

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292066

研究課題名(和文) AM菌におけるストリゴラクトン誘導性共生因子の解明

研究課題名(英文) Strigolactone-inducible symbiotic signals from arbuscular mycorrhizal fungi

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(系)・教授

研究者番号：20285307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアーバスキュラー菌根菌(AM菌)においてストリゴラクトンによって誘導される化学因子を探索・単離し、菌根形成における機能を精査することでAM菌共生シグナルであるMycファクターを同定することを目的として研究を開始した。しかし、ストリゴラクトン処理によってむしろMycファクター活性は低下することが判明したため、AM菌の細胞壁に由来する共生因子について追究した。その結果、ヘテロキトオリゴ糖がMycファクター活性を示すことが明らかになり、本オリゴ糖の菌体から分泌はストリゴラクトン処理により減少することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined Myc-LCOs and chitin oligomers as well as water extracts from mycelia of *Rhizophagus irregularis* for induction of AM symbiosis-related gene expression in roots of rice (*Oryza sativa*). The structure analysis of chitin from *R. irregularis*, the main chitinous component in the fungus, was also conducted by enzymatic hydrolysis.

研究分野：天然物化学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 Mycファクター ストリゴラクトン

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) と植物との共生は約 4 億年前の太古の昔に起源を持ち、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 菌との共生により植物には土壤中のリン酸が供給されるだけでなく、耐病性や乾燥耐性が付与される。このため、本共生は農業生産だけでなく、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。しかし、このような重要性にもかかわらず、AM 菌が絶対共生性の生活環を持ち、実験生物として取り扱いが困難なことが災いして、共生の分子機構はほとんど明らかにされていない。

AM 菌と植物との共生は互いが生産する共生シグナル物質の相互認識から始まる。他の植物-微生物相互作用におけるシグナル物質は 21 世紀を迎えるまでに単離・同定が終了し、シグナル受容系の解析に移行していった。これとは対照的に、AM 共生におけるシグナル物質は、AM 菌の取り扱いの難しさのために 21 世紀に入っても未解明のままであった。このような状況の中、我々は 2005 年に植物側の共生シグナルがストリゴラクトンであることを世界に先駆けて明らかにした (Akiyama *et al.*, *Nature* **435**, 824-827 (2005))。ストリゴラクトンは強害雑草である根寄生雑草の発芽刺激物質として約 40 年前に同定されていた物質であった。さらに、本申請者を含む研究グループによりストリゴラクトンが新規の植物ホルモンであることも明らかになった (Umehara *et al.*, *Nature*, **455**, 195-200 (2008))。

残る一方の AM 菌側のシグナル物質は Myc ファクターと呼ばれている。Myc ファクターの解明は菌根共生研究のみならず植物-微生物相互作用の研究史における一大イベントであり、主たる AM 研究者が参画して激しい国際競争を繰り広げてきた。我々も基盤研究(B)(2010~2012 年度)のサポートを受けて研究を進めていたが、2011 年 1 月、フランスのグループが AM 菌の菌糸から分泌される Myc-LCO を Myc ファクターとして同定したという論文を *Nature* 誌に発表した (Maillet *et al.*, *Nature* **469**, 58-63 (2011))。Myc-LCO は根粒菌の共生シグナルである Nod ファクターに極めて似た構造を持つリポキトオリゴ糖であった。そこで我々は Myc-LCO を合成し、ミヤコグサにおける共生応答を解析した。その結果、Myc-LCO による共生遺伝子誘導は一過的な弱いものであり、さらに重要なこととして Nod ファクター受容体変異体では共生応答が全く起こらないことが判明した。Nod ファクター受容体変異体では Nod ファクターに対する応答が失われ根粒共生は起こらないが、AM 菌根形成は全く正常である。このことはフランスのグループ自身によるタルウマゴヤシの Nod

