

虫えい内生菌の効率的単離・培養による新規活性物質の探索

慶應義塾大学 理工学部応用化学科

犀川 陽子

1. はじめに

昆虫が植物に卵を産み付け、幼虫が植物の中で育つとき、植物組織が異常発達して瘤状に変化することがある。この瘤状組織は虫えいと言われ、幼虫は虫えいの中で育ち、やがて虫えいと共に葉から脱落したり、成虫となって虫えいから脱出したりする。虫えい中には真菌が生息しており、ここでは虫えい内生菌と呼ぶ。菌食性の昆虫の虫えい内部では、特定の菌を栄養源として育てている例が報告されているが、このような明らかな共生関係ではない場合は、虫えいの侵略者となる病原菌の撃退や植物側の制御による虫えい環境の維持に役立っている可能性もある。いずれにせよ虫えい内生菌は、植物と昆虫どちらも敵対することなく共存する生存戦略を有しているとみなすことができ、この能力を発揮するために生物活性物質を生産していると期待した。

したがって、本研究では虫えいの分類から始め、それぞれの虫えいからの内生菌の分離、培養、活性試験の効率化を図った上で、植物や菌に対する活性を呈する物質の探索をおこなった。

2. 虫えい形成昆虫の分類

本研究では、ブナおよびイヌブナに形成されるタマバエの虫えいを研究対象とした（図 1）。タマバエの形成する虫えいは色形共に多様性に富んでおり、これまでにブナの虫えい 26 種類、イヌブナの虫えい 8 種類が報告されている¹⁾。特に、ブナに形成されるブナハアカゲタマフシは目立つ毬状の赤色えいであり、以前にこのブナハアカゲタマフシの赤色がブナの若芽にも存在するアントシアニン色素であることを報告している²⁾。

虫えいの形態は虫えい形成昆虫の種類によって決まることが知られており、同じホスト植物であっても、昆虫の種類によって虫えいも異なる。ブナやイヌブナに形成されるタマバエの虫えいについてもそのバリエーションはタマバエの種類の違いによるとされているが分類は進んでおらず、そのタマバエのほとんどが未記載種であった。そこでまず、虫えい中の幼虫の分類を行うこととした。

奥多摩および丹沢山系にて虫えいの採取を行い、虫えいの色・形・形成場所の違いを基に分類した。専門家のアドバイスをいただきながら、既知の 23 種類に加えて新種 6 種類を得た。種類ごとに幼虫を取り出して DNA を抽出した。この DNA をテンプレートとして、昆虫の分類に汎用されるミトコンドリア COI (シトクロム酸化酵素サブユニット I) 領域を PCR にて増幅させ、DNA バーコーディング解析をおこなった。得られた配列から分子系統解析を行ったところ、26 種類については、これまでに報告されている虫えい形成タマバエ *Hartigiola* や *Mikiola* と共に *Dasineurini* 族内に単系統を形成した。これは、タマバエがブナからイヌブ

ナへのホストシフトや産卵箇所を変えながら種分化を繰り返し、現在の多様性を獲得したことを示す結果である。また、解析した種については多くの場合、単系統から派生した近縁種でありながらも、異なる形態の虫えい中の幼虫は系統樹の中でも異なるクレードに属しており、遺伝子的にわずかに異なる幼虫によって、虫えいの形態が決まることが明らかになった（論文投稿中）。

この結果を踏まえ、虫えい内生菌の分類の際には虫えいをその色形で分類して記録し、虫えいの種類ごとに虫えい内生菌の分布に違いが出るのかを判断することとした。



図1. ブナの葉に形成されたタマバエの虫えい

左：ブナハアカゲタマフシ； 右：ブナハタマフシ； 枠内：ブナハタマフシ内の幼虫

3. 虫えい内生菌の分離と培養

次に得られた虫えいから内生菌の分離をおこなった。2で分類した虫えいごとに、虫えいの表面を消毒したのち、クリーンベンチ内で虫えいを切断し、断面を寒天培地に押し当てて虫えいの内部の菌が培地上で成長するものを選別した。17種類の虫えいから、計549コロニーを分離し、それぞれ新たな寒天培地で培養したのち数本ずつのグリセロールストックを作成して凍結保存したが、単離に至らず別の菌が混在したもの、凍結保存したものを解凍しても成長しない菌もあった。単離した内生菌は、順次gDNAを抽出し、ITS領域のDNAバーコーディングによって同定をおこなった。シーケンスにて明らかになった配列を基に属レベルで同定できた菌は82株であった。本研究ではここから菌の種類のバリエーションを考慮しながら順次内生菌の培養を行い、活性試験に用いる抽出物を調製した。2、3で行った手順を図2にまとめる。幼虫や内生菌の分離は研究者の手腕に頼る技術的に難しい行程であるが、DNA抽出や内生菌の保存、培養は適宜キットや安定性の高い培地を用いて効率化を図り、内生菌ライブラリーを拡充することができた。

