

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20576

研究課題名（和文）イネいもち病菌の生存に影響する放線菌との相互作用を成立させる分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms establishing the interaction between actinomycetes and rice blast fungi

研究代表者

古山 祐貴（Furuyama, Yuuki）

東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・助教

研究者番号：70906742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では放線菌 *Streptomyces griseus* の生育が、糸状菌であるイネいもち病菌の産生する化合物によって促進されることを明らかにした。また、その化合物は液体培養時には産生されておらず、寒天培地上で培養した際にのみ産生されていることを見出した。さらに、本現象が糸状菌一般的なものではなく、イネいもち病菌特異的なものであることが示唆された。以上の結果は、自然界においてイネいもち病菌と放線菌 *S. griseus* が化合物を介したケミカルコミュニケーションを行っていることを支持するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究において、イネいもち病菌と *Streptomyces griseus* が化合物を介した競合関係にあることが報告されている。本研究では、これらの菌が単純な競合関係にあるだけでなく、イネいもち病菌の存在によって *S. griseus* の生育が促進されるという、一見すると矛盾する複雑な相互作用関係にあることを明らかにした。*S. griseus* はイネいもち病菌の生育を阻害する化合物の産生能を持つことから、本研究での成果を応用することで新たなイネいもち病の防除法開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the growth of the actinomycete, *Streptomyces griseus* is promoted by the compound(s) produced by the filamentous fungus, *Pyricularia oryzae*. This compound was not produced during liquid culture, but only when the fungus was cultured on agar plate. Furthermore, it was suggested that this phenomenon is not general to filamentous fungi but specific to *P. oryzae*. These results support the idea that the *P. oryzae* and *S. griseus* communicate through chemical signals.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

微生物学は、実験条件下では純粋培養を基本とした研究により発展してきた。しかし、自然環境中では微生物は多様な様式により互いに影響を与えあい生きている。自然環境中における微生物の生態とそれを成立させるメカニズムを理解することは現在微生物学では重要な課題の一つであり、そのためには相互作用原理の解明が求められる。近年は情報科学や分析機器の発展に伴い、微生物生態系を包括的に解析しこれまで未踏であった生態系の分子メカニズムへアプローチすることが可能となってきた。一方で、相互作用関係にある菌種やシグナル因子の特定は依然として容易ではなく、相互作用機構には未詳な点も多い。

微生物間相互作用には二次代謝産物(ケミカルシグナル)が生物間の情報伝達物質として利用される。人類は、こうした微生物二次代謝産物を創薬シード等に利用するため、微生物間相互作用を模倣した複数菌種を混合した培養(複合培養)や他菌種由来化合物の処理等により二次代謝産物生産の活性化を達成してきた。これまでの研究の多くは産物の新規性や有用性が話題の中心であり、相互作用の根幹をなす情報伝達物質であるケミカルシグナルの送受信と双方の菌種によるシグナル認識の仕組みに関してはブラックボックス化している。

2. 研究の目的

申請者は植物病原糸状菌のイネいもち病菌が土壌放線菌 *Streptomyces griseus* と細胞外に放出される代謝産物(ケミカルシグナル)を介して生育を促進もしくは抑制しあう「相互作用関係」にあることを見出していたことから、これらの微生物をモデルとして、その間に存在する相互作用機構を分子レベルで解明することを目的とした。特に、イネいもち病菌によって *S. griseus* の生育が促進されるという現象に着目し、解析を行なった。

3. 研究の方法

両菌を同時に植菌した寒天培地、共培養を行なった液体培地、純粋培養した培養上清などから、種々の有機溶媒による抽出、TLC分析、カラムクロマトグラフィーなどにより、放線菌の生育を促進するいもち病菌由来化合物を探索した。また、イネいもち病菌以外の真菌を用いて、放線菌の生育誘導活性が種特異的な現象かどうかの検証を行なった。

4. 研究成果

(1) イネいもち病菌による *S. griseus* の生育誘導条件の検討を行なった。その結果、両菌のコロニーの距離が 5 mm となる時点で *S. griseus* の生育誘導が確認された (Fig1. A)。 *S. griseus* の単独培養では生育は見られなかった (Fig1. B)。一方で、いもち病菌単独培養プレートのコロニーから 5 mm の部分を切り出し *S. griseus* 単独培養プレート上に乗せても生育誘導は確認されなかった (Fig1. C)。このことから、放線菌の生育誘導には、活性分子が局所的に高濃度に分布する必要があると推定された。寒天を切り出した際には、活性分子が拡散し、生育誘導が見られなかったと考えられる。

