

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02861

研究課題名(和文)アーバスキュラー菌根の脂質代謝・輸送・制御に関わる分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying metabolism and transport of fatty acids and their regulation in arbuscular mycorrhiza

研究代表者

齋藤 勝晴 (Saito, Katsuharu)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：40444244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アーバスキュラー菌根は、アーバスキュラー菌根菌と植物根との共生体である。近年、植物は菌へ炭素源として脂質または脂肪酸を供給していることが明らかになっている。本研究では、菌根共生における植物の脂質合成・輸送・制御機構を明らかにするため、候補遺伝子の変異体を取得・作出し、菌根共生における脂質関連遺伝子の機能を解析した。脂質輸送タンパク質LTPdM1が菌根形成に関与する可能性や、WR15転写因子の下流で脂質代謝遺伝子が誘導される可能性が示された。植物から菌へ供給せれる脂質または脂肪酸を特定することはできなかったが、アーバスキュラー菌根菌はミリスチン酸添加で非共生的成長を開始することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌根共生における脂質代謝は新たな研究領域であり、共生のコスト・ベネフィットを考えるうえで重要な分野である。我々は、トランスクリプトーム解析をベースに菌根植物の脂質合成・輸送・制御に関わる候補遺伝子を抽出し、各種変異体を用いて機能解析を行った。本研究で得られた菌根共生における脂質代謝の基礎的知見は、圃場における菌根効果の診断につながる可能性がある。本研究では、植物から菌根菌へ供給される脂質の同定も試みたが、研究期間内には同定には至らなかった。一方で、非共生状態の菌根菌にミリスチン酸を添加するとバイオマスが増加することを明らかにした。今後、純粋培養による菌根菌資材の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Arbuscular mycorrhiza is a symbiotic association between arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots. Recently, it has been shown that plants supply lipids or fatty acids as a carbon source to the fungi. To elucidate the mechanisms of lipid synthesis, transport, and regulation in plants during mycorrhizal symbiosis, we obtained and generated mutants of the candidate lipid-related genes, and analyzed their functions in arbuscular mycorrhizal symbiosis. We found that the lipid transfer protein LTPdM1 might be involved in mycorrhizal formation and that lipid metabolism genes might be induced downstream of the WR15 transcription factors. Although the lipids or fatty acids supplied by the plant to the fungus could not be identified, arbuscular mycorrhizal fungi were found to initiate asymbiotic growth by addition of myristate.

研究分野：土壤生物学

キーワード：菌根 共生 脂質 脂肪酸 ミヤコグサ ミリスチン酸

### 1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根は、菌根菌と呼ばれる真菌類と植物根との共生体である。植物は菌根菌と共生することで、土壤中に広がった菌糸を通してリン酸を吸収することができ、結果として収量の増大が期待される。一方、植物はリンという利益を受け取る代わりに、コストとして光合成産物に由来する炭素をアーバスキュラー菌根菌に渡している。このコスト・ベネフィットのバランスによって植物に対するアーバスキュラー菌根菌の生育促進効果(菌根効果)の度合いは大きく異なる。

アーバスキュラー菌根菌は、植物から光合成産物に由来する炭素として単糖類を受け取っている。しかし、2013年にアーバスキュラー菌根菌のゲノムが解読されると、脂肪酸合成遺伝子が欠損していることが分かり、さらに2017年にはアーバスキュラー菌根菌は植物から直接脂質も受け取っていることが証明された<sup>1-4)</sup>。すなわち、植物からアーバスキュラー菌根菌への新たな炭素供給源として脂質の存在が明らかとなった(図1)。共生時に機能する植物の脂質合成遺伝子も単離されており、その変異体では共生が破綻しており、脂質供給が重要であることが示された<sup>4, 5)</sup>。菌根共生における脂質の研究はまだ始まったばかりであり未解明な点が多いが、我々はアーバスキュラー菌根の RNA-seq 解析から共生時に活性化される植物の脂質代謝・輸送・制御に関わる遺伝子候補を網羅的に同定し(図2)、一部の遺伝子については共生の維持に必須であることを明らかにしてきている。

