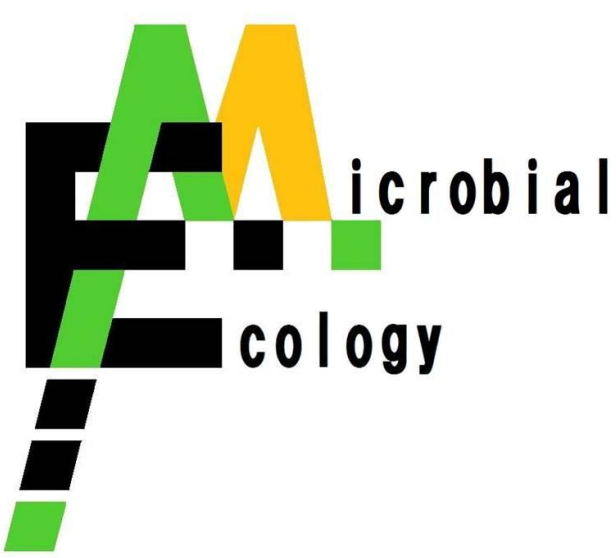
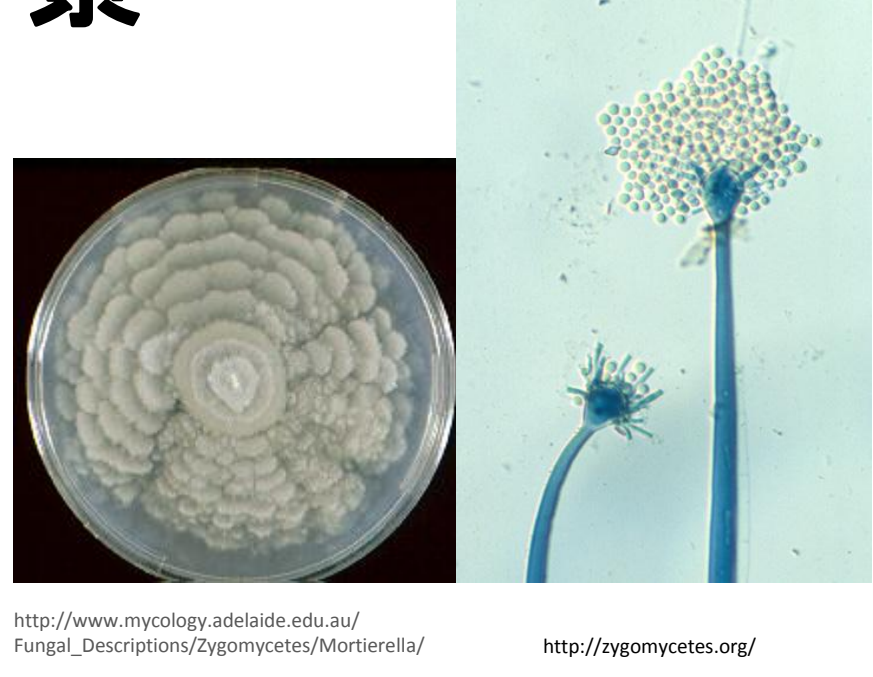


Mortierella属菌の内生細菌について



茨城大学院農学研究科 微生物生態学研究室修士1年
親泊 貴志

背景



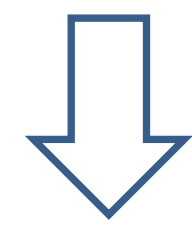
Mortierella属菌

- 一般的な土壌菌
- 世界中に普遍的に存在
- 土壌や糞から分離される

Sato et al., 2010

- Mortierella elongata*において、*Burkholderiaceae* (β-プロテオバクテリア) の内生細菌が存在
- 内生細菌保有菌株と非保有菌株が存在
- 細菌 - 菌類間の相互作用については明らかになっていない

仮説: 菌類と内生細菌の関係は自然界に普遍的に存在する
→ *M. elongata*以外の種にも内生細菌は存在するか?

