

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05537・20K20452

研究課題名（和文）根圏シグナル調節による菌根菌叢改変技術の開発

研究課題名（英文）Development of strigolactone analogues capable of modifying the composition of the arbuscular mycorrhizal fungal community

研究代表者

秋山 康紀（Akiyama, Kohki）

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20285307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,500,000円

研究成果の概要（和文）：非典型的ストリゴラクトンアナログを用いたアーバスキュラー菌根菌叢組成改変技術の開発を目的とした。A環にパラ置換ベンゼン環を持つ種々のカラクトン酸メチルアナログを新規に合成した。AM菌*Gigaspora margarita*に対する菌糸分岐誘導では、アルキル置換基の炭素鎖長を変えることで誘導活性を調節できることが分かった。3種類のAM菌*Rhizophagus irregularis*、*R. clarus*、*G. margarita*を同時接種する菌叢組成アッセイでは、数種のアナログにおいて非処理区と比べて、*R. irregularis*が減少し、*R. clarus*が有意に増加する菌叢改変効果が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィールド条件では植物種によって共生している菌根菌叢におけるAM菌の菌種組成が異なるが、その機構についてはほとんど分かっていない。また、共生効果の高い有用なAM菌を外来的に導入する場合に、土着菌による先住者効果が障害となっている。本研究で開発した非典型的SLアナログは、3種のAM菌からなる合成コミュニティにおいて、同属異種の2つのAM菌の菌叢組成比を逆転させることができた。本アナログは、菌根菌叢形成の分子機構の解明に利用できるだけでなく、菌叢改変剤としての応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a technique for modifying the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities using synthetic analogues of non-canonical strigolactone (SL). Various analogues of methyl carlactonoate (MeCLA) with a para-substituted benzene in the A-ring were newly synthesized. It was found that the hyphal branching activity in germinating spores of the AM fungus *G. margarita* could be regulated by varying the carbon chain length of the alkyl substituent. In a fungal composition assay using a synthetic community involving three AM fungi, *Rhizophagus irregularis*, *R. clarus*, and *G. margarita*, several analogues showed a modifying effect on the fungal community, significantly reducing *R. irregularis* and increasing *R. clarus* compared to the control.

研究分野：天然物化学・生物有機化学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 ストリゴラクトン 菌根菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人類活動による温暖化や土壌汚染、河川湖沼汚染などの地球レベルの環境問題に対処しつつ、人類への食糧供給を維持するためには環境負荷の低い次世代の栽培体系の構築が喫緊の課題である。その解決の一つとして有用土壌微生物叢の活用が世界的に活発化している。アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) は土壌微生物叢バイオマスの 50% を占める真菌の一種であり、有用土壌微生物として研究が進められている。AM 菌はイネ科やマメ科、ナス科などの重要作物を含む 70% 以上もの陸上植物と共生関係を結ぶことができ、農地などフィールドの植物の根には多様な AM 菌が同時に感染し菌根菌叢を形成している。AM 菌との共生により植物にはリン酸や窒素、微量元素の吸収促進、ヒ素、カドミウムなど有害物質の過剰害抑制、乾燥耐性、病害虫抵抗性の付与、根寄生雑草による寄生の抑制、機能性二次代謝物の蓄積促進など様々な有益な効果をもたらされる。これらに加えて、土壌団粒形成、栄養循環、土壌呼吸に好影響を与えると共に、温室効果ガスである亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) の生成を減少させるなど環境効果も高い。

