

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660098

研究課題名(和文) バクテリアの生産するアーバスキュラー菌根共生促進物質の同定と作用機序解析

研究課題名(英文) Identification of bacterial secondary metabolites that promote arbuscular mycorrhiza formation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アーバスキュラー菌根菌(AM菌)の菌体には菌根ヘルパーバクテリア(MHB)と呼ばれる特定のバクテリアが付着しており、菌根形成に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究ではMHBの生産する菌根共生促進物質を同定すると共に、クオラムセンシング分子として知られるN-アシルモノセリンラクトン(AHL)の菌根形成における機能について解析した。その結果、AHLはAM菌に対して生育促進作用を示さなかったが、ある種のバクテリア由来のシデロフォアがAM菌の生育を促進すると共に、シデロフォア鉄錯体トランスポーター遺伝子の発現を誘導することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Arbuscular mycorrhizas are formed between more than 80% of land plants and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Certain bacteria living on spores and hyphae of AM fungi promote mycorrhizal development and functioning and are therefore called mycorrhiza helper bacteria (MHB). The underlying mechanisms involve the production of growth factors that might stimulate spore germination, hyphal growth, and root receptiveness to the fungus. However, little is known about active principles responsible for the helper effects exerted by MHB. In this study, we found that bacterial siderophores stimulated AM fungal growth and induced a putative siderophore-iron transporter gene, SIT2, in an AM fungus *Rhizophagus irregularis*.

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 菌根ヘルパーバクテリア N-アシルモノセリンラクトン シデロフォア

1. 研究開始当初の背景

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。

AM 菌の菌体表面には AM 菌の植物根への感染・共生を助ける働きを持つ特定の細菌が付着していることが古くから知られている。これら細菌は菌根ヘルパー細菌 (mycorrhiza helper bacteria, MHB) と呼ばれ、菌根形成に極めて重要な役割を果たしている。これまでに MHB として *Pseudomonas* などのグラム陰性プロテオバクテリアをはじめ、種々のグラム陽性細菌や放線菌が報告されている。自然生態系では植物-AM 菌-細菌 (MHB) の三者の相互作用により効率的な菌根形成や高い共生機能が実現されていると考えられている。植物-AM 菌間についてはそれぞれストリゴラクトンと (リポ) キトオリゴ糖が共生シグナルとして機能することが明らかになっている。[Akiyama *et al.*, *Nature* (2005), Mailliet *et al.*, *Nature* (2011)]。しかし、MHB については AM 菌の胞子発芽や菌糸伸長の促進、植物の菌根感受性を高めることにより菌根共生を促進していると考えられているが、これらの作用を示す MHB 由来の菌根共生促進物質はこれまでに明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、MHB の生産する菌根共生促進物質を単離・同定すると共に、その作用機序の解析を行う。MHB との共培養や培養濾液処理によって AM 菌の胞子発芽や菌糸伸長、菌根形成などが促進されることがこれまでに多数報告されている。これら MHB の培養産物中に含まれる菌根共生促進物質をバイオアッセイにおける活性を指標に精製・単離し、その化学構造を明らかにする。また、最近、細菌の生産するクオラムセンシング分子であるアシルホモセリンラクトン (*N*-acyl homoserine lactone, AHL) が AM 菌の胞子発芽や菌根形成を促進するという特許が公開された (WO2013034621 A1)。MHB には AHL を生産する菌が数多く含まれているが、MHB の菌根形成促進能における AHL の寄与についてはこれまでに調べられていない。よって、菌根形成促進物質の同定と並行して、MHB の生産する AHL の菌根形成に対する寄与も精査していく。さらに植物における共生関連遺伝子の発現解析も行い、MHB の菌根形成促進の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) MHB の生産する菌根共生促進物質の

同定

AM 菌からの MHB の単離
最も代表的な AM 菌である *Gigaspora margarita* の胞子を滅菌水で軽く洗浄した後、再び滅菌水に懸濁し、超音波処理することで胞子表面に存在する細菌を水中に遊離させる。この懸濁液を細菌分離用の寒天平板培地に塗布し、一定時間培養して発生する細菌コロニーを釣菌することで AM 菌表面に付着している細菌を単離する。得られた MHB について 16S rRNA 配列分析により菌株を同定する。

MHB の生産する AM 菌生育促進物質の単離・同定

MHB を培養し、菌体および培養濾液を得る。それぞれについて適当な抽出、溶媒分画操作を行った後、それぞれの画分について、これまでに既に確立している *G. margarita* や *Rhizophagus irregularis* の胞子を用いた *in vitro* 系でのバイオアッセイにより AM 菌に対する胞子発芽、菌糸伸長・分岐誘導活性を評価し、活性物質が含まれる画分を特定する。活性物質の生産性を向上させるために条件検討を行って培養条件を最適化した後に大量培養を行う。バイオアッセイにおける活性を指標に各種クロマトグラフィーにより活性物質を精製・単離する。単離した活性物質について NMR や MS 分析により構造解析を行い、化学構造を決定する。

