

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：223 80069

研究課題名（和文）アーバスキュラー菌根共生系における相互認識機構の
ケミカルバイオロジー研究課題名（英文）Chemical identification of fungal signalling molecules
in the arbuscular mycorrhizal symbiosis

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

研究成果の概要（和文）：アーバスキュラー菌根菌の生産する共生シグナル物質である Myc ファクター（MF）の同定を目的とした。AM 菌から共生応答誘導物質としてキチンオリゴ糖を同定した。フランスのグループにより MF として報告されたリポキトオリゴ糖 Myc-LCO を化学酵素法により合成した。これらのキトオリゴ糖の共生マーカー遺伝子発現誘導における Nod ファクター受容体依存性解析から主要な共生シグナル物質が別に存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to identify arbuscular mycorrhizal (AM) fungal metabolites that act as the symbiotic signal “myc factor” in the AM symbiosis. We identified chitin tetramer to octamer as an inducer of symbiotic responses in the roots of model legume *Lotus japonicus*. Myc-LCOs (AM fungi-derived lipochitooligosaccharides) reported as myc factor by Maillet *et al.* (2011) were chemo-enzymatically synthesized. It was found that Myc-LCO and chitin oligomers respectively induce symbiotic responses via NFR-dependent and -independent pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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：アーバスキュラー菌根菌、Myc factor、キチンオリゴ糖、リポキトオリゴ糖

1. 研究開始当初の背景

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、現在では 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壌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、我々の研究グループは、独自に AM 菌の培養アッセイ系を開発し、2005 年に世界で初めて植物側のシグナル物質の解明に成功し、これをストリゴラクトンと呼ばれるテルペノイドであることを明らかにした (Akiyama *et al.*, *Nature* **435**, 824-827, 2005)。ストリゴラクトンは強害雑草として知られ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。さらに昨年、本申請者を含む研究グループにより本物質が地上部シュートの枝分かれを制御する新規の植物内生ホルモンであることが明らかになり (Umehara *et al.*, *Nature*, **455**, 195-200, 2008), ストリゴラクトンは現在植物科学において最も注目を集めている植物二次代謝産物となっている。

残る一方の AM 菌側のシグナル物質は Myc factor (MF) と呼ばれ、国際的に熾烈な競争の中で研究が行われているが、未だ単離されていない。AM 菌は共生シグナルを生産すると考えられてきたが、MF の存在を裏付ける実験的な証拠は長らく提出されなかった。2003 年になり、共生誘導性遺伝子である *MtENOD11* の発現を誘導する物質を AM 菌が菌糸から分泌していることをフランスのグループが報告した。透析膜を用いた実験から本物質は分子量が 3500 以下の物質であることが示されている。また、同グループにより AM 菌の菌糸からは側根分岐を誘導する物質が分泌されていることも報告されている。イタリアのグループは、AM 菌の胞子分泌物中にダイズ培養細胞における細胞内カルシウムの一過性の上昇を誘導するシグナル物質の存在を認めている。イギリスのグループは分岐菌糸の近傍にある植物根において共生相互作用における代表的な初期応答である細胞内でのカルシウムスパイクが起こることを見出した。我々も、ミヤコグサの共生誘導性の *LjCbp1* 遺伝子プロモーターの活性を指標としたバイオアッセイにより AM 菌の胞子中に MF 候補と考えられる物質が存在することを見出し、すでに MF 候補物質の一つを単離することに成功しており、解析を進めている。MF 解明はこれらグループによる国際的な熾烈な競争の中で行われている。宿主側のシグナルがすでに解明された今、MF 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、世界的に大きな興味と期待を受けている。

2. 研究の目的

本研究では、ケミカルバイオロジー的手法を用いて、AM 菌からの MF の世界初の同定を目指すと共に、ストリゴラクトンによる MF 生合成の調節機構、さらに MF の受容機構の解明のための分子プローブの作製を行い、AM 共生における相互認識機構を解明することを目的とした。

