

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05710

研究課題名（和文）菌根性きの子実体由来ヘルパー細菌の宿主特異的作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of host-specific mechanism of helper bacteria isolated from fruiting body of *Rhizopogon roseolus*

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） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ショウロ子実体から分離した細菌のショウロ菌糸生育に及ぼす効果を、2区画寒天培養検定法で調査したところ、本細菌とショウロ菌間の相互作用に有機酸が関与していることが判明した。本細菌はクロマツと共生するきの子菌株系統に対して特異的に生育を促進した。また、本きの子菌株系統特異性に関与する物質は低濃度の水溶性物質であると考えられた。一方、継代培養したショウロ菌糸からも細菌が分離できた。さらには、本細菌はショウロがクロマツに菌根を形成することを促進するヘルパー細菌であること、クロマツ根の生育を促進する効果を有すること、さらには、菌根を介してのストレス耐性の増強に関与していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウロ子実体由来細菌はクロマツと共生するきの子菌株系統に対して特異的に作用し、その作用には植物から分泌されと思われる有機酸が関与していることが示唆された。即ち、植物が生産する有機酸を細菌が認識してショウロ菌糸の生育を促進する特異的物質を生産し、菌根共生する新規性のある仮説を提案することができた。従って、本研究は外生菌根共生に関する基礎的知見の蓄積に寄与する。また、本細菌はショウロの菌根形成を促進するのみならず、クロマツ根の生育促進やストレス耐性の強化にも関与していることも明らかにすることができたため、本研究は細菌を用いたショウロ感染苗木の育成やきの子栽培等の応用研究の発展にも貢献する。

研究成果の概要（英文）：Study on effect of bacteria isolated from fruiting body of *Rhizopogon roseolus* on mycelial growth using two-compartment media revealed a potential role of organic acids as a mediator during the mutual interaction between *Paraburkholderia fungorum* and *R. roseolus*. Comparative study using several strains of ectomycorrhizal mushrooms suggested that *P. fungorum* GIB024 is a strain-specific fungiphile bacterium, with a mycelial growth-promoting ability specifically targeting ectomycorrhizal mushroom strains associated with host *P. thunbergia*. Fractionation experiment suggested that water soluble molecules would be associated with the specificity. Application study of bacteria into the ectomycorrhizal culture revealed that bacteria can be categorized as helper bacteria and would be contributed to promote plant growth and alleviation of stress.

研究分野：きの子生産学

キーワード：外生菌根菌 ショウロ ヘルパー細菌 クロマツ

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、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、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。本細菌を用いることで、ショウロ菌の人工感染の効率化や子実体生産量の増大が可能になると考えた。また、本細菌は、クロマツと共生するきのこの菌糸生育を促進するが、逆に、カラマツと共生するきのこの菌糸生育を抑制する等の宿主特異性を示すことも判明している。このことから、「本細菌は特定のきのこの種に作用する物質を生産して、きのこの菌糸を引き付け、感染して、細胞内に定着持続する細菌である」と考えられた。しかしながら、その特異的作用や感染過程のメカニズムに関する知見が少なく、さらには、ショウロ菌のクロマツ根へ菌根形成や宿主クロマツの生育への影響等の菌根共生系に及ぼす本細菌の役割は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、ショウロ子実体から分離される細菌に着目して、その細菌と多種多様な菌根性きのこの菌株系統との相互作用を調査することで、特異的作用メカニズムを解明することを目的としている。そのために、特異的作用を解明する有効な方法の開発し、その方法を用いて特異性を決定している因子の解明を目指した。さらには、植物の生育や菌根共生系に及ぼす本細菌の添加効果について調査し、本細菌の役割を明らかにすることも目指した。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株および供試細菌

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。

一方、ショウロ子実体から分離した、*Paraburkholderia fungorum* GIB024、*Caballeronia sordidicola* GIB028、*Janthinobacterium agaricidamnosum* GIB029、および、*Paraburkholderia caledonica* KN1 の 4 系統の細菌を用いた。

(2) 改良法を用いた菌糸生育促進効果の検定方法

ショウロ子実体由来細菌 *P. fungorum* GIB024 はショウロ菌糸生育を促進することが知られている。本研究では本促進作用に及ぼす炭素源の影響を調査するために、2 区画寒天培地検定法を開発した。第 1 区画はグルコースを除く 1/5 濃度 MMN 寒天培地とし、ここでショウロ菌糸体を培養した。第 2 区画は様々な炭素源を含む寒天培地でありここで GIB024 細菌を培養した。これらの寒天培地を同一容器内で接合させ、ショウロ菌糸生育に及ぼす GIB024 細菌の効果について調査した。