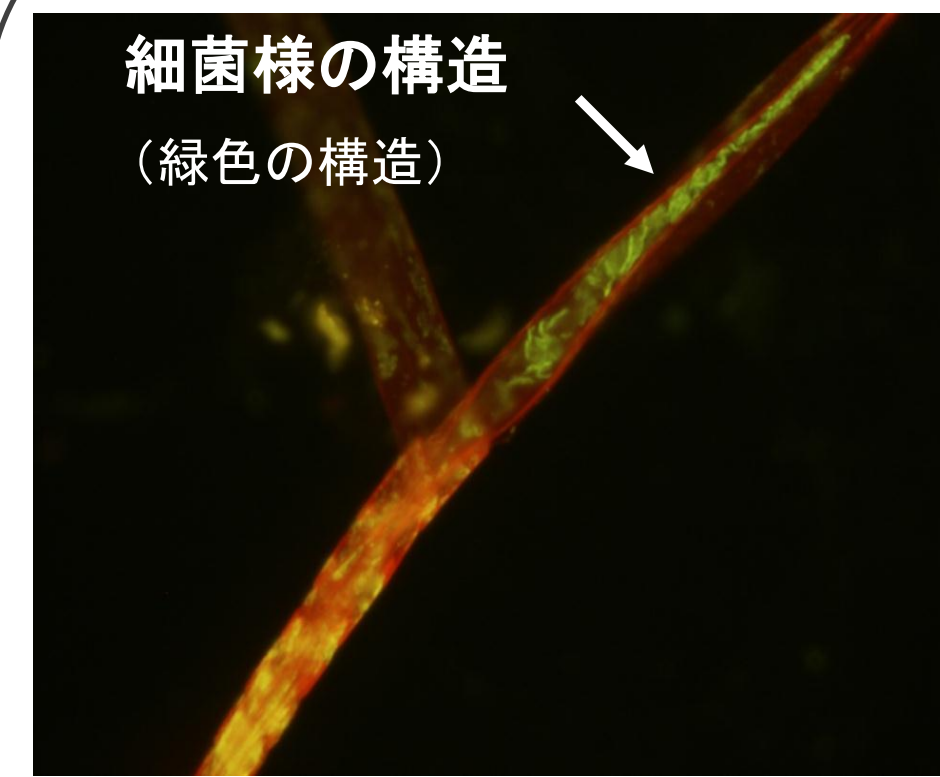


目的 *Mortierella*属及び近縁の*Modicella*属における内生細菌の有無を明らかにする



土壌菌

- 植物と共生
- 植物の病原菌
- 土壌の有機物を分解



糸状菌内生細菌

- 糸状菌の菌糸内にバクテリアが存在
- 内生細菌の代謝機構や、宿主との関係はほとんど明らかになっていないが、植物病原菌*Rhizopus microsporus*において、病原性毒素リゾキシンを内生細菌が産生することが報告されている(Lackner et al., 2009)

内生細菌は宿主菌類の働きの一部をコントロールしている?

材料

表1. 供試菌株

Mortierella vesiculosa (α)
M. vesiculosa (β)
M. bainieri
M. zychae
M. cf. kuhlmanii
M. reticulata
M. clausenii
M. schmuckeri
M. simplex
M. fimbriocystis
M. umbellata
M. exigua
M. humilis
M. elongata
M. minutissima
M. minutissima
Modicella malleola
Modicella reniformis

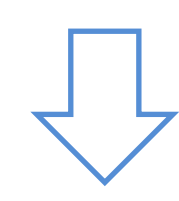
Mortierella属14種17菌株
Modiella属2種2菌株

計16種19菌株を用いた

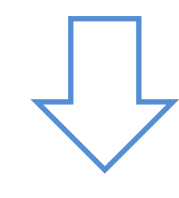
方法

①16S rRNA遺伝子を標的としたPCRによる内生細菌の検出及び塩基配列決定

糸状菌からDNAを抽出



内生細菌の16S rRNAを標的としたPCR
(primer : 10F - 907R, 10F - 1541R, 10F - 1504R)
(Morar et al., 2003)