ファクター受容体変異体を用いた解析においても確認された (Czaja *et al.*, *Plant Physiol.*, **159**, 1671-1685 (2012))。一方、我々とイタリアのグループはそれぞれ独立に AM 菌の共生シグナルとしてキチンオリゴ糖を同定していた (Akiyama *et al.*, Genre *et al.*, IS-MPMI 2012 XV International Congress, PROGRAM AND ABSTRACTS, PS02-131, PS01-028)。キチンオリゴ糖は Nod ファクター受容体変異体においても共生遺伝子発現やカルシウムスパイクキングなど AM 菌感染初期に見られる共生応答を誘導した。しかし、キチンオリゴ糖については病原抵抗性反応を誘導するエリシターとしての詳細な研究が多数あり、現在も精力的に研究が行われている。キチンオリゴ糖がなぜ共生応答と防御応答の両方を引き起こすのか、その生物学的意味については判然としないものの、キチンは細胞壁成分として一般真菌類に普遍的に存在することから、キチンオリゴ糖では植物が AM 菌を特異的に識別できないのは明らかである。以上のことは、AM 共生において主要な共生シグナル (すなわち Myc ファクター) として働く物質が別に存在することを示している。

2. 研究の目的

本研究では AM 菌においてストリゴラクトンによって誘導される化学因子を探索・単離し、菌根形成における機能を精査することで AM 菌共生シグナルである Myc ファクターを同定する。これまでの Myc ファクターの探索は共生マーカー遺伝子の発現を指標としたバイオアッセイにより菌体抽出物に含まれる活性物質を精製していくことにより行われてきた。本法は straightforward ではあるけれども、サンプルの調製法やバイオアッセイの感度・選択性次第で活性物質を見落とす恐れがある (実際、我々が Myc-LCO を発見できなかったのはこれによる)。また、これまでの研究から Myc ファクターはストリゴラクトンによって分岐が誘導された菌糸において生産・分泌されることが示唆されている。よって、本研究では植物側の共生シグナルであるストリゴラクトンにより特異的に誘導される化学因子を探索・単離し、それらについて複数のバイオアッセイにより菌根特異的な共生応答を精査することで Myc ファクターを解明する。

3. 研究の方法

(1) Myc-LCO およびキチンオリゴ糖を処理したミヤコグサ根におけるストリゴラクトン関連遺伝子の発現解析

ミヤコグサ実生を 24 ウェルマイクロプレート中、1 ウェルにつき 1 個体ずつ 0.5 mM のリンを含む 0.99 ml 1/2 B&D 培地に浸漬し、一晚順化した。順化後、調製した試料液 10 μ l を添加し、3 時間経過後に根をサンプリングした。終濃度 1 μ M Myc-LCO, 1 μ M CO (DP=4,

7, 8), 100 nM NF となるように処理し, コントロールには 5% DMSO を添加した。順化および試料処理はいずれも 24 時間, 暗所の条件下で行った。

ミヤコグサの根より RNeasy Plant mini kit (Qiagen 社製) を用いて total RNA を抽出し, TURBO DNA-Free DNase (Ambion 社製) を用いて DNase 処理を行った。このとき, RNase による RNA 分解を防ぐために, RNase 阻害剤である SUPERase-In (Ambion 社製) を反応液に加えた。DNase を失活させた後, エタノール沈殿を行い逆転写反応の鋳型とした。cDNA 調製は High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems 社製) を用い, 製品マニュアルに従って行った。

PCR 反応は SYBR green master mix (Applied Biosystems 社製) を用い, リアルタイム PCR 装置は Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社製) を用いた。恒常的に発現している遺伝子である Ubiquitin の発現量をコントロールとし, 対象となる各遺伝子の cDNA 発現量を相対値として算出した。

(2) ミヤコグサ形質転換体 T90B3 を用いた *Cbpl* レポーターアッセイ

ミヤコグサ形質転換体 T90B3 の実生を (1) と同様の条件で生育させ, AM 菌 *Rhizophagus irregularis* 菌体抽出物で 24 時間処理した。その後 GUS 染色を行い 37 °C, 暗所の条件で 24 時間静置した。その後 MeOH と入れ替え, 24 時間静置した。その後, 根の染色状況を観察し乳酸と入れ替え保存した。