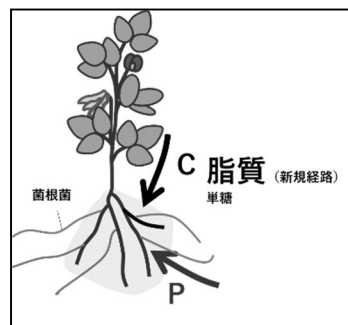


図1 .菌根共生のコスト・ベネフィット

### 2. 研究の目的

当研究室や海外のグループにより、菌根共生で誘導される植物の脂質合成・輸送・制御遺伝子 (*DIS*, *FatM*, *RAM2*, *GPDH*, *STR*, *WR15*) について機能解析されている<sup>1-6)</sup>。しかし、脂質合成に関しては、プラスチドでの脂肪酸合成と小胞体での脂肪酸修飾をつなぐ重要な因子であるアシル CoA 合成酵素 (LACS) の機能解析については全く手付かずである。脂質輸送に関する因子については、ほとんど分かっていないが、RNA-seq のデータをもとに脂質輸送タンパク質 (LTP) や ABC トランスポーター (STR) 、GDSL リパーゼの中から候補遺伝子が絞り込まれている。脂質合成の制御については、中国のグループによって *WR15* 転写因子の重要性が示されている<sup>6)</sup>。

本研究の目的は、アーバスキュラー菌根菌への脂質供給に関与する植物の脂質合成・輸送・制御機構を明らかにするため、各種遺伝子のミヤコグサ変異体を取得・作出し(挿入変異体、CRISPR/Cas9法、RNAi法)菌根共生における脂質関連遺伝子の機能を解析した。海外の研究では、植物が菌根菌に供給する脂質として *sn-2* モノパルミチン酸グリセリルが有力視されている<sup>2-4)</sup>。しかし、未だ決定的な証拠は得られていない。本研究では、ミヤコグサ変異体に安定同位体を添加し、グロマトグラフィ分析や各種質量分析により脂質の分子種の同定を試みた。さらに、植物からアーバスキュラー菌根菌に供給される脂質を定量し、植物にとっての共生に対するコストの評価の可能性を探った。

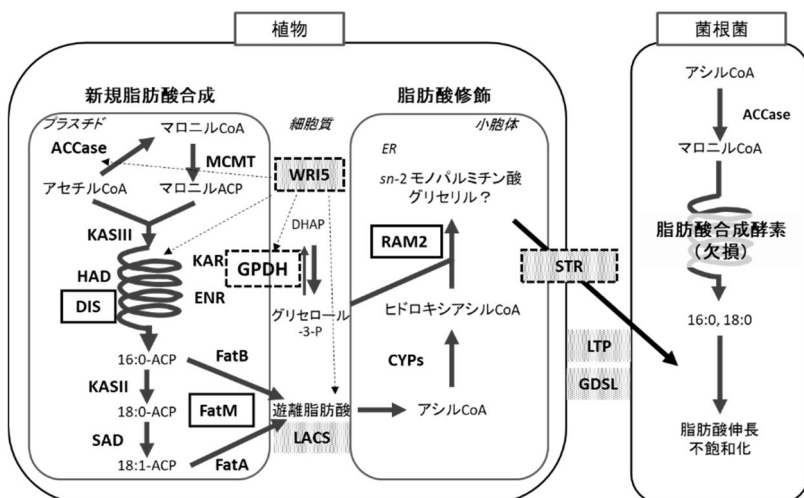


図2 . RNA-seq 解析で明らかになった菌根共生で誘導される植物の脂質合成・輸送・制御遺伝子候補。網掛けの遺伝子は本研究での解析対象遺伝子。実線で囲んだ遺伝子は、菌根形成に関与することが示されたもの。点線で囲んだ遺伝子は当研究室で機能解析したもの。破線の矢印は *WR15* 転写因子によって制御されると予想される遺伝子。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の4つの課題を実施し、アーバスキュラー菌根共生に関与する植物の脂質合成・輸送・制御機構を明らかにするとともに、アーバスキュラー菌根菌へ供給される脂質の同定を検討した。

#### (1) 脂質合成関連遺伝子の機能解析

脂肪酸合成関連遺伝子については、脂肪酸の活性化に関与するアシル CoA 合成酵素 (LACS) にターゲットを絞り菌根共生における機能を解析した。デンマークのオーフス大学からミヤコグサ *Iacs9* 遺伝子の挿入変異体を複数系統取り寄せた。PCR 法により野生型と *Iacs9* ホモ接合系統を選抜した。各植物にアーバスキュラー菌根菌 *Rhizophagus irregularis* を 500 孢子接種した。炭素同化量をコントロールするため、光量の異なるインキュベーターで4週間栽培した。根を採取しトリパンブルー染色によりアーバスキュラー菌根菌の感染や樹枝状体の形態を観察した。

#### (2) 脂質輸送遺伝子の機能解析

脂質輸送に関しては、脂質輸送タンパク質 (LTP) と GDSL リパーゼに着目して解析を進めた。トランスクリプトームデータをもとに、解析対象を *LTPdM1* 遺伝子と *GDSL1* 遺伝子に絞り込んだ。ミヤコグサ挿入変異体のデータベースを検索したが、目的の挿入変異体は存在しなかったため、RNAi 法で変異体系統の作出を行った。*Agrobacterium rhizogenes* を用いた毛状根形質転換法で発現抑制個体を得た。発現抑制個体にアーバスキュラー菌根菌を接種し、菌根表現型を解析した。*LTPdM1* については、組み換えタンパク質を作製し各種脂質に対する結合活性を評価し、輸送される分子種を推定した。また、*LTPdM1* に対するペプチド抗体を作製し、ウェスタンブロット法で解析するとともに、免疫染色により *LTPdM1* の細胞内局在を解析した。

