

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580172

研究課題名（和文） 菌根菌による難水溶性リン酸塩の可溶化に関わる分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for dissolution of water-insoluble minerals containing phosphates by mycorrhizal fungi

研究代表者

服部 武文 (HATTORI TAKEFUMI)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：60212148

研究成果の概要（和文）：

外生菌根菌が分泌する難水溶性リン酸塩を溶解させ、リン酸を遊離するキレート作用を示す有機酸の一つであるシュウ酸の生合成機構を解明しようとした。木材腐朽菌オオウズラタケのシュウ酸生合成酵素、チトクローム *c* 依存グリオキシル酸脱水素酵素(FpGLOXDH)をコードする cDNA をクローニングした。次いで、外生菌根菌 *Laccaria bicolor* (オオキツネタケ) のゲノムからそのホモログ (jgi|Lacbil|296363|er2 Lbscfoolog 01720, *Laccaria bicolor*)を見出した。しかし、オオキツネタケから本酵素活性を得ることができなかった。生合成機構について今後さらに研究が必要とされる。

研究成果の概要（英文）：

Ectomycorrhizal (ECM) fungi solubilize water-insoluble minerals containing phosphorus, making phosphate available in soluble form to be taken up by the host tree. Strong chelators, such as oxalate, citrate, and malate, released from ECM play a pivotal role in the dissolution of minerals through complexolysis. In this study, we attempted to clone a cDNA encoding a homologue of the oxalate-producing enzyme cytochrome *c* dependent glyoxylate dehydrogenase from *Laccaria bicolor*. We isolated cDNA encoding the cytochrome *c* dependent glyoxylate dehydrogenase (FpGLOXDH) from *Fomitopsis palustris*. We found that the homologue of *FpGLOXDH* (jgi|Lacbil|296363|er2 Lbscfoolog 01720, *Laccaria bicolor*) was present in the genome of *L. bicolor*. However, activity of FpGLOXDH was not detected in *L. bicolor*. Further research is needed to elucidate the mechanism underlying the biosynthesis of these organic acids.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学
キーワード：森林生物

1. 研究開始当初の背景

土壌中のリンのほとんどは、アルカリ土壌条件下ではカルシウムと、酸性土壌条件下ではアルミニウム、あるいは鉄と結合し難水溶性リン酸塩として存在している。従って、自然界では様々な作用によりこれらのリン酸塩が可溶化し、溶解したリン酸のみが樹木に吸収されうる。

樹木のほとんどが自然界では、アーバスキュラー菌根菌、外生菌根菌を含む、菌根菌と共生している。そして、樹木に共生する外生菌根菌のいくつかは、土壌中の重要なリン供給源である Apatite $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{CaF}_2$ を可溶化する事が知られている。

この可溶化のメカニズムの一つとしては、キレート作用を示す有機酸が外生菌根菌より分泌され、難水溶性リン酸塩中のカチオンがキレートされることにより、この塩が可溶化することが考えられている。外生菌根菌が分泌するこのようなキレート作用がある有機酸としては、リンゴ酸、シュウ酸、クエン酸が報告されている。

一方、これら有機酸は、難水溶性リン酸塩の種類によっては可溶化の際生成する、樹木に対し毒性を示す金属イオンの毒性を軽減させる作用も知られている。例えば、アルミニウムは、pH が 4 より低い土壌状態では、主に Al^{3+} として存在する。 Al^{3+} は植物根の伸長阻害を引き起こす。 Al^{3+} 毒性は、森林衰退の直接の原因の一つと提案されている。

しかし、注目されることは、 Al^{3+} 毒性が起こりうる状況下であっても、外生菌根菌と共生している実生は、共生していない実生に比べ、生育阻害を受けない事例が報告されていることである。この機構は、外生菌根菌が分泌するキレート作用がある有機酸と Al^{3+} とがキレート化合物を形成することにより、 Al^{3+} の毒性が緩和され、さらに、外生菌根菌が根より広い領域から栄養分を供給しているからであるかもしれないと考えられている。

