

## 研究終了報告書

### 「新規植物分子による AM 菌培養技術の開発と共生制御の解明」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:亀岡 啓

#### 1. 研究のねらい

化学肥料の使用を低減する栽培技術の一つとして、作物へのアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) 接種が注目されている。AM 菌は植物と共生し、植物から糖や脂質などの炭素源を受け取る代わりに、植物へリンや窒素などの無機栄養を与える。AM 菌はすでに農業資材として販売されており、低施肥条件下で AM 菌接種により収量が増加する例も数多く報告されている。しかし、AM 菌は単独では増殖できず、宿主植物に共生させて培養する必要があるため AM 菌資材の生産コストが高い。そのため、現状では AM 菌の農業利用は限定的である。

研究代表者らは、特定の脂肪酸を用いることで AM 菌を単独培養できることを見出した。パルミトレイン酸とミリスチン酸が AM 菌の孢子形成を誘導することを発見し、さらに、これらの脂肪酸に誘導された孢子を植物への接種に利用できることを示した (Kameoka *et al.*, 2019. *Nat. Microbiol.*; Sugiura *et al.*, 2020. *PNAS*; Tanaka *et al.*, 2022. *Commun. Biol.*)。この発見は AM 菌培養のブレイクスルーとなり得る重要な新技術である。ただし、植物に共生させた場合に比べて培養効率が著しく低いという点が実用化に向けた課題となっている。

研究代表者は、AM 菌の単糖トランスポーター *MONOSACCHARIDE TRANSPORTERT2* (*MST2*) が単独培養時の菌糸ではほとんど発現しないことを見出し、さらに、イネ抽出物中に *MST2* の発現を誘導する低分子化合物 (以下、*MST2* 誘導因子と呼ぶ) が含まれることを発見した。この結果から申請者は、1. *MST2* 誘導因子によって *MST2* の発現を誘導することにより単独培養での生育が改善する、2. *MST2* 誘導因子は AM 菌内生菌糸での共生遺伝子発現を誘導する、という仮説を立てた。

そこで、本課題では *MST2* 誘導因子と *MST2* 誘導因子の生合成関連遺伝子を同定し、作業仮説 1, 2 を検証することを目指した。*MST2* 誘導因子を用いて AM 菌単独培養系の培養効率改善を目指した。また、*MST2* 誘導因子とその生合成関連遺伝子の解析から、共生における *MST2* 誘導因子の機能解明を目指した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本課題ではまず *MST2* 誘導因子と *MST2* 誘導因子の生合成関連遺伝子の同定を目標としていたが、研究の進捗状況を踏まえ、まずは *MST2* 誘導因子の単離に注力した。

まず、AM 菌の植物抽出物応答アッセイ系の確立した。AM 菌の培養や化合物の処理条件を検討し、安定して応答を観察できる条件を決定した。さらに、抽出ソースを検討し、イネ実生を用いることにした。

次に、植物抽出物に対する AM 菌の応答の全容を把握し、MST2 誘導因子の MST2 発現誘導以外の効果を推測するために、確立した系を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、抽出物処理が AM 菌の炭素・窒素代謝を活性化することが示唆された。また、酸化ストレス応答に関連するとみられる遺伝子が多く誘導されていた。

確立した系を用いて、イネ抽出物を精製したところ、2 つの画分から活性が検出された。そのうち一つの画分に含まれる活性物質として、Dibutyl Phthalate (DBP)を単離した。DBP は植物由来の化合物ではなく、プラスチック製品の可塑剤として用いられている化合物である。現時点でこの結果から MST2 発現誘導の生物学的意義を見出すことは難しい。一方で、DBP は工業的に生産されている化合物なので安価であるため、DBP が AM 菌の生育を促進できれば応用的には有用である。現在、DBP を含んだ培地で AM 菌を培養しており、効果を検証中である。また、もう一方の画分に含まれる化合物も植物由来でないことが判明した。しかし、これらの化合物以外に、確かに植物由来の化合物が MST2 の発現を誘導することも確認した。今後、この画分をさらに精製し、活性分子を単離する予定である。

また、MST2 誘導因子の単離と並行して、同さきがけ領域の村上慧准教授のグループとの共同研究として、MST2 誘導因子とは別の作用機序で AM 菌の培養効率を上げ得る化合物を探索した。同グループが作製した化合物 51 種を処理して AM 菌を培養すると、そのうち構造の類似した 2 種の化合物が菌糸に瘤状の構造を誘導した。しかし、AM 菌の生育や孢子形成を促進する化合物は得られなかった。

