

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05764

研究課題名(和文) 菌根性きのこの高度利用を目指した子実体内ヘルパー細菌の役割解明

研究課題名(英文) A study on role of helper bacteria isolated from the fruiting body of ectomycorrhizal mushrooms, and their integrated utilization

研究代表者

霜村 典宏 (SHIMOMURA, Norihiro)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00250093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ショウロ子実体から様々な細菌が分離できた。その中には、ショウロ菌糸生育を促進する細菌が見出され、それらはParaburkholderia, Caballeronia, Janthinobacterium, Novosphingobium および Rhodobacter属に属することが判明した。本ヘルパー細菌はクロマツと共生している菌根性きのこに対して特異的に菌糸生育を促進する作用を有することが明らかになった。インビトロ菌根共生に及ぼす細菌接種の効果を調査した結果、ショウロ菌を接種した後に細菌系統GIB024またはGIB028を接種する方法が効果的であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにしたヘルパー細菌は、子実体から分離されていること、また、根圏土壌から分離されたヘルパー細菌とは種が異なることから、分離源の由来と細菌種に新規性がある。また、本ヘルパー細菌はクロマツを宿主としたきのこ種に対して特異的に菌糸生育を促進することを明らかにしているが、この特異性に関する新知見は、菌根性きのこ細菌の相互作用に関する新しい研究領域を提案することに寄与する。一方、ショウロ菌を効率的に宿主クロマツに感染させる有効な方法を提案したことから、本知見は菌根性きのこの高度利用に資するバイオ資材の開発にも貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Various bacterial strains were isolated from fruiting bodies of *Rhizopogon roseolus*. Some bacterial strains were found to stimulate mycelial growth in *R. roseolus*. BLAST analysis revealed that these bacterial strains belonged to the genera *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Janthinobacterium*, *Novosphingobium*, and *Rhodobacter*. A comparative study using several ectomycorrhizal mushroom strains revealed that the bacterial strain from the fruiting body of *R. roseolus* stimulated mycelial growth of ectomycorrhizal mushrooms collected from a *Pinus thunbergii* forest, but not in those collected from another forest, indicating a specific interaction between the bacterial strain and ectomycorrhizal mushroom species. An *in vitro* inoculation experiment using *P. thunbergii* seedlings indicated that post-bacterial inoculation with GIB024 or GIB028 was effective in increasing mycorrhization of *R. roseolus*.

研究分野：きのこ栽培学

キーワード：外生菌根菌 ショウロ ヘルパー細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海岸クロマツ林ではショウロなどの食用きのこが発生する。ショウロはクロマツ根に感染して共生する菌根性きのこであり、いわゆるマツタケと同様に人工栽培が困難なきのことである。これまでクロマツ実生を用いて、ショウロクロマツ菌根共生系を効率的に育成する方法を開発し、さらにそのショウロ感染クロマツ苗木を育成することによってショウロ子実体生産が可能であることを明らかにしている。しかしながら、感染して形成される共生構造体(外生菌根菌)数や子実体生産量が少ないことから、より効率的な人工感染や子実体生産量の増大が求められている。

近年、強増殖性および耐塩性を具備したショウロ菌株の育成に取り組んだ研究過程においてショウロ子実体から菌糸生育を促進する細菌を偶然発見した。このような特性を有する細菌はヘルパー細菌と呼ばれているが、子実体から分離された研究例は殆どなく、特殊な機能を有すると推定されていた。しかしながら、細菌の分離系統数は少なく、また、本細菌の生存戦略に関する基礎的知見やクロマツ-ショウロの菌根共生系における役割や機能については全く不明である。さらには、本細菌は子実体から分離されることから、子実体形成との関連性が予想されるものの、その役割については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、子実体から分離されるヘルパー細菌に着目して、ショウロ子実体からヘルパー細菌を多数分離しヘルパー細菌系統を拡充すること、ショウロ以外の菌根性きのこの菌糸生育に及ぼす細菌の効果を調査して菌根性きのこ細菌との間の特異性解析を進め、高親和性細菌系統を選抜すること、そしてインビトロ菌根共生系にヘルパー細菌を導入することで、ヘルパー細菌の共生系の維持や子実体形成における役割を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 供試子実体

