

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380042

研究課題名(和文)植物におけるもう一つの酸性環境適応戦略：微生物共生ネットワークの分子基盤

研究課題名(英文)An alternative strategy for adaptation to acidic soil in plants: molecular basis of symbiotic network with microorganisms

研究代表者

江澤 辰広 (Ezawa, Tatsuhiro)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40273213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：酸性土壌では根の伸長が阻害されることから、植物の生産性が低い。本研究では、微生物共生ネットワークが植物の酸性環境適応において果たす役割を明らかにする。植物がアーバスキュラー菌根菌(AM菌)との共生により酸性土壌において生存が可能となるのは、土壌酸性により傷害を受けた根に代わって、AM菌が提供する菌根経路からリン酸を吸収できるためであると考えられた。AM菌がリン酸を獲得する上で重要な役割を果たす遺伝子群をトランスクリプトームにより同定した。また、耐酸性AM菌が保持するウィルスの探索を行い、新規ウィルスを含めて4種類のウィルスを同定し、今後、宿主の耐酸性への関与を調べることとした。

研究成果の概要(英文)：Soil acidity inhibits plant root growth and thus constrains plant productivity. Acid-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi allow plant survival in acidic soil. The present study investigated the mechanisms underlying the enhancement of plant acid-tolerance by AM fungi. Acid-tolerant AM fungi provide an alternative pathway of phosphate uptake for the damaged roots. Genes involved in phosphate uptake and their expression in response to increased phosphate availability were demonstrated in an acid-tolerant fungus by transcriptome analysis. Four double-stranded RNA viruses were identified in an acid-tolerant fungus, of which a role in acid-tolerance of the host fungus will be investigated in the future.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 共生 菌類ウィルス 植物耐酸性 リン酸 dsRNA

1. 研究開始当初の背景

世界の陸地のおよそ 30%、農耕地の 50% は pH 5.5 以下の酸性土壌であると言われている。土壌酸性は植物(農作物)の生長(収量)の主要な制限因子であることから、植物の耐酸性メカニズムに関する研究が盛んに行われ、特に日本はこの分野において多くの先進的な成果を上げている。低 pH により可溶化する Al^{3+} の毒性に対する根の耐性は、 Al^{3+} をキレート/無毒化するリンゴ酸の分泌を担う *ALMT1* 遺伝子の発現量や原形質膜の 5-sterol 含量と相関が高いことが知られている。また、酸性土壌では Al^{3+} や Fe^{3+} と無機リン酸(Pi)が難溶性の塩を形成することから、Pi 欠乏対策も酸性環境に適応する重要な戦略である。事実、 Al^{3+} や Fe^{3+} をキレートする有機酸や有機態リン酸の分解を触媒するホスファターゼの分泌能は、低 Pi 耐性の重要な形質である。一方、アーバスキュラー菌根菌(AM 菌)は約 80%の陸上植物と共生関係を構築し、宿主から炭素源の供給を受ける代わりに、土壌中の Pi を濃縮して供給することから、植物の酸性環境適応において重要な役割を果たす菌類であることは容易に想像できる。

申請者はこれまで、硫化物を多量に含む母岩から生成する強酸性土壌(酸性硫酸塩土壌)のパイオニア植生と、そこに共生する AM 菌との相互依存関係に関する以下の調査・研究を通じて、植物には前述の酸性環境適応戦略とはまったく別の選択肢が存在するとの仮説を立てている。酸性硫酸塩土壌は最も劣悪な酸性土壌の一つであるが、この土壌では低 pH に起因する Al^{3+} など有害元素の他に、Pi などの必須養分の不足も植物の定着を制限する重要な要因である。

耐酸性 AM 菌: ススキは東アジアにおけるこの土壌の典型的なパイオニア植物であり、その Al^{3+} 耐性が高いことは良く知られているものの、pH 3.5 以下の酸性硫酸塩土壌では AM 菌との共生なしでは生存できない。別の実験から、強酸性土壌では Pi 施肥を行っても Al^{3+} による膜機能障害から、植物は根から Pi を吸収することができず、AM 菌は傷害を受けた根に代わって養分吸収を担っていると考えられた。また、我々が行った亜寒帯～亜熱帯に分布する酸性～中性土壌の AM 菌の生態調査から、強酸性土壌には限られた耐酸性の高い菌種のみが分布していることがわかっていく。

