

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658058

研究課題名（和文）微生物細胞内共生工学の基盤技術開発

研究課題名（英文）Development of core techniques for microbial endosymbiosis engineering

研究代表者

太田 寛行 (OHTA HIROYUKI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：80168947

研究成果の概要（和文）：本研究は、糸状菌細胞に有用細菌を内生させて有用共生微生物体を作成する新技術の開発を目的とする。まず、内生細菌保有糸状菌から内生細菌を除去して、細菌を受容する宿主糸状菌を調製する方法を開発した。また、土壌糸状菌 *Mortierella elongata* に内生する細菌のゲノム解析に成功し、硫黄代謝系の遺伝子を欠いている特徴を明らかにした。微生物細胞内共生のメカニズムとして、細菌側のこのような硫黄代謝系の欠失が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a new technique for the internalization of a useful bacterium into fungal cells, contributing to microbial endosymbiosis engineering. To provide a bacterium-recipient fungus, a technique of making an endobacterium (EB)-free fungus from an EB-possessing fungus was invented. Further, an EB fraction was successfully recovered from an EB-possessing soil fungus, *Mortierella elongata* and its genome sequence was determined. Biosynthetic pathway prediction revealed the lack of sulfur metabolism pathways, suggesting the strict dependence of this endobacterium on the fungus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：微生物工学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌糸状菌、内生細菌、*Mortierella elongata*、*Burkholderia* 属細菌、内生化技術、ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

2000年代に入って、いくつかの糸状菌の菌糸内に細菌が内生することが分かってきた。最も良く研究されている例は、*Rhizopus microsporus*（内生細菌は *Burkholderia* 属）(Partida-Martinez & Hertweck 2005)とAM菌根菌（内生細菌は *Burkholderiaceae* 科の新属）(Bianciotto *et al.* 2003)である。我々は、一酸化二窒素 (N₂O) を生成する土壌糸状菌の研究を行ってきたが、そのなかの分離株 (*Mortierella elongata* と同定) について顕微鏡観察を行った結果、菌糸内部に細菌様の構造体を確認した (Sato *et al.* 2010)。こ

の糸状菌の菌糸体破碎液中からグラム陰性細菌特有の細胞壁成分であるリポポリサッカライドが検出され、同破碎液から抽出・調製したDNAから原核生物に固有な16SリボソームRNA遺伝子がPCR増幅でき、その系統解析の結果、*Burkholderiaceae*科に属する新属の細菌の存在を明らかにした (Sato *et al.* 2010)。その他の *M. elongata* 分離株について、さらに内生細菌の検出を試みたところ、これまでに、7株で内生細菌の分布を確認した。新たに検出された内生細菌は系統的に *Burkholderiaceae*科に属する菌群であるが、属レベルで多様であり、生理学的な性質も多

様であることが推察された。

2. 研究の目的

本研究は、糸状菌-内生細菌の相互作用を明らかにして、糸状菌細胞に有用内生細菌を感染・安定化させて有用共生微生物体を作成する「微生物共生エンジニアリング」という新しい研究分野の確立を目指すものである。本研究では、以下の項目の解明を目的とした：

- (1) 様々な土壌糸状菌における内生細菌の網羅的な調査。
- (2) 糸状菌内での内生細菌の分布様式と内生細菌の特性の解明。
- (3) 宿主糸状菌への内生細菌の感染（内生）・安定化技術の開発。

3. 研究の方法

「様々な土壌糸状菌における内生細菌の網羅的な調査」では、土壌からの糸状菌分離株と他研究機関からの譲与菌株を用いて、糸状菌に内生する細菌の網羅的な調査を行った。分離源は、北海道、福島県、茨城県、東京都、神奈川県、長野県、沖縄県から採取した土壌を用いた。糸状菌の分離は直接接種法で行い、原核生物 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 増幅によって、内生細菌のスクリーニングを行った。

「糸状菌内での内生細菌の分布様式と内生細菌の特性の解明」では、当研究室が保有する *M. elongata* 株を用いて、その増殖過程を顕微鏡で観察・分析した。電子顕微鏡観察は、一般的な手法に従って、超薄切片を作製して観察した。糸状菌-内生細菌の相互作用を調べるにあたり、糸状菌から内生細菌を除去する方法の開発を行った。さらに、内生細菌を保有する *M. elongata* 株から内生細菌の DNA を調製し、内生細菌のゲノム解析を行った。ゲノムシーケンセスは、Roche 454 パイロシーケンサーを用いた whole-genome shotgun strategy によって行い、ショットガンリードは Phred/Phrap/Consed software でアセンブリーした。このゲノム解析は、東京大学大学院の服部正平教授との共同研究で進めた。

