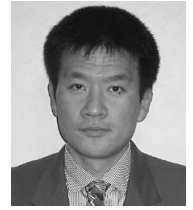


《農芸化学奨励賞》



アーバスキュラー菌根共生における共生制御物質に関する研究

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 助手 秋山 康 紀

「菌根」とは菌類と植物根との共生形態であり、菌根を形成する菌類を菌根菌と呼ぶ。アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi; AM 菌) は 80% 以上もの陸上植物と共生する自然生態系で最も広く見られる菌根菌である (図 1)。AM 菌のルーツは古く、植物が陸上に進出した約 4 億 6 千万年前とされる。本菌は皮層細胞内に樹枝状体 (arbuscule) と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名が付けられている。AM 菌は宿主植物にリン酸を供給する有用微生物であり、農業生産や自然生態系において極めて重要な役割を果たしている。このため、植物生産への利用など応用研究が盛んに行われている。一方、AM 共生の分子機構に関する基礎的研究は遅々として進んでいない。これは AM 菌が菌単独ではほとんど生育しない絶対共生菌であり、実験生物としては取り扱いが極めて難しいからである。しかし、約 10 年前にマメ科モデル植物が登場して以来、遺伝子レベルでの共生分子機構の解明は急速な進

歩を見せている。その一方で、AM 菌と植物との相互認識にかかわるシグナル物質や共生制御物質は依然としてほとんど明らかになっていない。本研究では、天然物化学的な手法を用いて、植物由来の共生制御物質を単離同定することを目的として研究を行った。

1. 共生により増加するキュウリ新規五環性トリテルペノイドの単離

AM 菌 *Glomus caledonium* を接種したキュウリ根の酢酸エチル抽出物について HPLC および TLC 分析を行い、共生経時的に増加する三つのテルペノイドを見いだした。これらを精製・単離し、構造解析を行った結果、新規五環性トリテルペノイド 2β -hydroxybryonolic acid と 3β -bryoferulic acid, そして既知トリテルペン bryonolic acid と決定した (図 2)。Bryonolic acid はウリ科植物の根に広く存在することが報告されており、二つの新規トリテルペノイドは bryonolic acid を前駆体として生合成されると考えられた。これら三つの化合物の増加は他の AM 菌 *G. mosseae* によっても誘導されたが、病原真菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* では起こらなかった。 2β -Hydroxybryonolic acid はメロンやスイカの根からも単離され、キュウリ同様、これらの根でも *G. caledonium* との共生によって増加することがわかった。このことから AM 共生における bryonolic acid とその生合成関連化合物の増加はウリ科植物に共通の現象であることが示唆された。