これまでショウロ子実体から分離したヘルパー細菌の系統数は少なく、特定の細菌種に偏っている可能性が危惧された。そこで、分離源となるショウロ子実体採取地を拡張し、ヘルパー細菌系統の拡充を目指した。分離源となるショウロ子実体採取地としては、鳥取県鳥取市浜坂の鳥取大学乾燥地センター構内のクロマツ林および石川県金沢市の内灘海岸に位置するクロマツ林を選定した。特に、2019年3月に集中してショウロ子実体を収集した。収集したショウロ子実体は菌株の分離および細菌分離に用いた。

(2) 組織分離および細菌分離

収集したショウロ子実体組織片を、改変 Meline-Norkrans (MMN) 平板寒天培地で培養して組織分離菌株を取得した。また、組織分離過程や胞子懸濁液の培養過程で出現した細菌コロニーを、濃度を5倍に希釈した1/5 MMN 平板寒天培地または PDA 平板培地に接種し培養した。分離した細菌は SCDLP 寒天培地および PDA 培地上で平板塗抹培養法によって単一コロニーとして、得られた単一コロニーを SCDLP 寒天培地および PDA 培地で培養した。

(3) 供試菌株

供試菌は、鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターに保存されている菌根性きのこの菌株を用いた。ショウロとして TUFC10010 を用いた。ショウロ以外のきのこでは 15 属 36 種 56 菌株を使用した。具体的には、宿主が二針葉マツのきのことして、アマタケ、チチアワタケ、ヌメリイグチ、マツタケ、マツシメジ、シモコシ、コツブタケの計 3 属 7 種、広葉樹のきのことして、サクラシメジの 1 種、カラマツ属のきのことして、シロヌメリイグチ、アジアカラマツイグチ、アミハナイグチ、ハナイグチの計 2 属 4 種、五針葉マツのきのことして、キヌメリイグチの 1 種、ハンノキ属のきのことして、ハンノキイグチの 1 種、宿主を特定しないきのことして、ウラムラサキ他 10 属 21 種を用いた。

(4) 細菌のきのこ菌糸生育に及ぼす効果の検定

菌根性きのこ菌糸の生育に及ぼすヘルパー細菌の影響調査は、以下の通り行った。菌根性きのこ菌糸を MMN-GM (MMN 培地からグルコースと麦芽エキスを除いた) 平板寒天培地に接種し、25°C、暗黒下で培養した後、菌糸末端から 2.5 cm 離れたところにヘルパー細菌を環状に画線し、同条件下で培養し、菌糸生育量を随時測定した。

(5) 細菌の同定と走査型電子顕微鏡観察

分離細菌を同定するために、細菌より DNA を抽出し、常法に従い PCR で増幅した。増幅産物を QIA 迅速 PCR 純化キットで純化した。シーケンシング反応は Eurofin Genomics で行い、塩基配列を Genetyz と BioEdit で解析した。細菌の同定には NCBI のデータベースに基づきプラス

ト検索した。さらに、細菌の微細構造を解析するために、細菌懸濁液を1%四酸化オスミウムで固定し、ナノパーコレーターで細菌を集め、エタノールで脱水し、tブチルアルコールに置換し、凍結乾燥した。乾燥試料を白金蒸着し、走査型電子顕微鏡で観察した。

(6) 菌糸生育促進効果検定法の改良

細菌が具備する菌糸生育促進効果を効率よく検定する検定培地、培養方法、さらには、細菌培養検定液の調製方法の改良に着手した。MMN 液体培地で培養した細菌培養液、高圧蒸気滅菌した細菌培養液、および、細菌培養液をろ過滅菌したろ液を検定液として用いた。検定用の培地として 1/5MMN 培地、1/5MMN 培地からグルコースを除いた 1/5MMN-G 培地、1/5MMN 培地から麦芽エキスを除いた 1/5MMN-M 培地、そして、1/5MMN 培地からグルコースと麦芽エキスを除いた 1/5MMN-GM 培地を用いた。これらの培地で予めショウロ菌を培養した後、細菌培養検定液を 2.5 cm 離して環状に塗布して培養し、菌糸生育量を計測した。

