

機関番号：13601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20688004

研究課題名（和文） 共生変異体を用いたマメ科植物の共生的リン酸獲得機構の解析

研究課題名（英文） Symbiotic phosphate acquisition in mycorrhizal legume

研究代表者

齋藤 勝晴（SAITO KATSUHARU）

信州大学・農学部・准教授

研究者番号：40444244

研究成果の概要（和文）：

アーバスキュラー菌根のリン酸輸送機構を免疫細胞化学的および分子生物学的手法により解析した。菌根菌のポリリン酸は内生菌糸では液胞と細胞壁に検出されたが、植物との養分の交換の場である樹枝状体ではほとんど検出されなかった。樹枝状体のペリアーバスキュラスペースに酸性ホスファターゼ活性が検出されたことから、細胞壁のポリリン酸が酸性ホスファターゼにより分解された可能性がある。宿主植物ミヤコグサでは樹枝状体を含む細胞でパープル酸性ホスファターゼ遺伝子 *LjPAP3* が特異的に発現することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed a phosphate translocation mechanism of arbuscular mycorrhiza by using methods of immunocytochemistry and molecular biology. Polyphosphates were detected in vacuoles and cell walls of intraradical hyphae, but were hardly detected in arbuscules. As an acid phosphatase activity was detected in peri-arbuscular spaces, the polyphosphate in cell wall of arbuscules may be hydrolyzed by the acid phosphatase. We also identified a purple acid phosphatase gene *LjPAP3* in *Lotus japonicus*, which specifically expressed in cortical cells including arbuscules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：土壌生物学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌、ポリリン酸、ミヤコグサ、酸性ホスファターゼ、電子顕微鏡、リン酸、共生、樹枝状体

1. 研究開始当初の背景

近い将来、良質なリン鉱石は枯渇すると予想され、リン酸は国際的に重要な資源となっている。アーバスキュラー菌根菌は植物の根に共生する糸状菌で、マメ科やイネ科を含む多くの植物のリン酸栄養改善に寄与してい

ることが知られている。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そのため、フィールドにおける菌根共生のベネフィットを評価するための有効な指標がなく、菌根の機能を農業の現場で評価するのが難しい状況にある。

我々は、菌根菌の細胞内微細構造を解析する過程で、リン酸の輸送媒体であるポリリン酸の検出法を開発し、ポリリン酸が液胞に蓄積するとともに細胞壁成分として細胞外に輸送されることを示してきた。さらに、ミヤコグサ菌根の解析から、樹枝状体がポリリン酸代謝の重要な共生器官であることを明らかにしてきた。本研究では、我々が明らかにしてきたこれらの知見と技術をもとに、菌根を介したマメ科植物のリン酸獲得機構を細胞および遺伝子レベルで明らかにする。

2. 研究の目的

菌根を介したマメ科植物のリン酸獲得機構を明らかにするため、(1) マメ科モデル植物ミヤコグサにおける菌根効果を検証するとともに、(2) 菌から植物へのリン酸輸送様式を細胞レベルで解析するため、ミヤコグサ野生型とリン酸代謝関連遺伝子の発現を抑制した RNAi 系統を用いて、ポリリン酸（リン酸ポリマー）局在と酸性ホスファターゼ活性の局在を調査した。(3) また、菌根共生に関わる宿主のリン酸代謝遺伝子を同定するため、ゲノムおよびトランスクリプトームの情報を用いて発現遺伝子の解析を行うとともに、一部の遺伝子についてはミヤコグサで発現抑制系統を作製し表現型解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マメ科モデル植物ミヤコグサにおける菌根効果

ミヤコグサ (*Lotus japonicus* B-129“Gifu”) の生育に対する菌根菌 (*Glomus intraradices*) の効果を確認するため、ミヤコグサに菌根菌を接種し、低リン (50 μ M リン酸) の 1/2 ホーランド溶液を施用し栽培した。また、菌根菌を接種しない非接種区も設けた。栽培は、グロースチャンバー内 (25°C、16 時間明期/8 時間暗期) で行い、菌根菌接種後 15, 30, 45, 60 日目に植物体を採取し、乾燥重量とリン含有量、菌根菌感染率を測定した。

