

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380074

研究課題名（和文） 菌根菌と植物との共生相互作用における化学的制御機構の解明

研究課題名（英文） Identification of host-derived chemical signals involved in the symbiotic interactions between ectomycorrhizal fungi and woody plants

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・准教授

研究者番号：20285307

研究成果の概要（和文）：本研究では、外生菌根菌－木本植物共生相互作用において植物の根から発せられる共生シグナル物質を同定することを目的とした。アーバスキュラー菌根菌に対する植物シグナルであるストリゴラクトンはコツブタケやマツタケの共生応答である菌糸分岐を誘導しなかった。ユーカリの根の分泌物及び抽出物にはコツブタケの菌糸分岐を顕著に誘導する物質が存在することが明らかになった。それら誘導物質の生産はユーカリの栄養条件により大きく影響されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to identify plant metabolites that act as a symbiotic signal in the ectomycorrhizal symbiosis. Strigolactones, which induce a host recognition response, hyphal branching, in arbuscular mycorrhizal fungi, have shown to be totally inactive on the ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Tricholoma matsutake*, in our newly developed bioassay. Root extracts and exudates from *Eucalyptus* have found to induce hyphal branching in *P. tinctorius*. This suggests that certain root metabolites other than strigolactones are produced in and exuded from *Eucalyptus* roots as a symbiotic signal for ectomycorrhizal fungi.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：菌根菌、共生、菌類、植物、シグナル物質

1. 研究開始当初の背景

「菌根(mycorrhiza)」とは菌類と植物根との

共生形態のことであり、菌根を形成する菌類を「菌根菌 (mycorrhizal fungi)」と呼ぶ。菌

根菌は根から伸ばした菌糸により土壤中のリンや窒素、ミネラルなどを吸収して宿主植物に与え、自らは光合成産物である糖類を植物から受け取る。菌根菌は内生菌根菌と外生菌根菌の2つに大別される。内生菌根菌は共生の際に菌糸を根の細胞内に侵入させる。そのうちアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) が農業上の重要性から最もよく研究されている。AM 菌は草本植物と一部の木本植物を含む 80%以上の陸上植物と共生する宿主選択性の広い菌である。外生菌根菌 (ectomycorrhizal fungi, ECM 菌) は木本植物と共生する。ECM 菌は根を包み込むように菌糸を生育させ、菌鞘と呼ばれる組織を形成する。菌糸は皮層細胞を包み込むように発達し、ハルティッヒネット (Hartig net) と呼ばれる構造を形成する。ECM は森林生態系での樹木の生命維持に絶対的な役割を果たしているだけでなく、高級食材である松茸やトリュフなどのキノコを形成し、人類の食生活・食文化を豊かにしている。以上のように、菌根菌は農業生産や自然生態系だけでなく、人類の食文化にも大きく貢献している。

植物と菌根菌は、元々は別々に独立して存在している。その二者が出会い、様々な段階を経て、共生形態である「菌根」を形成する。菌根形成に至る分子機構に関する研究は、菌根菌が絶対共生菌であり、実験生物として取扱いが難しいことから遅々として進んでいなかった。我々はこれまでに AM 菌の培養技術や生物検定法などを独自に開発し、共生を制御する植物二次代謝産物を明らかにしてきた。その中でも特に重要な物質は、ミヤコグサの根の分泌物から単離した 5-deoxystrigol である。本物質はピコグラムレベルで AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する。5-Deoxystrigol は根寄生雑草の種子発芽刺激物質であるストリゴラクトンとして報告されている化合物であった。しかし、ECM 菌と木本植物との共生相互作用において働く共生シグナル物質についてはこれまでに明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々の菌根共生研究における最終目標は、農地・草地・森林といったすべての植物生態系での菌根共生における化学的制御機構を解明し、得られた知見を農林業などの植物生産や地球上から急速に失われつつある緑地の再生に資することにある。これまでに我々は AM 菌と草本植物との共生を研究対象とし、植物の生産する共生シグナル物質の単離・同定に成功した。次のステップとして、本研究では AM 共生研究で培ってきた知見と技術を足掛りに、ECM 菌と木本植物にまで研究対象を拡げる。ECM 菌も AM 菌と同様に宿主