(7) インビトロ菌根共生系に及ぼす細菌接種の効果

インビトロ条件下のショウロ-クロマツ菌根共生系に及ぼすヘルパー細菌の影響について調査した。本実験には、ピートモスとパーミキュライトの混合土壌で無菌的に育成したクロマツ実生を用いた。これらの実生根に 1/5 MMN 液体培地で 30 日間培養したショウロ菌糸体を粉碎して接種した。また、クロマツ実生を育成した土壌に細菌を接種した。その細菌の接種試験区は、ショウロ菌接種 1 か月前に細菌を接種する細菌前接種区、ショウロ菌と細菌を同時に接種する同時接種区、そして、ショウロ菌を接種した後に細菌を接種する細菌後接種区の 3 接種試験区とした。ショウロ菌と細菌を接種したクロマツ実生を育成した後、根茎における菌根形成率を調査した。

4. 研究成果

(1) 細菌分離数と分離細菌のショウロ菌糸生育に及ぼす効果

鳥取県鳥取市および石川県金沢市より収集した 41 個のショウロ子実体から 49 細菌系統を分離した。分離細菌系統のショウロ菌糸体の生育に及ぼす効果を調査したところ 24 細菌系統で、菌糸生育促進効果が認められた。

(2) 分離細菌の同定と微細構造

菌糸生育促進効果を示した 24 系統のうち、6 系統において著しくショウロ菌糸の生育を促進したので、これらの細菌より DNA を抽出して分子生物学的同定を試みた。ブラスト検索をした結果、これらの細菌は、*Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Janthinobacterium*, *Novosphingobium* および *Rhodobacter* 属に属すると推定できた。さらに、主要な 3 細菌系統、GIB024 (*P. fungorum*), GIB028 (*C. sordidicola*), および、GIB029 (*J. agaricidamnorum*) の微細構造を走査型電子顕微鏡で調査したところ、これらは桿菌であることが判明した(図1)。以上の様な研究で、ショウロ子実体から分離したヘルパー細菌系統の実体を明らかにした。

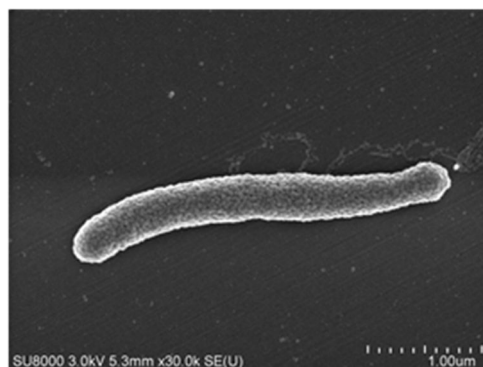


図1. 子実体から分離した細菌の SEM 像
Paraburkholderia fungorum (GIB024)

(3) ヘルパー細菌の菌根性きのこの菌糸生育に対する特異性解析

菌根性きのこの菌糸生育に対する細菌の影響について調査したところ、アマタケとチチアワタケの菌糸生育が促進された。最も菌糸生育が促進されたのは TUF31988 アマタケであり、相対生育率は 206% であった。最も菌糸生育が抑制されたのは TUF100861 イボラシャタケ、TUF100672 アジアカラマツイグチであり、その相対生育率はそれぞれ 54%、39% であった。また、対照区と比較して菌糸生育に影響を及ぼさないきのことしてオオキツネタケ、ガンタケ等が認められた。宿主がクロマツ由来の 5 菌株(ヌメリイグチ属)のきのこでは、菌糸生育が促進される傾向があり、逆に宿主がカラマツ属、五針葉マツのきのこに対して、菌糸生育を抑制する傾向が認められた。以上の結果から、ショウロ子実体から分離したヘルパー細菌はショウロを含め、宿主クロマツと共生している菌根性きのこに対して特異的に生育を促進する作用を有すると考えられた。

(4) 検定法の改良

1/5MMN-GM 培地を用いて検定すると菌糸生育促進効果は顕著に認められるが、1/5MMN-G 培地および 1/5MMN-M 培地では細菌の増殖が著しく旺盛で、逆に菌糸の生育が抑制された。一方、高圧蒸気滅菌した細菌培養液およびろ過滅菌したろ液を検定液として用いたところ、本検定液においても菌糸生育促進効果が認められた。その中でも、ろ過滅菌したろ液を 1/5MMN-GM 培地で検定した時に、最も顕著な促進効果が認められた。以上の結果から、ショウロ菌糸の生育を