「宿主糸状菌への内生細菌の感染（内生）・安定化技術の開発」では、内生細菌を除去した菌株と内生細菌画分の共培養を行って、内生の条件を探索した。内生の指標として、リポポリサッカライドの成分であるエンドトキシンを測定した。

4. 研究成果

- (1) 様々な土壌糸状菌における内生細菌の網羅的な調査

まず、*Mortierella* 属糸状菌に着目して、各地の土壌から分離した糸状菌株のなかで、*Mortierella* 属菌、15 種 21 株と *Mortierella*

属に近縁な *Modicella* 属 2 種 2 菌株を選んで、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR で内生細菌の保有性を調べた。その結果、4 菌株で内生細菌が検出された。そのなかの 3 菌株は、Sato *et al.* (2010) が分離した *M. elongata* 株の内生細菌と同じクラスターに属する *Betaproteobacteria* であった (図 1、2)。もう 1 菌株は、マダニの細胞内共生細菌と近縁な *Gammaproteobacteria* に属する新規の細菌であった。

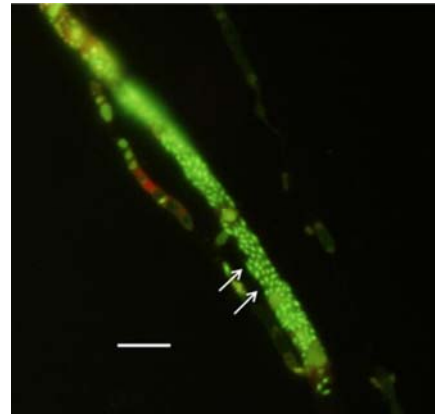


図 1. 福島県の土壌から分離した *Mortierella cf. kuhlmanii* 35:113-1 株の蛍光顕微鏡像。内生細菌は緑色の粒子として検出される。バーの長さは 10 μm を示す。

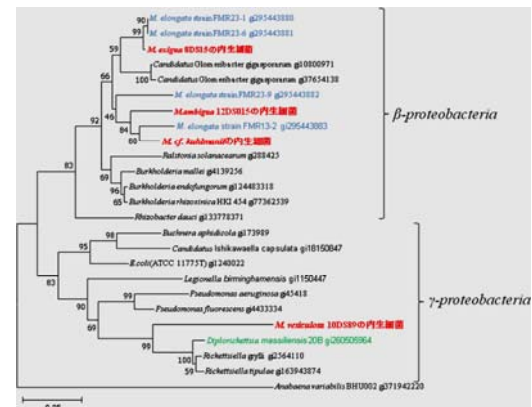


図 2. *Mortierella* 属と *Modicella* 属の糸状菌株に内生する細菌の 16S rRNA 遺伝子の系統樹。

赤字の菌株名、本研究で検出された内生細菌；青字、Sato *et al.* (2010) が発見した内生細菌；緑字、マダニの細胞内共生細菌。

次に、*Mortierella* 属以外の糸状菌も含めて調査するために、北海道標津群標津町の牧草地から、無作為に 116 株の糸状菌を分離して、PCR 法で調べた。その結果、9 株で内生細菌が検出された。その中の 7 株は *Gammaproteobacteria* に属する

Enterobacter 属と *Pseudomonas* 属の細菌であった。2 株は *Betaproteobacteria* に属する細菌であった。以上の結果からすれば、糸状菌に内生する細菌は、*Betaproteobacteria* と *Gammaproteobacteria* に限られると推察される。さらに、すでに知られている植物病原糸状菌である *Rhizopus microsporus* の細菌内生化の例から、別種の植物病原菌、*Pythium aphanidermatum* OPU344 株と *Pythium nunn* OPU640 及び UZ2041 株についても内生細菌の有無を検討した。その結果、3 菌株とも、unclutured bacterium clone に近縁な細菌の存在が示唆された。

(2) 糸状菌内での内生細菌の分布様式と内生細菌の特性の解明

内生細菌を保有する *M. elongata* FMR23-6 株の電子顕微鏡観察では、糸状菌の菌糸内部に内生細菌と糸状菌の菌糸内菌糸（二次菌糸）が観察され、複雑な内部構造になっていることが明らかになった（図3）。

