

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06635

研究課題名(和文) 菌根菌を用いたラン科セッコク属植物の有用物質産生システムの構築

研究課題名(英文) Development of the useful substance production system for genus Dendrobium using mycorrhizal fungi.

研究代表者

高宮 知子 (TAKAMIYA, Tomoko)

日本大学・薬学部・講師

研究者番号：50513917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラン科セッコク属植物からは、ビベンジル誘導体が数多く単離されており、生物活性を示す化合物が多い。ビベンジルの生合成はビベンジル合成酵素(BBS)が触媒する。キバナノセッコクからはBBSファミリーの6遺伝子が単離されているが、その発現に共生菌が及ぼす影響は明らかでない。本研究では、3種類の共生菌がBBS遺伝子の発現に及ぼす影響を経時的に調べた。その結果、菌と培養した幼苗では、遺伝子の発現量が早期に増加した。また、菌と培養した幼苗では、ビベンジル誘導体の量が増加していた。特定の菌と植物との相互作用を利用することで、短期間で生合成遺伝子の発現量と物質生産量を増加できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、共生菌と植物の共生関係に注目し、菌が植物の生合成遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、特定の菌がビベンジル合成に関与する遺伝子の発現に影響を与えることが明らかになった。さらに、共生菌との共培養によって代謝物量が増加していた。今回の結果から、適切な共生菌を選択することによって目的の代謝物生産を最適化できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dendrobium officinale Kimura & Migo is an important medicinal plant in orchid that produces various bibenzyl and phenanthrene derivatives. Bibenzyl biosynthesis is regulated by bibenzyl synthase (BBS). Although six genes of the BBS family have been registered from *D. officinale*, their gene regulation mechanisms remain unclear. The infection of orchid with mycorrhizal fungi reportedly increases the expression of genes involved in biosynthesis. However, the effect of mycorrhizal fungi on bibenzyl biosynthesis is unknown. In this study, we investigated the effects of three mycorrhizal fungi isolated from *D. officinale* in Japan on BBS gene expression and bibenzyl production over time. One of the Tulasnellaceae operational taxonomic units induced BBS gene expression and increased two bibenzyls, gigantol and dendrophenol at specific time points. These results suggest that it is possible to optimize metabolite production by selecting suitable symbiotic fungi.

研究分野：植物の二次代謝産物と生合成遺伝子

キーワード：共生菌 ラン科植物 ビベンジル合成酵素 物質生産

1. 研究開始当初の背景

ラン科植物は根に共生する真菌(菌根菌)への栄養依存度が高く、特に種子発芽・成長時には菌根菌からの栄養供給が必須である。ラン科植物は菌からの栄養供給を受ける一方で、過度な菌感染を防ぐためにピベンジルやフェナントレンなどのポリフェノールを生産して、菌の生育を制御している。ラン科植物が生産するポリフェノールの中には、抗菌、抗炎症、抗腫瘍などの生物活性を有する化合物が報告されている。特に、セッコク属 (*Dendrobium*) 植物からは、350 種類を超えるポリフェノールが単離されており、アジア・オセアニアの広い地域で薬用資源として重用されている。

本属植物からは複数種の菌根菌が単離されており、菌によって植物の成長に与える影響が異なる^{1,2)}。さらに、菌は植物の二次代謝産物の生産にも影響を及ぼしている。例えば、特定の菌との共生培養によって、アルカロイドが増産されることが報告されており³⁾、植物と菌の相互作用を利用した効率的な物質生産系の確立が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、セッコク属植物から単離されている複数種の菌根菌とセッコク属植物を共生培養し、機能性ポリフェノールの生合成を増加させる菌種の特定を試みた。また、ポリフェノールなどの生合成に関与する遺伝子群の発現解析を行い、菌根菌によって発現誘導される生合成遺伝子を明らかにすることを試みた。さらに、菌根菌と植物の共生培養を用いた有用代謝物の大量生産系の構築を目指した。

3. 研究の方法

日本に自生するキバナノセッコク (*Dendrobium officinale*) から、担子菌門ツラスネラ科に属する 2 種類の菌 (TU22、TU27)、セレンディピタ科の 1 種類の菌 (SE1) が辻田らにより単離され、この 3 種類の菌は *D. officinale* の発芽を促進した²⁾。本研究では、この 3 種類の菌を用いた共生培養を実施した。

共生培養は菌ごとに実施し、培養開始から 2 週間毎に幼苗をサンプリングし、RNA 抽出を行った。得られた RNA を逆転写した後、RT-PCR あるいは RT-qPCR を用いた遺伝子発現解析を実施した。さらに、6 週間、12 週間共生培養した幼苗を凍結乾燥し、80% MeOH にてエキスを得た。次に、エキスの固相抽出を行って MeOH 画分を得て、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) を用いたメタボローム解析を実施した。