(3) AM 菌細胞壁キチンの分析

AM 菌 *R. irregularis* の菌体 500 mg を 1 N 水酸化ナトリウム水溶液 20 mL (1:40 w/v) で 120 °C, 30 分間加熱還流した。ろ過して得られた菌体を水とエタノールで 2 回ずつ洗浄し, 続いて 2% 酢酸水溶液 50 mL (1:100 w/v) で 6 時間加熱還流した。菌体を再び水とエタノールで洗浄し, 真空下で乾燥させキチン画分を得た。得られたキチン画分を 30 mM, pH 6.1 のリン酸緩衝液に懸濁し *Streptomyces griseus* 由来のエンド型キチナーゼで 37 °C, 12 時間暗所で処理した。懸濁液を 15,000 rpm, 20 °C で 5 分間遠心分離し, 上清を活性炭カラムクロマトグラフィーに供した。0.1 N アンモニア水を含むメタノール-水からなる混合溶媒系での 5% ステップワイズで溶出した。30 ~ 35% 画分を濃縮し, TLC, LC-MS, ¹H-NMR 分析を行った。TLC 分析は水飽和 *n*-ブタノール:メタノール:水 = 6:3:1 を展開溶媒とし, 呈色試薬としてジフェニルアミン-アニリン溶液を用いた。LC-MS のカラムには Asahipak NH2P-50 4D (4.6 × 250 mm, 粒径 5 μm) を用いた。流速 0.5 mL/min, カラム温度 40 °C, 85% アセトニトリル-水混合溶媒系アイソクラチックで溶出し, 検出には ESI+, SIM を用い分析した。¹H-NMR は重

水を溶媒として用い, 周波数 400 MHz で行った。

(4) 部分 *N*-脱アセチル化キチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖を処理したイネの根における AM 共生マーカー遺伝子の発現誘導

DAC3 糖および 4 糖の調製

キトサン 3 糖 あるいは 4 糖をメタノール水に溶解し, 陰イオン交換樹脂 Dowex 1-x8 (HCO₃⁻)、続いて氷冷下で無水酢酸を加え, 1.5 時間攪拌した後, 吸引濾過により樹脂を濾別した。濾液を Dowex 50-x8 (H⁺) を担体とした陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し, アンモニア水を溶媒とした 3% ステップワイズにより溶出した。3% ~ 12% 溶出画分を減圧留去し, DAC3 糖および 4 糖を得た。目的物を重水に溶解し ¹H-NMR 分析を行い *N*-アセチル化度を算出した。

qRT-PCR を用いたイネ実生における AM 共生マーカー遺伝子の発現解析

2.5% 次亜塩素酸ナトリウムで 20 分間表面殺菌浸漬したイネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare BL2) の種子を 1% 素寒天培地に播種し, パラフィルムでシャーレを密封した。シャーレをアルミホイルで遮光した状態で 24 °C のインキュベーターに 4 日間置いた。発芽した種子を 10 個体ずつ滅菌 MilliQ 水を入れた角 2 号プレートに移し, 再び 24 °C のインキュベーターに 2 日間置き実生の状態まで生育させた。その後, 滅菌 MilliQ 水を入れた 60 mm プラスチックシャーレに, 根の合計量が同じぐらいになるようにイネの実生を 2 個体ずつ入れ, 3 連ずつ用意した。24 °C, 16 時間明所, 8 時間暗所で 24 時間置き順化を行った。順化後, 調製した試料液を添加し 6 時間経過後に根をサンプリングした。試料液の溶媒を同量添加したものをコントロールとした。qRT-PCR による遺伝子発現解析は (1) と同様にして行った。