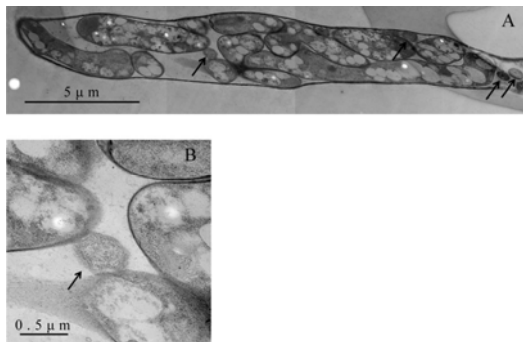


図3. *M. elongata* FMR23-6 株の菌糸断面の透過型電子顕微鏡写真(A)と内生細菌（矢印）の拡大写真（B）。

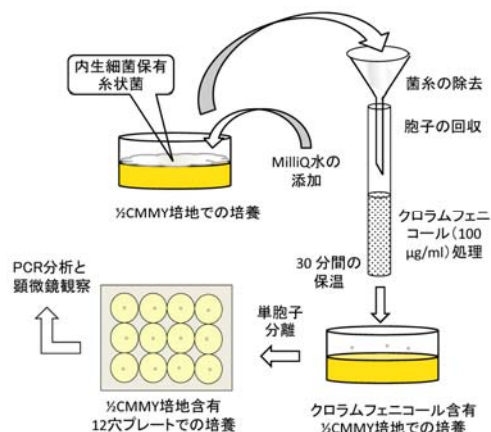


図4. 内生細菌を保有する糸状菌株から内生細菌を除去する方法

糸状菌が細菌を内生することによって、糸状菌にどのような生理・生化学的な影響が表れるかを調べるために、内生細菌保有株から内生細菌を除去する方法を開発した。その概要を図4に示した。また、この方法によって作出した内生細菌除去株の顕微鏡像を内生細菌保有株と比較して図5に示した。次に、内生細菌を保有する *Mortierella elongata* 株の N_2O 生成活性に着目して、亜硝酸イオンが糸状菌に与える毒性を調べた結果、 $NaNO_2$ を添加して数日間嫌氣的に培養することによって、内生細菌を保有する糸状菌でのみ細胞死が起こることを見出した（図6）。この結果から、内生細菌が亜硝酸イオンを還元して、より毒性の強い NO を生成して糸状菌の細胞死を導くという仮説を考えており、その検証を現在進めている。

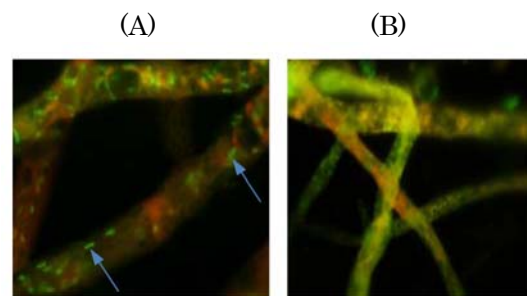


図5. 内生細菌除去処理前(A)と処理後(B)の *M. elongata* FMR23-6 株の蛍光顕微鏡像。矢印は内生細菌を示す。

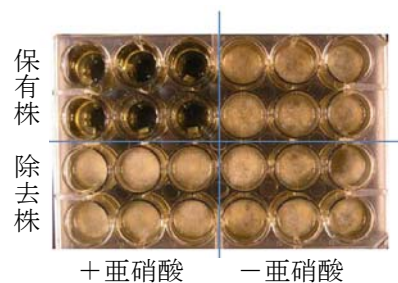


図6. *M. elongata* FMR23-6 株の内生細菌保有株と除去株の亜硝酸イオンへの感受性。糸状菌は、 $30^{\circ}C$ 、7日間、 $10\text{ mM } NaNO_2$ の存在下と非存在下で培養し、その後、好気培養して増殖を判定した。写真は1条件6連（ウェル）での結果を示し、白く見えるのが糸状菌が増殖した菌糸である。

内生細菌の特性を明らかにするために、*M. elongata* FMR23-6I-B1 株から内生細菌画分を調製して、DNA を抽出しゲノム解析を行った。内生細菌画分の調製は、糸状菌菌糸を破碎し、Nycodenz を用いた密度勾配遠心後、糸状菌 DNA を DNase で分解して、内生細菌の DNA を得た。内生細菌のドラフトゲノム