しかしながら、本基盤研究の研究期間中の 2011 年 1 月にフランスのグループが AM 菌から根粒菌の生産する共生シグナルである Nod ファクターに極めて構造の類似したリポキチンオリゴ糖 Myc-LCO (mycorrhizal lipochitooligosaccharide) を MF として同定した (Maillet *et al.*, *Nature* **469**, 58-63 (2011))。また、我々は AM 菌の菌体熱水抽出物および菌体分泌物からミヤコグサの共生遺伝子誘導を引き起こす物質としてキチンオリゴ糖を同定していた。さらに、他のグループによってもキチンオリゴ糖が common sym pathway 依存的に共生遺伝子発現を誘導することが報告された (Nakagawa *et al.*, *Plant J.*, **65**, 169-180 (2011))。よって、本研究では Myc-LCO とキチンオリゴ糖が MF として機能するかどうかを精査することとした。

3. 研究の方法

(1) AM 菌からの MF の単離

MF の単離は、植物根における AM 菌感染誘導性遺伝子プロモーターであるミヤコグサ *LjCbp1* プロモーターの活性化度を指標としたアッセイ系を用いて、菌体抽出物あるいは菌糸分泌物を精製していくことにより行った。これまでの知見から宿主シグナルであるストリゴラクトンが MF の生合成ないしは分泌を刺激することが示唆されているので、ストリゴラクトン存在下で菌体を培養して MF の生産性を高める条件を探索しつつ研究を進めた。単離した MF の化学構造を MS や NMR 等のスペクトル分析により決定した。

(2) Myc-LCO の化学酵素合成

Rhizobium etli および *Sinorhizobium meliloti* の菌体 DNA を鋳型として RTS 100 *E. coli* LinTempGenSet, His-tag キットを用いて、直鎖状鋳型 DNA を二段階の PCR により調製した後、無細胞タンパク質合成システム RTS 100 *E. coli* HY expression キットにより NodB (chitin deacetylase) および NodH (sulfotransferase) を C 末端 His タグ融合タンパクとしてそれぞれ合成した。キチン 4 糖の非還元末端の GlcNAc 残基を NodB により脱アセチル化することにより *N*-モノ脱アセチルキチン 4 糖を得た。これを DMT-MM

[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride]を縮合剤として種々の脂肪酸と反応させることにより非硫酸化 Myc-LCO を合成した。硫酸化 Myc-LCO は非硫酸化 Myc-LCO の還元末端側 GlcNAc 残基の 6 位水酸基を PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate) を硫酸基供与体として NodH により硫酸化することにより合成した。

(3) キチンオリゴ糖の調製

N-アセチルグルコサミン、キチン二糖～六糖は市販品（生化学工業社製）を用いた。キチン七糖および八糖の調製は以下のように行った。市販のキトサンを水酸化ナトリウム水溶液で処理することにより残存する *N*-アセチル基を完全に脱アセチル化した。この完全脱アセチル化したキトサンを酢酸バッファに溶解し、メイセラーゼで酵素加水分解してキトサンオリゴ糖を調製した。アセトン沈殿によって高重合度オリゴ糖を濃縮した後、これを弱陽イオン交換カラムによって各オリゴ糖を分離・精製して、キトサン七糖と八糖を得た。これをメタノール水系、無水酢酸により *N*-アセチル化してキチン七糖および八糖に変換した。その後、活性炭カラムに通してキチン七糖および八糖を吸着させ、カラムを水でよく洗浄した後、アセトン水溶液でキチンオリゴ糖を溶出することにより純粋なキチン七糖と八糖を得た。

(4) ミヤコグサ共生応答遺伝子の qRT-PCR 解析

24°C 暗黒下、Pi-free 1/2 B&D アガー培地上で 3-4 日間発芽生育させたミヤコグサ実生を 24-well1 micro plate 上で 0.99 ml Pi-free 1/2 B&D 培地に浸漬し、3-6 時間順化させた。順化後、調製した試料液 10 μ l を添加し、1, 3, 24 時間経過後に根をサンプリングした。サンプリング後の根の保存には、RNAlater (Ambion 社製) を用いた。順化および試料処理はいずれも 24°C、暗所の条件下で行った。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。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。サーマルサイクラーの条件は、50°C、2 分間；95°C、10 分間の変性を行った後、95°C、15 秒間；60°C、1 分間

の 2 ステップからなるサイクルを 40 回行った。*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。