(2) MHB の生産する AHL の菌根共生に対する効果の解析

MHB の生産する AHL の同定

1. で単離された MHB のうち、グラム陰性プロテオバクテリアについて、1. に準じて培養を行い、それらが生産している AHL をこれまでに既に確立している GC-MS や NMR による分析法とレポーターアッセイを用いて同定する。

MHB の生産する AHL の有機合成

一般に細菌によって生産される AHL は微量であり、精製には多段階のクロマト精製が必要となる。AHL は塩基存在下でホモセリンラクトン塩酸塩とアシルクロライドとを反応させることで容易に合成できるので、MHB で同定された AHL を有機合成により大量調製し以後の実験に用いる。

AHL の AM 菌の生育に及ぼす効果の検討

AHL の AM 菌の生育に及ぼす影響についてはこれまでにほとんど報告例がない。よって、前項で合成した AHL について 1. の *in vitro* バイオアッセイを用いて AM 菌に対する胞子発芽、菌糸伸長・分岐誘導活性を評価する。

4. 研究成果

(1) MHB の生産する AHL の同定と AHL の AM 菌生育促進活性の評価

AM 菌 *Gigaspora margarita* の胞子を滅菌水で軽く洗浄した後に、再び滅菌水に懸濁し、超音波処理することで胞子表面に付着しているバクテリアを水中に遊離させた。この懸濁液を R2A 寒天培地に塗布し、30°C で培養した。発生したバクテリアのコロニーを培養し、AHL のレポーター株である *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 株を用いたペーパーディスクアッセイにより AHL 生産菌の単離を試みた。ほとんどの菌株が継代培養により AHL 生産能を失ったが、安定して AHL を生産する菌株を数株単離することに成功した。これらの中で最も AHL 生産性の安定していた TM-29 株と TM-M3 株について 16S rDNA 塩基配列解析を行い、それぞれ *Sphingomonas changbaiensis* に近縁の *Sphingomonas* sp. 及び *Agrobacterium tumefaciens* と同定した。

TM-29 株を R2A 液体培地で大量培養した後、培養濾液を酢酸エチルで抽出し、得られた抽出物について AHL 活性を指標としてシリカゲルオープンカラム、シリカゲル、ODS 及びフェニル HPLC カラムを用いて精製し、2 つの AHL 活性物質を単離した。¹H-NMR 及び MS 解析を行ったところ、これら AHL は 3-hydroxyoctanoyl-HSL(3-HO-C8-HSL) の立体異性体と推定された。そこで、DMT-MM を縮合剤とした L-HL と(±)-3-hydroxyoctanoic acid とのカップリング反応により標品を合成し、LC-MS 分析による比較を行ったところ、完全に一致した。さらに、キラル HPLC-MS 分析によりこれら AHL の絶対立体配置を(3*R*)-HO-C8-L-HSL と(3*S*)-HO-C8-L-HSL と決定した。同様に TM-M3 株の生産する AHL の単離同定を行った結果、本菌株が(3*R*)-及び(3*S*)-HO-C8-L-HSL に加えて、3-HO-C12-及び 3-HO-C14-HSL を生産していることが分かった(図 1)。二つの 3-HO-C8-L-HSL について AM 菌 *G. margarita* に対する菌糸分岐誘導活性を調べたところ、活性を示さなかった。

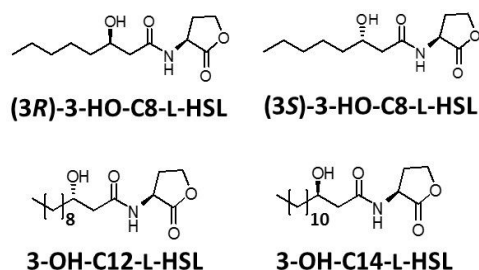


図 1. TM-29 株及び TM-M3 株の生産する AHL

(2) MHB の生産する AM 菌生育促進物質の同定

TM-29 株及び TM-M3 株の培養濾液酢酸エチル抽出物を AM 菌である *G. margarita* に処理したところ、明瞭な菌糸分岐を誘導した。そこで、これら菌株の生産する菌糸分岐誘導物質を単離することとした。はじめに比較的明瞭な菌糸分岐誘導を示した TM-29 株について、その活性物質の精製をバイオアッセイの活性を指標に行うことにした。TM-29 株の培養濾液酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、溶媒分画及び HPLC によって精製することで目的物を単離した。本化合物について LC-MS 分析を行ったところ、分子量の一致からシデロフォアであるエルシニアバクチンと推定された。そこで、*A. tumefaciens* の生産するシデロフォアはアグロバクチンであることがすでに明らかにされていたので、TM-M3 株からは菌糸分岐誘導候補物質としてアグロバクチンを単離し、*G. margarita* に処理したところ顕著な菌糸分岐活性が見られた(図 2)。TM-29 株の生産する活性物質の化学構造を決定するために、大量培養により活性物質を 1.2 mg 単離し、¹H-NMR に供したところスペクトルデータはエルシニアバクチンのものとは一致しなかった。最終的に、この活性物質が脂肪族化合物であることまでは分かったが、その化学構造を決定することはできなかった。