したがって、外生菌根菌の有機酸生合成機構を解明することは、酸性土壌を含む荒廃地での植物生育を促進し、バイオマスの生産に基礎知見を供給できる点で重要と考えられる。

ここで、外生菌根菌のシュウ酸の生合成機構に着目すると、これまでシュウ酸生成の生化学的経路は、*Paxillus involutus* でのみ報告されている。本菌は $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ から ^{14}C 標識のシュウ酸を生合成し、シュウ酸がグリオキシル酸経路を経由し生合成されていることが

示唆された。しかしながら、オキサロ酢酸加水分解酵素の触媒作用によりシュウ酸が生成する可能性も残されている。

このように、外生菌根菌による難水溶性リン酸塩の可溶化に機能する、キレート作用を示す有機酸の生合成機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

・シュウ酸生合成酵素が精製され、さらに、生合成機構の解明が進んでいる、木材腐朽菌 *Fomitopsis palustris* (オオウズラタケ) より、シュウ酸生合成酵素をコードする cDNA をクローニングし、その酵素の局在を明らかにする。外生菌根菌 *Laccaria bicolor* のゲノムにそのホモログがあるか検討する。

・リン酸アルミニウムまたはリン酸カルシウムを添加した培地で *L. bicolor* 1283 株を培養し、分泌された有機酸を定性・定量分析する。

3. 研究の方法

3-1 *Fomitopsis palustris* (オオウズラタケ) のシュウ酸生合成酵素をコードする cDNA のクローニングと細胞内局在および外生菌根菌 *L. bicolor* のゲノムからのホモログ検索

供試菌と培養条件

Fomitopsis palustris (Berkeley et Curtis) Murill, strain TYP-6137 を PDA 培地で継代培養し、調製した菌糸片を液体培地で静置培養した。

内部アミノ酸配列の決定

FpGLOXDH をオオウズラタケより精製し、Lysylendopeptidase で消化し、各断片のアミノ末端からアミノ酸配列を決定した。

cDNA *FpGLOXDH* の単離

オオウズラタケ cDNA ライブラリーを調製した。その配列をテンプレートとして、内部アミノ酸配列を基にプライマーを設計し、PCR, 3', 5' RACE により、FpGLOXDH の全コード領域を含む cDNA 断片を得た。

cDNA *FpGLOXDH* の解析

CLUSTAL W, CLUSTAL X, BLASTp で解析した。

Anti-FpGLOXDH antibody の調製

大腸菌により組換え FpGLOXDH を調製し、ウサギに免疫し、Anti-FpGLOXDH antibody を調製

した。

免疫電子顕微鏡観察による FpGLOXDH の細胞内局在

Anti-FpGLOXDH antibody により、オオウズラタケ菌糸を用いた免疫電子顕微鏡観察により、FpGLOXDH の細胞内局在を明らかにした。

3-2 リン酸アルミニウムまたはリン酸カルシウムを添加した MN 培地で *L. bicolor* 1283 株により分泌された有機酸の定性・定量分析

使用菌株

L. bicolor 1283 (鳥取大学保存菌株) を MN 寒天培地で継代培養し、コルクボーラー#4 で打ち抜いた菌糸片を使用した。

培養

リン酸アルミニウム、またはリン酸カルシウムを双方共 0.3 (w/v) 添加した MN 寒天培地上に透析膜を敷き、その上に別途 MN 寒天培地で培養し、コルクボーラー#4 で打ち抜いた *L. bicolor* 1283 菌糸片を置き、25°C、28 日間培養した。

菌糸生育測定

コロニーの中心を通り、透析膜の縦横に平行する十字線をシャーレ上に引き、1 週毎に縦横の長さを計測した。

クリアーゾーンの測定

培養途中で、培地裏面より観察しリン酸カルシウムが透明になった個所をクリアーゾーンとし、その直径を計測した。さらに、培養後透析膜と共に菌糸を寒天培地から剥離し、リン酸カルシウムが透明になった個所をクリアーゾーンとし、その直径を計測した。