(5) 菌根形成促進活性の評価

乾熱滅菌を行ったパーミキュライトに AM 菌 *Glomus intraradices* の胞子を混ぜ、植物培養試験管 (ϕ 25 \times 100 mm) に詰めた。次に、表面殺菌処理し、発芽させたミヤコグサ実生を試験管に置床し、チャンバー内で生育させた。液体肥料には 0.1 mM のリン酸を含む 1/2 Hoagland-II 液 (pH 6.0) を用い、1 個体あたり 5 ml を週 1 回の頻度で与えた。Myc-LCO 処理は液体肥料に Myc-LCO を添加することにより行った。チャンバーの設定は 16 時間日長、25°C とした。AM 菌接種 3, 4, 6 週間後に根を取り出し、洗浄してパーミキュライトを取り除いた。これを 10% 水酸化カリウム水溶液中、90°C で 8 分間煮て透明化した後、0.05% トリパンプルー乳酸溶液中、90°C で 30 分間煮て染色を行った。染色した根はプレパラート上に均一に並べて、生物顕微鏡を用いて感染率を測定した。測定方法には拡大交点法 (magnified intersection method) を用いた。

4. 研究成果

Glomus intraradices を天然ストリゴラクトン 5-デオキシストリゴールあるいは合成アナログ GR24 を添加した液体培地で静置培養した。菌体を濾別し、菌体分泌物を含む培養濾液を得た。これをミヤコグサの AM 共生誘導性の *Cbp1pro::GUS*、*SbtM1pro::GUS* プロモーター・レポーター融合遺伝子について誘導活性を精査した。その結果、AM 菌培養濾液は *Cbp1pro::GUS* アッセイにおいて活性を示したが、*SbtM1pro::GUS* の誘導活性は示さなかった。*Cbp1pro::GUS* アッセイで活性を示した物質を精製・単離し、MALDI-TOF-MS、¹H-NMR 解析、そして標品との比較により、キチン四糖と決定した。そこで、各種重合度のキチンオリゴ糖の *Cbp1pro::GUS* アッセイでの活性を調べたところ、四糖～八糖に顕著な活性が見られることが分かった。

フランスのグループによって MF として AM 菌から単離された硫酸化および非硫酸化 Myc-LCO とそれらのアシル鎖改変誘導体 (計 14 種) を出発原料としてキチン 4 糖を用いて化学酵素法により合成した (図 1)。

これらについて野生型ミヤコグサ実生根に対する共生マーカー遺伝子 (*SbtS*、*SbtM1*、*NIN*、*NSP2*) 発現誘導活性を qRT-PCR により調べたところ、非硫酸化 Myc-LCO および

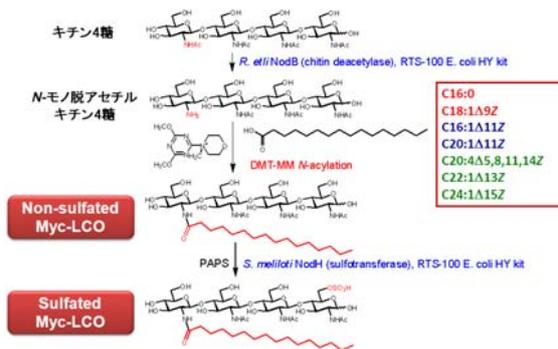


図 1

アシル鎖として C16:1A11Z, C20:1A11Z を持つ LCO が顕著な活性を示した。硫酸化 Myc-LCO はほとんど全く活性を示さなかった。次に、強い活性を示した非硫酸化 Myc-LCO について、Nod ファクター受容体変異体である *nfr1*, *nfr5*, *nfr1/nfr5* に対する共生マーカー遺伝子発現を調べたところ、ほとんど全く発現誘導は見られなかった(図 2)。キチンオリゴ糖で処理したミヤコグサの根における *SbtS*, *SbtM1*, *NIN*, *NSP2* などのミヤコグサ共生関連遺伝子の発現誘導活性を qRT-PCR により調べた。その結果、キチンオリゴ糖では重合度が 4 以上、特に七糖と八糖の長鎖のオリゴ糖で *SbtS*, *SbtM1*, *NIN*, *NSP2* の発現応答が見られ、Nod ファクター受容体変異体においても野生型と同様の応答が見られた(図 2)。