植物の根の近傍で菌糸を細かく分岐させる。これは ECM 菌の宿主認識反応であり、根から分泌される物質により誘導されると考えられている。本研究では、このこれまでに単離されていない ECM 共生におけるシグナル物質の単離・同定を主たる目標に研究に取り組んでいくことにする。

3. 研究の方法

草本植物に比べて、木本植物は本質的に生育が遅い。ECM 菌は AM 菌に比べれば単独でもよく生育するが、一般の菌類に比べるとやはり生育は非常に遅い。このようなことから、ECM 共生研究は AM 共生研究よりもさらに時間と労力と根気の要るものになることは避けられない。しかし、研究開始から木本植物と ECM を扱い、同時に二重の困難を背負うのは研究戦略としては妥当ではない。よって、本研究ではユーカリ (*Eucalyptus*) など AM 菌と ECM 菌の両方と共生する木本植物を用いて基盤となる実験系を構築しつつ、それを ECM 菌としか共生しないマツなど木本植物を用いた実験系に適用しつつ進めていくこととした。ECM 菌についても比較的生育が早く、扱いやすいと思われるコツブタケ (*Pisolithus tinctorius*) を主として用いつつ、並行して非常に扱いが難しいことが予想されるマツタケ (*Tricholoma matsutake*) についても培養条件等の基礎実験条件を整えていくこととした。

まず、ユーカリ・コツブタケ、アカマツ・マツタケのそれぞれについて *in vitro* 二者培養を行い、その際に見られる根近傍での菌糸分岐が再現できるように培養条件やサンプル処理法などを検討していくことにより ECM 菌を被検菌として用いた菌糸分岐アッセイを構築した。

次に、ユーカリが AM 菌とも共生することからストリゴラクトンを生産していることが予想され、かつストリゴラクトンが AM 菌だけではなく ECM 菌に対してもシグナル物質として機能する可能性も考えられたことから、ユーカリ根分泌物について AM 菌の菌糸分岐アッセイや LC-MS/MS 分析を行ない、ストリゴラクトンの存在について調べると共に、上記により新規に構築した ECM 菌の菌糸分岐アッセイにストリゴラクトンを供し、活性を示すかどうか調べた。

また、ECM 菌に対して菌糸伸長促進が報告されているフラボノイド配糖体であるルチンや、菌糸伸長の伸長角度を変化させる作用が報告されている植物ホルモンであるサイトカイニン類についても菌糸分岐アッセイを行なった。

ユーカリやマツの根において生産・分泌される ECM 菌の菌糸分岐誘導物質の探索と精製は、水耕栽培したこれら植物の水耕液や根

の抽出物を出発原料とし、ECM 菌菌糸分岐アッセイにおける活性を指標に精製を進めた。

4. 研究成果

ECM 菌におけるアッセイ系は未だ確立されていないため、アッセイ系の構築を行なった。ユーカリ実生を無菌条件下で、寒天プレート上で生育させ、別のプレートで生育させたコツブタケ菌体をコルクボーラーで打ち抜き、ゲルブロックをユーカリの根近傍に置床（接種）した。その後、菌根形成にいたるまでの菌糸の形態変化について顕微鏡で観察したところ、根の近傍での菌糸分岐が観察された（図-1）。