(2) ミヤコグサ菌根のポリリン酸と酸性ホスファターゼ活性の局在解析

ポリリン酸の検出には、ポリリン酸に特異的に結合するポリリン酸結合タンパク質を用いた免疫電顕で行った。観察試料には、*G. intraradices* を接種したミヤコグサ野生型

(Gifu) の根を用いた。菌根を 4%パラフォルムアルデヒドと 5% グルタルアルデヒドで固定し、Spurr 樹脂に包埋した。ポリリン酸を検出するため、超薄切片を過酸化水素水でエッチング処理し、ポリリン酸結合タンパク質と抗 Xpress 抗体を含む一次反応液に浸漬し、続いて金コロイド標識二次抗体で反応することによってポリリン酸をラベルした。観察には透過型電子顕微鏡を用いた。

酸性ホスファターゼ活性の検出は、グリセロリン酸を基質としたセリウム塩法で行った。*G. intraradices* を接種したミヤコグサの根を 4%パラフォルムアルデヒドと 5% グルタルアルデヒドで前固定し、試料を酸性ホスファターゼ反応液 (0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0、20 mM CeCl₃、10 mM グリセロリン酸) 中でインキュベートした。さらに根を 1% OsO₄ で後固定し、脱水後 Spurr 樹脂に包埋した。電子顕微鏡観察用の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で酸性ホスファターゼ活性の局在を観察した。

ミヤコグサの菌根特異的リン酸トランスポーター *LjPT4* と菌根のポリリン酸局在の関係性を調べるため、*LjPT4* 遺伝子の発現抑制個体を作製し、ポリリン酸局在を解析した。

LjPT4 遺伝子のミヤコグサ RNAi 系統を *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換法で作製した。RNAi 用のコンストラクトを作製し *A. tumefaciens* LBA4404 に導入した。*A. tumefaciens* をミヤコグサ胚軸に接種することで T-DNA を植物に導入し、ハイグロマイシンで遺伝子導入カルスを選抜した。選抜カルスから T1 系統を作出し PCR 法で目的遺伝子の導入を確認した。*LjPT4* 遺伝子の発現抑制の確認は RNA 抽出し、逆転写反応後リアルタイム PCR で解析した。リファレンス遺伝子として *LjUBC* 遺伝子を用いた。

(3) 菌根特異的ミヤコグサ酸性ホスファターゼ遺伝子の同定と機能解析

ミヤコグサのパープル酸性ホスファターゼ遺伝子群をクローニングするため、ミヤコグサゲノムおよび EST データベースから、同源性検索とキーワード検索によりパープル酸性ホスファターゼ様の遺伝子を抽出した。遺伝子の部分配列をもとに 5'および 3'RACE 法により、全長配列を決定した。推定アミノ酸配列をもとに系統樹を近隣結合法で作成した。また、パープル酸性ホスファターゼの局在を局在予測プログラム PSORT を用いて推定した。

菌根特異的パープル酸性ホスファターゼ遺伝子を同定するため、遺伝子発現解析を行った。菌根菌接種ミヤコグサと非接種ミヤコグサ、高リン酸施用ミヤコグサを栽培し、接種後 4 週目に根をサンプリングした。根から RNA を抽出し、逆転写反応後、定量 PCR により *LjPAP1*~*LjPAP7* 遺伝子の相対発現量を測定した。リファレンス遺伝子として *LjUBC* と *LjTIT41* 遺伝子を用いた。また、菌根特異的リン酸トランスポーター遺伝子 *LjPT4* と *LjPT3* の発現量も調査した。

菌根菌接種によって発現上昇が確認された *LjPAP3* 遺伝子については、プロモーター解析によって遺伝子発現部位を調査した。*LjPAP3* 遺伝子の開始コドンから約 1.4 kbp 上流のゲノム領域をクローニングし、GUS レポ

