

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15583

研究課題名（和文）紅藻スサビノリと付着細菌のインドール酢酸を介した共生機構の研究

研究課題名（英文）Study on interaction of a red alga *Neopyropia yezoensis* and epiphytic bacteria via indole acetic acid

研究代表者

松田 竜也 (Matsuda, Ryuya)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・水産領域・任期付研究員

研究者番号：00849086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：細菌 *Neptunomonas* sp. BPy-1 のゲノムより、2つの合成酵素トリプトファンモノオキシゲナーゼ（*iaaM*遺伝子）およびインドールアセタミドヒドロゲナーゼ（*gatA*遺伝子）を分離した。発現量を調べたところ、これらの遺伝子はトリプトファンの有無にかかわらず恒常的に発現していた。トリプトファン無添加では培養液中にIAAの蓄積はないこと、IAA合成はトリプトファン濃度に依存したことから、外部からトリプトファンが供給されると、直ちにIAAを合成可能であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、スサビノリ付着細菌よりインドール酢酸（IAA）合成遺伝子を分離し、その遺伝子が恒常的に発現することを明らかにした。また、付着細菌はIAAを合成・分解するなどして適正な濃度に調整し、海藻の生育に対して影響を与える可能性を示唆した。これらの研究成果はノリ養殖における安定生産や品質改善技術への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Two synthetic enzymes, tryptophan monooxygenase (*iaaM* gene) and indoleacetamide hydrogenase (*gatA* gene), were isolated from the genome of the bacterium *Neptunomonas* sp. BPy-1. These genes exhibited a constant expression in the presence or absence of tryptophan. The absence of IAA accumulation in the culture medium without tryptophan and the dependence of IAA synthesis on tryptophan concentration in the medium indicate that IAA is synthesised immediately when tryptophan is supplied externally.

研究分野：植物生理学

キーワード：スサビノリ インドール-3-酢酸 付着細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

養殖ノリであるスサビノリは、無菌化すると異常な形態を示すことから、ある種の細菌がその成長に必須であると考えられている。また、一部の細菌はスサビノリの生育を促進させる有用な細菌であるとされる。しかし、そのような有用細菌の報告例はわずかであり、その生育促進機構は不明である。

スサビノリは葉状体、糸状体共に実験室内でインビトロに培養可能であり、純系の系統株が分離されている。ただしこれらの培養系は多数の細菌が共存した状態で維持されている。以前、スサビノリ葉状体培養液に空気中のエタノールが混入するトラブルがあり、培養液内はエタノールを炭素源として生育可能な細菌が異常増殖し白濁した。その原因菌である *Neptunomonas* sp. BPy-1 (NBRC 108560) は薬剤処理で付着細菌を洗い落として、その結果成長阻害を受けた葉状体薬剤処理した葉状体の生長低下を部分的に回復した。さらに、BPy-1 はトリプトファン添加時に植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (IAA) を合成した。また、糸状体付着細菌 *Marinobacter* sp. BPy-S1 (NBRC 114608) もトリプトファン存在下で IAA を合成した。これらのスサビノリ付着細菌が IAA を合成可能であることから、付着細菌とスサビノリの間に関連した共生機構が存在する可能性が惹起される。しかし、両株において、その合成機構や IAA のスサビノリ成長に与える影響は不明であった。

### 2. 研究の目的

植物成長促進細菌は IAA を合成することで陸上植物や単細胞藻類の成長を促進する機能を持つことが知られており、単細胞藻類でもその効果があることが実証されているが、大型藻類である海藻ではその効果についてよくわかっていない。植物成長促進細菌の IAA 合成経路は複数存在し、種間あるいは環境条件により異なることが知られている。一方で、スサビノリから分離した BPy-1 や BPy-S1 は培養時にトリプトファンを添加することで IAA を合成する。従って、両細菌ともにおいて、いずれかの IAA 合成経路を駆動可能であると考えられる。しかし、いずれの IAA 合成経路が機能しているか不明であった。本研究では、スサビノリ付着細菌の IAA 合成機構を明らかにし、海藻への IAA 添加により、スサビノリと付着細菌の共生関係について解析することを目的とし、(1) スサビノリ付着細菌のゲノム中の IAA 合成遺伝子の探索、(2) 付着細菌の IAA 合成遺伝子の発現様式、および (3) 海藻への IAA 添加実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 付着細菌の IAA 合成酵素遺伝子の探索

スサビノリ葉状体付着細菌 BPy-1 と糸状体付着細菌 BPy-S1 の全ゲノムを解読し、IAA 合成関連遺伝子を相同性検索で探索した。細菌の IAA 合成はトリプトファンを始発物質として開始される。図 1 は細菌の IAA 合成経路のうち、IAM 経路、TAM 経路、IPA 経路を示す。これらの経路では 7 種類の酵素が関与するとされる。