菌糸内有機酸定量分析

培地 6 枚分から剥離した菌糸をひとまとめに回収した。菌糸をオーバーナイトで凍結乾燥させ、テイッシュライザーで 25Hz で 40sec 粉碎した。本粉碎サンプルを -20°C で保管し、GCMS 分析に供した。

寒天培地内有機酸分析

寒天培地をコルクボーラー#4 で回収し、液体窒素で凍結させた後、オーバーナイトで凍結乾燥させ、テイッシュライザー (㈱レッチェ) で 25Hz×0.4min(40sec) 粉碎した。本粉碎サンプルを -20°C で保管し、GC-MS 分析に供した。

有機酸抽出

凍結乾燥後粉碎した菌糸粉末 20 mg に蒸留水 572 μ l 添加し 50°C、800 rpm で 12 時間

有機酸を抽出し、陽イオン交換樹脂を通したのち、十分乾燥させ、*N*-tert-butyl dimethylsilyl 誘導体化し、GC-MS により定量した。

クリアーゾーン内サンプルは、コルクボーラー#4 で回収した 1 サンプル分に対し蒸留水 300 μ l 添加し、40°C、800 rpm で 12 時間有機酸を抽出し、同様の処理の後、同様に分析した。

GC-MS : 島津製作所 GC-MS QP-2010 PLUS
カラム : CBP1-M25-025 25m×0.22mm(i. d.)
キャリアガス : He 線速度 50cm/秒
分析条件 : 80°C から 8°C/分 で 240°C まで昇温、維持

4. 研究成果

4-1F. *palustris* (オオウズラタケ) のシユウ酸生成酵素をコードする cDNA のクローニングと細胞内局在および外生菌根菌 *L. bicolor* のゲノムにおけるホモログ検索

cDNA *FpGLOXDH* クローニングと解析

cDNA *FpGLOXDH* として、502 アミノ酸をコードする 1506bp の cDNA を単離した。Cyt-b5 (Heme binding domain), FCB2_FMN (FMN-binding domain) が保存されていた。これは、オオウズラタケより精製した FpGLOXDH が Heme と FMN を補欠分子族として保有していたこととよく一致した。

cDNA *FpGLOXDH* の配列を基に考察すると、*Saccharomyces cerevisiae* と *Hansenula anomala* の乳酸脱水素酵素の配列とアミノ酸レベルで 46%、56% の identity を示した。しかし、酵母由来の乳酸脱水素酵素が mitochondria target signal を持つのに対し、FpGLOXDH は持っていなかった。さらに、カルボキシ末端に、SKL という、ペルオキシソームターゲットシグナルを持っていることが分かった (図 4-1-1)。