さらに、遺伝子発現量及びピベンジル誘導体の含有量を増加させた菌根菌 TU22 を用いて、共生培養の条件検討を行った。培地は 2.5 g/L のオートミールを含む液体培地 (OM) 及び固体培地 (OMA) を用いた。なお、培地には菌体接種、菌すり潰し液添加、菌培養液添加、菌抽出液添加などの処理を行い、共生培養開始から 2 か月後に幼苗の成長を比較した。さらに、フォーリン・チオカルト法を用いて総ポリフェノール量を比較した。

4. 研究成果

(1) 菌根菌が植物の成長に及ぼす影響

各菌種 (TU22、TU27、SE1B) を接種した幼苗の 12 週間後の新鮮重量は、菌を接種していない幼苗 (Control) と比較して増加傾向を示した (表 1)。3 菌種の中で、SE1B を接種した幼苗の新鮮重量が最も増加した。

表 1 幼苗の新鮮重量の比較

科	菌株	開始時の新鮮重量 (g)	12週間後の新鮮重量 (g)
No fungi	Control	1.54	1.75
Tulasnellaceae	TU22	1.49	2.18
Tulasnellaceae	TU27	1.51	2.11
Serendipitaceae	SE1B	1.51	2.43

(2) 菌根菌が植物の遺伝子発現に及ぼす影響

本研究では、まず 2 週間および 4 週間培養した幼苗から RNA を抽出し、ポリフェノール、脂質、糖類の生合成に関与する 14 種類の遺伝子について、RT-PCR を用いた発現解析を行った。UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP)、Trehalose-6 phosphate phosphatase (TPP)、 β -glucosidase-2 (GBA2)、Acetoacetyl-coenzyme A thiolase (AACT)、Bibenzyl synthase (BBS)、Chalcone synthase (CHS)、CYP735A 及び CYP94C1 の遺伝子の発現は、菌と共生培養した幼苗と Control では異なっていた。例えば、CYP94C1 の遺伝子発現は、SE1B で培養した幼苗では 4 週間目に減少していた。AACT の遺伝子発現は、TU27 と 2 週間共生培養した幼苗では他の幼苗よりも低かった。BBS 及び CHS 遺伝子発現については、TU22 と培養した幼苗で増加傾向が観察された。この結果から、菌種ごとに遺伝子発現に対する影響は異なり、さらに、変動パターンも遺伝子ごとに異なることが示された (The 23rd World Orchid Conference)。

次に、BBS 及び CHS、さらにその上流の反応を担う Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) に関して、各菌種が遺伝子発現に与える影響を RT-qPCR を用いて経時的に解析した。*D. officinale* のゲノムには、1 つの BBS 遺伝子と 5 つの BBS-like 遺伝子が存在する。そこで、この 6 遺伝子 (LOC110115249 (DoBBS)、LOC110105072 (DoBBS-like1)、LOC110105073 (DoBBS-like2)、

LOC110115253 (DoBBS-like3)、LOC110105791 (DoBBS-like4)、LOC110093469 (DoBBS-like5)) の発現を解析した。その結果、各菌種と共生培養した幼苗では、遺伝子発現の変動パターンが異なることが示された。さらに、遺伝子ごとに発現変動パターンは異なっていた⁴⁾。

DoBBS、DoBBS-like1、DoBBS-like2 及び DoBBS-like3 は、TU22 あるいは TU27 を接種した幼苗において同様の発現パターンを示した。すなわち、これらの遺伝子は、接種 2 週間後または 4 週間後

に増加した。一方、DoBBS-like4 及び DoBBS-like5 の遺伝子発現は、TU22 あるいは TU27 を接種した幼苗では特定の時期に増加した (図 1)。Adejobi *et al.* 2021 は、ジャスモン酸メチル処理によって DoBBS、DoBBS-like1 及び DoBBS-like2 の発現が増加することを報告しており⁵⁾、DoBBS、DoBBS-like1 及び DoBBS-like2 には共通の遺伝子制御機構が存在する可能性がある。PAL (LOC110113904、LOC110115785) 及び CHS (LOC110113809、LOC110107833) に関しても RT-qPCR を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、共生培養した幼苗と Control では異なる発現変動パターンを示したが、BBS、CHS、及び PAL の変動パターンに共通性は見られなかった。