現時点では AM 菌単独培養系の培養効率改善の検証や共生における MST2 誘導因子の機能解析を行っていないが、引き続きこれらの研究を行っていく予定である。

## (2) 詳細

### 1. 植物抽出物応答のトランスクリプトーム解析

植物抽出物に対する AM 菌の応答の全容を把握し、MST2 誘導因子の MST2 発現誘導以外の効果を推測するためにトランスクリプトーム解析を行った。RNA-seq ライブラリーの作成は、龍谷大学の永野惇教授のグループとの共同研究として実施した。同グループが開発した Lasy-seq (Kamitani *et al.*, 2019. *Sci. Rep.*)は多サンプルのライブラリー作製を低コストで行うことができる。

植物抽出物処理は、脂肪酸処理や糖処理とは異なるトランスクリプトーム応答を誘導することが明らかになった(図1A)。抽出物の処理/非処理を比較すると、約 700 の遺伝子が有意に発現変動していた(図1B)。これらの遺伝子の中には MST2 に加えて窒素同化経路の遺

伝子が多く含まれていた(図1C)。この結果は、抽出物処理がAM菌の炭素・窒素代謝を活性化することを示唆している。また、GO解析から、酸化ストレス応答に寄与するとみられる遺伝子が多く誘導されることが明らかになった。*MST2* や窒素代謝関連遺伝子の誘導と酸化ストレス応答の関連も今後検証する予定である。

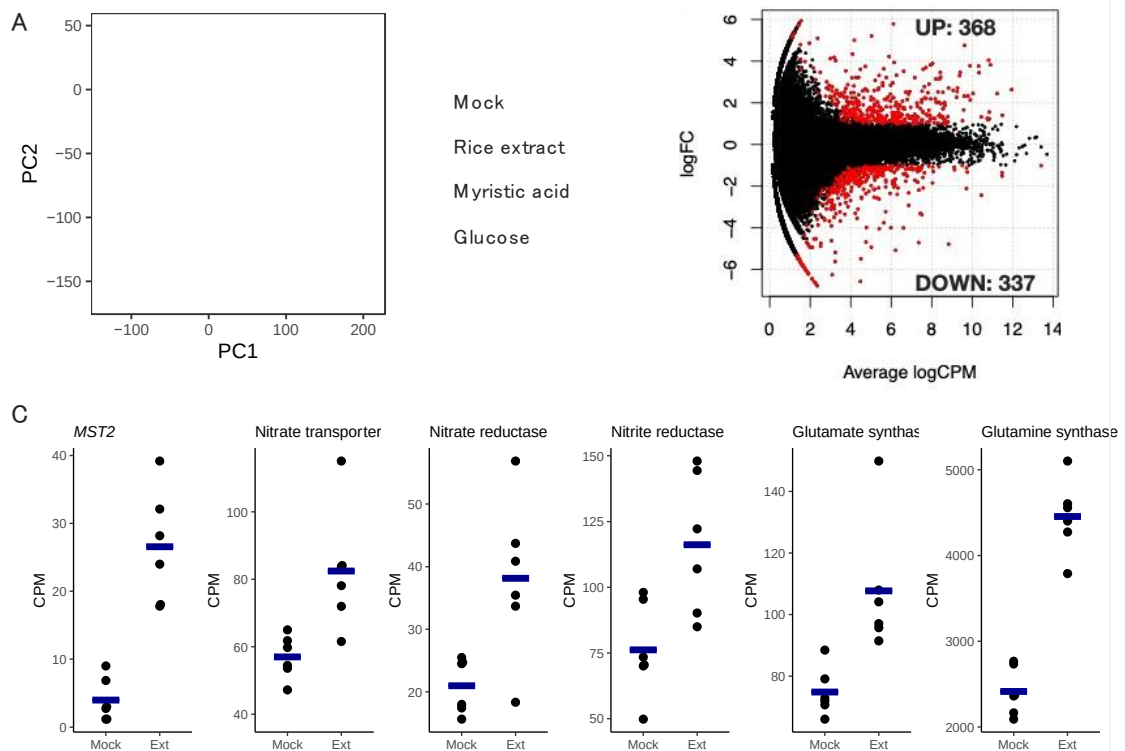


図1. 植物抽出物に対するAM菌のトランスクリプトーム応答

A. イネ抽出物、ミリスチン酸、グルコース処理をしたサンプル間のPCA解析。抽出物処理は脂肪酸や糖の処理とは異なる応答を誘導した。B. 抽出物処理による遺伝子発現変動。約700の遺伝子が発現変動した。C. 抽出物処理によって発現誘導される遺伝子。窒素同化経路の遺伝子の発現が誘導されていた。