AM 菌の耐酸性と共生ウイルス: 植物に共生する菌類の中には、体内のウイルスが宿主植物に高度のストレス耐性を付与するものが存在する。AM 菌は人工培養できないため、これまでウイルスに関する知見は皆無であったが、我々は解放系ながら大量培養系を確立して、AM 菌ウイルス群のゲノム構造の決定に世界で初めて成功すると共に、耐酸性 AM 菌から高頻度にウイルスが検出されることを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、酸性硫酸塩土壌のパイオニア種であるススキをモデルに、植物-AM 菌-ウイルスの共生ネットワークの構築が酸性環境に適応するための植物の重要な戦略であるとの仮説について、以下の二点から検証する。i) 強酸性土壌における植物の定着は AM 菌の耐酸性に依存する。ii) AM 菌の耐酸性は菌自身の耐酸性だけでなく、特定のウイルスの感染にも関係する。

これまで、植物の環境耐性は、植物自身の持つ形質により規定されると考えられてきた。本仮説が実証されれば、植物自身では克服できない不良環境の下では、他の生物との共生により耐性形質を獲得する機構が存在することが明らかになり、その学術的意義は大きい。また、耐酸性に関わる共生微生物の生態や生理機能が明らかになれば、世界中で顕在化している酸性土壌の緑化修復や耕地化のための新たな技術シーズとなり得る。一方、ススキはその高い生産性と環境耐性から、次世代バイオ燃料用の作物として注目され、その選抜育種も始まっている。微生物共生が不良環境でのススキの生産性に大きく関わることが明らかになれば、その選抜目標の設定にも多大なインパクトを与えると予想される。

3. 研究の方法

耐酸性 AM 菌による植物耐酸性付与機構

酸性土壌では、 Al^{3+} が根の伸長を阻害することに加え、必須栄養素であるリン酸の欠乏により、植物の生長が大きく制限される。ススキは酸性土壌のパイオニア植物であり、耐酸性が強いことが知られているものの、pH 4 を下回る強酸性土壌への定着にはアーバスキュラー菌根(AM)菌との共生が必要である。しかし、ススキ AM 菌共生による強酸性土壌への適応機構はよく分かっていない。菌根形成した植物のリン酸吸収経路には、根表皮に局在するリン酸輸送体を介する「直接経路」に加え、皮層内の AM 菌樹枝状体周囲に局在する菌根特異的リン酸輸送体を介する「菌根経路」の二つが存在する。本研究では、強酸性土壌では、AM 菌が Al^{3+} により傷害を受けた根に代わるリン酸吸収経路を提供するとの仮説を立て、AM 共生がススキの生長と根の Al^{3+} 障害に及ぼす影響を評価すると共に、両経路を担うリン酸輸送体遺伝子群の発現制御機構から、AM 共生が強酸性土壌におけるススキの生存を支えるメカニズムを考察した。

pH 3.2 の酸性硫酸塩土壌、および石灰により pH 5.2 に調整した土壌にススキを播種し、0.5 mM KH_2PO_4 (P) を週に 30 mL 施用する区、酸性感受性 AM 菌である *Claroideoglomus etunicatum* H1-1 を接種する区、および耐酸性 AM 菌 *Rhizophagus clarus* RF1 を接種する区を設けて温室で栽培し、地上部と根を収穫した。

ススキのトランスクリプトームの塩基配列解読、相同性検索および発現解析から、直接および菌根経路を担うと予想されるリン酸輸送体遺伝子を同定し、それら遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量した。

耐酸性 AM 菌の遺伝子レパートリーの取得およびリン酸応答遺伝子の発現制御機構

AM 菌は、土壌から取り込んだ無機リン酸をポリリン酸として液胞内に大量に蓄積する能力を持つものの、それがどのようなプロセスにより行われるのかわかっていない。これまでに、取り込まれたリン酸は極めて迅速にポリリン酸に変換されること、ポリリン酸は ATP を直接の基質として合成されること、このとき K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} などのカチオンが同調的に吸収されることがわかっている。本研究では、ポリリン酸の大量集積に関与する遺伝子群を網羅的に同定し、ポリリン酸超集積のメカニズムを明らかにする。

ミヤコグサを用いたナイロンメッシュバッグ区画栽培法を応用し *Rhizosphaera* sp. HR1 株 (MAFF520076) の外生菌糸画分に 1 mM リン酸溶液を施与前および4時間後に菌糸約 0.5 – 1 g を収穫した ($n = 3$)。ここから RNA を抽出し、mRNA を精製後、Illumina HiSeq 2000 による RNA-Seq を行った。