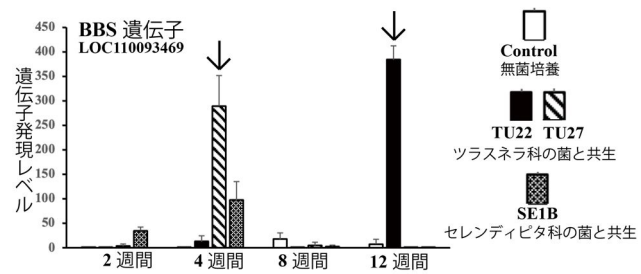


図 1 菌との共生培養による BBS 遺伝子の発現上昇

菌 TU22、TU27 と共生培養した植物体では BBS 遺伝子の発現量が増加した。

(3) 菌根菌が植物の代謝物生産に及ぼす影響

各菌種と共生培養した幼苗から得たエキス中のピベンジル誘導体の含量を分析した。本研究では、*D. officinale* から単理され、抗腫瘍活性が報告されている gigantol、dendrophenol、erianin を LC-MS を用いて定量した⁴⁾。TU22 を接種した幼苗では、共生培養 6 週間目に gigantol 含量が増加しており、Control の 3.6 倍であった (図 2)。6 週間目と比べると、12 週間目の幼苗では gigantol 含量は減少していた。一方、Dendrophenol 含量は、TU22 の接種後 12 週間目の幼苗で増加しており、Control の 3.3 倍あった。TU27 または SE1B を接種した幼苗では、gigantol 及び Dendrophenol の含量に有意な変化は認められなかった。また、erianin はどのサンプルからも検出されなかった。

LC-MS のクロマトグラムには、gigantol、dendrophenol 及び erianin と同じ分子量を持つ複数の代謝物が検出された。そこで、TU27 と SE1B を接種した幼苗に特徴的な代謝物があるか検証するため、クロマトグラムを比較した。その結果、SE1B を接種した幼苗に特徴的な 2 つのシグナルが認められた。一方、TU27 接種の幼苗には特異的な代謝物は検出されなかった。TU22 接種の幼苗では gigantol と dendrophenol に加えて、複数の代謝物シグナルが他の幼苗よりも増加していた。

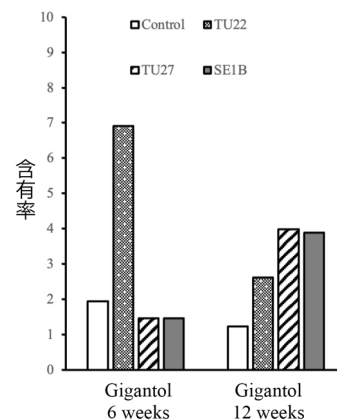


図 2 菌との共生培養による Gigantol の含有量の増加

菌 TU22 と共生培養した植物体では Gigantol の量が増加した。

(4) 効率的な物質生産系の検討

新鮮重量が最も増加したのは、OM 培地に菌培養液を添加して振とう培養した幼苗であり、次いで、OM 培地に PD を添加して振とう培養を行った幼苗であった⁶⁾。これらの培地には Potato starch (4 g/L) と Dextrose (20 g/L) が含まれている。今回の結果では、これらの栄養が幼苗の成長を促進した可能性が考えられた。植物エキスに含まれる総ポリフェノール量の比較では、最もポリフェノール量が多かったのは、OM 培地に菌液を加えて振とう培養を行った幼苗であった。他にも、生きた菌を OMA 培地にあるいは OM 培地に接種して共生培養した幼苗において、ポリフェノール量が増加傾向を示しており、菌の存在がポリフェノール生産を増加させる可能性が示唆された。また、OM 培地に菌液を加えて振とう培養を行った幼苗においても、コントロールと比較すると、総ポリフェノール量が増加傾向を示しており、効率的に植物組織を増殖させながら、ポリフェノール生産量も増加できる培養法である可能性が示唆された。

結論

我々の結果から、セッコク属植物への共生能力を有する菌は、植物の代謝物生産に関連する遺伝子の発現に特異的な影響を及ぼす可能性が示された。従って、植物と菌との相互作用を利用して目的代謝物の生産性を高めるためには、適切な共生菌のスクリーニングが不可欠である。今後、BBS 遺伝子の網羅的解析、BBS の触媒機能および生成物の解明、さらに下流の生合成経路を明らかにすることで、効率的な物質生産を目指す。