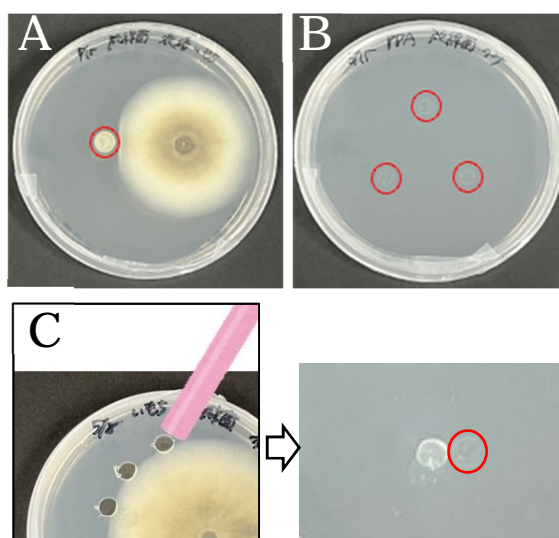


Figure 1 いもち病菌と *S. griseus* の対峙培養
赤丸は *S. griseus* 植菌部位を示す

(2) 本現象が実際に化合物を介したもののなのかどうかという点を検証するために、ストローで物理的にこれらの菌を隔離して対峙培養を行なった (Fig. 2)。その結果、ストローで *S. griseus* を囲うと生育誘導活性が通常時 (Fig. 2 右) よりも弱まることが確認された (Fig. 2 左)。このことから、イネいもち病菌による *S. griseus* の生育誘導には化合物が関与していることが強く示唆された。

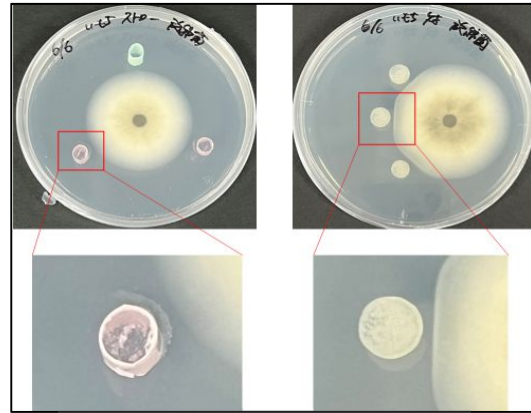


Figure2 ストローによる隔離

(3) 続いて、化合物の大量取得を目的として、いもち病菌の液体培養を行い、培養上清が活性を保持しているのかを検証した。いもち病菌を単独培養した液体培養液をフィルター滅菌したものの原液、10倍濃縮液、100倍濃縮液を *S. griseus* を植菌したプレートに添加した。その結果、興味深いことに、いもち病菌の培養上清は *S. griseus* の生育誘導活性を示さなかった。いもち病菌を単独培養したことが原因として考えられたため、水平型共培養容器 UniWells™ (富士フィルム和光純薬) を用いて液体培養による複合培養を行なった。しかし、混合培養時においても *S. griseus* に対する生育誘導活性は認められなかった。これらのことから、イネいもち病菌は寒天培地上で培養した際にのみ *S. griseus* の生育を誘導する化合物を産生していることが示された。寒天培地上からの活性分子の単離・同定を試みたが、本研究では活性本体の同定までには至らなかった。

(4) 次に、*S. griseus* に対する生育促進作用がイネいもち病菌特異的なものなのかを検証するために、他の糸状菌を用いて対峙培養を実施した。本研究では、トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*) およびハナサナギダケ (*Cordyceps tenuipes*) を用いた。その結果、これらの菌では *S. griseus* との距離が 5 mm より近くなっても生育誘導は認められなかった (Fig. 3)。この結果より、*S. griseus* に対する生育誘導活性は真菌一般的な現象ではなく、イネいもち病菌特異的な現象であることが示された。今後、これらの菌を培養したプレートから化合物を抽出し、比較することで活性本体を同定できることが期待される。

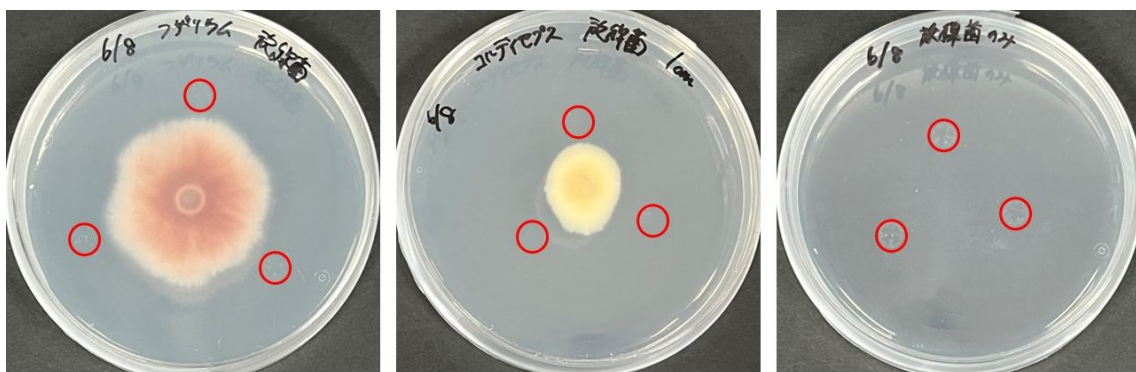


Figure3 他の真菌との対峙培養. (左) トマト萎凋病菌 (中) ハナサナギダケ (右) *S. griseus* のみ. 赤丸は *S. griseus* の植菌部位を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|