

学位論文題名

微生物資源としての植物内生菌に関する研究

(Studies on endophytes as microbial resources)

学位論文内容の要旨

地球上の微生物は、系統的に多様であることが確かめられながら、その多くが未分離、未同定のままである。本研究では、植物体内に侵入し、病徴を示すことなく、植物の防御作用やライフサイクルに応答しながら植物組織内で生育を繰り返している植物内生菌を、新規微生物探索資源として利用するため、体系的に、分離及び機能探索、そして有望株の同定を行い、得られた植物内生真菌による特異的物質の生産例を示した。さらに植物と内生菌の相互作用を調べ、内生菌の植物に対する役割から微生物資源としての可能性について推察した。

1. 各種植物からの内生菌の分離

より多くの植物から、植物内生菌を分離するため表面殺菌条件及び分離方法を検討し、この方法で、北海道、インドネシア、マレーシアの、土地固有の植物や、絶滅が危惧される植物を含めた、402種の植物を採取し、1133株の内生真菌と678株の内生細菌を分離保存した。どの植物からも、一種類以上の真菌類か細菌が分離されていることから、一般的に植物中には、一時的にせよ、病徴を現すことなく植物内部組織に生活する、内生菌の存在が予想された。

2. 植物内生菌の機能探索

得られた植物内生菌について、その有用性を検討した。内生菌を液体培養し、その培養上清を用いて、有用酵素、抗生物質、生理活性物質生産株のスクリーニングを行った結果、植物組織成分である、キシランやマンナンからキシロオリゴ糖やマンノオリゴ糖を生産する株を数多く得た。これらのうち、キシロビオースやマンノトリオースを主生成物とする酵素については、その諸性質が調べられた。また、真菌、細菌に対して抗菌力をもつ植物内生真菌や、内生細菌が約10%から30%の割合で得られた。TS- α リダクターゼ活性阻害及びマウス毛包細胞増殖活性を調べた結果、真菌10株、細菌10株のうち、真菌3株の培養上清にこれらの活性が見られ、育毛剤として評価されうる活性物質の存在が認められた。この他、グルコースを主生成物とする何種類かのアミラーゼ生産株やマンナン分解酵素生産株、植物に対し感化作用をもつレピジモイド生産株を得、植物内生菌がオリゴ糖生産菌や抗生物質のリード化合物、あるいは様々な生理活性物質の探索源として大いに期待できることが確かめられた。

3. 植物内生菌の分類同定とその多様性

有用と思われる内生真菌の25株について、形態学的観察及び、rDNA塩基配列の解析をし、分類同定を行った。その結果、各内生真菌の分類学的位置は大きく、核菌類、小房子囊菌類、盤菌類、菌蕈類に分かれた。核菌類では、さらに *Diaporthales*, *Xylariales*,

Phyllachorales, *Hypocreales* の各目に分かれ、また小房子囊菌類も、*Pleosporaceae*, *Phaeosphaericeae*, *Leptosphaeriaceae*, *Botryosphaericeae*, anamorphic *Mycosphaerellaceae*, *Coccodiniaceae* の各科のクラスターに分けられた。植物内生真菌は、系統的に非常に多様であることが明らかとなった。また、分子生物学的に系統分類が可能になった現在、この方法が、真菌の分類分野においても、有性世代の形成が不可能であったり、孢子形成能の低い植物内生真菌における分類手段のひとつとして、非常に有効な方法であることが判明した。

4. 植物内生菌による、アレロパシー物質レピジモイド生産と生産株の同定

植物から放出され、他の植物や微生物、昆虫に対して、阻害的あるいは促進的な何らかの作用を及ぼす化学物質をアレロパシー物質という。このアレロパシー物質のひとつ、レピジモイドは、当初、クレス発芽種子の粘質物から抽出されたが微量であり、植物オクラに含まれる多糖を微生物分解することによりこれを大量に得ようとした。この分解酵素生産株を植物内生菌から探索し、AHU9748株を得た。分解生産物を、TLC, HPLCで確認しながら抽出精製後、物理化学的分析を行ったところ、クレス種子から抽出されたレピジモイドの分析値と一致し、この生成オリゴ糖をレピジモイドと同定した。さらに、形態学的及び分子生物学的データに基づき、この生産株を、クロカワキン科 (*phyllachoraceae*) に属し、アナモルフ状態である *Colletotrichum dematium* に近縁ではあるが異なる、*Colletotrichum* 属の真菌であると分類同定した。植物に関連した生理活性物質あるいはそれらを生成する酵素などの探索源として、植物内生菌は大きな可能性を持つことが示された。