#### (3) 脂質合成制御遺伝子の機能解析

*WR15* 転写因子は樹枝状体の形成に関与することや、RAM1 転写因子と相互作用し一部の遺伝子が発現誘導されることが報告されている<sup>6)</sup>。しかし、*WR15* の下流でどのような脂質合成関連遺伝子が発現制御されるかは分かっていない。そこで、RNAi 発現抑制系統を作出して遺伝子発現解析を行った。*Agrobacterium tumefaciens* を用いた形質転換法で発現抑制系統を得た。アーバスキュラー菌根菌を接種後、根を採取し RNA を抽出した。逆転写反応後、リアルタイム PCR により遺伝子発現量を定量した。

#### (4) 脂質同定

脂質合成変異体 (*DIS*, *FatM*, *RAM2*, *STR*) の解析から、植物から供給される脂質は *sn-2* モノパルミチン酸グリセリルと考えられているが<sup>2-4)</sup>、今のところ直接的な証明はない。脂質合成に関与する *GPDH3* 遺伝子の変異体を用いて、脂質組成を分析し輸送される脂質を推定した。*gpdh3* 変異体にアーバスキュラー菌根菌を接種し、4週間後に根を採取した。凍結乾燥した根から有機溶媒で脂質を抽出し、固相抽出によりモノアシルグリセロールを含む画分を得た。GC-MS 分析により、各種のモノアシルグリセロールを定量した。また、変異体の根に <sup>13</sup>C-グルコースを投与し、<sup>13</sup>C の取り込まれる位置を GC-MS で分析した。

アーバスキュラー菌根菌による脂肪酸の利用性を調査するため、非共生状態のアーバスキュラー菌根菌にミリスチン酸やパルミチン酸を投与し培養を行った。培養後、菌体を回収し、乾燥重量を測定した。ミリスチン酸のエネルギー源としての利用性を評価するため、発芽胞子にミリスチン酸を添加し、菌体内の ATP 量を測定した。また、安定同位体標識したミリスチン酸を投与し、菌体細胞壁のキチン・キトサンをグルコサミンに変換し LC-MS 分析することで、安定同位体標識ミリスチン酸由来の炭素の取り込み率を測定した。

## 4. 研究成果

以下の4課題について結果を得た。

#### (1) 脂質合成関連遺伝子の機能解析

脂肪酸合成関連遺伝子については、脂肪酸の活性化に関与する *LACS* 遺伝子にターゲットを絞り菌根共生における機能を解析した。モデルマメ科植物のミヤコグサには9つの *LACS* 遺伝子が存在し、菌根で遺伝子発現が高誘導される *LACS9* 遺伝子を特定した。ミヤコグサの挿入変異体を用いてアーバスキュラー菌根菌の感染を確認したが、野生型との間には違いが見られなかった。植物からの炭素供給量を抑制するため、インキュベーター内の光量を低下させて栽培したが、野生型と変異体の間に感染率の違いはなかった。他の *LACS* 遺伝子が冗長的に働いている可能性が考えられたため、*LACS9* の過剰発現個体を作成した。しかし、個体間のばらつきが大きく菌根形成における *LACS9* 遺伝子の効果を明らかにすることができなかった。組み換え *LACS9* タンパク質を大腸菌で発現させ生化学的解析を試みたが、可溶性画分に *LACS9* が得られず脂肪酸に対する特異性を明らかにすることができなかった。

本研究では菌根誘導性 *LACS9* 遺伝子の共生における機能を変異体や過剰発現の解析では明らかにすることができなかった。*LACS* 遺伝子はゲノム中に複数存在することから他の *LACS* 遺伝子が冗長的に機能している可能性があり、今後二重変異体や三重変異体を作成し解析する必要がある。