耐酸性 AM 菌のウイルス探索

AM 菌の中には、植物へのミネラル供給を通じて、強酸性や有害金属汚染、乾燥などの環境ストレスに対する耐性を付与するものが存在する。一方、真菌に感染する二本鎖 RNA (dsRNA) ウィルスの中には、植物病原菌の病原性を減衰させたり、宿主であるエンドファイトを介して植物に耐熱性を与える例などが報告されているものの、AM 菌のウイルスに関する情報は皆無である。本研究では、耐酸性 AM 菌が保持するウイルスの探索を通じ、ウイルスの存在と宿主菌の耐酸性との関連を明らかにすることを最終目標としている。

ミヤコグサを宿主としたナイロンメッシュバッグ区画栽培法より得た耐酸性株 *R. clarus* RF1 (MAFF520086) の菌糸から dsRNA 画分を精製し、これを鋳型にランダムプライマーを用いた RT-PCR を行って、その塩基配列を Roche 454 Titanium により決定した。末端配列は 5'/3' RACE によって決定した。また、配列情報から設計した PCR プライマーにより、*in vitro* 培養系で得た孢子におけるウイルスの存在確認を行った。また、単孢子分離により、特定のウイルスのみが欠落した株を作成し、ウイルスが表現形質に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

耐酸性 AM 菌による植物耐酸性付与機構

pH 5.2 で栽培したすべてのススキは、Pi 施肥および接種菌株に関わらず持続的に生長

したのに対して、pH 3.2 では、処理に関わらず根端における Al^{3+} 集積と伸長阻害が認められ、耐酸性菌株 *R. clarus* RF1 を接種したススキ以外はすべて枯死した。植物体の地上部乾物重とリン濃度に相関があったことから、リン吸収量が生長を制限する要因であることが示唆された。樹枝状体周囲に局在し、菌根経路を担うと推定されるリン酸輸送体 *MsPT3* の発現量は、菌根形成で増加するものの、pH および菌種間差は認められなかった。また、*MsPT3* の発現量は、地上部リン濃度とは相関がなかったことから、その発現は本経路からのリン吸収量とは独立して、菌根形成の有無によって一義的に制御されていると考えられた。表皮に局在して直接経路を担うと推定される *MsPT2* の発現量は、菌根形成により pH 5.2 では減少したものの、pH 3.2 では減少しなかったこと、地上部リン濃度と負の相関が認められたことから、菌根形成とは独立して植物のリン栄養状態でその発現が制御されていると考えられた。以上の結果から、ススキが強酸性土壌においても耐酸性 AM 菌との共生によって生存可能になるのは、耐酸性 AM 菌が提供する菌根経路を介して必要なリン酸を吸収しているためであると考えられた (Kawahara *et al.*, *in preparation*)。

耐酸性 AM 菌の遺伝子レパートリーの取得および発現制御機構

RNA-Seq により得られた約 1.5 億リードの *de novo* アッセンブルから構築された 19,144 個の *Rhizosphaera* sp. HR1 遺伝子モデルからは、従来知られていたリン酸輸送体である H^+/Pi 輸送体の他に、 Na^+ 勾配を利用する Na^+/Pi 輸送体の遺伝子も検出された。また、ポリリン酸合成を担う vacuolar transporter chaperone 複合体、エネルギー代謝関連酵素群、原形質膜型カチオン輸送体、液胞膜型 H^+/K^+ , $/Na^+$, $/Ca^{2+}$ antiporter などをコードする多数の重要な遺伝子群を同定した。また、リン酸応答解析では、リン酸吸収からポリリン酸集積に至るプロセスに関与するリン酸輸送体、カチオン輸送体、ポリリン酸代謝関連酵素群、および pH 恒常性に関わる輸送体群の遺伝子が発現上昇するのに対し、エネルギー生成系の酵素群の遺伝子発現は変動しないこと、活性酸素消去系の遺伝子群の発現は低下することなどが明らかになった。AM 菌のリン酸吸収能力は、宿主植物へのリン酸供給の第一段階であり、このプロセスの分子機構をトランスクリプトームレベルで明らかにした意義は大きい (Kikuchi *et al.*, *in submission*)。