ーター遺伝子に融合させコンストラクトを作製した。*Agrobacterium rhizogenes* LBA1334を用いた毛状根形質転換法により *LjPAP3* プロモーター::GUS 遺伝子をミヤコグサに導入した。ミヤコグサ形質転換毛状根に菌根菌 *G. intraradices* を接種し、約1か月間グロースチャンパー内で栽培した。根を採取後に GUS 染色し、GUS 発現部位を光学顕微鏡で観察した。

LjPAP3 遺伝子の機能を解析するため、*LjPAP3* 遺伝子の発現抑制システムを作製した。*LjPAP3* 遺伝子に対する3種類の RNAi コンストラクトを作製し *A. tumefaciens* LBA4404 に導入した。*A. tumefaciens* をミヤコグサ胚軸に接種することで T-DNA を植物に導入し、ハイグロマイシンで遺伝子導入カルスを選抜した。選抜カルスから T1 系統を作出し PCR 法で目的遺伝子の導入を確認した。*LjPAP3* 遺伝子の発現抑制の確認は RNA 抽出し、逆転写反応後リアルタイム PCR で解析した。リファレンス遺伝子として *LjUBC* 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) マメ科モデル植物ミヤコグサにおける菌根効果

ミヤコグサはマメ科のモデル植物であり、根粒形成や窒素固定の研究に用いられている。また、近年は菌根形成の研究にも用いられているが、菌根のリン栄養に関する研究は限られており、菌根効果を示す栽培条件は確立していない。本実験では、菌根効果の観点からミヤコグサの栽培条件の検討を行った。接種15日目は菌根菌の感染がほとんど見られなかったが、接種30日目以降は菌根菌接種区の感染率は80%以上の高い値で推移した。共生器官である樹枝状体の形成率は30日目にピークを示し、その後時間と共に減少した。菌根菌接種区と非接種区で植物体の乾重とリン含有量を比較したところ、菌根菌接種区は非接種区に比べ乾重で約2~4倍、リン含有量で約5~12倍の高い値を示した。本実験の栽培条件でミヤコグサを栽培することにより、顕著な菌根効果が現れることが明らかとなり、リン酸輸送解析のための材料の調製が可能となった。

(2) ミヤコグサ菌根のポリリン酸と酸性ホスファターゼ活性の局在解析

ポリリン酸はオルトリン酸が高エネルギーリン酸結合によって直鎖状に結合した重合体であり、原核生物から真核生物まで広くその体内に存在している。ポリリン酸は菌根共生において宿主に供給されるリン酸の供給源として重要な役割を果たしていると考えられている。これまで、菌根菌のポリリン酸局在は、発芽菌糸を用いて電子顕微鏡レベ

ルで詳細に調べられてきた。一方で、菌根内の内生菌糸や樹枝状体のポリリン酸局在については、光学顕微鏡レベルの解析のみでポリリン酸の詳細な細胞内局在は明らかになっていない。本実験では、ポリリン酸の輸送を明らかにするため、ポリリン酸検出法により樹枝状体のポリリン酸局在を電子顕微鏡レベルで詳細に解析した。電子顕微鏡観察によるポリリン酸の詳細な局在解析の結果、細胞間菌糸や樹枝状体のトランク菌糸の細胞壁にポリリン酸が検出された(図)。一方で、樹枝状体のファインブランチの細胞壁やペリアーバスキュラススペースにはポリリン酸がほとんど検出されなかった。この原因として、ファインブランチ周辺の高い酸性ホスファターゼ活性により、ポリリン酸が分解され、ファインブランチでポリリン酸が検出されなかった可能性がある。これまでの研究では、ポリリン酸と酸性ホスファターゼの関係性を電子顕微鏡レベルで詳細に解析した報告はない。そこで、樹枝状体における酸性ホスファターゼ活性の局在を調べるため、セリウム塩法を用いて酵素組織化学的に酸性ホスファターゼ活性を検出し、電子顕微鏡レベルでその局在を解析した。酸性ホスファターゼ活性は、樹枝状体のファインブランチ周辺のペリアーバスキュラー膜やペリアーバスキュラススペースに高頻度で観察された。この領域にはポリリン酸ラベルがほとんど観察されないことから、ファインブランチでは酸性ホスファターゼによってポリリン酸が分解されている可能性がある。しかし、酸性ホスファターゼがポリリン酸を分解する直接的な証拠は得られておらず、酸性ホスファターゼとポリリン酸の関係性については分からなかった。酸性ホスファターゼ活性は、成熟した樹枝状体だけでなく崩壊した樹枝状体にも検出され、リン酸は崩壊した樹枝状体からも放出されている可能性が考えられた。*LjPT4* 遺伝子の発現抑制システムのポリリン酸局在も調査したが野生型との間に違いは認められなかった。