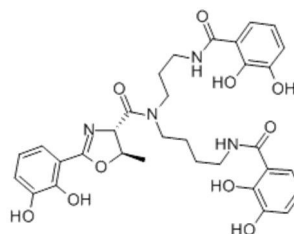


図 2. TM-29 株から AM 菌生育促進物質として単離したバクテリアシデロフォア・アグロバクチン

アグロバクチンのように AM 菌の生育を促進する微生物由来のシデロフォアの報告例を検索したところ、2008 年の酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* からのロドトルラ酸の単離の一例のみであった。MHB を含む植物根圏に生息するバクテリアの多くがシデロフォアを生産していることが分かっており、これらシデロフォアに対する AM 菌の生育応答に興味を持たれた。そこで、代表的な MHB として知られる *Pseudomonas fluorescens* の生産するシデロフォアであるピオベルジン(PVD) が AM 菌の生育応答を誘導するのかを調べることにした。また、植物の根からはムギネ酸などのシデロフォアが分泌されているので、これらの植物シデロフォアについても AM 菌の生育応答を調べた。まず、*P. fluorescens* の培養濾液から PVD を CAS アッセイにおける活性を指標に単離した。さらに既知の合成法に従い、ニコチアナミン及び 2'-デオキシムギネ

酸を合成した(図3)。これらのシデロフォアを *G. margarita* に処理したところ、アグロバクチン及びニコチアナミンにおいて菌系分岐が誘導されたが、PVD や 2'-デオキシムギネ酸では活性が見られなかった。さらに Fe(III)-EDTA についても菌系分岐活性を調べたところ、菌系分岐は誘導されなかった。このことより、*G. margarita* に対するシデロフォアの菌系分岐活性は鉄によるものではないことが示唆された。さらにもう一つの代表的な AM 菌である *Rhizophagus irregularis* においてもシデロフォアに対して生育応答を示すのかを調べた。その結果、アグロバクチン及びニコチアナミンで処理したプレートでは局所的な菌系分岐が誘導され、次世代胞子形成も観察された。しかし、PVD を処理した場合においては AM 菌の生育に顕著な変化は認められなかった。これらの結果から、AM 菌が特定のシデロフォアに対して生育応答を示すことが考えられた。

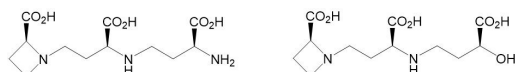


図3. 植物シデロフォア・ニコチアナミン(左)と2'-デオキシムギネ酸(右)

次にシデロフォアに対する *R. irregularis* の遺伝子応答について調べることとした。*R. irregularis* のゲノムには3つのシデロフォア鉄錯体トランスポーター(siderophore-iron transporter) 遺伝子ホモログ *SIT1*, *SIT2*, *SIT3* が存在することが分かっている。そこで、バクテリア及び植物シデロフォアで処理した *R. irregularis* でのこれら遺伝子の発現解析を行った。その結果、PVD を処理した場合にはすべての *SIT* 遺伝子について発現誘導は起こらなかったが、アグロバクチン及びニコチアナミンでは *SIT2* の発現量が高くなっていた(図4)。AM 菌が生育応答を示す特定のシデロフォアに対して *SIT2* の発現が誘導されていることから、*R. irregularis* が *SIT2* を介して特定のシデロフォアを菌体内に取り込む機構が存在する可能性が示唆された。

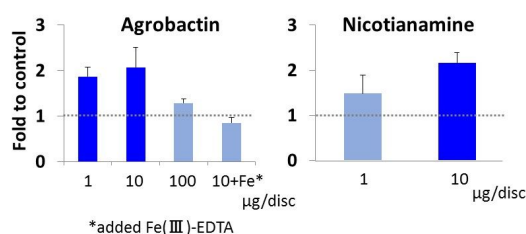


図4. アグロバクチン及びニコチアナミンによる *SIT2* 遺伝子の発現誘導

以上の研究から、AM 菌は外生菌系からバクテリアシデロフォアを取り込むだけでな

く、内生菌系からも植物シデロフォアを菌体内に取り込むことで鉄を獲得する機構を持つ可能性が示唆された。シデロフォアによるバクテリアからの鉄供給が菌根形成促進に寄与するかどうか今後検討していく必要がある。

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0件)

[学会発表](計3件)

三宅智、甲斐建次、秋山康紀、AM 菌から分離した AHL 生産細菌に由来する菌系分岐誘導物質、植物微生物研究会第25回研究交流会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2015年9月14日~16日

三宅智、甲斐建次、秋山康紀、AM 菌から分離した AHL 生産菌に由来する菌系分岐誘導物質、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、北海道札幌市、2016年3月28日~30日

三宅智、甲斐建次、秋山康紀、バクテリア及び植物シデロフォアに対する AM 菌の生育および遺伝子応答の解析、植物微生物研究会第26回研究交流会、東北大学片平さくらホール、宮城県仙台市、2016年9月07日~09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

<https://kai1372.wixsite.com/npclab>

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

(2)研究分担者

甲斐 建次 (KAI, Kenji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号：40508404