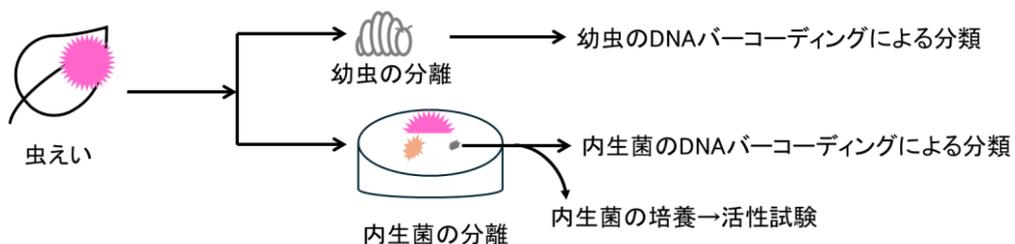


図2. 虫えいからの幼虫および内生菌の分離・分類の流れ

4. 虫えい内生菌由来植物成長制御物質の探索

上述の方法で単離・同定した虫えい内生菌は、植物内生菌として報告のある菌がほとんどであった。中には植物病原菌として報告のある属/種の菌もあるが、虫えい自体には病原菌に感染した病状は見られず、植物と共存していると考えられた。そこで、虫えい内生菌を培養した抽出物から、植物成長に影響を及ぼす成分を探索することにした。虫えい内生菌は虫えい中の植物組織をメンテナンスするために成長を早めたり遅らせたりする物質を生産していると期待した。

植物に対して作用する物質は、内生菌が外部に向けて分泌していると考え、内生菌を培養した培養液を酢酸エチルで抽出したものを試験することにした。活性試験はシロイヌナズナを寒天培地で栽培し、その培地に抽出物を添加して植物成長への影響を調べた。スクリーニングの結果、シロイヌナズナの胚軸が対照区と比較して有意に成長しているもの、成長が阻害されているものが見いだされた。なお、胚軸長は試験期間終了後にシロイヌナズナを培地から引き抜いて試験区ごとに並べ、画像として読み込んだものを Image J にて解析した。

有意な成長促進を誘導した抽出物は複数あったが、そのほとんどは *Epicoccum* 属であった。*Epicoccum* 属は植物病原菌、植物内生菌として知られており、その二次代謝産物から様々な抗菌物質が構造決定されている。しかし、シロイヌナズナの胚軸成長促進活性は本研究で初めて見出したものであったため、内生菌を大量培養し、活性を指標に成長促進物質の分離を試みた。結果的にこの活性物質の単離には至らなかったが、極めて微量で活性を示す物質であることがわかった。一方、活性は複数種類見られたにもかかわらず、培養を繰り返したためか活性が減弱する傾向がみられた。活性を保持したまま大量培養を行うためには、虫えい内環境に近い条件で保存、培養することや、活性物質の生産に必要な栄養素の人工的な供給などを検討する必要がある。実際、この検討の中で、培養液に添加する糖の種類で活性物質の生産能が大きく異なることを見出した。植物成長促進物質は農業的に有用であるため、今回見出した虫えい内生菌株の活性物質生産能の維持を図る検討が引き続き必要である。

一方、シロイヌナズナの成長抑制活性を示した抽出物も複数得られ、虫えい内生菌の種類も様々であった。いずれも粗抽出物の試験の段階では胚軸が短いこと以外に形態的な変化はみられなかった。抽出物の中で活性の再現性が良く活性も高いアカゲタマフシ内生菌 NAC90 株および NAC10 株の抽出物について、活性物質を探索することにした。NAC90 は DNA バーコーディングにより *Alternaria alternata* と同定された。この菌は葉上生息菌であり、植物病原菌とも報告されている。NAC90 の粗抽出物をカラムクロマトグラフィーで分離し、画分ごとに活性試験をおこなったところ、複数の画分に活性が認められたが、そのうちの 1 つの画分はほぼ 1 成分であったので、構造解析をおこなった。NMR スペクトル解析によって推定された化学構造から文献調査をおこなったところ、活性画分の主成分は同じ種の菌から単離報告のあるアルタナリオール (図 3) と同定できた³⁾。アルタナリオールは抗真菌活性と共に植物毒としても知られており、微量でも根の成長を阻害する。そこで、アルタナリオールを主成分とする活性画分を添加した培地にて成長したシロイヌナズナを対照区と比較したところ、根の長さや形状に違いは見られず、胚軸長のみ大きな違いが認められた (図 4)。

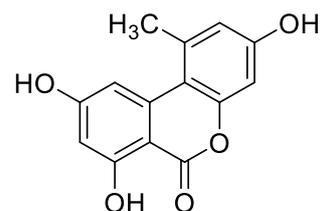


図 3. アルタナリオールの構造

文献情報との相違は、被験植物の違いや投与方法によっても考えられるが、NAC90 抽出物の分離画分には他にも活性が認められており、今後それらの画分から活性を指標に精製することで、アルタナリオール類縁体を始めとした別の新規活性物質が得られると期待できる。