| | | |
|----------|--|-----|
| FpGLOXDH | ----- | 52 |
| HaLDH | --MFKSGLRTAT--ARSSFRSLASLKNPQRFNSKTF---LLNATRGNSRNSLIALA | |
| ScLDH | MLRYKPLLRISKNCEAAILRASRTRLNTIRAYGSTVFKSKSFEQDSRKRQTQWALRVGA | 60 |
| FpGLOXDH | -----MSDIRVLTGPEVAQHASKDCWIIIVHGKVDVDFDL | 36 |
| HaLDH | ISLSAVSSYYLYQKDKIIRADVPWHKDIETPEIVSQHNKDDLWVINGVYDLTDFL | 112 |
| ScLDH | ILAATSSVAYLNWHNGQIDNDFKRLDMNKQKISPAEVARHNKFDCCWVINGVYDLTRFY | 120 |
| | MTS | |
| FpGLOXDH | PEHFGGQAILKYAGKDATAAYEPIHPPDAITNLPVEKHLGVVDASTVAKVVKV---- | 91 |
| HaLDH | PNHPGGQKIIIRYAGKDATKIFVPIHPPDTIEKFIPEKHLGLPLVG-EFEQEEEE----- | 166 |
| ScLDH | PNHPGGQDVIRFAGKDVTAIFEPHAPVNDIKYIAPEKHLGLPLQSGMPPELVCPYPYAFG | 180 |
| FpGLOXDH | VTEEEKQRQKYIE-ARPPDITINLHDFENVARKVISEKAWAYSSASDDEITLRENMA | 150 |
| HaLDH | LSDEIDRLERIE-RKPLSLQMINLHDFETIARQILPPALAYCSAADDEVTLRENHNA | 225 |
| ScLDH | ETREDIARERQLKSLPLDNLINLYDFEYLAQTLLTKQAWAYSSGANDDEVTHRENHNA | 240 |
| FpGLOXDH | YQRVWFRPRLRDVENVVSTTILGQKSSLEFVYISATALKGLGHP-EGELCLTFAAQ-- | 207 |
| HaLDH | YHRIFNPKLIDVQVDISTEFEGKTSAPFYISATALAKLGH-EGEVAIAGKAGR-- | 341 |
| ScLDH | YHRIFNPKLIDVQVDISTDMLGSHVDVFFYSATALKGLGHPLEGEKAVARGCGGV | 300 |
| FpGLOXDH | HGVIQVATLASCDFEILDAKPD-QSLFLQLVNRDREITRKYQHAERGVKALFIT | 266 |
| HaLDH | EDVVMISTLASCDFEIDARIPG-QQQVYQVYNADRSITEKAVRHAERGMKGLFIT | 341 |
| ScLDH | TKVPMISTLASCDFEIEAAPSDDKIQWYQVYNADRSITEKAVRHAERGMKGLFIT | 360 |
| FpGLOXDH | VDAPQLGRREKMRKFEVGEVAVQDQSGSGLKDEGVARAISFIDPFLSKWDIPWFK | 326 |
| HaLDH | VDAPSLGRREKMRKFEADSD--DVQDDEIDDRSQGASRALSSFIDPFLSKWDIAFIR | 398 |
| ScLDH | VDAPSLGRREKMRKLFNTKAG-FKAMKRTNVEESQASRALSKFIDPFLSKWDIEELR | 419 |
| FpGLOXDH | SITKMPILKIGISTAEADAILAYEAGVQGLVLSNHGGRLDARSGLVLEVVPAARAG | 386 |
| HaLDH | SITKMPIVIKGVRKEDVLLAEHGLQGVLSNHGGRLDTRAPVEVLAEMVPIKERG | 458 |
| ScLDH | KTKLPIVIVGVRKEDVIRKAEIGVSVLSNHGGRLDTRAPVEVLAEMVPIKERG | 479 |
| FpGLOXDH | YFPDPNFEIFVQGMRRASDVLKALGARAQVGRPFYAFCSYQGEVKEAIIQIFRDE | 446 |
| HaLDH | --LDQKIDIFVQGMRRASDVLKALGARAQVGRPFYAFCSYQGEVKEAIIQIFRDE | 516 |
| ScLDH | --LKDLEVFVQGMRRASDVLKALGARAQVGRPFYAFCSYQGEVKEAIIQIFRDE | 537 |
| FpGLOXDH | FEMNMLLGGARTIDELVPEMVASALSHVVLTPODNLFHNTYQPLSGAKFQSEK | 502 |
| HaLDH | IEMNMLLGVNRIEELTPELLDTRSIHNRVAVKDYLEQVQRMGAEFRFGIED | 573 |
| ScLDH | IEMNMLLGVNRIEELTPELLDTRSIHNRVAVKDYLEQVQRMGAEFRFGIED | 591 |