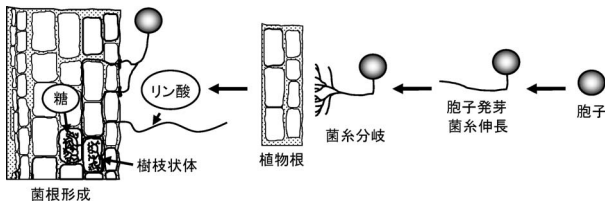


図 1 アーバスキュラー菌根菌と植物との共生

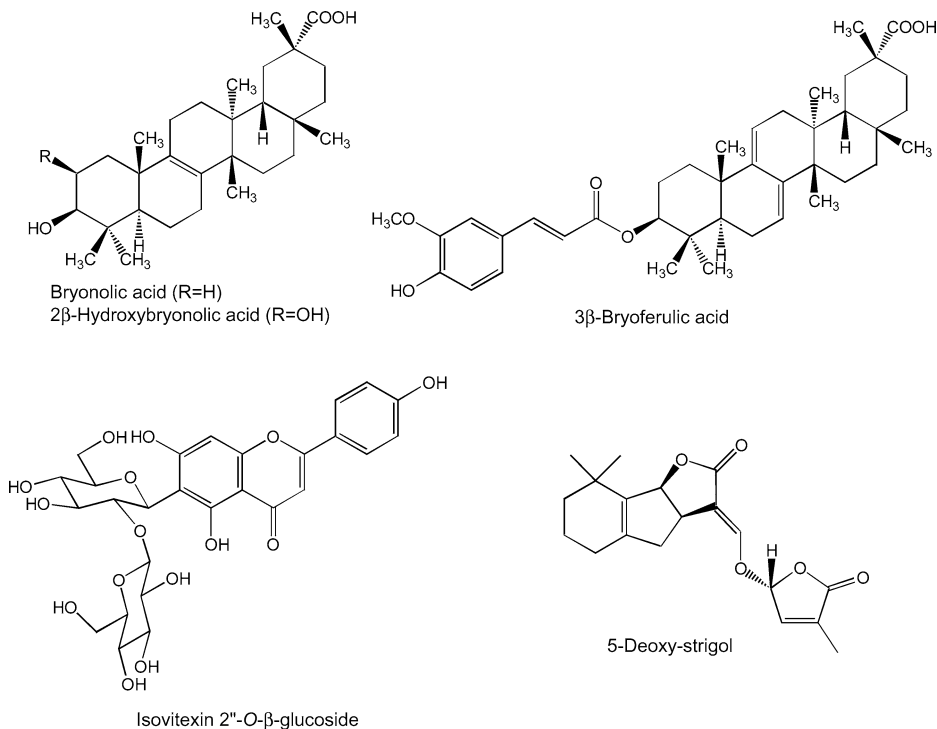


図 2 本研究で単離した植物由来の AM 共生関連物質

Bryonolic acid は動物や動物細胞に対して抗アレルギー活性や細胞毒性などの薬理活性を示すことが報告されているが、植物における機能は不明であり、AM 共生における役割や機能についても調べていく必要がある。

2. 菌根形成を促進するメロンフラボノイド配糖体の単離

低リン酸栄養条件下で AM 菌 *Glomus caledonium* を接種したメロン根の *n*-ブタノール抽出物について HPLC 分析を行ったところ、AM 菌非接種の対照区において顕著に増加し、AM 菌との共生により減少する化合物を見いだした。本化合物はリン酸施与によっても減少することから、この蓄積はリン酸欠乏によるものであることがわかった。これを精製・単離して構造解析を行い、既知フラボノイド配糖体 isovitexin 2''-*O*- β -glucoside (IG) と同定した (図 2)。低リン酸および高リン酸栄養条件下で生育させたメロンの根に IG を与えたところ、両栄養条件下で IG は *G. caledonium* による菌根形成を顕著に促進した。通常、高リン酸栄養条件下では植物は防御機構を誘導して菌根形成を抑制する。しかし、本条件においても IG 処理により低リン酸栄養条件下と同等の菌根形成が見られた。AM 菌が植物根に感染・共生する際、オキシダティブースト、すなわち急速な活性酸素の生成が起こることが観察されている。この活性酸素は防御機構を誘導するセカンドメッセンジャーとしても働く。IG は α -トコフェロールと同等の強い抗酸化活性を有することが報告されている。このことから IG はラジカルスカベンジャーとして働き、オキシダティブーストを抑制することにより防御機構の誘導を抑え、菌根形成を促進するのではないかと考えられた。本研究により、植物がリン酸栄養状態に応じて根内の抗酸化活性フラボノイド量を変動させてオキシダティブーストを調節することにより菌根形成を制御するという新たな仮説が提出できるかもしれない。

3. AM 菌の宿主認識シグナル物質 branching factor の解明

AM 菌の菌糸は宿主の根の近傍に達すると激しく分岐する。この菌糸分岐は非宿主であるアブラナ科やアカザ科などの植物では見られないことから、AM 菌の宿主認識反応であると見なされている。この形態変化は根から分泌される分子量 500 以下の脂溶性物質により引き起こされることがこれまでにわかってきた。本物質は branching factor (BF) と呼ばれ、その単離が試みられてきたが、これまでに成功した例はなかった。本研究では、AM 菌 *Gigaspora margarita* の発芽胞子を用いたペーパーディスク法による菌糸分岐アッセイを独自に開発し、マメ科モデル植物であるミヤコグサの根分泌物から世界に先駆けて BF の単離・構造決定に成功した。