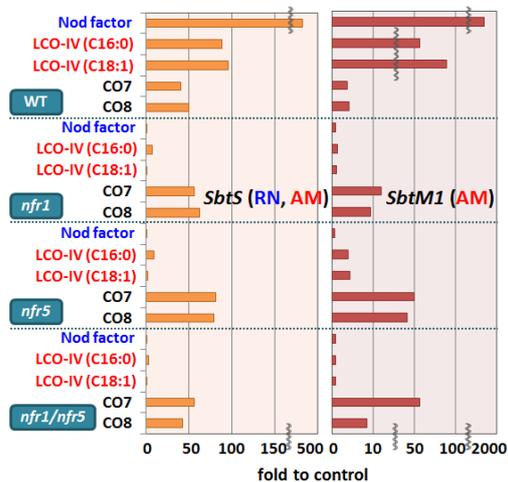


図 2

続いて、NF, Myc-LCO, キチンオリゴ糖が菌根形成に及ぼす影響について調べるために、野生型ミヤコグサを用いて AM 菌 *Glomus intraradices* の接種実験を行った。播種時とその後 1 週間毎にこれら試料溶液を培土に灌注することにより処理を施した。3 週間後の感染率を計測したところ、

Myc-LCO 処理区ではコントロールと比べて菌根形成が有意に抑制されていた。一方、キチンオリゴ糖処理区ではコントロールとの差は見られなかった(図 3)。

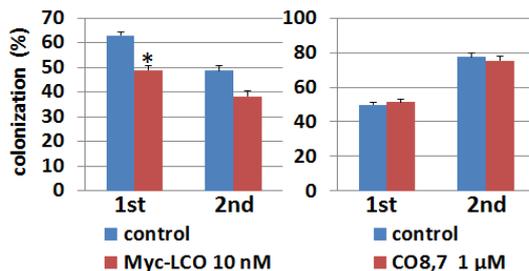


図 3

以上の結果より、Myc-LCO は Nod ファクター受容体依存的に、長鎖のキチンオリゴ糖は非依存的に共生応答を誘導することが示唆された。Nod ファクター受容体変異体である *nfr1*, *nfr5*, *nfr1/nfr5* では菌根形成は全く正常であり、異常はない。また、キチンは AM 菌だけでなく、一般の真菌にも広く存在する。これらのことを考え合わせると Myc-LCO およびキチンオリゴ糖が AM 菌特異的に機能する共生シグナルであるとは考え難く、これら以外に働く主要なシグナル物質が存在することを強く示唆している。

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)

- ① 佐々木 満、秋山 康紀、林 英雄、中山 弘一、ストリゴラクトンの根寄生植物種子発芽刺激活性およびアーバスキュラー菌根菌菌糸分岐誘導活性における構造要求性と農業への利用を指向した分子デザイン、植物の生長調節、45、95-103 (2010)、査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 秋山 康紀、河原 千春、林 英雄、Myc-LCO およびキチンオリゴ糖によるミヤコグサ共生遺伝子発現における NFR 依存性の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学
- ② 秋山 康紀、ストリゴラクトン：植物における共生と寄生そして形態形成を司るテルペノイド、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2012 年 11 月 13 日、ウイックあいち
- ③ 秋山 康紀、河原 千春、林 英雄、Myc-LCO およびキチンオリゴ糖によるミヤコグサ

共生遺伝子発現における NFR 依存性の解析、植物微生物研究会第 22 回研究交流会、2012 年 9 月 26 日、神戸大学

- ④ Kohki Akiyama, Chiharu Kawahara, Hideo Hayashi、Synthesis and symbiosis-related gene-inducing activity of Myc-LCOs and their N-acyl chain-modified derivatives、XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、2012 年 7 月 30 日、国立京都国際会館
- ⑤ 秋山 康紀、河原 千春、林 英雄、Myc-LCO の化学酵素合成とミヤコゴサ共生関連遺伝子の発現誘導活性、日本農芸化学会 (2012 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学
- ⑥ 秋山 康紀、河原 千春、林 英雄、Myc-LCO の化学酵素合成とミヤコゴサ共生関連遺伝子の発現誘導活性、植物微生物研究会第 21 回研究交流会、2011 年 9 月 20 日、岡山大学
- ⑦ 秋山 康紀、林 英雄、アーバスキュラー菌根菌-植物共生系における相互認識シグナル物質、日本土壌肥料学会 2011 年度つくば大会シンポジウム、2011 年 8 月 8 日、つくば国際会議場
- ⑧ 秋山 康紀、林 英雄、アーバスキュラー菌根菌におけるストリゴラクトン誘導性の分岐菌糸形成、日本農芸化学会 2011 年度大会シンポジウム、2011 年 3 月 28 日、京都女子大学

〔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/MAIN-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 康紀 (KOHKI AKIYAMA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20285307