図 4-1-1 塩基配列に基づく FpGLOXDH アミノ酸配列と酵母の乳酸脱水素酵素 HaLDH, ScLDH のアミノ酸配列の比較

細胞内局在

免疫電子顕微鏡観察の結果、FpGLOXDH はペルオキシソームに局在していることが示された。(図 4-1-2)

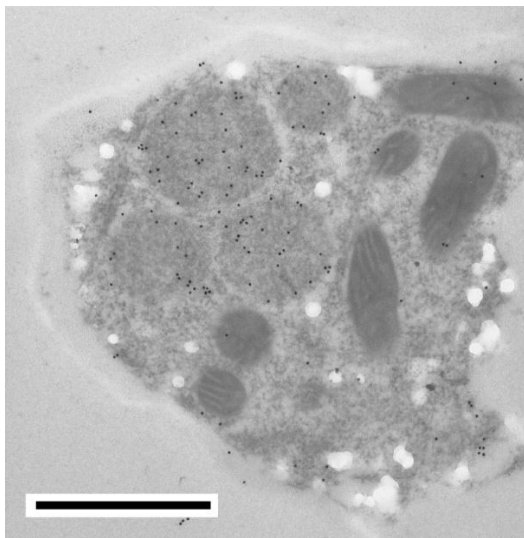


図 4-1-2 免疫電子顕微鏡観察によるシウ酸生成酵素 FpGLOXDH はペルオキシソームに存在する。Bar は 1 μm

L. bicolor からの FpGLOXDH ホモログの検出
少なくとも 34 の FpGLOXDH ホモログが Ascomycota と Basidiomycota のみから見出さ

れた。その中には、アミノ酸レベルで 67%を示す、*Laccaria bicolor* の (jgi|Lacbil|296363|er2|Lbscfoolog_01720, *Laccaria bicolor*) も見出された(図 4-1-3)。

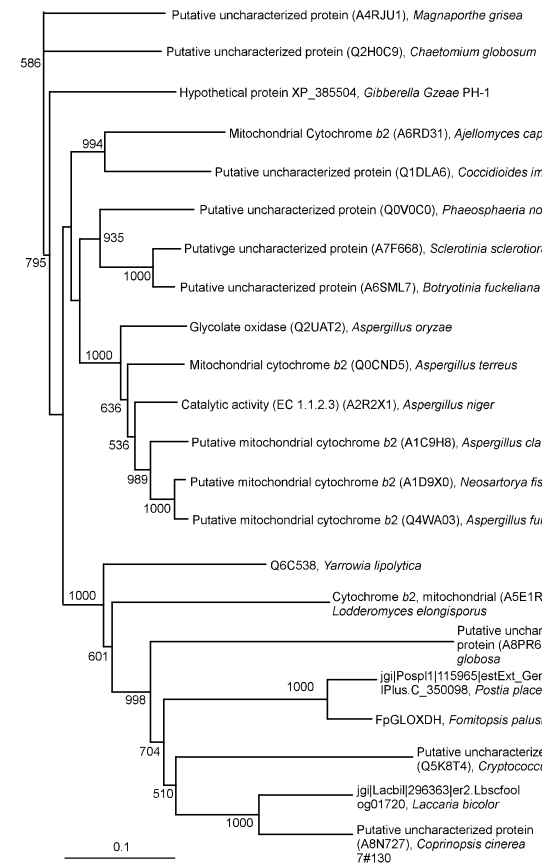


図 4-1-3 FpGLOXDH とそのホモログとの関係

しかし、*L. bicolor* から本酵素活性は検出されなかった。そこで、以下の 4-2 で記すように、本菌を難水溶性リン酸塩添加培地で培養し、得られた有機酸を明らかにし、その結果を受けて検討を進めることとした。