## 2. *MST2* 誘導因子の精製

イネの実生をメタノールで抽出し、水-酢酸エチルで分液すると酢酸エチル画分に活性が見られた。また、抽出物を酸性・アルカリ性溶液を用いて酸性・中性・塩基性の化合物を含む画分に分画すると、すべての画分に活性が見られたが塩基性化合物を含む画分が最も強く *MST2* の発現を誘導した。そこで、塩基性化合物を含む画分をシリカゲルカラムに供し、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (+1%酢酸) 20%ステップワイズ、次いでメタノール/酢酸エチル (+1%酢酸) 20%ステップワイズで溶出すると、20%酢酸エチル/*n*-ヘキサン画分(以下 Fr. A)と40%メタノール/酢酸エチル画分(以下 Fr. B)に活性が見られた。

Fr. Aをさらに逆相HPLCで分画すると、*Rt* 13 minに検出される単一のピークに活性が見られた(図 2A, B)。このピークを LC-MS/MS で分析すると、含まれている化合物は dibutyl

phthalate (DBP)であることが判明した(図 2C)。DBPは植物由来の化合物ではなく、プラスチック製品の可塑剤として用いられている化合物である。化学合成された市販の DBP を AM 菌に処理しても活性が見られたことから、同じ画分に含まれる別の物質ではなく、DBP 自体が活性をもつことが示された(図 2D)。抽出や分画の過程を植物を用いずに行っても 20%酢酸エチル/*n*-ヘキサン画分に活性が見られたことから、溶媒やプラスチック製品から混入した DBP が MST2 の発現を誘導したことが示唆された(図 2D)。

そこで、植物由来の化合物は MST2 の応答を誘導しないのか確認した。植物を用いない抽出・分画の操作で、40%メタノール/酢酸エチル画分にも活性が見られたことから、この画分に含まれる化合物も植物由来ではないと考えられた(図 2E)。しかし、植物抽出物を分液した酢酸エチル画分と、同様の操作を溶媒のみで行った際の酢酸エチル画分を比べると、植物抽出物を含む画分から著しく強い活性がみられた(図 2F)。今後、この画分をさらに精製し、活性分子を単離する予定である。