## (2) 脂質輸送遺伝子の機能解析

脂質輸送に関しては、菌根誘導性のLTPとGDSLリパーゼに着目した。ミヤコグサはLTPとGDSLを数十遺伝子有している。RNA-seq解析から菌根誘導性の*LTPdM1*遺伝子と*GDSLm1*遺伝子を同定した。それぞれの遺伝子について、発現抑制システムを作出するため、RNAi用のコンストラクトを作製した。*LTPdM1*については、毛状根形質転換系を用いて発現抑制個体を作製し、菌根表現型を解析した。まだ予備的なデータではあるが、樹枝状体の形成異常が観察された。今後サンプル数を増やして解析する予定である。LTPdM1タンパク質を*Brevibacillus*発現系で作製し、脂肪酸の結合能を評価した。広範囲の脂肪酸と結合するものの、反応液のpHにより結合能が異なり、酸性ではミリスチン酸に比較的高い親和性を示し、中性ではパルミチン酸に高い親和性を示した。LTPdM1の局在解析のため抗LTPdM1抗体を作製し、LTPdM1に特異的に結合する抗体を精製した。特異的抗体を用いて菌根の組織切片を染色したがシグナルは得られなかった。今後、サンプルの固定法などを検討して、LTPdM1の局在を明らかにする。

## (3) 脂質合成制御遺伝子の機能解析

*WR15*転写因子は樹枝状体の形成に関与することが報告されている。しかし、*WR15*の下流でどのような脂質合成関連遺伝子が発現制御されるかは分かっていない。ミヤコグサは3つの*WR15* (*WR15a*, *WR15b*, *WR15c*) 遺伝子を有するため、RNAi法にて同時に3遺伝子の発現を抑制した。発現抑制システムを用いて脂質代謝に関係する遺伝子発現を解析したところ、菌根形成時に誘導される脂質代謝遺伝子の発現がRNAiシステムで低下していることから、*WR15*遺伝子はこれらの遺伝子発現制御に関与していることが考えられた。それぞれの*WR15*遺伝子の機能を解析するため、挿入変異体の解析を行った。一重変異体におけるアーバスキュラー菌根菌の感染は野生型と変わらなかったことから、*WR15*遺伝子は冗長的に機能していると考えられる。今後、二重変異体や三重変異体を作成し、菌根表現型の解析を行う予定である。

## (4) 脂質同定

脂質合成変異体である*gpdh3*変異体を用いて植物から供給される脂質の推定を試みた。菌根からモノアシルグリセロール画分を抽出し、GC-MSで組成を解析した。野生型と変異体の間にモノアシルグリセロールの組成の違いは無かった。GPDH3は脂質のグリセロール部位の生合成に関与すると考えられるため、*gpdh3*変異体の根に<sup>13</sup>C-グルコースを投与し、モノアシルグリセロール内の<sup>13</sup>Cの分布の偏りを調査した。GC-MSのマスマスペクトルから<sup>13</sup>Cの分布をある程度特定できることが分かったため、今後、変異体と野生型でマスマスペクトルを比較し、脂質の代謝過程を明らかにする。また、非共棲培養においてアーバスキュラー菌根菌がミリスチン酸を吸収しエネルギー源と炭素骨格源として利用することを明らかにした<sup>7)</sup>。

## 引用文献

1. Tisserant et al. (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. PNAS 50, 20117-20122.
2. Jiang et al. (2017) Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. Science 356, 1172-1175.
3. Luginbuehl et al. (2017) Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. Science 356, 1175-1178.
4. Keymer et al. (2017) Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. eLife 6, e29107.
5. Brands et al. (2018) The *Lotus japonicus* acyl-acyl carrier protein thioesterase FatM is required for mycorrhiza formation and lipid accumulation of *Rhizophagus irregularis*. Plant Journal 95, 219-232.
6. Jiang et al. (2018) *Medicago* AP2-domain Transcription Factor WR15a Is a Master Regulator of Lipid Biosynthesis and Transfer During Mycorrhizal Symbiosis. Molecular Plant 11, 1344-1359.
7. Sugiura et al. (2020) Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. PNAS 117, 25779-25788.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuta Sugiura, Rei Akiyama, Sachiko Tanaka, Koji Yano, Hiromu Kameoka, Shiori Marui, Masanori Saito, Masayoshi Kawaguchi, Kohki Akiyama, and Katsuharu Saito	4. 巻 117
2. 論文標題 Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 25779-25788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2006948117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 亀岡啓・齋藤勝晴・川口正代司・秋山康紀	4. 巻 78
2. 論文標題 有用土壌微生物アーバスキュラー菌根菌の純粋培養法の確立	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉浦優太・秋山礼伊・田中幸子・矢野幸司・亀岡啓・丸井汐里・齋藤雅典・川口正代司・秋山康紀・齋藤勝晴
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌におけるミリスチン酸の炭素源としての利用
3. 学会等名 日本菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉浦優太・秋山礼伊・田中幸子・矢野幸司・亀岡啓・丸井汐里・齋藤雅典・川口正代司・秋山康紀・齋藤勝晴
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌の脂肪酸の利用性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アーバスキュラー菌根菌の培養方法	発明者 齋藤勝晴・秋山礼 伊・川口正代司・田 中幸子・矢野幸司・	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-208775	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------