

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660273

研究課題名(和文)糸状菌エンドファイト-内生バクテリア間相互作用の解明とその利用

研究課題名(英文)An interaction elucidation and its application of endobacteria present inside the hyphae of endophyte

研究代表者

成澤 才彦(Narisawa, Kazuhiko)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90431650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの分類群を含む菌株を供試して、内生バクテリアの存在を確認したところ、接合菌類からPCR増幅を確認できた。検出されたバクテリアは、*M. elongata*より検出されている内生バクテリアの近縁種であった。*Veronaeopsis simplex* 3菌株を供試して、内生バクテリアの検出および系統解析を行った。DNA抽出を行いPCR増幅を行った。その後、クローンライブラリー解析に供し、内生バクテリアの同定を行った。解析の結果、*V. simplex* 3菌株から共通して*Rhizobium*属細菌が検出され、これらが宿主植物の生育に関わっていることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Microscopic and molecular analyses showed the presence of endobacteria inside the hyphae of randomly selected fungal species. The 16S rRNA gene was successfully amplified with DNA extracted directly from the endobacterium-containing fungal isolates and most of the sequences were related to the family Burkholderiaceae.

Microscopic observation confirmed the presence of rod-shaped, motile bacteria living inside and outside the hyphae of *Veronaeopsis simplex* all isolates. The PCR results using universal primers for 16S rRNA positively detected the presence of bacteria on *V. simplex*. Analysis of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) coupled with the sequence data from 16S rDNA gene cloning revealed that *Rhizobium* sp. was found to be associated with the fungal isolates. In conclusion the findings suggest that *V. simplex* has a complex interaction with associated bacteria involving host plant growth promotion effect.

研究分野：農学

キーワード：共生 菌類内生バクテリア エンドファイト

1. 研究開始当初の背景

土壌からの N₂O 発生に糸状菌 *Mortierella elongata* が関与しており、さらに同菌体内に多数のバクテリアが観察され、相同性検索の結果、新種であることも明らかとなった。そこで、カルチャーコレクションより *M. elongata* の基準菌株を複数入手し、観察したところ、菌体内バクテリアの存在が観察された。さらに、他の糸状菌数種の多くにもバクテリアの存在が示唆された。以上より、糸状菌体内には、普遍的にバクテリアが存在しており、相互依存の関係にあるとの仮説を提唱した。

2. 研究の目的

“糸状菌体内には普遍的にバクテリアが存在し、相互依存の関係にある”との仮説に基づき、選抜したエンドファイトおよび南方地域から新たにエンドファイトを分離、供試して、内生バクテリアを検出し、糸状菌内生バクテリアの普遍性を検証する。特に培養可能な内生バクテリアの獲得を目的とする。次に、バクテリアの特性である嫌気や高温での生育に注目して、有用バクテリアを積極的に内生させる技術を開発する。以上を踏まえて、本研究では、菌類の有する諸形質を内生バクテリアがコントロールすることを実証し、その利用技術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 菌類-バクテリア共生体の網羅的な解析

選抜されたエンドファイト *Heteroconium chaetospora*, *Cadophora finlandica*, *Meliniomyces variabilis*, *Phialocephala fortinii*, *V. simplex* 等および主に南方地域から菌株を分離供試して、蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡による形態観察の他、下記に示す2つの手法を用い、菌類に内生するバクテリアの存在の有無を確認し、内生バクテリアが確認出来た場合は、その同定も

試みる。

(2) 内生バクテリアの有用形質付与の評価

選抜された共生系を供試し、バクテリアが内生することで菌類に付与される形質、例えば内生能の強弱に対する同バクテリアの関与を検証する。

(3) エンドファイトへの有用バクテリアの積極的な内生による新たな有用形質の付与

培養可能なバクテリアが内生しているエンドファイトを選抜し、まずは抗生物質で処理をして内生しているバクテリアを取り除く、次に有用バクテリア(空中窒素固定など)を人工的に内生させる。