(5) ストリゴラクトンを添加した AM 菌の菌分泌物中のキトオリゴ糖の分析

AM 菌 *R. irregularis* の菌体懸濁液 120 mL を無菌条件下で吸引濾過し, 菌体を収集した。菌体を滅菌 MilliQ 水で十分に洗浄し, 120 mL の滅菌 MilliQ 水に懸濁し 100 mL 三角フラスコに 60 mL ずつ注いだ。一方の懸濁液に 0.05% (w/w) のアセトンに溶解した GR24 を, 終濃度 1 μM となるように加えた。シリコン栓でふたを閉め, 32 °C の暗所で 7 日間静置培養した。7 日後の培養液をそれぞれ吸引濾過し菌体と濾液に濾別した。菌体を乳鉢に移し液体窒素で凍結させ, 乳棒ですりつぶした。すりつぶした菌体を水で懸濁し 1.5 mL エッペンチューブに入れ, 15,000 rpm, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後の上清を菌体抽出物とした。また濾液を濃縮した後, 水に溶解し菌分泌物とした。菌体抽出

物および菌分泌物をそれぞれ 1-ブタノールで3回抽出し、水相を濃縮し重量を測定した。

菌体抽出物の GR24 非添加, GR24 添加, および菌分泌物の GR24 非添加, GR24 添加の4サンプルについて重水素無水酢酸を用いて, N-アセチル化を行った。攪拌後, 吸引濾過により樹脂を濾別し濾液を WGA-アガロースを担体としたカラムクロマトグラフィーに供し, pH5.0 の酢酸緩衝液でキチンオリゴ糖を選択的に溶出した。溶出液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し, 水および 40% アセトン-水混合溶媒で溶出した。40%アセトン-水溶出区を濃縮し, 100 μ L の水に溶解し LC-MS 分析を行った。LC-MS のカラムには Asahipak NH2P-50 4D (4.6 \times 250 mm, 粒径 5 μ m) を用いた。流速 0.8 mL/min, カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 70%アセトニトリル-水混合溶媒系アイソクラチックで溶出し, 検出には ESI+, SIM を用い分析した。

4. 研究成果

(1) Myc-LCO およびキチンオリゴ糖を処理したミヤコグサ根におけるストリゴラクトン関連遺伝子の発現解析

AM 菌と植物との間での共生シグナルのクロストークについてまず検討することとした。Myc-LCO およびキチンオリゴ糖 (2-8 糖) をそれぞれ処理したミヤコグサ根におけるストリゴラクトン (SL) 関連遺伝子ホモログ (D27, CCD7, CCD8, MAX1, D3, D14) の発現誘導を qRT-PCR により調べた。その結果, 野生型ミヤコグサにおいて Myc-LCO および重合度 4 以上のキチンオリゴ糖により SL 生合成遺伝子 (D27, CCD8, MAX1) の発現誘導が見られた。この SL 生合成遺伝子の発現誘導の菌根特異性を検討するために, Nod ファクター受容体 (NFR) 欠損変異体 (*nfr1*, *nfr5*, *nfr1/nfr5*) を用いて同様に解析を行ったところ, Myc-LCO では発現誘導は大きく低下したが, キチンオリゴ糖では野生型と同様に誘導が見られた。この結果より, AM 菌の共生シグナルが植物の菌根共生シグナルである SL の生合成を活性化する可能性が示唆された。

(2) ミヤコグサ形質転換体 T90B3 を用いた *Cbp1* レポーターアッセイ

SL (5-deoxystrigol, GR24) を加えた培養液中で, AM 菌 *R. irregularis* を培養し, 経時的に菌体を取り出して菌体抽出液を調製して, ミヤコグサ共生誘導性 *pCbp1-GUS* レポーターおよびイネ菌根共生マーカー遺伝子 (AM1) 誘導を指標に菌体抽出物の共生応答誘導活性を評価した。その結果, コントロールおよび SL 処理した菌体由来の水抽出物は共に共生応答を誘導したが, それら両者の間で活性に差はなかった。また, 共生応答誘導活性は培養 0 日目から見られ, 培養日数の経過と共に弱くなっていく傾向があった。