(3) ショウロの菌糸体からの細菌の分離

ショウロ菌糸体を 1/5 濃度 MMN 寒天培地で培養し、その培養菌糸体を 0.85% NaCl 溶液に入れ、ピペットで懸濁しながら菌糸細胞を破壊した。菌糸破壊懸濁液を遠心分離しその上清液の一部を Luria Bertani (LB) 培地で培養した。その後培養液の濁度を検定して細菌液とした。細菌液を LB 寒天培地に画線して細菌を分離し、分離した細菌を菌糸体由来細菌とした。

(4) ショウロ菌株からの細菌の検出

LIVE/DEAR BacLight Bacterial Viability Kit を用いて、菌糸体内における細菌を検出した。1/5 MMN 寒天培地で培養したショウロ菌糸体に SYTO 液、次いでヨウ化プロピジウムを滴下し、黒下に静置し、PBS で洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察した。

(5) 細菌の同定

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。シークエンシング反応は 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。

(6) 寒天培地におけるクロマツの育成、ショウロ菌糸体と細菌の接種およびその接種効果の評価

表面殺菌したクロマツ種子を無菌的に発芽させた。発芽させたクロマツ実生を 1/5 濃度 MMN 寒天培地の育成系に移植した(図1)。本育成系で育成したクロマツ実生に、ショウロ菌糸体を含む寒天片、または、細菌の懸濁液を接種して育成した。育成 12 週後、菌根形成率、クロマツのバイオマス量および針葉の黄色化率を調査した。

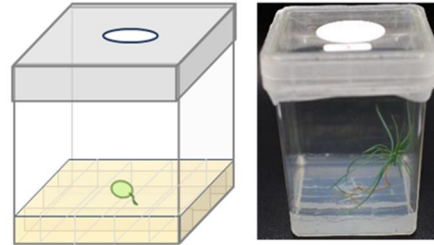


図1 . 1/5 濃度 MMN 寒天培地の育成系

4 . 研究成果

(1) 検定条件の改良と細菌培養ろ液における菌糸生育促進作用物質

子実体から分離した *P. fungorum* GIB024 および *P. caledonica* KN1 細菌が示す菌糸生育促進効果を効率よくかつ安定的に検定するために、検定条件を再度検討した。GIB024 細菌とショウロ菌糸体を同一培地内で培養する二員培養検定における培地成分の影響について調査した。その結果、グルコースを除去した貧栄養条件下では、GIB024 細菌は著しい菌糸生育促進効果を示したが、KN1 は阻害効果を示した。一方、グルコース添加培地では、両細菌が若干の生育促進効果を示した。細菌培養液におけるショウロ菌糸体生育促進効果を検出するための細菌培養条件と菌糸生育促進効果との関連性を調査した。その結果、GIB024 細菌を攪拌培養し殺菌したろ液よりも静置培養し殺菌したろ液の方が、促進効果が高かった。さらには、殺菌細菌ろ液は、低濃度が有効であり、菌糸体培養培地へ添加する細菌ろ液を増加させると、菌糸生育が阻害される傾向が認められた。以上のことから、菌糸生育促進効果は用いる細菌の種類や培地の栄養条件に依存していること、また、菌糸生育促進効果は低濃度の水溶性の物質が関与していることが示唆された。

(2) 菌糸生育促進効果に及ぼす炭素源の影響

GIB024 細菌がショウロ菌糸生育を促進する作用に及ぼす炭素源の影響について、2 区画寒天培地検定法を用いた。本検定方法を用いて調査した結果、ショウロの菌糸生育は GIB024 細菌を有機酸含有培地で培養すると顕著に促進されることが判明した(図2)。GIB024 細菌は有機酸含有培地で旺盛に増殖し、細菌培養培地の pH は上昇した。さらには、殺菌した細菌懸濁液でもショウロ菌糸生育を促進した。以上のことから、GIB024 細菌とショウロ菌糸体間の相互作用に有機酸が重要な役割を担っていると思われる。