引用文献

1. Zhang, L.; Rammitsu, K.; Tetsuka, K.; Yukawa, T.; Ogura-Tsujita, Y. Dominant *Dendrobium officinale* mycorrhizal partners vary among habitats and strongly induce seed germination in vitro. *Front. Ecol. Evol.* 2022, 10, 994641.
2. Zhang, L.; Rammitsu, K.; Kinoshita, A.; Tokuhara, K.; Yukawa, T.; Ogura-Tsujita, Y. Symbiotic culture of three closely related *Dendrobium* species reveals a growth bottleneck and differences in mycorrhizal specificity at early developmental stages. *Diversity* 2022, 14, 1119.
3. Li, Q.; Ding, G.; Li, B.; Guo, S.X. Transcriptome analysis of genes involved in dendrobine biosynthesis in *Dendrobium nobile* Lindl. infected with mycorrhizal fungus MF23 (*Mycena* sp.). *Sci. Rep.* 2017, 7, 316.
4. Takamiya, T.; Saito, M.; Miyamoto, A.; Oikawa, M.; Zhang, L.; Yanagihashi, K.; Okawa, E.; Takahashi, Y.; Suzuki, Y.; Watanabe, M.; Yahagi, T.; Matsuzaki, K.; Iijima H.; Yukawa, T.; Ogura-Tsujita, Y. BBS gene expression and its diversity in the genus *Dendrobium*. *Diversity* 2024, 16, 337.
5. Adejobi, O.I.; Guan, J.; Yang, L.; Hu, J.M.; Yu, A.; Muraguri, S.; Liu, A. Transcriptomic analyses shed light on critical genes associated with bibenzyl biosynthesis in *Dendrobium officinal*. *Plants* 2021, 10, 633.
6. 高宮 知子, 及川 未央, 齊藤 真奈子, 張 麗月, 滝沢 真央, 矢作 忠弘, 飯島 洋, 松崎 桂一, 遊川 知久, 辻田 有紀, ラン科セッコク属植物と共生菌の共生培養系の検討. *日本植物園協会誌*, 2024, 58, 72-76.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高宮 知子, 及川 未央, 齊藤 真奈子, 張 麗月, 滝沢 真央, 矢作 忠弘, 飯島 洋, 松崎 桂一, 遊川 知久, 辻田 有紀	4. 巻 58
2. 論文標題 ラン科セッコク属植物と共生菌の共生培養系の検討	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本植物園協会誌	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamiya Tomoko, Saito Manako, Miyamoto Aoi, Oikawa Mio, Zhang Liyue, Yanagihashi Kazuki, Okawa Erika, Takahashi Yuuka, Suzuki Yui, Watanabe Misaki, Yahagi Tadahiro, Matsuzaki Keiichi, Iijima Hiroshi, Yukawa Tomohisha, Ogura-Tsujita Yuki	4. 巻 16
2. 論文標題 BBS Gene Expression and Its Diversity in the Genus Dendrobium	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Diversity	6. 最初と最後の頁 337 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/d16060337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齊藤真奈子, 及川未央, 張 麗月, 松崎桂一, 遊川知久, 飯島 洋, 辻田有紀, 高宮知子
2. 発表標題 共生菌がラン科セッコク属植物のポリフェノール生合成経路に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 及川未央, 齊藤真奈子, 張 麗月, 滝沢真央, 矢作忠弘, 飯島 洋, 松崎桂一, 遊川知久, 辻田有紀, 高宮知子
2. 発表標題 ラン科セッコク属植物と共生菌の共培養系の検討
3. 学会等名 日本植物園協会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齊藤真奈子, 及川未央, 張 麗月, 遊川知久, 辻田有紀, 飯島 洋, 高宮知子
2. 発表標題 ラン科セッコク属植物と共生菌の共培養を用いた物質産生系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoko Takamiya, Manako Saito, Mio Oikawa, Liyue Zhang, Tadahiro Yahagi, Keiichi Matsuzaki, Hiroshi Iijima, Tomohisa Yukawa, Yuki Ogura-Tsujita
2. 発表標題 The effect of mycorrhizal fungi on the gene expression of polyphenol biosynthesis in <i>Dendrobium officinale</i>
3. 学会等名 The 23rd World Orchid Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 榎戸 舞, 鈴木華菜, 宮本 葵, 滝沢真央, 及川未央, 齊藤真奈子, 張 麗月, 矢作忠弘, 飯島 洋, 松崎桂一, 遊川知久, 辻田有紀, 高宮知子
2. 発表標題 ラン科セッコク属植物と共生菌の共培養系の検討2
3. 学会等名 日本植物園協会第59回大会
4. 発表年 2024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
研究 分担者	遊川 知久 (Yukawa Tomohisa) (50280524)	独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・グループ長 (82617)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	辻田 有紀 (Ogura-Tsujita Yuki) (80522523)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関