ミヤコグサを低リン酸栄養条件下で水耕栽培し、水耕液を Diaion HP-20 カラムに通すことにより、水耕液中に分泌される BF を回収した。溶媒分画を行ったところ、BF は酢酸エチル可溶性中性物質画分に分配されたので、これを出発原料として精製を開始した。BF が化学的に不安定であったことから精製は難航したが、順相カラムを多用する精製スキームによって 9920 L の水耕液より調製した酢酸エチル可溶性中性物質画分 11 g からほぼ純粋な BF を約 8 μ g 単離することにまず成功した。その後さらに水耕液からの回収法や精製条件について検討してい

ったところ、水耕液を活性炭に連続的に循環吸着させることで、BF を選択的かつ多量に水耕液から回収できることがわかった。本法により、20 L の水耕液を 3 日間活性炭に循環吸着して得られた酢酸エチル可溶性中性物質画分から 2 ステップのカラム精製で完全に純粋な BF を 18 μ g 単離できた。スペクトル解析と化学合成により BF をストリゴラクトン (SL) の一種である 5-deoxy-strigol (5-DS) と同定した (図 2)。SL は強毒雑草であるストライガやオロバンキなど根寄生雑草の種子発芽刺激物質として単離されていたセスキテルペンであり、植物界に広く存在することがわかっている。5-DS は既知 SL である strigol の合成誘導体として報告されていたが、天然から単離されたのはこれが初めてである。5-DS は pg レベルで菌糸分岐を誘導した。既知 SL である sorgolactone, strigol, そして合成アナログである GR24 も ng から pg レベルで菌糸分岐を誘導した。以上より、AM 共生における宿主認識シグナル物質 BF は、根寄生雑草の種子発芽刺激物質としてすでに単離されていた SL であることが明らかになった。

4. おわりに

AM 菌は絶対共生菌であるがために、研究として成立するレベルの実験系を構築すること自体に高い障壁がある。これがこの分野への研究者の参入を阻み、他の植物-微生物間相互作用の研究に比べて大きく遅れる原因となっていた。しかし、逆の見方をすれば、学問としてすでに成熟の域に達している天然物化学に身をおく一研究者にとって、21 世紀に入ってもなお極めて重要な化学因子が未解明なまま残されていること自体希有であり、ある意味でありがたいことであった。本研究では植物側の共生制御物質を対象にした。次のターゲットは AM 菌の生産する共生シグナル物質である。このシグナル物質は Myc factor と呼ばれ、その単離同定が待たれている。植物側のシグナル物質 branching factor については世界に先駆けて明らかにすることができた。Myc factor についても農芸化学出身の天然物化学者として世界に先駆けたいと思っている。

本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科環境資源化学講座 (旧 農学生命科学研究科生理活性物質化学研究室) で行われたものであります。研究の機会を与えていただき、終始ご指導ご鞭撻賜りました林 英雄教授に深く感謝いたします。講座・研究室スタッフとして協力いただいた藤田智之助教授、そして共に研究に励んでくれた卒業生、学生の皆様に心より御礼申し上げます。学生時代より現在に至るまで常に厳しくも温かく見守ってくださった大阪大学教授・小林昭雄先生と岡山大学名誉教授・河津一儀先生に厚く御礼申し上げます。貴重なサンプルや助言をいただいた宇都宮大学・米山弘一教授と神戸大学・杉本幸裕教授に感謝いたします。また、生物学者としての視点から忌憚のない助言をいただいた農業生物資源研究所上席研究官・川崎信二先生と東京大学・川口正代司助教授に深く感謝いたします。AM 菌を供与していただいた出光興産とセントラル硝子株式会社の関係者の方々に御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長・清水 昌先生ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。