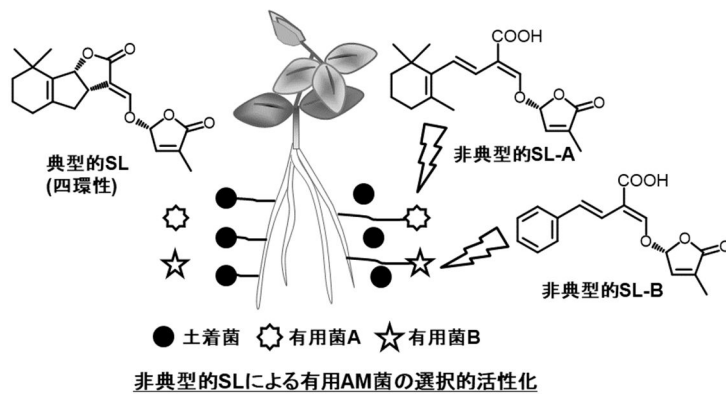
AM 菌は絶対共生菌であり、その生育と次世代胞子の形成には宿主植物との共生が必須である。しかし、植物にはリン栄養が十分であると AM 菌の感染共生を抑制する機構がある。このため過剰施肥や過耕作を行う現代集約農業では、AM 菌は植物と共生できなくなり、結果として現在の農地では AM 菌の存在量と種多様性は低下してしまっている。さらに、そのような共生に不利な環境下では植物に対して効果の低い AM 菌が土着菌として選択的に生き残る傾向にある。そのため効果の高い有用な AM 菌を新たに農地に導入しようとしても、すでにその環境に適応した土着の AM 菌との競合に負けてしまい、植物と共生することができず効果を発揮できない。これは先住者効果 (priority effect) と呼ばれ、有用 AM 菌を農地に導入する際の最も大きな障害の一つであり、これを解決できる技術の開発が望まれている。

AM 菌は植物の根から分泌される根圏シグナル物質であるストリゴラクトン (strigolactone, SL) を宿主シグナルとして感知する。SL は AM 菌に対して胞子発芽、菌糸伸長、菌糸分岐などの形態変化を促進することにより AM 菌を根に誘引すると共に、AM 菌が根に感染するのに必要な様々な分子機構を活性化する。SL はストライガやオロバンキなどの根寄生雑草の種子発芽を刺激する寄生シグナルとして同定されていたが、2005 年に我々が AM 菌に対する共生シグナルであることを明らかにした。さらに、我々を含む研究グループは、SL がシュートの枝分かれを制御する新規の植物ホルモンであることも明らかにしている。SL はカロテノイドの酸化開裂から生合成されるテルペノイド化合物であり、これまでに天然から約 30 種が同定されている。これら SL は構造的特徴に基づき、共通の四環性構造を持つ典型的 SL (canonical strigolactone)、2012 年以降に発見されるようになった非四環性構造を持つ非典型的 SL (non-canonical strigolactone) の 2 つに分類される。典型的・非典型的 SL 共に AM 菌に対して菌糸分岐活性を示すが、総じて典型的 SL の方が非典型的 SL よりも活性が強い。SL 生合成欠損変異体では AM 菌との共生能が大きく低下すること、また、野生型植物に SL 溶液を土壌灌注により外部投与すると菌根形成が促進されることから、SL の AM 共生活性化剤としての応用が期待されている。実際、欧米の農薬企業による SL 関連特許の申請が近年活発化している。

### 2. 研究の目的

フィールド条件では植物種によって共生している菌根菌叢における AM 菌の菌種組成が異なる

ることが知られている。すなわち、ある特定の AM 菌が特定の植物とパートナー関係を結ぶ傾向が見られる。しかし、植物と AM 菌が互いの種をどうやって識別するのか、その機構についてはほとんど分かっていない。通常、ほとんどの植物は典型的・非典型的 SL の両方を同時に生産分泌している。典型的 SL が広く植物種間で保存された共通の基本骨格を持つのに対して、非典型的 SL は植物種によって化学構造が大きく異なる。典型的 SL よりも AM 菌に対する活性の弱い非典型的 SL を植物が分泌している理由として、非典型的 SL がその植物種に固有の共生シグナルとして特定の AM 菌を誘引している可能性が示唆されている。よって、本研究では、非典型的 SL による種特異的な菌根菌叢形成の分子基盤を解明すると共に非典型的 SL をリードとして特定の AM 菌種を個々に活性化できる新たなアグロケミカルを創製する。このような AM 菌種選択的 SL アゴニストを開発できれば、有用 AM 菌の農地への新規導入の壁となっている土着菌の先住者効果を克服できるだけでなく、化学的に菌根菌叢を制御できる革新的技術となる。創製する新規ケミカルは AM 菌の SL シグナル受容系を作用点とするため、低濃度で特異的に効果を発揮することが期待されるので化学的にも生物的にも環境負荷が低く、次世代の栽培体系に求められる要件に適合している。



