

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02548

研究課題名(和文) 菌根共生におけるキトオリゴ糖シグナリングの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular basis of chitooligosaccharide signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis

研究代表者

秋山 康紀 (Akiyama, Kohki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20285307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：アーバスキュラー菌根菌はMycファクターと呼ばれる共生シグナルにより植物の共生応答を誘導して感染・共生する。本研究では、これまでに同定されていたMyc-LCOとキチンオリゴ糖に加え、新規Mycファクターとして部分N-脱アセチルキチン3糖を生物有機化学的アプローチにより同定した。本オリゴ糖は従来のMycファクターオリゴ糖とは異なり、植物の共通共生経路(common SYM pathway)非依存的に共生応答を活性化することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は共生菌や病原菌に由来する様々なキチン質オリゴ糖を識別して適切な共生・防御応答を示すと考えられている。生理活性オリゴ糖では鎖長が重要な構造的要素であり、一般に4糖以上のものが強い活性を示す。本研究で同定した短鎖のヘテロキトオリゴ糖やキトサンオリゴ糖は3糖が最も強い活性を示す。このような短鎖長のオリゴ糖の共生における関与は全く新規の発見であり、植物微生物相互作用研究において新たな展開をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：AM fungi had long been postulated to produce signal molecules called “Myc factors” that induce the molecular and cellular responses leading to successful root colonization by AM fungi. Lipochitooligosaccharides called Myc-LCOs and small chitin oligomers have been identified as Myc factors from the germinated spore exudates of the AM fungus *Rhizophagus irregularis* (Maillet et al., 2011, Genre et al., 2012). However, it was found that Myc-LCOs and chitin oligomers elicit only partial and limited induction of symbiotic responses in AM host plants. We previously showed that partially N-deacetylated chitin (DAC) trimers were strong inducers of AM symbiosis-related gene expression in rice roots and were secreted from *R. irregularis*. There are six possible isomers for DAC trimers. In this study, we identified a DAC trimer isomer, secreted by the AM fungus, acting as an inducer of AM-symbiotic responses in rice.

研究分野：天然物化学・生物有機化学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 Mycファクター キトオリゴ糖 ストリゴラクトン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AM 菌と植物との共生は約 4 億年前のオルドビス紀に起源を持ち、今日では 80% 以上もの陸上植物に見られるため「地球上で最も普遍的な共生系」と呼ばれている。AM 菌は植物に必須元素であるリン酸を供給するだけでなく、耐病性や乾燥耐性を付与することにより、農業や自然生態系における植物の生育に極めて重要な役割を果たしている。また、近年、リン鉱石の枯渇によるリン肥料の生産供給が危惧されていることから、AM 菌の微生物肥料としての利用が期待されている。しかし、AM 菌は絶対共生菌であるため、増殖には植物との共生が必須であり、菌単独での生育は極めて遅く、形質転換もできない。このため、共生の分子機構、特に AM 菌由来の共生因子については未解明な部分が多い。

AM 共生において、宿主植物と AM 菌はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する(図 1)。植物の根から分泌されるストリゴラクトン (strigolactone, SL) は AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導することからブランチングファクターと呼ばれている。一方で AM 菌が生産する共生シグナルは Myc ファクターと呼ばれ、現在までに Myc-LCO と呼ばれるリポキトオリゴ糖とキチンオリゴ糖が報告されている。しかしながら、これら二つのシグナルによる共生応答は部分的かつ限定的であり、真の共生シグナルが別に存在することが示唆されている。

平成 25 ~ 27 年度の基盤研究(B)において、AM 菌の主なキチン質である細胞壁キチンについて糖鎖構造を詳細に調べたところ、AM 菌のキチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) だけではなく、アセチル基が脱離したグルコサミン (GlcN) を含むヘテロ多糖であることが明らかになった。このような多糖から遊離しうるオリゴ糖として部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖および 4 糖そしてキトサンオリゴ糖を化学的に調製し、イネの根における共生遺伝子発現を調べたところ、極めて顕著な誘導が見られた。また、この共生遺伝子誘導はイネのキチン受容体である CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) には依存せず、新たなキトオリゴ糖受容体を介したシグナル伝達系によるものであることが分かった。このようなヘテロキトオリゴ糖による菌根共生遺伝子の発現誘導はこれまでに報告例のない新規の発見であった。以上より、植物は AM 菌由来の複数のキトオリゴ糖のうち、特定の組み合わせを共生シグナル (= Myc factors) として受容することにより AM 菌を共生菌として認識し特異的な共生応答を示すことが示唆された。