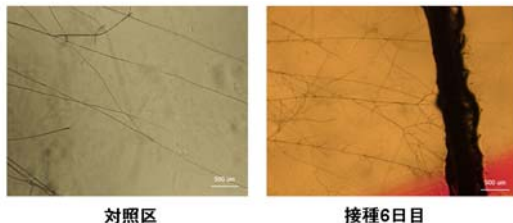


図-1

次に、目的とする菌糸分岐形態を示すアッセイ系を確立するため、ユーカリ根近傍で示した菌糸の形態変化が誘導されるように培養条件及びサンプル処理法を検討した。コツブタケの単独培養に用いられるような栄養分の豊富なポテト-デキストロース-アガー（PDA）培地では旺盛に菌糸は生育するもののユーカリ根分泌による菌糸分岐反応は全く見られなかった。しかし、栄養分を制限したM（エム）培地では対照区における自発的な菌糸分岐が判定の障害にはなるものの、ユーカリの根分泌物処理により顕著な菌糸分岐誘導が起こることが判明した。この栄養分を制限した培養条件を適用することにより次のようなアッセイ系を構築することができた。PDA 培地で培養させたコツブタケを6 cm シャーレ中M培地（0.25% Phytigel）上に置床し、25℃暗黒下で培養した。5～7日後、一次菌糸が伸長していることを確認し、菌糸前方にフィルター滅菌したサンプルを含んだペーパーディスクをおいて、2% CO₂条件下で培養し、24～40時間後の菌糸を観察し菌糸が分岐しているかどうかを判定した。本アッセイ系において、ユーカリ根分泌物酢酸エチル可溶性物質画分で顕著な菌糸分岐が見られた（図-2）。

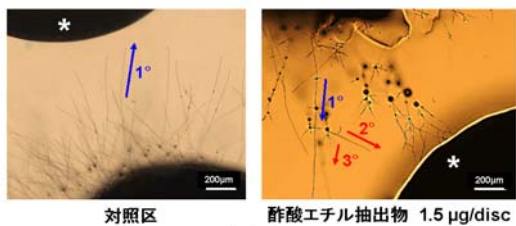


図-2

アカマツ-マツタケの二者培養系においても根の近傍でマツタケ菌糸は一次菌糸から数多くの二次菌糸を分岐生成することが分かった。これを応用して菌糸分岐アッセイを構築した。アカマツを水耕栽培した水耕液を酢酸エチル、ブタノールで溶媒分画を行い、分岐誘導活性を調べたところ、活性は水相残渣に見られた。

ユーカリ（*Eucalyptus viminalis*）を低リン酸栄養条件下で水耕栽培し、活性炭循環吸着法により根分泌物を回収した。吸着した根分泌物をアセトンで溶出した後、ストリゴラクトンが分配される酢酸エチル可溶性物質画分を調製した。この画分をAM菌 *Gigaspora margarita* の胞子を用いたプランチングアッセイに供したところ、菌糸分岐が観察された。また、この画分をLC-MS/MS分析に供したところ、5-deoxystrigol 及び didehydro-strigol 異性体と考えられる新規ストリゴラクトンが確認され、ユーカリがAM菌菌糸分岐誘導物質を生産・分泌していることが分かった（図-3）。

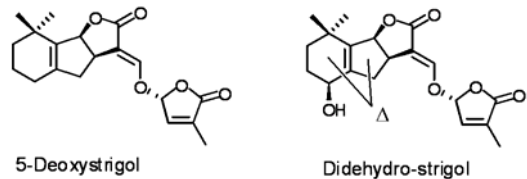


図-3

コツブタケおよびマツタケ菌糸分岐アッセイを用いてストリゴラクトンの一種である5-deoxystrigolについて調べたところ、菌糸分岐は全く誘導されなかった。よって、ストリゴラクトンはECM菌に対する菌糸分岐誘導物質としては作用しない、すなわち、共生シグナルとしては機能しないことが判明した。また、ECM菌に対して菌糸伸長促進が報告されているフラボノイド配糖体であるルチンについても評価したところ、全く菌糸分岐誘導は観察されなかった。菌糸の分岐生育に影響を与えるという報告がなされていたサイトカイニン類についても活性評価を行なった。トランスゼアチン、イソペンテニルアデニン、イソペンテニルアデニンリボシドをそれぞれアッセイに供したところトランスゼアチンが15 μg/discで菌糸を湾曲状に生育させる効果があることが分かった。しかしながら、3つの化合物はいずれも分岐誘導活性は示さなかった。

コツブタケを用いた菌糸分岐アッセイにおける活性を指標にユーカリの根分泌物から菌糸分岐誘導物質の精製を試みた。上述の低リン酸栄養条件下で水耕栽培したユーカリ（*Eucalyptus viminalis*）の水耕液については菌糸分岐活性物質の存在を確認できた