### 3. 研究の方法

#### (1) 新規非典型的 SL アゴニストの合成

最も代表的な非典型的 SL であるカーラクトンの化学合成法を 2014 年に開発して以来、我々は様々なカーラクトン誘導體やアナログの合成を行ってきた。カーラクトン誘導體は合成中間体も含めて化学的に不安定であるため、合成難度が高い。ごく最近、スイス・シンジェンタ社のグループが分子の左半分と右半部分を Stille カップリングで結合させてカーラクトン骨格を構築する新たな合成法を開発した。彼らの方法と我々の方法を組み合わせれば、これまで以上のスループットで新たな非典型的 SL 誘導體を合成できる。AM 菌活性に必須なのは分子の右半分であるので、左半分に様々な構造改変を加えることで新規誘導體を合成し、AM 菌 *Gigaspora margarita* を用いた菌糸分岐アッセイに供し、アゴニスト活性を評価する。

#### (2) SL 生合成欠損変異体を用いた菌根菌叢形成における SL 調節機構の解析

マメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は典型的 SL である 5-デオキシストリゴール (5DS) と非典型的 SL であるロータスラクトン (LL) を生産分泌する。これまでのミヤコグサの SL 生合成研究で、我々はミヤコグサ内在性レトロトランスポゾン LORE1 タグラインから、5DS と LL の両方、5DS のみ、LL のみ、をそれぞれ欠損した 3 種の SL 生合成変異体を単離している。これらの変異体に既知の AM 菌を単独あるいは複数種を混合して接種し、経時的に根および培土をサンプリングし、根内や根外の AM 菌の存在量および代謝活性を個々の AM 菌の LSU (large ribosomal subunit) をターゲットとした定量 PCR で測定し、野生型と比較することで菌根菌叢の菌種組成に対する典型的・非典型的 SL の寄与を解析する。

#### (3) 合成コミュニティを用いた非典型的 SL アゴニストによる菌根菌叢形成調節の解析

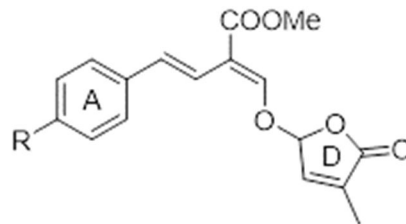
3 種の AM 菌 *Rhizophagus irregularis*, *R. clarus*, *G. margarita* を混合した培土に(1)で合成した

非典型的 SL アゴニストを灌注し、そこにミヤコグサを定植する。以降は、(2)と同様にしてサンプリングし菌叢解析を行う。このような生物的・化学的組成が完全に規定された合成コミュニティにおいて、菌根菌叢の菌種組成に対して改変効果を示す SL アゴニストを探索する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規非典型的 SL アゴニストの合成

ハロゲン原子やアルキル基などを置換基とする種々のパラ置換ベンズアルデヒドを出発物質として、トリメチルシリルジアゾメタンと強塩基である LDA を用いたアルデヒドのアルキンへの変換反応、スタニル化、vinyl iodide との Stille カップリングを含む 3 段階または 5 段階の反応を経て A 環にパラ置換ベンゼン環を持つカーラクトン酸メチルアナログを計 9 種類合成した (図 1)。



R = H, Br, Cl, Me, Bu, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>

図 1. 新規非典型的 SL 合成アゴニスト

合成した新規非典型的 SL アナログ 9 種類について、AM 菌 *Gigaspora margarita* に対する菌糸分岐誘導活性をペーパーディスクアッセイにより評価をした。その結果、ハロゲン原子やメチル基(C<sub>1</sub>)を置換基とするアナログでは 100 pg/disc で強い菌糸分岐活性を示したのに対し、直鎖ブチル基(C<sub>4</sub>)を持つアナログでは 10 ng/disc と活性が大きく低下し、直鎖ヘキシル基(C<sub>6</sub>)や直鎖オクチル基(C<sub>8</sub>)ではアッセイ上限濃度である 1 μg/disc でも活性を示さなかった。このことから、ベンゼン環上の置換基の炭素鎖長を変えることで *G. margarita* に対する菌糸分岐活性を容易に調節できることが分かった。

