様式 C-7-2

自己評価報告書

平成 21 年 4 月 30 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．研究計画の概要
本研究では、これまでに単離されていない外生菌根菌(ECM 菌)と木本植物との共生における宿主植物側のシグナル物質の単離・同定を目的とする。ECM 菌は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。ECM 菌と AM 菌の両方と共生できるポプラやユーカリなどを水耕栽培して得られる根分泌物を出発材料し、これら植物と共生する ECM 菌であるコツブタケの分岐菌糸生成を指標とするアッセイ系を新たに構築し、植物から発せられる ECM 菌へのシグナル物質の精製・単離を行う。ユーカリやポプラに着生する ECM 菌に対する共生シグナル物質の同定にほぼ見通しがついた段階で、ECM 菌としか共生しない木本植物であるマツの生産するマツタケに対する共生シグナル物質の単離・同定へと展開する。

２．研究の進捗状況
ECM 菌における菌糸分岐アッセイは未だ確立されていなかったため、まずアッセイ系の開発を試みた。ユーカリ実生を無菌条件下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（*Pisolithus tinctorius*）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。次に、菌糸分岐アッセイを確立するため、ユーカリ根近傍で観察され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。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% Phytagel）上に置床し、25 ℃暗黒下で培養した。5～7 日後、一次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% CO_2 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。本条件下で、ユーカリの根分泌物メタノール可溶画分により菌糸分岐が再現性良く誘導され、アッセイ系が確立できた。本アッセイ系において、ユーカリの根分泌物に含まれる AM 菌に対する菌糸分岐誘導物質の一つである 5-deoxystrigol は菌糸分岐を誘導しなかったことから、ストリゴラクトンは ECM 菌に対して非活性であることが明らかになった。菌糸伸長促進活性が報告されているフラボノイド配糖体である rutin についても菌糸分岐は誘導されなかった。また、菌糸の分岐生育に影響を与える報告があるサイトカイニンであるトランスゼアチンには菌糸を湾曲状に生育させる効果が確認されたが、菌糸分岐は誘導しなかった。活性物質の単離・同定には精製の出発原料となるユーカリの根分泌物が大量に必要であるので、現在、根分泌物の大量調製法について検討を行なっている。

３．現在までの達成度
④遅れている
ECM 菌の菌糸分岐アッセイについては当初予想していたよりスムーズに確立することができた。しかしながら、当初から予想していたことではあるが、ECM 菌の生育は一般の糸状菌

と比較すると極めて遅く、また、継代培養中に生育が悪くなる現象にしばしば遭遇し、研究進行の障害となっている。また、木本植物の中では比較的生育は早いとはいうものの、ユーカリの生育速度は一般に研究に用いられる草本植物に比べて極めて遅く、根張りを含め根の形成も貧弱で、活性物質精製の出発原料となる根分泌物の収集に困難をきたしている。以上、2 つのことが律速要因となり、研究の進行状況は芳しくない。

４．今後の研究の推進方策

菌糸分岐アッセイはすでに確立できているので、精製の出発原料の量的確保さえクリアできれば、研究はスムーズに進行していくはずである。これまで根分泌物の収集に水耕栽培を用いてきたが、ユーカリの生育の遅さや根張りの貧弱さのため、量的確保は困難であった。ユーカリは芽生えから実生までの初期生育の速さは草本植物と同等であることから、種子を大量に播種し実生から根分泌物を収集・調製すれば量的確保が可能になるかもしれない。また、活性物質は根から分泌されていることを考えると、根の中にも存在する確率は高い。よって、根分泌物だけではなく、根抽出物の活性も評価し、もし根内にも存在するならば、根そのものを抽出源にしてもよい。これら出発原料の量的確保の改善法として考えられ得ることを一つ一つ検討していくことにより、事態の打破を図りたいと考えている。

５．　代表的な研究成果

（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）

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