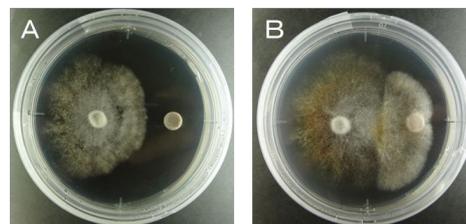


図6 *Stereum* sp. TN4F と *Curtobacterium* sp. TN4W-19 培養液抽出物との対峙培養 TN4F のみ(A)、TN4F と TN4W-19 培養液抽出物(B)

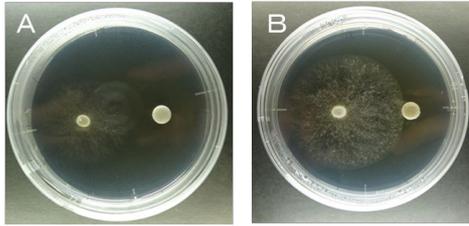


図7 *P. brevispora* TN3F と TN3W-14 培養液抽出物との対峙培養 TN3F のみ(A)、TN3F と TN3W-14 培養液抽出物(B)

そこで、本抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、促進物質の分画・精製を試みたが、分画の段階で促進活性が失われる結果となり、物質の同定には至らなかった。これは、活性物質が揮発性物質であるか、もしくは複数の化合物の混合物として機能しているからではないかと考えられた。今後さらに検討する必要があるが、少なくとも細菌が菌糸伸長促進物質を生産・分泌していることは証明され、それが酢酸エチルで抽出可能であることが初めて示された。これは、白色腐朽菌と共存細菌との相互作用解明に向けて大きな前進と言える。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Purnomo, A.S., Nawfa, R., Martak, F., Shimizu, K., Kamei, I. Biodegradation of Aldrin and Dieldrin by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* Current Microbiology. 査読有 74(3), 320-324. 2017

Kamei, I. Co-culturing Effects of Coexisting Bacteria on Wood Degradation by *Trametes versicolor*. Current Microbiology. 査読有 74(1), 125-131. 2017

### 〔学会発表〕(計 7 件)

小関直人, 津山 濯, 亀井一郎 白色腐朽菌 *Stereum* sp. の菌糸伸長促進効果を持つ共存細菌由来物質の探索 第 67 回日本木材学会大会 2017 年 3 月 18 日 九州大学(福岡)

Joy Linda Harry-asobara, 亀井一郎 Growth and degradation effects of co-isolated bacterial strains on indigenous and non-indigenous strains of white-rot fungus *Phlebia brevispora* 第 67 回日本木材学会大会 2017 年 3 月 17 日 九州大学(福岡)

小松亮太, 目黒貞利, 亀井一郎 白色腐朽担子菌の菌糸伸長促進に関わる細菌由来物質の探索 第 66 回日本木材学会大会 2016 年 3 月 28 日 名古屋大学(名古屋)

小松亮太, 目黒貞利, 亀井一郎 木材腐

朽菌の菌糸伸長促進に関わる細菌由来物質の探索 第 22 回日本木材学会九州支部大会 2015 年 10 月 5 日 大分県労働福祉会館ソレイユ(大分)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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: 9 0 5 2 6 5 2 6

### (2) 研究分担者

平井 浩文 (HIRAI, Hirofumi)

静岡大学大学院・農学研究科・教授

研究者番号: 7 0 3 2 2 1 3 8