促進する水溶性の物質がヘルパー細菌培養液中に生産されるが、その物質を追跡するためには、ヘルパー細菌の培養液をろ過滅菌し、そのろ液を 1/5MMN-GM 培地を用いて検定する方法が有効であることが判明した。

(5) ショウロ菌系の菌根形成に及ぼすヘルパー細菌の接種効果

分離同定した細菌系統のショウロ - クロマツ菌根共生に及ぼす影響について調査した。その結果、細菌の前接種、ショウロ菌との同時接種において1か月目よりも、2か月目に菌根形成率が穏やかに増大する傾向が認められた。しかし、ショウロ菌接種後に細菌系統 GIB029 を接種すると、1か月後には39%、2か月後に21%と、時間とともに菌根形成率が減少した。しかし、ショウロ菌接種後に細菌系統 GIB024 または GIB028 を接種すると菌根形成率が、1か月目より2か月目に著しく増大した。以上の結果から、クロマツ実生におけるショウロの菌根形成に及ぼす細菌接種の効果は用いる細菌系統と接種のタイミングで異なり、ショウロ菌を接種した後に細菌系統 GIB024 または GIB028 を接種する方法が効果的であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pramoj Na Ayudhya, S., Riffiani, R., Ozaki, Y., Onda, Y., Nakano, S., Aimi, T and Shimomura, N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Isolation of bacteria from fruiting bodies of Rhizopogon roseolus and their effect on mycelial growth of host mushroom	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 134-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24465/msb.27.4_134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 6件/うち国際学会 12件）

1. 発表者名 Pramoj Na Ayudhya, S., Ozaki, Y., Onda, Y., Aimi, T. and Shimomura, N.
2. 発表標題 Isolation and characterization of bacteria from fruiting bodies of Rhizopogon roseolus
3. 学会等名 The 10th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura, N.
2. 発表標題 Mushroom use for enhanced salt-stress tolerance of host pine seedlings
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2019 (AFELISA2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pramoj Na Ayudhya, S., Riffiari, R., Ozaki, Y., Aimi, T. and Shimomura, N.
2. 発表標題 Effects of isolated bacteria from Rhizopogon roseolus fruiting bodies on its mycelial growth and ectomycorrhizal formation
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2019 (AFELISA2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada, T., Pramoj Na Ayudhya, S. and Shimomura, N.
2. 発表標題 Induction of mutant bacteria by UV-C irradiation for stimulation of mycelial growth of <i>Rhizopogon roseolus</i> .
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2019 (AFELiSA2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimomura, N.
2. 発表標題 Breeding strategies on the edible ectomycorrhizal mushroom <i>Rhizopogon roseolus</i> : Strain improvement for enhanced salt-stress tolerance.
3. 学会等名 1st Symposium on Mushroom Research and Cultivation Technology: Progress & Challenges. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Pramoj Na Ayudhya, S., Onda, Y., Aimi, T. and Shimomura, N.
2. 発表標題 The role of specific mycorrhiza helper bacteria in the mycorrhization of <i>Pinus thunbergii</i> root in vitro
3. 学会等名 日本きのこ学会 第22回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 霜村典宏
2. 発表標題 外生菌根菌ショウロの人工栽培に関する研究
3. 学会等名 日本きのこ学会 第22回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimomura, N.
2. 発表標題 Use of the ectomycorrhizal mushroom for revegetation of host pine trees under salt-stress condition
3. 学会等名 The International Symposium on Bioremediation, Revegetation, Biomaterial, and Conservation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Pramoj Na Ayudhya, S., Onda, Y., Aimi, T. and Shimomura, N.
2. 発表標題 Effects of interaction between Rhizopogon roseolus and mycorrhiza helper bacteria on ectomycorrhizal formation in Pinus thunbergii roots in vitro
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2018 (AFELiSA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 霜村典宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 フジメディカル出版	5. 総ページ数 72
3. 書名 外生菌根菌の人工栽培に関する取り組みと今後の展望 Functional Food 機能性食品の基礎から臨床へ	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------