(3) AM 菌細胞壁キチンの分析

AM 菌の菌体水抽出物中には Myc-LCO やキチンオリゴ糖とは別に, キチン様の構造を有する新規共生シグナルが存在する事が強く示唆された。キチンは AM 菌を始めとする糸状菌の主要な細胞壁成分である。そこで, AM 菌の細胞壁キチンを酵素処理し加水分解産物を分析することで AM 菌の細胞壁から生成され得るオリゴ糖について精査した。AM 菌の主要な細胞壁成分であるキチンの構造解析を行った。AM 菌 *Rhizophagus irregularis* の菌体を 1 N 水酸化ナトリウム水溶液, 続いて 2% 酢酸で加熱還流することによりキチン画分を得た。これを *Streptomyces griseus* 由来のエンド型キチナーゼで 12 時間処理した。酵素加水分解産物を活性炭カラムクロマトグラフィーで精製し, TLC, LC-MS, NMR により分析を行ったところ, N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のみからなるキチン 2 糖 (GlcNAc-GlcNAc) に加えて, 非還元末端側の糖残基のアセトアミド基が脱アセチル化されたキチン 2 糖 (GlcNAc-GlcN) が同定された。このことから AM 菌のキチンは N-アセチルグルコサミンだけではなく, グルコサミンを含むヘテロ多糖であることが明らかとなった (図 1)。

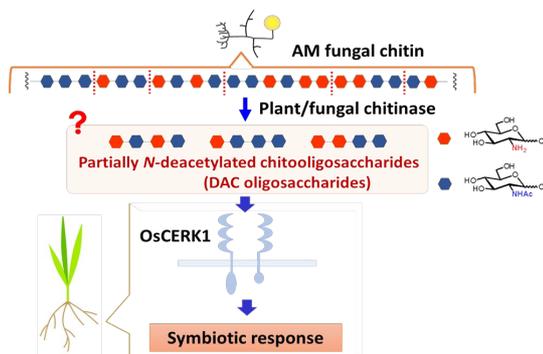


図 1. AM 菌細胞壁キチンの推定構造と生成され得るキトオリゴ糖

(4) 部分 N-脱アセチル化キチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖を処理したイネの根における AM 共生マーカー遺伝子の発現誘導
ヘテロ多糖構造を有する AM 菌の細胞壁キチンから生成し得るオリゴ糖断片として, 部分 N-脱アセチルキチン (partially N-deacetylated chitin, DAC) 3, 4 糖およびキトサンオリゴ糖を調製し, それらオリゴ糖の共生シグナルとしての機能について調べることにした。キトサン 3 糖および 4 糖をそれぞれメタノール 水中で無水酢酸および Dowex1-X8 (HCO₃⁻) を用いて部分 N-アセチル化した後, 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにて精製し DAC3 糖および 4 糖を調製した。これらに加えてキトサン 2~6 糖およびグルコサミンをイネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare BL2) 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。その結果、DAC3 糖および 4 糖, キトサン 2~6 糖により共生マーカー遺伝子 (AM1, AM3, RAM1) および防御応答関連遺伝子の発現誘導が見られ、特に DAC3 糖, キトサン 3~5 糖がこれら遺伝子を強く誘導した。一方、Myc-LCO(C16:0, C18:1), Nod ファクター, キチン 3 糖, 4 糖および 7, 8 糖では遺伝子発現はほとんど誘導されなかった。DAC4 糖およびキトサン 2~4 糖はイネの LysM 型キチン受容体である OsCERK1 の欠損変異体においても野生型と同様にマーカー遺伝子の発現を強く誘導した。これらのことから、イネにおいて N-アセチル基が脱離したキトオリゴ糖が OsCERK1 非依存的に菌根共生遺伝子を誘導する新規の共生シグナルとして働くことが強く示唆された。