内生細菌の同定

②蛍光顕微鏡観察

Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probe)を用いて菌糸を染色



SYTO9
生細胞のDNAを緑色に染色
ヨウ化プロピジウム (PI)
死細胞のDNAを赤く染色

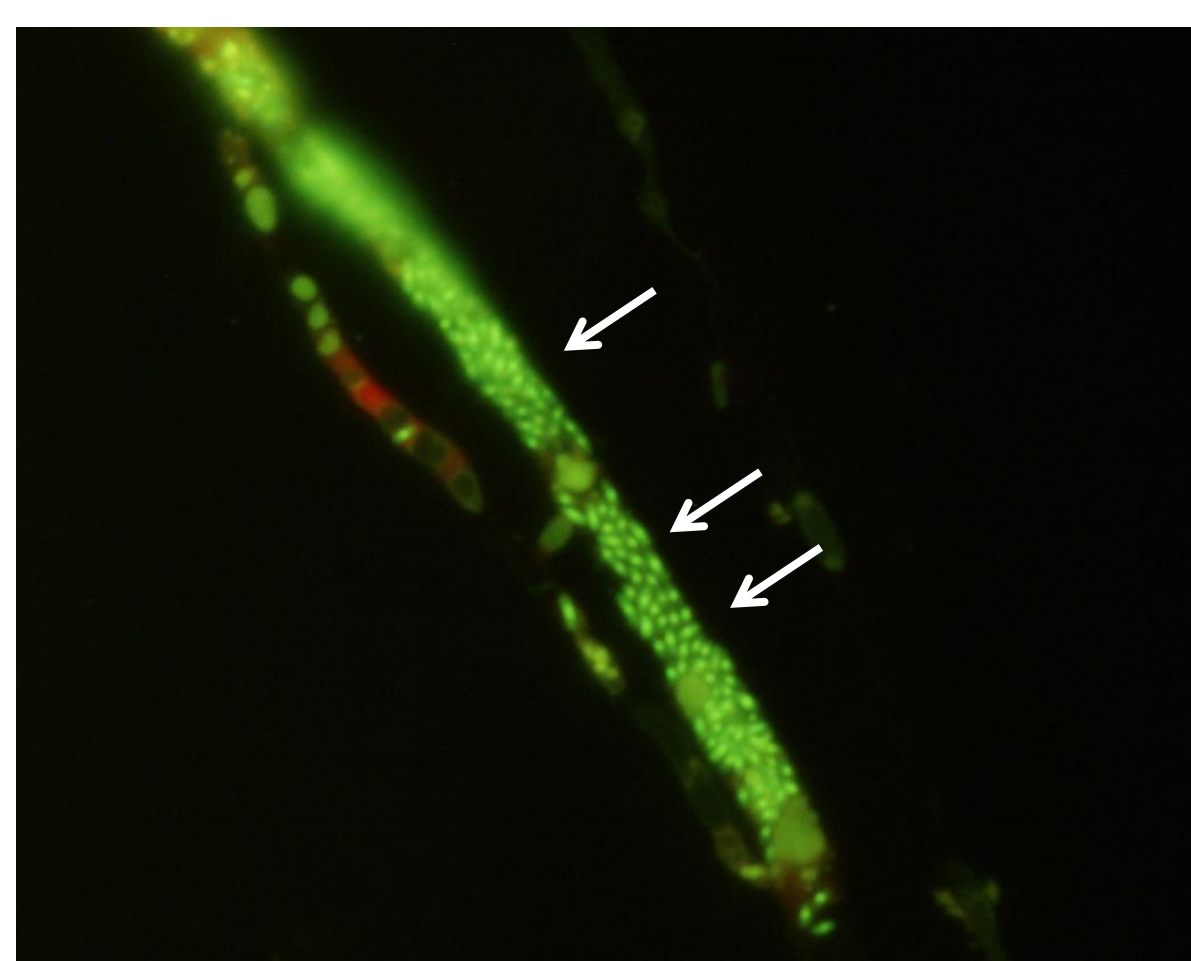
蛍光顕微鏡で菌糸内の内生細菌を観察

結果

- 19菌株中の4菌株でDNAの増幅を確認、そのうち3菌株を同定

表2. 同定結果のまとめ

宿主糸状菌	<i>M. vesiculosa</i> (β)	<i>M. cf. kuhlmanii</i>	<i>M. exigua</i>
内生細菌	<i>Diplorickettsia massiliensis</i> (マダニ <i>Ixodes ricinus</i> の偏性共生細菌)の近縁種	<i>M. elongata</i> FMR13-2の内生細菌の近縁種	<i>M. elongata</i> FMR23-1及びFMR23-6の内生細菌の近縁種
近縁種との相同性	88%	96%	99%
細菌の分類	γ-プロテオバクテリア	β-プロテオバクテリア	β-プロテオバクテリア
増幅できたプライマー	10F - 907R, 10F - 1541R, 10F-1504R	10F - 907R, 10F - 1541R, 10F-1504R	10F - 1541R, 10F-1504R