5. ハルニレ (*Ulmus davidiana*) の植物内生菌とその相互作用

植物内生菌の生産する特異的酵素や活性物質を明らかにし、有用物質として探索するためには、それぞれの植物と内生菌との間でどのような相互関係が成り立っているのかを理解することが、重要である。研究対象植物として、これまでに知見がなく、樹齢100年を超えることも珍しくない落葉高木広葉樹ハルニレ (*Ulmus davidiana*) の枝を取り上げ、内生菌との間でどのような感染サイクルや相互関係が成立しているのかを見るため、生理状態の異なる枝や、種子におけるハルニレ内生菌のコロニー出現頻度を調べた。分離されたハルニレ内生菌の形態学的及び分子生物学的的手法による分類と同定を行い、高頻度で分離される、*Coniothyrium fuckelii* と *Phomopsis* sp. が優占種であることが明らかとなった。また、各分類群のコロニー出現頻度が植物の生育や季節によってどのように変化するか、また、寒天培地上で各分類群を対峙培養させた時の発育の特徴なども調べた。得られた結果から、ハルニレ枝切片の内生真菌においては、牧草エンドファイトのような種子を介した感染経路は考えにくく、*C. fuckelii* や *Phomopsis* sp. のような粘液を伴って形成される分生子による枝切片上への感染や、枝細胞間隙内での菌糸の伸長が繰り返行われている可能性が大きいと思われた。また、ハルニレに対して植物内生真菌が果たす役割として、ハルニレにとっては不都合な、昆虫や真菌に対する生育抑制作用や、内生菌によるハルニレの不要な枝の排除の可能性が考えられた。

本研究においては、植物から数多くの内生菌を分離し、これらが、酵素、抗生物質、生理活性物質などの生産株として有望であることが明らかになった。さらに、植物内生真菌では、rDNAの解析による系統分類の結果、非常に多様であることが示唆された。また実際、植物内生菌から様々なオリゴ糖や生理活性物質の生産株の取得に成功した。内生菌の感染サイクルや相互作用を個々に明らかにすることにより、内生菌に特有な物質の生産が予測され、新規物質の探索を容易にすると考えられた。種特異性の高い植物内生菌の、感染サイクルを利用したベクターとしての可能性なども考えられ、さらに、様々な植物から、分離条件によって制限することなく、できるだけ広範囲の内生菌を分離し、個々の植物との相互作用を理解することで、産業上重要な新規微生物遺伝資源の探索に貢献するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

微生物資源としての植物内生菌に関する研究

(Studies on endophytes as microbial resources)

地球上の微生物は、系統的に多様であることが確かめられながら、その多くが未分離、未同定のままである。本研究では、植物体内に侵入し、病徴を示すことなく、植物の防御作用やライフサイクルに応答しながら、植物組織内に生育している植物内生菌を、体系的に分離し、機能探索を行った後、有用物質生産株の同定を行った。得られた植物内生真菌には、有用物質生産株が多数存在し、且つ多様な新規菌株と同定できたので、これらが微生物探索資源として重要であることを示した。さらに木本植物と内生菌の相互作用を調べ、植物と植物内生菌の間には特異的な相関作用のあることが示唆された。

1. 各種植物からの内生菌の分離

より多くの植物から、植物内生菌を分離するため表面殺菌条件及び分離方法を検討し、この方法で、北海道、インドネシア、マレーシアの固有の植物や、絶滅危惧植物を含めた402種の植物を採取し、1133株の内生真菌と678株の内生細菌を分離、保存した。どの植物からも、一種類以上の真菌類または細菌が分離されたことから、一般的に植物中には、一時的にせよ、病徴を現すことなく植物内部組織に生活する内生菌の存在が予想された。