これまでの観察から、ポリリン酸ラベルや酸性ホスファターゼ活性は崩壊した樹枝状体にもあることを確認しており、樹枝状体の崩壊過程を通して、菌根菌に由来するリン酸が植物に移行している可能性が考えられる。そこで本研究では崩壊した樹枝状体からのリン酸移行の可能性を調査するために、崩壊した樹枝状体のポリリン酸局在と酸性ホスファターゼ活性の局在を電子顕微鏡レベルで解析した。崩壊した樹枝状体の細胞壁にポリリン酸が観察され、部分的に崩壊した樹枝状体の周辺にも酸性ホスファターゼ活性が観察された。また、部分崩壊している樹枝状体にクロスウォールの形成が観察された。クロスウォールは、老化した樹枝状体からリン

酸が細胞間菌糸へ逆流するのを防ぐ役割をもつと考えられており、崩壊した樹枝状体の菌糸内に残ったポリリン酸などの生体分子は、植物の消化や分解作用によって最終的に植物に利用されると考えられ、植物は崩壊した樹枝状体からも菌根菌に由来するリン酸を積極的に利用している可能性が考えられた。

(3) 菌根特異的ミヤコグサ酸性ホスファターゼ遺伝子の同定と機能解析

菌根の樹枝状体のペリアーバスキュラースペースには酸性ホスファターゼ活性が存在し、植物側のペリアーバスキュラー膜に高頻度に観察されることから本酵素活性は植物に揺らすると考えられる。しかし、ペリアーバスキュラースペースで酸性ホスファターゼ活性を示す酵素またはそれをコードする遺伝子は単離されていない。本実験ではミヤコグサのゲノム情報を用いてペリアーバスキュラースペースで機能する酸性ホスファターゼ酵素の同定を試みた。ミヤコグサのゲノム及びESTデータベース検索により5つの高分子量パープル酸性ホスファターゼ遺伝子と2つの低分子量パープル酸性ホスファターゼ遺伝子を抽出した。5'-RACE、3'-RACEおよびcDNAクローンの塩基配列決定により、高分子量パープル酸性ホスファターゼ遺伝子 *LjPAP1*~*LjPAP5* と低分子量パープル酸性ホスファターゼ遺伝子 *LjPAP6*~*LjPAP7* をクローニングした。推定アミノ酸配列をもとにシグナルペプチド配列と局在を予測し、*LjPAP1*~*LjPAP5* はN末端に18~29残基からなるシグナルペプチドを持ち、外分泌型と予測された。*LjPAP1*~*LjPAP5* は、5つのパープル酸性ホスファターゼ遺伝子保存領域が存在した。近隣結合法により系統解析しところ、*LjPAP1*~2 のクレードと *LjPAP3*~5 のクレードに大きく分かれた。