(5) ストリゴラクトンを添加した AM 菌の菌分泌物中のキトオリゴ糖の分析

N-脱アセチルキトオリゴ糖が実際に AM 菌の菌体から分泌されているのかどうかを検証した。AM 菌 *R. irregularis* を滅菌水中で 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 ($(CD_3CO)_2O$) を用いて N-アセチル化した後、WGA (wheat-germ agglutinin)-アガロースによりキチンオリゴ糖を選択的に回収 LC-MS 分析したところ、DAC3 糖およびキトサン 3 糖が検出された。重水素ラベル化キチン 3 糖を試料とし、LC-MS を用いて標準添加法により 3 糖の定量を行ったところ、AM 菌体 1 mg あたり 40~500 pg と非常に低濃度であり、また GR24 の添加によって 3 糖の分泌量は 1/6 程度まで減少していた (図 2)。

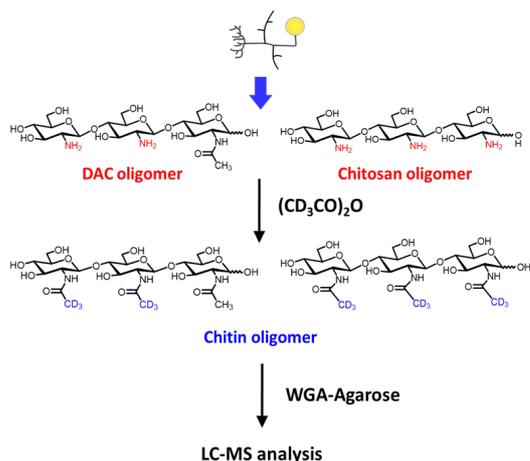


図 2. 重水素無水酢酸による N-アセチル化および WGA アガロースを用いた N-脱アセチルキトオリゴ糖の分析法

以上の研究から、DAC3 糖およびキトサン 3 糖がイネにおいて AM 菌の共生シグナルである Myc factor として機能していること、AM 菌は SL を感知することにより非共生的 (asymbiotic) 生育から前共生的 (presymbiotic) 生育に切り替わると菌体からの DAC3 糖およびキトサン 3 糖の分泌を抑制することが明らかになった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

秋山康紀, 辰巳雄亮, キトサンオリゴ糖によるイネ根におけるアーバスキュラー菌根誘導性遺伝子の発現誘導, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2016 年 3 月 28 日~30 日

辰巳雄亮, 秋山康紀, AM 菌細胞壁キチン質に由来するオリゴ糖によるイネ菌根共生遺伝子の発現誘導, 植物微生物研究会第 25 回研究交流会, つくば国際会議場, つくば, 2015 年 9 月 14 日~16 日

辰巳雄亮, 秋山康紀, AM 菌細胞壁キチン質に由来するオリゴ糖によるイネ菌根共生遺伝子の発現誘導, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学津島キャンパス, 岡山, 2015 年 3 月 27 日

Kohki Akiyama, Strigolactones and carlactones as a signal for arbuscular mycorrhizal symbiosis, 1st International Congress on Strigolactones, Wageningen, the Netherlands, 2015 年 3 月 1 日~6 日

辰巳雄亮, 秋山康紀, イネの共生応答を誘導する AM 菌由来キチン様物質の探索, 植物微生物研究会第 24 回研究交流会, 佐賀大学農学部, 佐賀, 2014 年 9 月 19 日~21 日

秋山康紀,河原千春,AM 菌共生シグナル
による共生関連遺伝子発現誘導における植
物ホルモンの関与,日本農芸化学会 2014 年
度大会,明治大学生田キャンパス,神奈川,
2014 年 3 月 30 日

河原千春,秋山康紀,Myc-LCO およびキ
チンオリゴ糖を処理したミヤコグサ根にお
けるストリゴラクトンおよび菌根共生関連
遺伝子の発現解析,植物化学調節学会第 48
回大会,新潟大学付属図書館,新潟,2013
年 10 月 31 日~11 月 1 日

〔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/
index.html](http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NPC/index.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・教授
研究者番号: 20285307