4. 研究成果

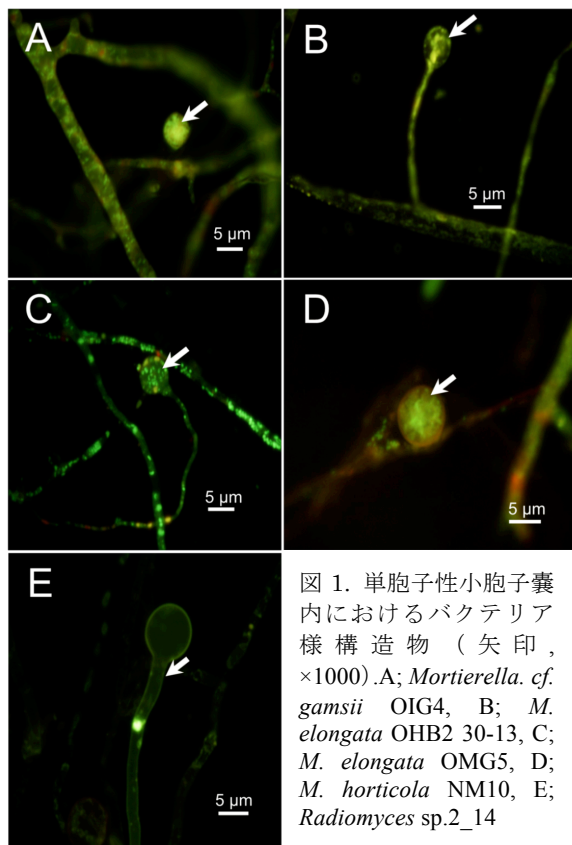
(1) 菌類-バクテリア共生体の網羅的な解析

接合菌類および子囊菌類に対して、同一条件下において、菌類内生バクテリアのスクリーニングを行い、その検出率を比較し、内生バクテリアの存在を明らかにすることを目的とした。

接合菌類 85 菌株 (16 属) および子囊菌類 109 菌株 (45 属) を供試菌株とした。Nutrient Broth 培地において容易に培養可能なバクテリアがないことを確認した供試菌株の菌糸体より DNA を抽出し、バクテリア 16S rRNA 遺伝子を標的としたユニバーサルプライマーである 10F-907R を用いた PCR 法により内生バクテリアの検出を行った。また、LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits を用いて菌糸体内のバクテリアを染色・観察することで内生バクテリアの存在を確認した (図1)。

PCR の結果、接合菌類 10% (9 菌株) からのみ PCR 増幅を確認できた。宿主の構成は *Cunninghamella* 属菌 3 菌株, *Mortierella* 属

菌 5 菌株, そして *Umbelopsis* 属菌 1 菌株であった。そのうち *Mortierella* 属菌 5 菌株中 4 菌株より検出された細菌は, *M. elongata* より検出されている内生細菌 (Sato *et al.*, 2009) の近縁種であった。



蛍光顕微鏡観察の結果, 内生細菌が検出された 9 菌株のうち 5 菌株を任意に選び観察したところ, そのすべてにおいて菌糸内に細菌様構造物が観察できた。

以上より, 少なくとも, 本実験で用いた手法では, 菌類内生細菌は子囊菌類に比べ, 接合菌類において高頻度に検出されることが示された。

(2) 内生細菌の有用形質付与の評価およびエンドファイトへの有用細菌の積極的な内生による新たな有用形質の付与

西南地方から分離された DSE *Veronaepsis simplex* と内生細菌の相互作用を明らかにするために, *V. simplex3* 菌株を供試して,