LjPAP 遺伝子の発現量を調べたところ、*LjPAP3* は菌根菌接種によって非接種個体に比べ約10倍高い発現量を示した。高リン酸施用個体の *LjPAP3* 遺伝子の発現量は非接種個体とほぼ同じ程度であったことから *LjPAP3* は植物のリン酸栄養と関係なく菌根菌接種により発現上昇することが明らかとなった。*LjPAP1*, 6, 7 遺伝子は発現量が低下したことから、低リン酸条件で機能する遺伝子と考えられた。*LjPAP2*, 4, 5 遺伝子の発現量は、ほとんど変化しなかった。*LjPAP3* はN末端にシグナルペプチドを持ち分泌性のタンパク質と予測された。

LjPAP3 のプロモーター活性をGUSレポーター遺伝子で解析したところ、菌根菌を接種した形質転換根では樹枝状体を含む皮層細胞でGUS活性が確認された。GUS活性を示さない樹枝状体も存在したが、多くの樹枝状体がGUS活性を示した。外生菌糸が接触する

表皮細胞では、GUS活性は確認されなかった。これらの結果から、菌根菌を接種したミヤコグサでは、*LjPAP3* 遺伝子は樹枝状体を含む皮層細胞で発現することが明らかとなった。現在、*LjPAP3* に対するペプチド抗体を作製しており、今後免疫染色により *LjPAP3* の細胞内局在を解析する予定である。

LjPAP3 遺伝子のRNAi系統を作製し、遺伝子発現量が1/10~1/25程度に抑制されたミヤコグサを複数系統得た。今後、これらの系統を用いて、ポリリン酸や酸性ホスファターゼ活性の局在およびリン酸栄養を解析し、菌根における *LjPAP3* の機能を解析する。

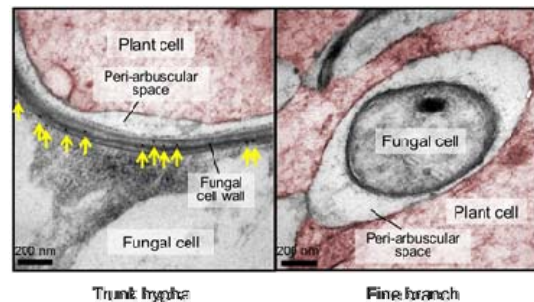


図. 樹枝状体のトランク菌糸とファインブランチ菌糸のポリリン酸局在. 赤の領域は植物細胞を示し、灰色の領域は菌根菌および境界域を示す。黄色矢印はポリリン酸の局在を示す。トランク菌糸の細胞壁にはポリリン酸が見られるが、ファインブランチ菌糸にはポリリン酸が観察されない。

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3件)

- ① 齋藤勝晴・林誠 (2011) アーバスキュラー菌根菌との共生. 細胞工学. 30, 149-154. 査読無
- ② Saito, K., Sugawara, K. (2010) Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungal colonization for coexisting plant in *Miscanthus*-type semi-natural grassland. Journal of Integrated Field Science. 7, 29-35. 査読無
- ③ 齋藤勝晴 (2008) 共生 その2 菌根菌. 日本土壤肥料科学雑誌. 79, 555-557 査読無

[学会発表] (計17件)

- ① 池上佳苗・齋藤勝晴 (2011・3・26-27) 菌根のリン酸輸送に関わるミヤコグサ変異体のスクリーニング. 日本草地学会.