を検出できたものの、その量は極わずかであり、また、低リン酸栄養条件下の栽培では植物体の生育が徐々に悪くなり、ついには枯死してしまう事態に陥った。そこでリン酸栄養を十分に与えた状態で水耕栽培したユーカリ (*Eucalyptus globulus*) の水耕液について菌糸分岐誘導物質の存在を調べることにした。計 600 L の水耕液から合成吸着担体である XAD-7 を用いた固相抽出法により根分泌物を回収した。得られた根分泌物を水にまで濃縮した後、酢酸エチル、水飽和ブタノールで順次溶媒抽出し、得られた抽出画分を菌糸分岐アッセイに供し、菌糸分岐誘導活性を評価したところ、いずれの画分にも活性は見られなかった。低リン酸条件ではユーカリの生育の遅さが研究遂行の障害となったことから、ユーカリの健全な生育のためにリン酸栄養を十分に与えたのだが、それが逆に菌糸分岐誘導物質の低生産ないしは生産停止に結びついてしまったものと考えられた。

次に、ユーカリ実生を水寒天培地で発芽・生育させ、培地に分泌される根分泌物を収集して、これを活性物質精製の出発原料とする方法の構築を試みた。また、根内にも活性物質が存在する可能性があるので、根抽出物の活性についても評価した。培地分泌物についてはユーカリ実生の生育が極めて遅く、活性評価に十分なサンプル量が得られなかったので調べることはできなかったが、根のメタノール抽出物については活性が検出された。このメタノール抽出物をメタノール-水系ステップワイズ溶出での逆相 ODS カラムクロマトグラフィーに供したところ、50、70% メタノール溶出区に活性が見られた。この活性フラクションをヘキサノン-酢酸エチル系ステップワイズ溶出でのシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、得られた各フラクションについてアッセイを行なったところ、いずれの画分にも明瞭な菌糸分岐誘導は見られず、これ以上の活性物質の追求は困難であった。

以上、ECM 菌に対する共生シグナル (菌糸分岐誘導物質) の同定を目標に研究を進め、コツブタケを被検菌とした菌糸分岐アッセイを新規に構築し、ユーカリやマツの根分泌物や抽出物に菌糸分岐誘導物質が存在することを突き止めた。それらは AM 菌に対する共生シグナルであるストリゴラクトンやフラボノイド配糖体、サイトカイニン類などではないことは分かった。しかし、目標とした ECM 菌の共生シグナルの単離・同定は達成することはできなかった。この最大の要因としては、研究開始当初からの懸念された木本植物および ECM 菌の生育の遅さや栽培・培養の難しさが挙げられる。コツブタケを用いた菌糸分岐アッセイも構築することはできたものの、自発的分岐の頻度の高さ、菌のコ

ンディション調整の難しさから活性の判定が困難であることも多かった。マツタケについては継代培養を数回繰り返したところで、全く生育が停止してしまい、培養がそのもの不可能となり、本菌についての研究遂行を断念せざるをえなかった。

これらの困難さはもちろん承知の上で研究に着手したのではあるが、現時点における我々の研究能力では克服することはできなかった。しかし、木本植物-ECM 菌共生系は森林生態系の根幹をなす生物システムであり、また、化学のメスがほとんど全く入っていない未知の領域でもある。近い将来、再度、同課題に挑戦したいと考えている。

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 1 件)

① Akiyama, K., Chemical Identification and Functional Analysis of Apocarotenoids Involved in the Development of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, **71**, 2007, 1405-1414

[学会発表] (計 2 件)

① 秋山康紀, 上田沙悠里, 林 英雄, ユーカリの根が分泌する外生菌根菌に対する菌糸分岐誘導物質の精製, 2008 年度日本農芸化学会大会, 2008 年 3 月 28 日, 名城大・名古屋

② 秋山康紀, 上田沙悠里, 林 英雄, ユーカリの根が分泌する外生菌根菌と AM 菌に対するブランチングファクター, 第 17 回 植物微生物研究会研究交流会, 2007 年 9 月 20 日, 鹿児島大・鹿児島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NPC/MAIN-J.html>

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号: 20285307