#### (2) 遺伝子発現の解析

BPy-1 ゲノム中に存在する IAA 合成系の遺伝子が発現するか調べるために、BPy-1 をマリンブロス培地中で培養し、RNA を抽出後、RT-PCR を行った。次に、1 mM のトリプトファンを添加し、24 時間後に発現が変動するか調べた。さらに、人工海水中での遺伝子発現を調べるために、人工海水に炭素源としてグルコースを添加し、トリプトファンの有無によって発現が変化するか調べた。

#### (3) 藻体への IAA 添加効果

スサビノリ培養株 (TU-1) 葉状体を 0.05%~0.1% 多酵素洗浄剤 (3M ヘルスケア社) で処理後、5 mm 長に切断し、IAA を添加培養した。2 週間培養後の葉状体の伸長の効果を調べた。スサビノリ以外の紅藻に対する IAA の効果を調べるため、野外でイバラノリを採集し、アンピシリンおよびストレプトマイシン添加培養 (Amp/Str) で簡易的に付着細菌を除去し、10  $\mu$ M IAA を添加、1 週間培養し、湿重量より日間成長率を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) スサビノリ付着細菌のゲノム中の IAA 合成遺伝子の探索

BPy-1 および BPy-S1 のゲノム情報を用いて、それぞれの酵素の相同遺伝子を調べ、その結果を表 1 にまとめた。BPy-1 において、*iaaM*-like、*gatA*、AT、AIDH が見出された (表 1)。BPy-S1 においては *iaaM*、*iaaM*-like、*gatA*、AT、AIDH が見出された。両株とも、*iaaH*、TDC、AO、*ipdC* は存在しなかった。BPy-1 と BPy-S1 のゲノム中に存在していた相同遺伝子配列はどちらも IAM 経路のみでトリプトファンから IAA までの合成経路が保存されていた。従って両種とも IAM 経路によって IAA を合成することが示唆された。

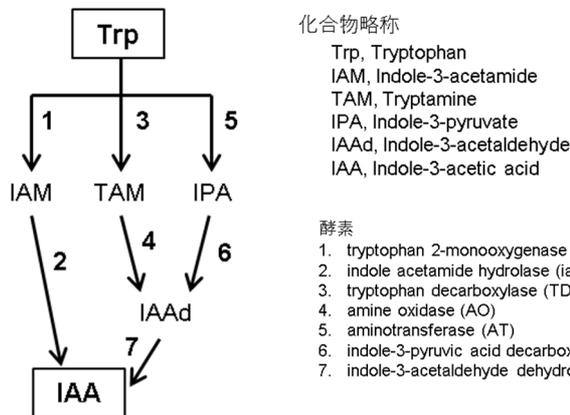


表 1 BPy-1、BPy-S1 ゲノム中の IAA 合成遺伝子

	Gene	BPy-1	BPy-S1
IAM pathway	iaaM	-	+
	iaaM-like	+	+
	iaaH	-	-
	gatA	+	+
TAM pathway	TDC	-	-
	AO	-	-
IPA pathway	AT	+	+
	ipdC	-	-
	AIDH	+	+

図 1 細菌の主要な IAA 合成経路

## (2) IAA 合成酵素の遺伝子発現

まず、BPy-1 ゲノム中に存在する *iaaM*-like 遺伝子および *gatA* 遺伝子が発現するか調べるために、BPy-1 をマリンプロス (MB) 培地中で培養し、RNA を抽出後、RT-PCR を行った。マリンプロス培養時、BPy-1 は成長し、ゲノム中の *iaaM*-like 遺伝子および *gatA* 遺伝子の発現が認められた。次に、1 mM のトリプトファン (Trp) を添加したマリンプロス培地で細菌を培養した。その結果、トリプトファン存在下でも両遺伝子は発現したが、トリプトファン無添加条件と比べて発現量に有意差はないものの、その発現は増加する傾向であった (図 2)。

BPy-1 は通常はスサビノリ葉状体と共に維持されている。スサビノリ葉状体は通常人工海水 (SEALIFE, MarineTech) に窒素源を添加して培養しており、炭素源は含まれていない。従って普段 BPy-1 はスサビノリより炭素が供給されることで維持されていると推定される。炭素源として 0.1% グルコースを添加した人工海水 (ASW) を用いて BPy-1 を培養した。また、IAA 合成酵素の遺伝子発現のトリプトファンへの応答を調べるためにさらに、1 mM トリプトファンを添加して培養を行った。その結果、人工海水中でも両遺伝子の発現が認められ、その遺伝子発現は増加する傾向であった (図 3)。

これらのことから、BPy-1 は細胞外のトリプトファンに反応して、IAM 経路遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。しかし、トリプトファン無添加でも遺伝子発現は見られ、また、発現量自体に有意差はなく、その上昇率は 1.5~2.5 倍程度であった。このことから、BPy-1 は恒常的に IAM 経路遺伝子を発現させることで、トリプトファンが供給されると速やかに IAA に変換していると考えられた。