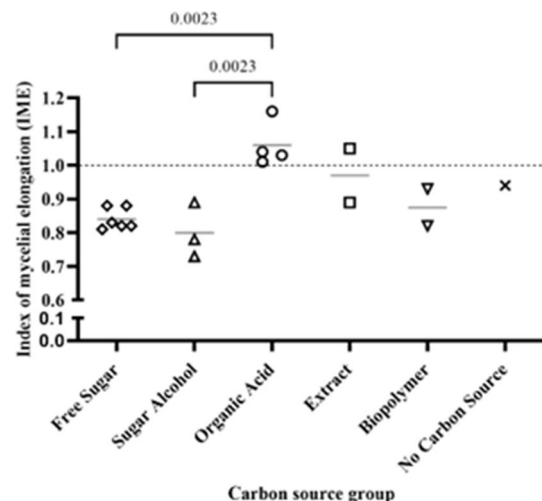


図2 . 細菌による菌糸生育促進効果に及ぼす細菌培養培地の炭素源の影響

Napitupulu et al. (2022)

(3) 菌糸生育促進作用の特異性解析

菌糸生育促進効果の特異性について多様な外生菌根菌を用いて調査した。調査方法としては、きのこ菌糸と GIB024 細菌を同一シャーレ内で離して培養する二員培養検定法と細菌培養ろ液での検定法の両検定法を用いた。その結果、クロマツ林から分離したアミタケ *Suillus bovinus* の菌糸生育を著しく促進したが、アカマツ *Pinus densiflora* 林から分離したアミタケの菌糸生育は促進しなかった。このことは、同一のきのこ種であっても、共生する樹木種が異なる菌株系統を用いると細菌への反応性が異なることを示している。さらに、GIB024 細菌はクロマツ林や他のマツ林から採取したチチア

ワタケ *S. granulatu* や他の *Suillus* 属のきのこ菌糸生育に対して促進効果を示さないか、あるいは反対に阻害的に作用した。また、本現象は、細菌培養ろ液でも同様の現象が認められた。以上のことから、GIB024 細菌はショウロを含め宿主クロマツと共生する特定のきのこ菌株系統に対して特異的に生育促進すると考えられた。また、本きのこ菌株系統特異性に関与する物質は低濃度の水溶性物質であると考えられた。

(4) 継代培養菌糸体における細菌の検出

多種多様な外生菌根菌の子実体を入手できなかったため、継代培養菌糸体から細菌を分離し、同定することを試みた。まずは、ショウロ菌糸体から細菌分離を試みたところ、3 細菌系統 (MBRr6a、MBRr6b および MBRrH9) を分離できた。分離した細菌の分子系統解析をした結果、MBRr6a は *Bacillus tequilensis*、MBRr6b および MBRrH9 は、*B. subtilis* であることが判明した。ショウロ菌糸を SYTO 染色で処理したところ、生細菌を示す緑色のスポットが検出できたが、抗生物質を処理した菌糸ではその緑色のスポットは認められなかった(図3)。本結果は、ショウロのカルチャーコレクションの菌糸体が細菌系統を保有していることを明らかにした初めての報告である。さらに、ショウロ菌糸のみならず多様な外生菌根菌の菌糸体からも細菌系統を分離することに成功した。

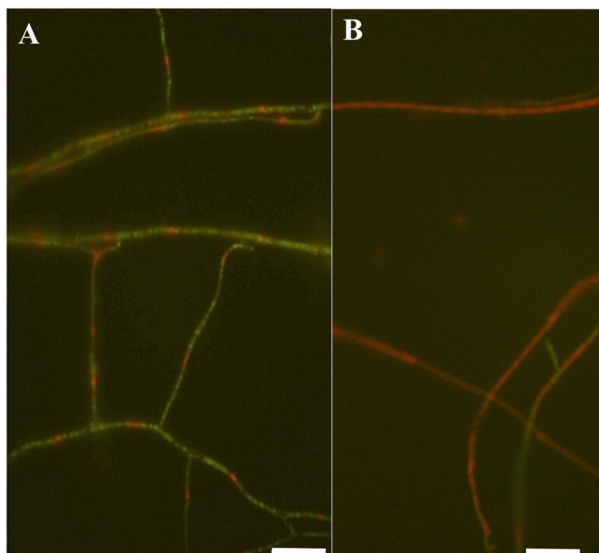


図3 . SYTO 染色したショウロ菌糸体
A:無処理、B:抗生物質処理、スケール: 20 μm
緑色: 活性を有する細菌、赤色: 不活性化した細菌
Hermawan et al. (2023)