耐酸性 AM 菌のウイルス探索

dsRNA の増幅産物の網羅的塩基配列の決定により、*R. clarus* RF1 株からは4種類のウイルスの存在が予想された。最もサイズの小さいものは、全長 2,895 nt のゲノムに RNA 依存型 RNA ポリメラーゼ (RdRp) をコードする唯一の ORF を持つ *Mitovirus* 属ウイルスで

あったことから、*R. clarus* mitovirus1-RF1 と命名した (Kitahara *et al.*, 2014)。二番目に小さなものは、全長 4,557 nt のゲノムに、RdRp および構造タンパク質をコードした 2 つの ORF が存在しており、菌類ウイルスとしては報告例のないゲノム構造であった。また、これら遺伝子のアミノ酸配列に基づく系統解析を行ったところ、このウイルスは既知のいずれの属とも類縁性を示さない新規ウイルスであったことから、*R. clarus* medium virus-RF1 (RcMV-RF1) と命名した (Ikeda *et al.*, 2012)。他の 2 つのウイルスは全長が 10,000 nt 以上の巨大なもので、相同性検索から、一方は *Endornavirus* 属ウイルス、他方は *Megabirnavirus* 属ウイルスと推定された。これら 2 つウイルスについては、全長および末端配列は現段階で未決定である。

単胞子分離により、RcMV-RF1 が欠落した系統が得られたため、表現形質の解析に供した。各ウイルスに特異的なプライマーを設計して、それぞれ RT-PCR による検出を試みたところ、この系統は RcMV-RF1 以外のすべてのウイルスを保持していた。この RcMV-RF1 フリー系統は、RcMV-RF1 を保持している系統と比べて、宿主の生長促進能力に大きな差は認められなかったものの、RcMV-RF1 保持系統の 2 倍量の胞子を形成した (Ikeda *et al.*, 2012)。本研究により、AM 菌がウイルスを保持していることが世界で初めて示されると共に、これらウイルスが宿主菌の表現形質に影響を及ぼすことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Kitahara, R., Ikeda, Y., Shimura, H., Masuta, C., and Ezawa, T. (2014) A unique mitovirus from Glomeromycota, the phylum of arbuscular mycorrhizal fungi. *Archives of Virology*. (in press) (査読有り)

doi: 10.1007/s00705-014-1999-1.

Kawahara, A. and Ezawa, T. (2013) Characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities with respect to zonal vegetation in a coastal dune ecosystem. *Oecologia* 173: 533–543. (査読有り)

doi: 10.1007/s00442-013-2622-y

Cheng, Y., Ishimoto, K., Kuriyama, Y., Osaki, M., and Ezawa, T. (2013) Ninety-year-, but not single, application of phosphorus fertilizer has a major impact on arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Plant and Soil* 365: 397–407. (査読有り)

doi: 10.1007/s11104-012-1398-x

Ikeda, Y., Shimura, H., Kitahara, R., Masuta, C. and Ezawa, T. (2012) A novel virus-like double-stranded RNA in an obligate biotroph arbuscular mycorrhizal fungus: a hidden player in mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1005–1012.

(査読有り)

doi: 10.1094/MPMI-11-11-0288

Hijikata, N., Murase, M., Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M. and Ezawa, T. (2010) Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186: 285–289. (査読有り)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03168.x

田中淳・堀江直樹・江澤辰広・伴資英 (2010) 耐酸性菌根菌を活用した強酸性法面緑化適用の可能性. *日緑工誌* 36: 119–122. (査読有り)

doi: 10.7211/jjsrt.36.119

江澤辰広・河原愛 (2012) 強酸性土壌に棲息するアーバスキュラー菌根菌：パイオニア植生を支える「化石的」絶対共生菌. *生物科学* 64: 238–246. (査読有り)

http://hdl.handle.net/2115/48964

〔学会発表〕(計 52 件, うち招待講演 2 件)

江澤辰広・河原愛・荒川竜太. アーバスキュラー菌根菌における Baas Becking 仮説の検証-多重環境フィルタを生き抜く「最強ジェネラリスト」存在の可能性-, 日本土壤肥料学会, 2013 年 9 月 12 日, 名古屋. (招待講演)

河原愛・佐藤理子・江澤辰広. アルミニウム耐性植物ススキのリン酸吸収を担う直接および菌根経路-強酸性土壌におけるリン酸輸送体遺伝子群の発現と菌根経路の重要性-, 日本土壤肥料学会, 2013 年 9 月 12 日, 名古屋.