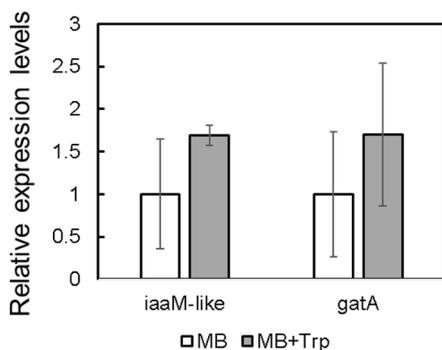


図 2 BPy-1 の IAA 合成酵素の遺伝子発現 (マリンプロス培地)

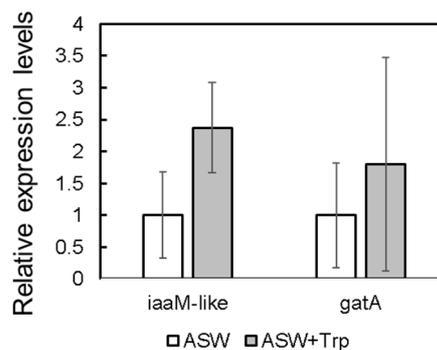


図 3 人工海水中の IAA 合成酵素の遺伝子発現 (人工海水 + グルコース)

## (3) 藻体への IAA 添加効果

スサビノリ葉状体を洗剤処理し、細菌類を一部洗い落とし、その上で 1, 10, 100 μM IAA を添加した。2 週間培養を行ったものの、コントロールと比べ、その成長は変わらなかった (図 4)。スサビノリ系状体の成長においては、IAA 添加により細胞分裂が誘導され、また IAA 阻害剤の添加により、その効果が打ち消されたことから、少なくとも糸状体においては IAA が生理機能を持つことが知られている。しかし葉状体については、明確な影響が明らかになっていない。今回の実験では洗浄した葉状体へ IAA を添加したが、洗剤による洗浄では、細菌を完全に脱落させることができないため、残存する付着細菌の影響により、添加した IAA が分解された可能性が

考えられた。今後、この点を検討し、付着細菌の影響を除き、実験を実施する必要がある。

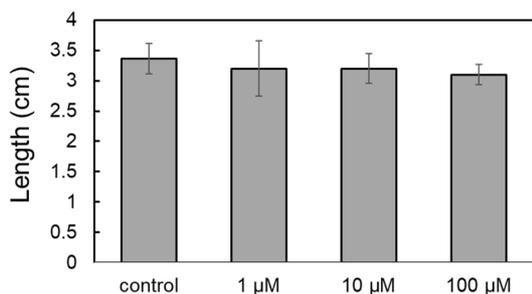


図4 IAA添加スサビノリの成長

スサビノリ以外の海藻について、IAAの効果がみられるか調べるため、野外で採集したイバラノリを抗生物質およびIAAの添加または無添加条件で培養し、その成長を比較した。IAAの添加のみでは、スサビノリと同様成長に影響は見られなかったが、抗生物質単独の添加で、成長が抑制され、さらにIAAも添加することで、その成長阻害が強化された。一般的な植物や藻類では、低濃度のIAAは成長を促進し、高濃度のIAAは成長を阻害することが知られている。イバラノリにおいて、細菌を抑制した条件ではIAAの効果がわずかに見られたことから、付着細菌がIAAを合成・分解、またはその他の調節により、宿主に対してIAAを適正な濃度に調整する可能性が考えられた。

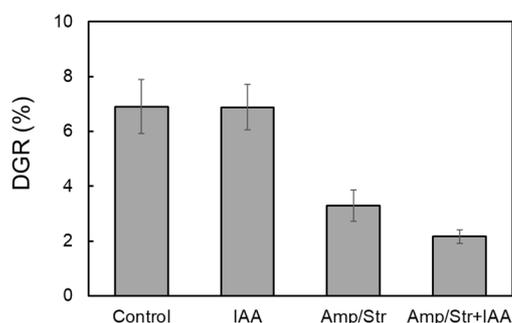


図5 IAA添加イバラノリの成長

今回の研究では、海藻がIAAに対し、共生する細菌との相互作用を介して応答する可能性を示した。付着細菌はトリプトファンに素早く応答し、IAAを合成し、宿主である海藻は合成されたIAAに対して、応答する可能性が示唆された。今後はIAAの分解および細菌によりIAA以外の成長促進効果も検討することで、スサビノリ養殖の成長促進、安定化に寄与する知見を得ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田竜也, 武智克彰, 高野博嘉, 瀧尾進
2. 発表標題 紅藻スサビノリ糸状体共生細菌のアセトアルデヒド生成
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------