##### (2) SL 生合成欠損変異体を用いた菌根菌叢形成における SL 調節機構の解析

ミヤコグサは典型的 SL である 5DS と非典型的 SL である LL を生産する。これまでのミヤコグサの SL 生合成研究で、我々は LORE1 タグラインから、5DS 生合成を欠損した *dsd* 変異体と LL 生合成を欠損した *lld* 変異体を単離している。野生型およびこれら SL 生合成変異体に 3 種類の AM 菌 *R. irregularis*, *R. clarus*, *G. margarita* を接種し、根における AM 菌の感染率の測定とそれぞれの AM 菌の LSU をターゲットとした種特異的プライマーを用いた定量 PCR により根における AM 菌の存在量を定量し、菌根菌叢の菌種組成に対する典型的・非典型的 SL の寄与を解析した。その結果、感染率は 3 種類のミヤコグサの間で違いは見られなかったが、菌種組成は *dsd* 変異体と *lld* 変異体において野生型と比較して *G. margarita* の比率が有意に減少していた。

##### (3) 合成コミュニティを用いた非典型的 SL アゴニストによる菌根菌叢形成調節の解析

上記 3 種類のミヤコグサを 3 種類の AM 菌 *Rhizophagus irregularis*, *R. clarus*, *G. margarita* を含む培土に定植し、非典型的 SL アナログを 100 nM 含む 1/2 ホーグランド液 (0.1 mM Pi) を与えて 4 週間生育させた。(2)と同様にして AM 菌の感染率の測定と定量 PCR による菌叢組成解析を行った。その結果、感染率の平均値はアナログ間で違いは見られなかったが、野生型と *lld* 変異体では、数種の非典型的 SL アナログにおいて  $p < 0.05$  を閾値として *R. irregularis* が減少し、

*R. clarus* が有意に増加するという菌叢改変効果が見られた (図 2)。

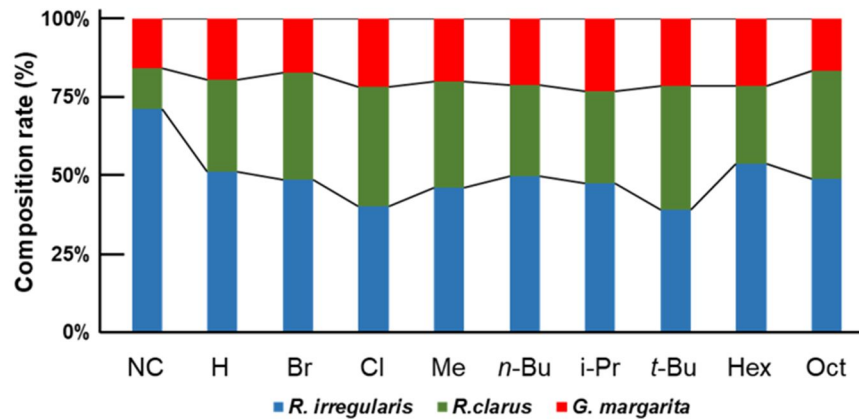


図 2. ミヤコグサ *Ild* 変異体を用いた菌叢組成アッセイの結果

<引用文献>

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827 (2005).
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200 (2008).
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H. Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol*, **51**, 1104–1117 (2010).
- Mori N, Nishiuma K, Sugiyama T, Hayashi H, Akiyama K. Carlactone-type strigolactones and their synthetic analogues as inducers of hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, *Phytochemistry*, **130**, 90–98 (2016).
- Yoshida S, Kameoka H, Tempo M, Akiyama K, Umehara M, Yamaguchi S, Hayashi H, Kyojuka J, Shirasu K. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*, **196**, 1208–1216 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村航太、秋山康紀
2. 発表標題 AM菌の菌叢組成を改変できるSLアナログの開発
3. 学会等名 植物微生物研究会第30回研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村航太、秋山康紀
2. 発表標題 AM菌の菌叢組成を改変できるSLアナログの開発
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------