Kawahara, A., An, G.H., Miyakawa, S., Sonoda, J., and Ezawa, T. Responses of arbuscular mycorrhizal fungal communities to soil acidity: acid-tolerant fungi are the generalists that occur in a wide range of soil pH, 7th International Conference on Mycorrhizas, Jan 6–11, 2013, New Delhi, India.

Kawahara, A. and Ezawa, T. Acid-tolerant arbuscular mycorrhizal fungi provide an alternative pathway of plant nutrient uptake in acidic soil, 7th International Conference on Mycorrhizas, Jan 6–11, 2013, New Delhi, India.

Kitahara, R., Ikeda, Y., Shimura, H., Masuta, C., and Ezawa, T. Viruses in arbuscular mycorrhizal fungi: a new player in the symbiosis, 7th International Conference on Mycorrhizas, Jan 6–11, 2013, New Delhi, India.

河原愛・安起弘・宮川祥江・園田順・江澤辰広. 耐酸性アーバスキュラー菌根菌は広範な環境に分布するジェネラリストである-フィールド調査およびモデル実験の統合-, 日本土壤肥料学会, 2012 年 9 月 4 日, 鳥取.

北原涼子・池田庸二・志村華子・増田税・江沢辰広。多様なウイルスを保持するアーバスキュラー菌根菌 *Glomus* sp. RF1 株 -2.9 kb-RNA ウイルスのゲノム構造と系統進化的位置-, 日本土壤肥料学, 2012年9月4日, 鳥取。

Ikeda, Y., Shimura, H., Masuta, C. and Ezawa, T. A novel mycovirus in an obligate biotroph arbuscular mycorrhizal fungus: a hidden player in mycorrhizal symbiosis. 2nd International Mycovirus Symposium, Sep 17-20, 2011, Otaru, Japan.

Kawahara, A., An, G.H., Miyakawa, S., Sonoda, J., Osaki, M. and Ezawa, T. Responses of arbuscular mycorrhizal fungal communities to soil acidity: a synthesis of field studies and a model experiment. *Rhizosphere* 3, Sep 25-30, 2011, Perth, Australia.

江沢辰広・菊池裕介・土方野分. AM 菌のリン酸吸収・運搬メカニズム, 日本土壤肥料学会, 2011年8月9日, つくば。(招待講演)

Kageyama, C., Arakawa, R., Nakajima, R., Osaki, M., and Ezawa, T. Mycorrhizal formation enhances *in planta nifH* expression of diazotrophic endophytes and N acquisition in a pioneer grass species *Miscanthus sinensis* grown in acid sulfate soil. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Sep 20-24, 2010, Miyazaki, Japan.

Kawahara, A., An, G.H., Miyakawa, S., Sonoda, J., Osaki, M. and Ezawa, T. Responses of arbuscular mycorrhizal fungal communities to soil pH: a synthesis of field studies and a model experiment. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, Sep 20-24, 2010, Miyazaki, Japan.

〔図書〕(計2件)

江沢辰広, 植物の生育を助ける微生物「菌根菌」, 環境と微生物の事典, 日本微生物生態学会編 (2014) 朝倉書店 ISBN978-4-254-17158-7 (印刷中)

Ezawa, T., Ikeda, Y., Shimura, H., and Masuta, C. (2014) Detection and characterization of mycoviruses in arbuscular mycorrhizal fungi by deep-sequencing, *Methods in Molecular Biology*, I. Uyeda and C. Masuta Ed., Springer Protocol, Humana Press Inc. NJ, USA. (印刷中)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 法面緑化工法

発明者: 江沢辰広・大崎満・宮川祥江・田中淳・堀江直樹・伴資英

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2011-250729

出願年月日: 2010年6月1日

国内外の別: 国内

〔その他〕

成果掲載ホームページ:

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/botagr/rhizo/RhizoCont/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江沢 辰広 (EZAWA Tatsuhiro)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 40273213

(2) 研究分担者

青野 俊裕 (AONO Toshihiro)

東京大学・生物生産工学研究センター・助教

研究者番号: 10372418

(3) 連携研究者

増田 税 (MASTA Chikara)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 60281854

(4) 研究協力者

河原 愛 (KAWAHARA Ai)

北海道大学・大学院農学院・博士課程

菊池 裕介 (KIKUCHI Yusuke)

北海道大学・大学院農学院・博士課程

横山 楓 (YOKOYAMA Kaede)

北海道大学・大学院農学院・修士課程