また、同様にして、胚軸成長阻害を示した NAC10 抽出物についても分離精製をおこなったところ、NAC10 抽出物の主成分としてイソスクレロンという植物成長抑制物質が同定された。NAC10 株は DNA の ITS 領域の比較では属を定めることができなかったが、相同性の高い菌にイソスクレロン生産菌があることから、二次代謝産物の生合成についても近い経路をもつ菌であると考えられる。ただし、NAC90 と同様に NAC10 抽出物にも様々な成分が存在しており、イソスクレロンは文献で成長抑制が報告されている濃度ほどは抽出物に含まれていなかったことから、イソスクレロンとは別の強力な胚軸成長阻害活性物質が抽出物の活性本体であるとして、探索を続けている。

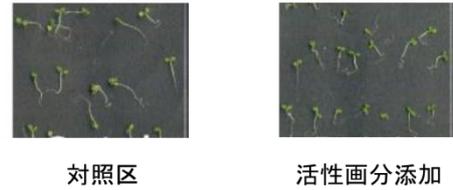


図4. NAC90 株由来活性画分を添加したシロイヌナズナの成長抑制

4. 虫えい内生菌由来抗菌物質の探索

虫えい内生菌が虫えい環境を維持していると仮定すると、虫えいに侵入する病原菌を撃退している可能性が挙げられる。実際、虫えい内生菌の中には抗菌活性が報告されている種も多く、上述のアルタナリオールも抗真菌活性を有している。そこで、虫えい採取時に虫えいの周囲の菌（ここでは外生菌と呼ぶ）も捕捉し、外生菌に対して抗菌活性を示す虫えい内生菌をスクリーニングすることにした。寒天培地の中央に外生菌を植菌し、その周囲に虫えい内生菌を植菌して培養し、内生菌の菌糸や分泌物拡散の接触部分で外生菌の成長阻害がみられるものを選別した（図5）。



図5. 外生菌（中央）と虫えい内生菌（左右）の対峙培養

次に抗菌活性を示した虫えい内生菌を培養し、培養液の抽出物が外生菌の成長を阻害するかを試験した。一般的な抗菌試験に従い、ウェルの中に被験菌を入れて虫えい内生菌抽出物を添加したところ、高濃度で活性がみられた抽出物もあったものの、被験菌の成長がウェルによるばらつきが大きいため、活性の有無を判断できないことが多々あった。そこで、外生菌を植菌した寒天培地に、外生菌と距離を置いて小さなペーパーディスクを配置し、抽出物の DMSO 溶液を染み込ませて外生菌の影響を調べる方法に変更した。この方法では先の方法よりも抽出物の使用量を減らすことができたが、明らかな活性を示して阻止円のできる抽出物と被験菌の組み合わせは非常に少なくなった。この方法では、ブナハタマフシ由来の虫えい内生菌 24ABT4-3 株の抽出物と *Botrytis* 属の外生菌の組み合わせでは再現性よく抗菌活性が認められた。24ABT4-3 抽出物から活性を指標に分離をおこなった結果、複数の活性画分を得た。DNA バーコーディング解析により 24ABT4-3 は *Fusarium* 属の菌であることが判明した。*Fusarium* 属の菌が生産するペプチドが *Botrytis* 属の菌に対して抗菌活性を示すという報告があり⁴⁾、今回得られた活性画分にも、このペプチドが含まれていると示唆する結果を得ている。

5. まとめ

本研究では、植物組織内で虫えい形成昆虫と共存するという特殊な環境で生存する虫えい内生菌の生存戦略に注目し、虫えいの分類、虫えい内生菌の分類から始め、虫えい内生菌が生産する植物成長制御物質および抗菌物質の探索をおこなった。新規活性物質の発見には至らなかったが、強力な活性物質が潜む活性画分を複数得ており、今後さらなる探索法、培養法の効率化を図りながら、新規活性物質の発見とその安定生産に挑む。

謝辞

本研究は宮崎翔博士（現東京電機大）および森信之介博士（現慶應義塾大学）との共同研究として行いました。また、虫えいおよび虫えい形成昆虫の分類に当たりご助言いただきました徳田誠博士（佐賀大学）、佐藤信輔博士（茨城県農業総合センター）に感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Sato, S.; Tsuda, K.; Yukawa, J. *Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology* **2010**, *21*, 7–13.
- 2) Miyazaki, S.; Kurisu, H.; Nakata, M.; Saikawa, Y. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2020**, *84*, 797–799.
- 3) Raistrick, H.; Stickings, C. E.; Thomas, R. *The Biochemical Journal* **1953**, *55*, 421–433.
- 4) Pohanka, A.; Capieau, K.; Broberg, A.; Stenlid, J.; Stenström, E.; Kenne, L. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 851–857.