2. 植物内生菌の機能探索

得られた植物内生菌について、その有用性を検討した。内生菌を液体培養し、その培養上清を用いて、有用酵素、抗生物質、生理活性物質生産株のスクリーニングを行った結果、植物組織成分であるキシランやマンナンからキシロオリゴ糖やマンノオリゴ糖を生成する株を数多く得た。これらのうち、キシロビオースやマンノトリオースを主生成物とする酵素については、その諸性質が調べられた。また、真菌、細菌に対して抗菌力をもつ植物内生真菌や細菌が約10%から30%の割合で得られた。T5- α リダクターゼ活性阻害及びマウス毛包細胞増殖活性を調べた結果、真菌10株、細菌10株のうち、真菌3株の培養上清にこれらの活性が見られ、育毛剤として評価されうる活性物質の存在が認められた。その他、グルコースを主生成物とする何種類かのアミラーゼ生産株やマンナン分解酵素生産株、植物に対し感化作用をもつレピジモイド生産株を得、植物内生菌がオリゴ糖や抗生物質のリード化合物、あるいは様々な生理活性物質の探索源として大いに期待できることが確かめられた。

3. 植物内生菌の分類同定とその多様性

有用と思われる内生真菌の25株について、形態学的観察及びrDNA塩基配列の解析をし、分類同定を行った。その結果、各内生真菌の分類学的位置は大きく核菌類、小房子囊菌類、盤菌類、菌蕈類に分かれた。核菌類では、さらに *Diaporthales*, *Xylariales*, *Phyllachorales*, *Hypocreales* の各目に深い分岐をつくり、また小房子囊菌類も、*Pleosporaceae*, *Phaeosphaericeae*, など6つの科のクラスターに分けられた。植物内生真菌は、系統的に非常に多様であることが明らかとなった。また、この方法が、真菌の分類分野においても、有性世代の形成が不可能であったり、胞子形成能の低い植物内生真菌における分類手段のひとつとして、非常に有効な方法であることが判明した。

4. 植物内生菌によるアレロパシー物質レピジモイド生産と生産株の同定

アレロパシー物質のひとつ、レピジモイドは、当初、クレス発芽種子の粘質物から抽出されたが微量で、植物オクラに含まれる多糖を微生物分解することにより大量に得ようとした。この分解酵素生産株を植物内生菌から探索し、AHU9748株を得た。分解生産物をTLC, HPLCで確認しながら抽出精製後、物理化学的分析を行ったところ、クレス種子から抽出されたレピジモイドの分析値と一致し、この生成オリゴ糖をレピジモイドと同定した。さらに、形態学的及び分子生物学的データに基づき、この生産株を *Colletotrichum dematium* に近縁ではあるが異なる *Colletotrichum* 属の真菌であると分類同定した。植物に関連した生理活性物質あるいはそれらの生成酵素探索源として、植物内生菌は大きな可能性を持つことが示された。

5. ハルニレ (*Ulmus davidiana*) の植物内生菌とその相互作用

植物内生菌の生産する特異的酵素や活性物質を明らかにし、有用物質として利用するためには、それぞれの植物と内生菌との間でどのような相互関係が成り立っているかを理解することが、重要である。研究対象植物として、これまでに知見がなく、樹齢100年を超えることも珍しくない落葉高木広葉樹ハルニレ (*Ulmus davidiana*) の枝を取り上げ、内生菌との間でどのような感染サイクルや相互関係が成立しているのかを調べるため、生理状態の異なる枝や、種子におけるハルニレ内生菌のコロニー出現頻度を調べた。分離されたハルニレ内生菌の形態学的及び分子生物学的手法による分類と同定を行い、高頻度で分離される、*Coniothyrium fuckelii* と *Phomopsis* sp. が優占種であると思われた。各分類群のコロニー出現頻度が植物の生育や季節によってどのように変化するか、また、寒天培地上で各分類群を対峙培養させた時の発育の特徴なども調べた。得られた結果から、ハルニレ枝切片の内生真菌においては牧草エンドファイトのような種子を介した感染経路は考えにくく、*C. fuckelii* や *Phomopsis* sp. のような粘液を伴って形成される分生子による枝切片上への感染や、枝細胞間隙内での菌糸の伸長が繰り返し行われている可能性が大きいと思われた。また、ハルニレに対して植物内生真菌が果たす役割として、ハルニレにとっては不都合な昆虫や真菌に対する生育抑制作用や、内生菌によるハルニレの不要な枝の排除の可能性が考えられ、木本植物ハルニレと植物内生菌の間の特異的相互作用が示唆された。

以上のように本研究では、植物内生菌が、酵素、抗生物質、生理活性物質などの生産株として有望であること、rDNAの解析による系統分類の結果、非常に多様であることが示された。また実際様々なオリゴ糖や生理活性物質の生産株の取得に成功し、植物内生菌について多くの新知見を得ており、学術的並びに実用的に高く評価される。よって審査員一同は、田中みち子が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。