は2,795,381 bpからなり、12のスキファフォールドに分布した。GC含量は49%、推定遺伝子数は2,285であった(図7)。ハウスキーピング遺伝子として *dnaJ*, *gyrA*, *rpoD*(全長約4,900 bp)を用いた MLSA (Multilocus Sequence Analysis)解析では、この内生細菌は、糸状菌から分離培養できる内生細菌である *Burkholderia rhizoxinica* よりは、分離培養できない内生細菌に近い系統関係が示された(図8)。

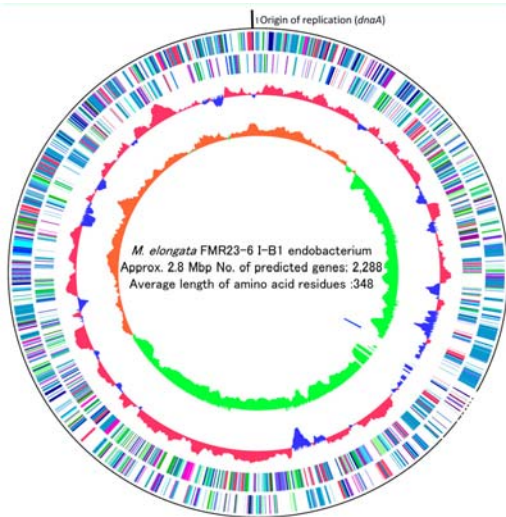


図7. *M. elongata* FMR23-6I-B1株に内生する細菌のゲノム構造の模式図。

ゲノムサイズは2,795,381 bp、遺伝子は12のスキファフォールドに分布した。GC含量は49%、推定遺伝子数は2,285であった。図中に示した色分けはCOGカテゴリーによる遺伝子分類を示す。色区分とカテゴリーの関係は以下の通りである。

J	D	N	C	I
A	Y	Z	G	P
K	V	W	E	Q
L	T	U	F	R
B	M	O	H	S

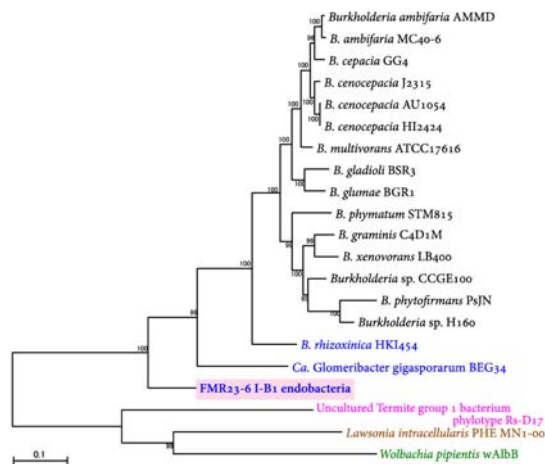


図8. *dnaJ*, *gyrA*, *rpoD*を用いた MLSA 解析による *M. elongata* FMR23-6I-B1株の内生細菌と近縁細菌との間の系統関係

COGカテゴリーを用いた遺伝子カテゴリー解析では、「複製、組換え、修復」カテゴリーと「アミノ酸の輸送と代謝」カテゴリーの遺伝子の割合が高かった。タイプII、III、IV、VIの分泌系遺伝子が最も大きなスキファフォールドに存在した。遺伝子情報から生合成代謝経路を推定すると、システイン合成系、システインと硫酸イオンの輸送系、グルタチオン合成系を欠いていた(図9)。この結果は、内生細菌の宿主糸状菌依存性は、このような硫黄代謝に関わる遺伝子の欠失に起因することが推察された。また、我々の知る限りにおいて、この結果は、糸状菌-内生細菌の共生関係を遺伝子レベルで示した新しい例である。

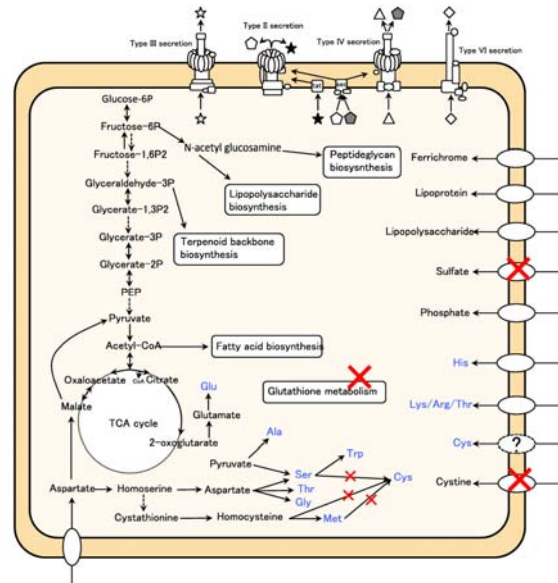


図9. *M. elongata* FMR23-6I-B1株に内生する細菌の主要な代謝の推定模式図。

赤色の×印は欠損していることを示す。

- ☆ Type III effectors
- ★ Type II effectors
- ⬠ Type IV effectors
- ◇ Type VI effectors
- The genes of each reaction enzyme not predicted
- ✗ Genes for synthetic pathways or transporters not predicted
- ⊖ ABC transporter
- ⊖ Unknown transporter??