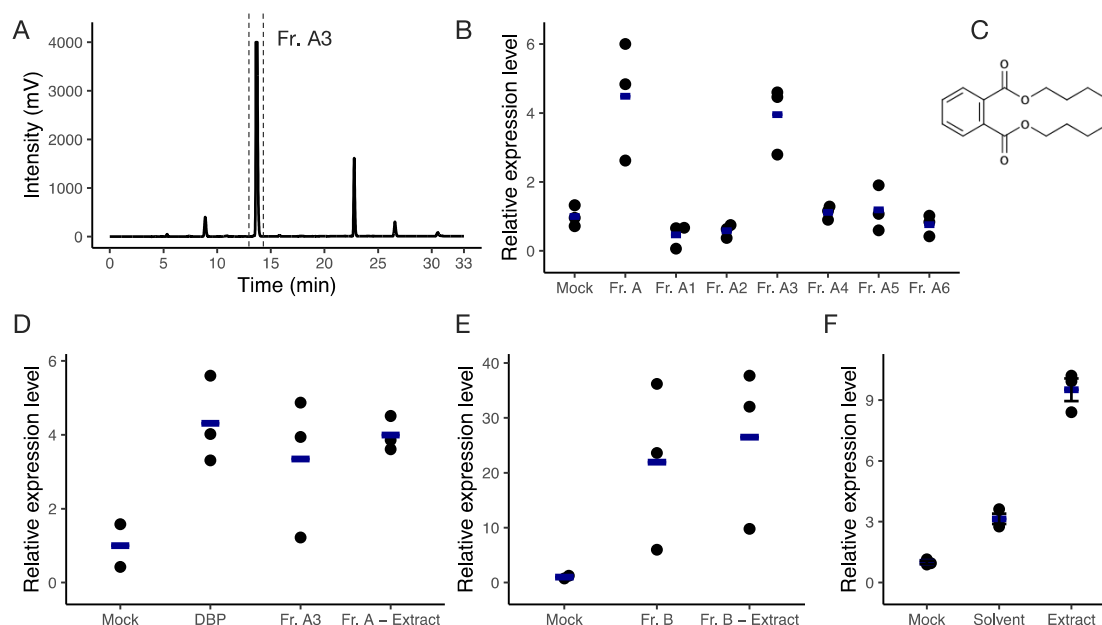


図2. MST2誘導因子の精製

A, B 逆相HPLCによるFr. Aの分画(A)と、その各分画のMST2誘導活性(B)。Fr. A3の化合物がMST2の発現を強く誘導した。C. Dibutyl phthalate (DBP)の化学式。Fr. A3に含まれていた。D. DBPとFr. Aに含まれる不純物によるMST2誘導活性。DBPがMST2誘導活性を示した。また、植物を用いずに同様の抽出・分画操作を行うと、Fr. Aと同じ画分に活性が見られた。E. Fr. Bに含まれる不純物によるMST2誘導活性。同様に、Fr. Bと同じ画分からも不純物由来の活性が見られた。F. 植物抽出物を分液したEtOAc画分と同様の操作をした溶媒の比較。抽出物が顕著に高い活性を示した。

### 3. DBP を用いた AM 菌培養

DBP が MST2 の発現を誘導することが明らかになったので、脂肪酸培養における DBP の効果を検証した。脂肪酸培地に DBP を加えて AM 菌を培養すると、AM 菌は通常より太く枝分かれの少ない菌糸を形成した。これは、植物と共生中の菌糸と共通する特徴である。しか

し、少なくとも現在の条件では、顕著な孢子形成や生育の促進はみられなかった(図 3)。

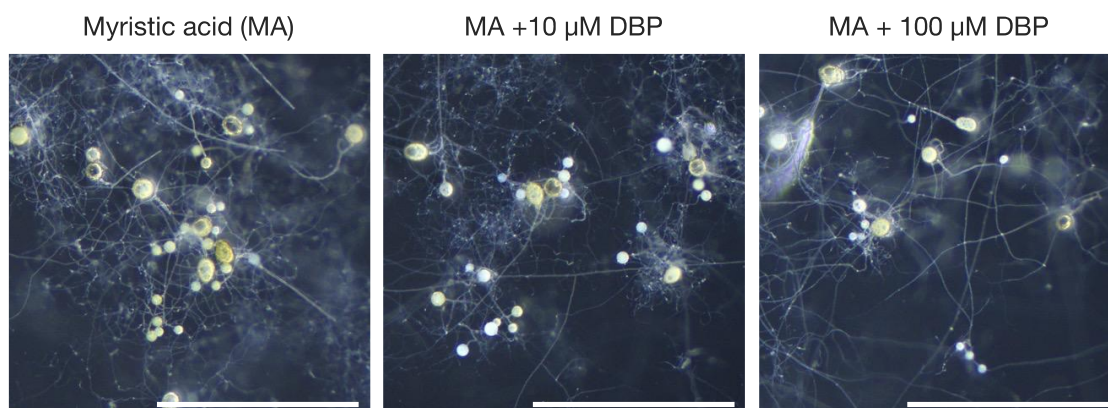


図3 DBPのAM菌培養への影響  
ミリスチン酸を含む培地に0, 10, 100  $\mu$ MのDBPを加えてAM菌を2ヶ月間培養した。DBPは太く分岐の少ない菌糸を誘導したが、少なくとも現在の条件では、顕著な孢子形成や生育の促進はみられなかった。

#### 4. AM 菌培養効率を上げる化合物の探索

MST2 誘導因子の単離と並行して、MST2 誘導因子とは別の作用機序で AM 菌の培養効率を上げ得る化合物を探索した。同さがけ領域の村上慧准教授のグループが作製した化合物 51 種を処理して AM 菌を培養すると、そのうち構造の類似した 2 種の化合物が菌糸に瘤状の構造を誘導した(図 4)。しかし、AM 菌の生育や孢子形成を促進する化合物は得られなかった。