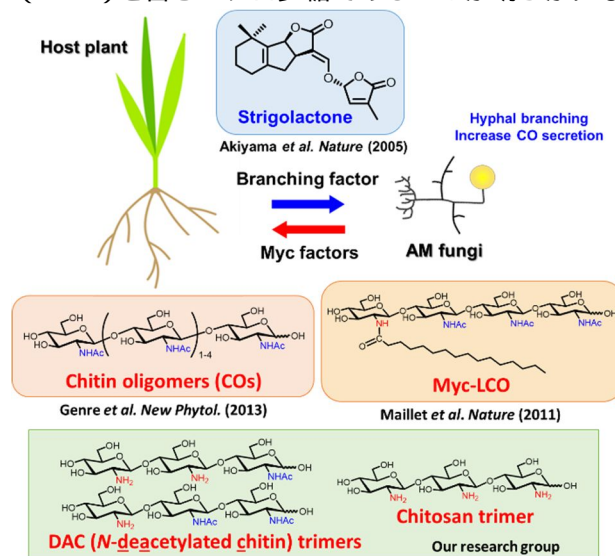


図 1. AM 共生における植物および AM 菌由来のシグナル物質

2. 研究の目的

本研究では、AM 菌が生産する Myc ファクター活性ヘテロキトオリゴ糖を同定し、それらオリゴ糖の生成機構および受容体タンパクの同定を含むシグナル経路の解析により AM 共生におけるキトオリゴ糖シグナリングの分子基盤を解明することを目指した。ヘテロキトオリゴ糖は重合度、アセチル化度、GlcNAc と GlcN の配列により様々な構造を持つ。イネに対して Myc ファクター活性を示す部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖には糖鎖配列・糖残基組成の異なる 6 種類の配列異性体が存在し、どの配列をもつオリゴ糖が共生シグナルとして機能しているかは明らかになっていない。よって、化学合成および酵素合成により調製した標品を用いた高感度 LC-MS/MS により AM 菌の菌分泌物に含まれるヘテロキトオリゴ糖を分析し、それらの共生遺伝子発現誘導活性を評価することにより Myc ファクター活性ヘテロキトオリゴ糖を同定することとした。さらに、イネの共生受容・伝達遺伝子の欠損変異体である *Oscerk1* および *Osccamk* を用いて、ヘテロキトオリゴ糖が活性化する共生経路について解析を行うと共に、ヘテロキトオリゴ糖受容体タンパク質の同定に向けた光アフィニティープロープの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖の合成

グルコサミン塩酸塩から 2 位のアミノ基が DMM (dimethylmaleoyl) 基あるいはフタロイル基で保護された糖受容体と糖供与体をそれぞれ合成した。その後、グリコシル化反応、脱保護反応を経て、GlcN-GlcN-GlcNAc、GlcNAc-GlcN-GlcNAc を合成した。また、根粒菌由来キチンデアセチラーゼである NodB によりキチン 3 糖の非還元末端の GlcNAc 残基を脱アセチル化することで GlcN-GlcNAc-GlcNAc を得た。NodB 酵素は無細胞タンパク質合成システムにより

C 末端 His タグ融合タンパクとして合成した。

(2) AM 菌が分泌する部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖の糖鎖配列の決定

AM 菌 *Rhizophagus irregularis* を合成ストリゴラクトンである GR24 を添加した滅菌水あるいは改変 M 培地中、32°C で 7 日間静置培養した後、菌体を濾別し菌分泌物を得た。これを重水素無水酢酸 ((CD₃CO)₂O) を用いて *N*-重アセチル化した後、活性炭カラムクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーで精製した。合成した 3 種類の部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖についてもそれぞれ *N*-重アセチル化し、これらを標品として菌分泌物の LC-MS/MS 分析を行った。

(3) 部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖のイネ共生遺伝子発現誘導活性

合成した 3 種類の部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖およびキトサン 3 糖をそれぞれイネの発芽 3 日後の実生に処理し、6 時間後の根における AM 共生マーカー遺伝子 (*AM1*、*AM2*、*AM3*、*RAM1*) および防御応答関連遺伝子 (*PAL*、*KSL4*) の発現量を qRT-PCR により測定した。

(4) ヘテロキトオリゴ糖光アフィニティープローブの合成

光反応性基には最近開発された疎水性が低く、コンパクトな 2-チエニル置換型 β -ケトアミド構造を採用することにした。2-methylthiophene を出発物質として、5 ステップの反応により光反応性基ユニットを合成した。この光反応性基ユニットを保護キトサン 3 糖糖供与体に導入した。

4. 研究成果

(1) AM 菌が分泌する部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖の同定

化学合成および酵素合成により還元末端に GlcNAc 残基を持つ 3 種の部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖を調製した。これらの *N*-重アセチル化誘導体を標品として AM 菌分泌物の LC-MS/MS 分析を行った結果、キチン 1-4 糖および部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖、キトサン 3 糖が同定された。部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖の糖鎖配列については、6 種類の配列異性体と推定されるピークが検出され、GlcN-GlcN-GlcNAc の配列については合成標品とピークの保持時間およびマススペクトルが一致した。このことから、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖のうち GlcN-GlcN-GlcNAc については菌から実際に分泌されていることが明らかになった。また、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖が分泌されている際は、共生シグナルとしてこれまでに報告されているキチン 4 糖も同時に分泌されていることが分かった。