内生細菌の検出および系統解析を行った。それぞれの菌株を 2 週間培養後, DNA 抽出を行い, 細菌のユニバーサルプライマー 10F-907R を用いて PCR 増幅を行った。その後, クローンライブラリー解析に供し, 内生細菌の同定を行った。さらに蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) により内生細菌の観察を行った。クローンライブラリー解析の結果, *V. simplex3* 菌株から共通して *Rhizobium* 属細菌が検出され, 顕微鏡観察においても菌糸内に細菌様構造物を確認した。また, 検出された *Rhizobium* 属細菌に関して, 16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹を構築した結果, 検出された *Rhizobium* 属細菌は *Piriformospora indica* の内生細菌として報告された *Rhizobium radiobacter* に近縁であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 高島勇介, 太田寛行, 成澤才彦. 糸状菌, 特にエンドファイトの諸形質を内生細菌がコントロールするのか? 土と微生物 69 16-24: 2015. (査読有り)
- ② Fujimura R, Nishimura A, Ohshima S, Sato Y, Nishizawa T, Oshima K, Hattori M, Narisawa K, Ohta H. Draft genome sequence of the betaproteobacterial endosymbiont associated with the fungus *Mortierella elongata* FMR23-6. Genome Announc. 2(6):e01272-14. doi:10.1128/genomeA.01272-14, 2014. (査読有り)
- ③ Diene, O., Sakagami, N. and Narisawa K. The role of dark septate endophytic fungal isolates in the accumulation of cesium by chinese cabbage and tomato plants under contaminated environments. PLoS ONE, 9(10): e109233

DOI:10.1371/journal.pone.0109233, 2014.

(査読有り)

- ④ Rida O. Khastini, T. Ogawara, Y. Sato and Narisawa K. Control of Fusarium wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. Eur J Plant Pathol 139: 333-342, 2014. DOI 10.1007/s10658-014-0389-6, 2014. (査読有り)
- ⑤ Rola S. Mahmoud and Narisawa, K. A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promoting growth of tomato under organic nitrogen conditions. PLoS ONE 8(11): e78746. doi:10.1371/journal.pone.0078746, 2013. (査読有り)
- ⑥ Diene, O., Wang, W. T. and Narisawa, K. *Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov., a Dark Septate Endophytic Fungus from a Cedar Forest in Ibaraki, Japan. Microbes and Environments 28: 381-387 DOI: 10.1264/jsme2.ME13002, 2013. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 松岡 勇人, Rida Khastini, 成澤 才彦 植物根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* とその菌糸圏から分離されたバクテリアの相互作用 環境微生物系学会合同大会 アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡・浜松) 10月24日 2014年高
- ② 高島 勇介, 出川 洋介, 成澤 才彦 接合菌類および子嚢菌類における菌類内生バクテリアの検出率について 環境微生物系学会合同大会 アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡・浜松) 10月24日 2014年
- ③ 中西布実子, 高島勇介, 太田寛行, 成澤才彦 子実体起源 *Pleosporales* sp. および *Mortierella* sp. に内生するバクテリアについて 環境微生物系学会合同大会 アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡・浜松) 10月24日 2014

年

- ④ Erika Usui, Narisawa K. The fungal endophytes *Cladophialophora* sp. and *Phialocephala helvetica* which promote growth of tomato plant under salinity stressed conditions. International Society for Environmental Biogeochemistry, Wuhan (China) October 13-18, 2013
- ⑤ Saki Shingaki, Narisawa K. Selection of Dark-septate endophytic (DSE) fungus associate with the roots of *Spiranthes sinensis*. 31st New Phytologist Symposium Orchid Symbiosis. Rende (Italy) May14-16, 2013
- ⑥ 山本翔也, 小松崎佑樹, 塩津文隆, 成澤才彦 スイートソルガム連作障害の原因解明と *Veronaeopsis simplex* Y34 を利用した同病害抑制について 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 11月23日 2013年
- ⑦ 寺田晴菜, 成澤才彦 根部エンドファイト *Veronaeopsis simplex* Y34 による高温条件下でのトマトの生育促進及び萎凋病の抑制 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 11月23日 2013年
- ⑧ 松岡 勇人, 菊池 聖永, 畑 明李, 成澤才彦 根部エンドファイト *Phialocephala fortinii* を用いたアスパラガス育苗法の有効性 第29回日本微生物生態学会大会 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市) 11月23日 2013年

[図書] (計 1 件)

- ① 太田寛行, 成澤才彦 土・植物・動物のつながりを探る科学 「農学入門」-食料・生命・環境科学の魅力- 養賢堂 81-101, 2013年

[その他]
ホームページ等
[http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse
arch/index.htm](http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/webse
arch/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成澤 才彦 (NARISAWA KAZUHIKO)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：90431650

(2) 研究分担者

太田 寛行 (OHTA HIROYUKI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：80168947

(3) 研究分担者

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