4-2 リン酸アルミニウムまたはリン酸カルシウムを添加した MMN 培地で *L. bicolor* 1283 株により分泌された有機酸の定性・定量分析

菌糸生育

リン酸アルミニウム添加、また、リン酸カルシウム添加培地では、培養 28 日目、コントロールに比べ、リン酸アルミニウム添加で約 9mm、リン酸カルシウム添加で約 11mm コロニー直径が大きく生育した。コントロールと比較した場合の生育の違いは、培養 3 週で認められ、生育期間が長くなるに従って、その差が大きくなった(図 4-2-1)。

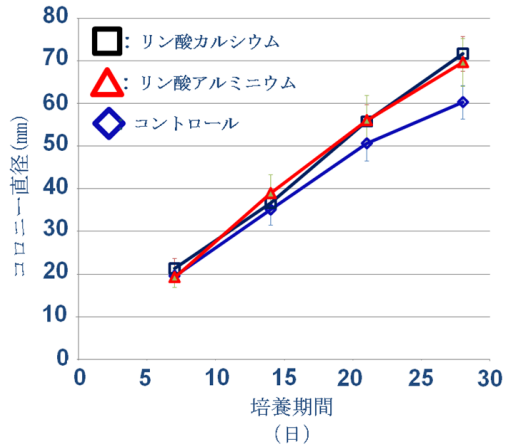


図 4-2-1 リン酸アルミニウム、あるいは、リン酸カルシウム含有培地におけるオオキツネタケの生育

リン酸カルシウム添加系での有機酸量

菌糸体シュウ酸量は、カルシウム添加によって有意に増大しなかった。逆に、リンゴ酸、クエン酸は各々、2.1倍、2.5倍に増大した。一方、培地中に分泌された有機酸については、リン酸カルシウムの添加により、シュウ酸量は増大しなかったが、リンゴ酸、クエン酸は有意に検出された。この機構に関し、さらに検討する必要がある。

リン酸アルミニウム添加系での有機酸量

コントロール培地で生育した菌糸体より、キレート作用を示すシュウ酸、リンゴ酸、クエン酸が検出された。シュウ酸はこれら3種では最大量(6.9 mg/g 乾燥菌体重量)であった。しかし、その量はアルミニウム添加により増大しなかった。逆に、リンゴ酸、クエン酸は各々、9.0、4.8倍増大した。

一方、培地中に分泌された有機酸については、コントロール培地では、シュウ酸が最大量であったが、リンゴ酸、クエン酸は認めうる量は検出されなかった。一方、アルミニウムの添加により、シュウ酸量は増大しなかったが、リンゴ酸、クエン酸は検出された。

CE-MS 分析の結果、解糖系、TCA 回路を含む主要代謝経路の中間代謝物量は増大した。

外生菌根菌から可溶化を引き起こすと考えられる有機酸を同定することはできた。しかし、その生合成酵素のクローニングには至らなかった。

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 1 件) (査読あり)

① Hattori, T., Okawa, K., Fujimura, M., Mizoguchi, M., Watanabe, T., Tokimatsu, T., Inui, H., Baba, K., Suzuki S., Umezawa, T. and Shimada, M.: Subcellular localization of the oxalic acid-producing enzyme, cytochrome *c* dependent glyoxylate dehydrogenase, in brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. *Cellulose Chemistry and Technology*, **51**, 545-553 (2007) (この論文は 2007 と記載されていますが、実際に発行されたのは、2008 年です。)

[学会発表] (計 1 件)

① 小篠貴臣, 大和麻子, 大和政秀, 岩瀬剛二, 鈴木史朗, 梅澤俊明, 服部武文: アルミニウムによる外生菌根菌の有機酸代謝変動, 第 60 回日本木材学会大会, 2010/3/17-19, (CD-ROM), p.88, 宮崎 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 武文 (HATTORI TAKEFUMI)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号: 60212148

(2) 研究分担者

岩瀬 剛二 (IWASE KOJI)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 60444642

梅澤 俊明 (UMEZAWA TOSHIKI)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号: 80151926

(3) 連携研究者

大和 政秀 (YAMATO MASAHIDE)
鳥取大学・農学部・助教
研究者番号: 00571788