(5) クロマツ根におけるショウロ菌根形成、クロマツの生育およびストレス耐性に及ぼす細菌の添加効果

ショウロ菌のクロマツ根における菌根形成やクロマツの生育やストレス耐性に及ぼす子実体由来細菌の添加効果については不明であった。そこで、寒天培地で育成したクロマツにおけるショウロ菌根形成、クロマツのバイオマス量、さらには、マツ葉の黄色化に及ぼす、ショウロ菌接種および子実体由来細菌添加の効果について調査した。その結果、GIB024、GIB028 および GIB029 の3 種の子実体由来細菌は、クロマツにおけるショウロ菌根形成を促進することが判明した。一方、子実体由来細菌をクロマツに添加するとクロマツ根のバイオマス量は増大したが、ショウロ菌と共生しているクロマツではその添加効果は認められなかった。一方、クロマツの黄色化率を調査したところ、ショウロ菌を接種すると黄色化率が抑制され、その抑制効果は、GIB028 または GIB029 を添加することでさらに顕著になった。これらの結果から、子実体由来細菌はショウロの菌根形成を促進するヘルパー細菌であること、クロマツ根の生育を促進する効果を有すること、さらには、菌根を介してのストレス耐性の増強に関与していることが判明した。

<引用文献>

Napitupulu et al. (2022) Potential role of organic acids in the mycelial growth promotion of *Rhizopogon roseole* during interaction with sporocarp bacterium, *Paraburkholderia fungorum* GIB024. *Mushroom Science and Biotechnology*, 30:74-84

Hermawan et al. (2023) Two species of hyphal bacteria isolated from sub-cultured mycelium of ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon roseolus*. *Mushroom Science and Biotechnology*, 31:38-45

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 T.P.Napitupulu, S.Pramoj Na Ayudhya, T.Aimi and N.Shimomura	4. 巻 16
2. 論文標題 Mycelial growth-promoting potential of extracellular metabolites of Paraburkholderia spp. isolated from Rhizopogon roseolus sporocarp	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pure and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 1154 ~ 1166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22207/JPAM.16.2.43	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

1. 著者名 T.P.Napitupulu, T.Aimi and N.Shimomura	4. 巻 30
2. 論文標題 Potential role of organic acids in the mycelial growth promotion of Rhizopogon roseolus during interaction with the sporocarp bacterium, Paraburkholderia fungorum GIB024	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 74-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24465/msb.30.2_74	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

1. 著者名 R.Hermawan, N.Kaeoniwong, T.Aimi and N.Shimomura	4. 巻 31
2. 論文標題 Two species of hyphal bacteria isolated from sub-cultured mycelium of ectomycorrhizal mushroom	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mushroom Science and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 N.Nurdebyandaru, T.P. Napitupulu, T.Ichiyanagi, T.Aimi and N.Shimomura
2. 発表標題 Promoting effect of crude extract of Burkholderiales bacteria on mycelial growth of Suillus bovinus
3. 学会等名 日本きのこ学会 第25回大会
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 R.Hermawan, T.Aimi and N.Shimomura
2 . 発表標題 Two bacteria isolated from mycelium of ectomycorrhizal mushroom, Rhizopogon roseolus
3 . 学会等名 日本きのこ学会 第25回大会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 T.P.Napitupulu, S.Pramoj Na Ayudhya, T.Aimi and N.Shimomura
2 . 発表標題 Growth-promoting potential of the extracellular metabolites of Paraburkholderia spp. isolated from Rhizopogon roseolus sporocarp
3 . 学会等名 The International Society for Mushroom Science e-Congress 2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 T.P.Napitupulu, T.Aimi and N.Shimomura
2 . 発表標題 Paraburkholderia fungorum GIB024 specifically promotes the mycelium growth of ectomycorrhizal mushroom
3 . 学会等名 The 4th International Workshop on Mushroom Biology and Technology 2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M.R. Sidiq, T.Aimi and N.Shimomura
2 . 発表標題 Establishment of bacterial culture conditions for production of bioactive compounds that enhance mycelial growth of Rhizopogon roseolus
3 . 学会等名 The 4th International Workshop on Mushroom Biology and Technology 2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 N.Nurdehyandaru, T.P.Napitupulu, T.Aimi and N.Shimomura
2. 発表標題 Different carbon level influence Rhgizopogon roseolus response during interaction with sporocarp bacterium Paraburkholderia fungorum GIB024
3. 学会等名 The 13th International Symposium of Indonesian Society for Microbiology (ISISM2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------