(2) 部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖のイネ共生遺伝子発現誘導活性

イネ実生の根に対する共生遺伝子発現誘導活性について qRT-PCR 解析を行ったところ、GlcN-GlcN-GlcNAc、GlcNAc-GlcN-GlcNAc、キトサン 3 糖により共生マーカー遺伝子 (*AM1*、*AM3*) および防御応答関連遺伝子の発現誘導が見られた。一方、GlcN-GlcNAc-GlcNAc ではマーカー遺伝子の発現はほとんど誘導されなかった。これらのことから特定の糖鎖配列を持つ部分 *N*-脱アセチルキチンオリゴ糖が菌根共生遺伝子を誘導する共生シグナルとして働くことが示された。

続いて、イネの *OsCERK1* 欠損変異体、*OsCCaMK* 欠損変異体に部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖混合物を処理し、マーカー遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、野生型と同様に共生マーカー遺伝子 (*AM1*、*AM3*) および防御応答関連遺伝子の発現が誘導された。*OsCERK1* および *OsCCaMK* は共通共生経路 (Common Symbiotic Signaling Pathway, CSSP) を構成する遺伝子であることから、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖が活性化する共生経路は CSSP とは異なる経路であることが示唆された。さらに、CSSP を活性化させる AM 菌由来の共生シグナルとして報告されている Myc-LCO およびキチン 4 糖を部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖と同時に処理し、マーカー遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖を単独で処理したものと同様の遺伝子発現プロファイルが認められた。このことから、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖が引き起こす共生応答は Myc-LCO とキチン 4 糖の影響を受けないことが示唆された。

以上の研究から、GlcN-GlcN-GlcNAc がイネにおいて AM 菌の共生シグナルである Myc ファクターの 1 つとして機能しており、CSSP とは異なる共生経路を活性化することが示唆された (図 2)。現在、ヘテロキトオリゴ糖受容体タンパク質の同定に向け、2-チエニル置換型 β -ケトアミド構造を光反応基としたフォトアフィニティープローブの合成開発を進めている。今後、部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖の生成機構およびシグナル受容・伝達機構の解明が期待される。

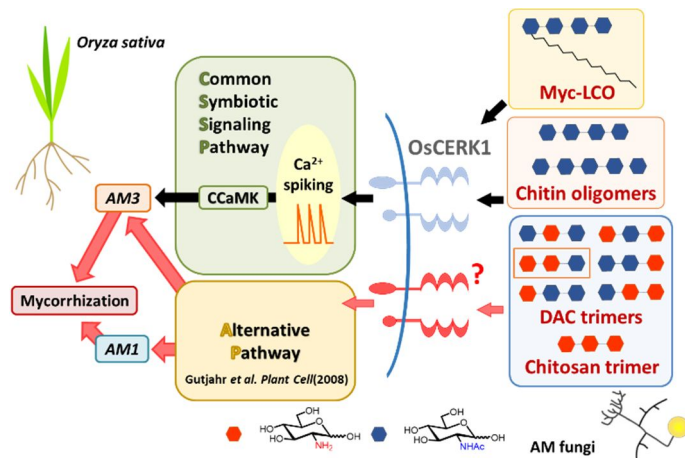


図 2 . 本研究のまとめ

< 引用文献 >

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827 (2005).

Maillet F, Poinso V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58–63 (2011).

Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Bécard G, Bonfante P, Barker DG. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* **198**, 190–202 (2013).

Miyata K, Kozaki T, Kouzai Y, Ozawa K, Ishii K, Asamizu E, Okabe Y, Umehara Y, Miyamoto A, Kobae Y, Akiyama K, Kaku H, Nishizawa Y, Shibuya N, Nakagawa T. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1864–1872 (2014).

Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, Hirochika H, Imaizumi-Anraku H, Paszkowski U. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* **20**, 2989–3005 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣岡 健太郎、野島 耕陽、秋山 康紀
2. 発表標題 ヘテロキトオリゴ糖受容体のタンパク質同定に向けた光アフィニティープローブの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣岡 健太郎、野島 耕陽、秋山 康紀
2. 発表標題 ヘテロキトオリゴ糖受容体のタンパク質同定に向けた光アフィニティープローブの開発
3. 学会等名 植物微生物研究会 第29回研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野島耕陽、秋山康紀
2. 発表標題 AM菌が分泌するヘテロキトオリゴ糖共生シグナルの糖鎖配列の決定
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野島耕陽、秋山康紀
2. 発表標題 AM菌が分泌する部分N-脱アセチルキチン3糖による イネ菌根共生遺伝子の発現誘導
3. 学会等名 植物微生物研究会 第28回研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野島耕陽、辰巳雄亮、秋山康紀
2. 発表標題 有機合成アプローチによる Myc factor活性ヘテロキトオリゴ糖の同定
3. 学会等名 植物微生物研究会 第27回研究交流会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考