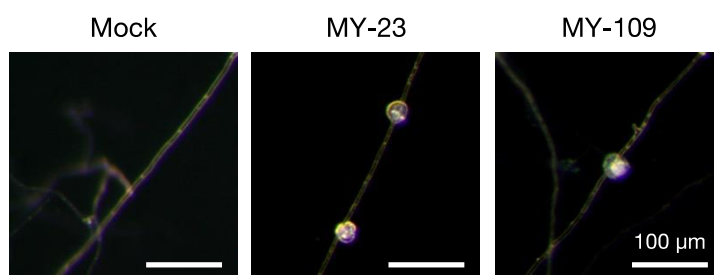


図4 化合物のAM菌培養への影響  
村上准教授のグループが作製した2種の化合物がAM菌に瘤状の構造を誘導した

#### 3. 今後の展開

今後はまず、植物由来の活性分子と、植物由来ではないもうひとつの活性分子の単離を目指す。そして、DBP とともに、この活性分子による AM 菌生育促進効果の検証を行う。その後一年程度を目処に、さらに濃度や組み合わせなどの最適化を行う。顕著な生育促進効果が得られれば、企業等との共同研究により社会実装を目指し、数年後に資材生産を可能にすることを目指す。一方



で、DBP や植物由来の活性分子、植物由来ではないもうひとつの活性分子の処理への応答をトランスクリプトーム解析等により解析し、これらの応答の生物学的意義を探索し、3 年程度での論文文化を目指す。

#### 4. 自己評価

本研究ではまず、① *MST2* 誘導因子の単離と構造決定、② *MST2* 誘導因子生合成関連遺伝子の同定を目指し、次いでこれらの結果を基に、③ *MST2* 誘導因子による単独培養の効率改善、④ 共生における *MST2* 誘導因子の機能の解析を目標としていた。研究の進捗状況を踏まえ、まずは①、②のうち①に注力したのは正しい判断だったと考えている。植物由来ではなかったが *MST2* の発現を誘導する化合物を一つ特定することに成功し、もう一つの化合物についても単離まであと一步のところまで研究を進めることができた。現時点では③の研究を開始したばかりで、④の研究は開始できていない。当初の計画よりは進捗が遅れてしまったことは反省点である。

研究実施体制や研究費執行は適切に行えたと考えている。必要最低限の機械と消耗品類を購入し、研究支援員を雇用することで、効率的に研究を進めることができた。海外への異動に際して一時期研究が滞ってしまったことが悔やまれるが、これは避けられない事態だったと考えている。

科学技術及び社会・経済への波及効果は現時点での評価は難しいが、将来的に大きな波及効果を生み得る成果を得られたと考えている。単離した DBP、もしくは精製中の化合物を用いる AM 菌培養によって培養効率が改善されれば、AM 菌培養コストを削減でき、農業での AM 菌利用を拡大できると考えている。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

|    |  |
|----|--|
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

|   |           |  |
|---|-----------|--|
| 1 | 発 明 者     |  |
|   | 発 明 の 名 称 |  |
|   | 出 願 人     |  |
|   | 出 願 日     |  |
|   | 出 願 番 号   |  |

|   |           |  |
|---|-----------|--|
|   | 概 要       |  |
| 2 | 発 明 者     |  |
|   | 発 明 の 名 称 |  |
|   | 出 願 人     |  |
|   | 出 願 日     |  |
|   | 出 願 番 号   |  |
|   | 概 要       |  |

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 総説

**Kameoka H, Gutjahr C (2022) Functions of Lipids in Development and Reproduction of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Plant Cell Physiol 63: 1356–1365**

#### 学会発表

亀岡 啓，筒井 一步，齋藤 勝晴，菊池 裕介，半田 佳宏，江澤 辰広，林 英雄，川口 正代司，秋山 康紀「生物間相互作用で働く化合物を利用した AM 菌培養系の開発」 日本農芸化学会 2021 年度大会 2021/03/19 招待講演

Hiromu Kameoka, Katsuharu Saito, Masayoshi Kawaguchi, Kohki Akiyama, “Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids” 第 94 回日本生化学会大会 2021/11/04 招待講演

亀岡 啓「植物分子によるアーバスキュラー菌根菌の制御」 第 63 回日本植物生理学会年会 2022/03/23 招待講演

Hiromu Kameoka “Plant-derived compounds that induce symbiotic responses in AM fungi” 6th International Molecular Mycorrhiza Meeting 2023/09/25 招待講演

亀岡 啓「植物分子でアーバスキュラー菌根菌を操る」 第 64 回日本植物生理学会年会 2022/03/17 招待講演