(3) 宿主糸状菌への内生細菌の感染(内生)・安定化技術の開発

これまでに *Rhizopus microsporus* とその

内生細菌である *Burkholderia rhizoxinica* では、その共生体より細菌を除去した株に内生細菌を再感染することができるとの報告がされている。またゲノム解析よりこの感染能はタイプⅢ分泌系によるものであるが推察されている。本研究でも、タイプⅢ分泌系が *M. elongata* FMR23-6I-B1 株の内生細菌ゲノムに見出された。そこで、内生細菌除去糸状菌株と物理的に分画した内生細菌を共培養によって、再導入化実験を行った。さらに、*M. alpina* UM5 内生細菌および *R. microsporus* 内生細菌 (*B. endofungorum* HKI456) を用いた再導入化実験も行い、異種および異属由来の内生細菌でも再導入化が起こるかどうかを検討した。共培養は、内生細菌分画液を 1.5% NB 寒天培地上に 1 mL 塗抹し、除去株切片をのせ 30°C で 1 日間培養した。その後、伸長した菌糸を培地ごと切りだし、1/2CMMY 培地で培養した。23°C で 1 週間以上培養して行った。再内生化の判定はエンドトキシンの測定によって行った。残念ながら、これまでの実験では、再内生化を導く条件はみつかっていない。原因の一つとして、共培養中での内生細菌画分の生存性の低下が大きいことが推察された。また、今後は、再生細菌の分泌系遺伝子の発現も調べることが必要であろう。内生細菌のゲノム情報から、硫黄代謝系の欠失が示され、その点を考慮すれば、内生細菌の分離培養が確立できると考えられる。

本研究により、① *Mortierella* 属や *Rhizopus* 属以外の土壌糸状菌においても内生細菌を保持する可能性があること、② 調査した範囲では、その内生細菌は *Betaproteobacteria* と *Gammaproteobacteria* にほぼ限られることが明らかになった。また、本研究では、③ 内生細菌の除去方法と分画法を開発し、④ 内生細菌のゲノム情報を解明した。このような研究成果から、新分野である「微生物細胞内生工学」の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- ① 佐藤嘉則、成澤才彦、西澤智康、小松崎将一、太田寛行、『糸状菌細胞に内生する細菌の存在とその検出法』、土と微生物、65 巻、49-54、2011、査読有
(http://ci.nii.ac.jp/els/110009468808.pdf?id=ART0009940862&type=pdf&lang=jp&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1370937918&cp=)

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① 大島翔子、佐藤嘉則、西村 歩、藤村玲子、木川りか、成澤才彦、太田寛行、『糸状菌 *Mortierella elongata* の菌糸内部に生息する細菌の除去及び再導入化に関する研

究』、第28回日本微生物生態学会大会、2012.9.20、豊橋

- ② 藤村玲子、西村 歩、佐藤嘉則、大島翔子、大島健志朗、服部正平、成澤才彦、太田寛行、『糸状菌 *Mortierella elongata* 菌糸内部に生息する細菌のゲノム解析』、第28回日本微生物生態学会大会、2012.9.20、豊橋
- ③ 高島勇介、佐藤嘉則、東條元昭、成澤才彦、『*Pythium aphanidermatum* 及び *P. nunn* に内生する細菌様構造物の検出』、第27回日本微生物生態学会大会、2011.10.8、京都
- ④ Rida Khastini、Yoshinori Sato、Hiroyuki Ohta、Kazuhiko Narisawa、『Change in the community of associated bacteria with *Veronaeopsis simplex* in the response of high temperature stress』、第27回日本微生物生態学会大会、2011.10.8、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 寛行 (OHTA HIROYUKI)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：80168947

(2) 研究分担者

成澤 才彦 (NARISAWA KAZUHIKO)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：90431650

佐藤 嘉則 (SATO YOSHINORI)
独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存修復科学センター・研究員
研究者番号：50466645