蛍光顕微鏡観察により、菌糸内に細菌様構造物を確認



同定された細菌は菌に内生している

図1. *M. cf. kuhlmanii*の蛍光顕微鏡写真
矢印は菌糸内の細菌様構造物を示す

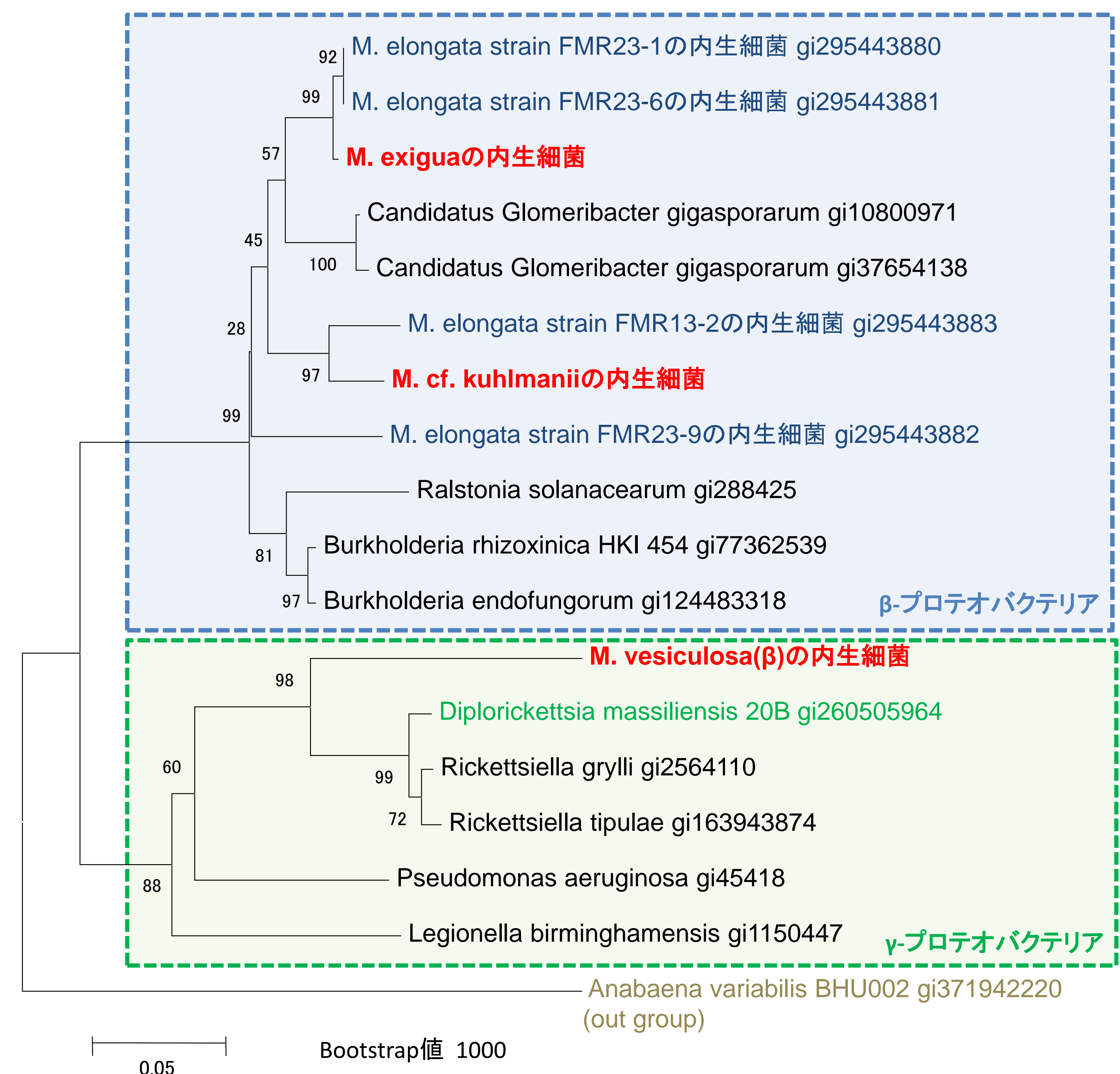


図2. 系統樹 近隣接合法 (MEGA)

考察

- M. elongata*以外の*Mortierella*属も*Burkholderiaceae*の内生細菌を保有することが示された
- これらの*Burkholderia*属細菌はそれぞれ別種である可能性がある
- M. vesiculosa*の内生細菌の同定結果から、*Mortierella*属は*Burkholderia*属を含むβ-プロテオバクテリアだけでなく、γ-プロテオバクテリアに属する内生細菌を保有する可能性が示唆された
- 本研究で用いた手法では検出不可能な内生細菌も存在すると考えられるため、実験手法の更なる検討により、更に多くの菌種から内生細菌が検出されると考えられる