- 宇都宮大学
- ② 吉村理・山本裕・高崎淳史・諏訪尚圭・飯田真次・池西史生・齋藤勝晴・田淵晃 (2011.3.26-28) アルファルファ根粒菌の mcp 欠損株により形成された根粒における nif 遺伝子の発現. 日本農芸化学会. 京都大会.
 - ③ 大畑映利子, 長田泰幸, 齋藤勝晴, 久我ゆかり, 北川学, 中澤武, 山崎広三, 保井久子 (2011.3.26-28) *T. halophilus* MN45 の培養塩濃度と免疫誘導能との関係. 日本農芸化学会. 京都大会.
 - ④ 齋藤勝晴 (2010.11.18) ポリリン酸ラベリング法と酵素組織化学によるアーバスキュラー菌根菌のリン酸輸送解明. 植物電子顕微鏡若手ワークショップ. 理化学研究所横浜研究所植物科学研究センター
 - ⑤ Nishimura, A., Ezawa, T., Saito, K. (2010.9.20) Identification of purple acid phosphatase gene up-regulated in arbuscular mycorrhizal roots of *Lotus japonicus*. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Aoshima Palmbeach Hotel, Miyazaki
 - ⑥ Kojima, T., Oba, H., Saito, K., Suganuma, N., Kawaguchi, M., Ohtomo, R. (2010.9.20) The linkage mapping and the phenotypic characterization of *Lotus japonicus* mutants specifically defective in arbuscular mycorrhizal symbiosis. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Aoshima Palmbeach Hotel, Miyazaki
 - ⑦ 長田泰行・齋藤雅典・齋藤勝晴 (2010.9.7) アーバスキュラー菌根の樹枝状体におけるポリリン酸と酸性ホスファターゼ活性の局在. 日本土壌肥料学会. 北海道大学
 - ⑧ 西村あおい・江沢辰広・齋藤勝晴 (2010.9.7) 菌根菌感染により発現上昇するミヤコグサパープルホスファターゼ遺伝子. 日本土壌肥料学会. 北海道大学
 - ⑨ 後藤確帆・齋藤勝晴 (2010.9.7) 銅および亜鉛添加土壌でのシソ科植物の生育に対するアーバスキュラー菌根の影響. 日本土壌肥料学会. 北海道大会.
 - ⑩ 齋藤勝晴 (2010.9.6) 菌根菌リン酸トランスポーターの発見から 15 年. 菌根共生のリン酸輸送はどこまで分った? 日本土壌肥料学会. 北海道大学
 - ⑪ 西村あおい・長田泰幸・江沢辰広・齋藤勝晴 (2009.12.2-3) ミヤコグサ菌根で発現するパープルホスファターゼ遺伝子の探索. 第 5 回ミヤコグサ・ダイズシンポジウム. かずさアカデミアホー

ル

- ⑫ Saito, K. (2009.10.10-12) Arbuscular mycorrhizal communities in semi-natural grassland. 7th International Symposium on Integrated Field Science. Tohoku University
- ⑬ 西村あおい・鈴木伊作・江沢辰広・齋藤勝晴 (2009.9.15-17) アーバスキュラー菌根菌感染に応答するミヤコグサ酸性ホスファターゼ遺伝子の探索. 日本土壌肥料学会. 京都大学
- ⑭ 長田泰幸・齋藤雅典・齋藤勝晴 (2009.9.15-17) アーバスキュラー菌根における組織化学的ポリリン酸検出法の検討. 日本土壌肥料学会. 京都大学
- ⑮ 小島知子・大場広輔・齋藤勝晴・菅沼教生・川口正代司・大友量 (2009.9.8-10) ミヤコグサ菌根共生特異的変異株のマッピングおよび表現型解析. 植物微生物研究会. 松本市あがたの森文化会館
- ⑯ Saito, K., Isobe, Y., Kawaguchi, M. (2009.8.9-14) Common *SYM* gene *NUP85* affects pollen tube growth in *Lotus japonicus*. 6th International Conference on Mycorrhiza. Convention Centre of Ouro Minas Palace Hotel, Belo Horizonte, Brazil
- ⑰ 後藤確帆・齋藤勝晴 (2009.6.21) ダイズ菌根共生における感染率とアルカリホスファターゼ活性の変動. 土壌肥料学会 関東支部会. 信州大学理学部

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 齋藤勝晴・川口正代司 (2008) アーバスキュラー菌根共生から根粒共生系への進化. 「共生の生態学」文一出版. 237-260
- ② 齋藤勝晴・川口正代司 (2008) アーバスキュラー菌根以外の菌根. 「共生の生態学」文一出版. 261-263

〔その他〕

土壌生物学研究室 HP
<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/soil/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 勝晴 (SAITO KATSU HARU)
 信州大学・農学部・准教授
 研究者番号: 40444244