

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05329

研究課題名（和文）アーバスキュラー菌根の共生崩壊ステージにおける遺伝子発現

研究課題名（英文）Gene expression analysis of arbuscular mycorrhiza at the stage of symbiotic collapse

研究代表者

小八重 善裕（Kobae, Yoshihiro）

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：60456598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：植物はアーバスキュラー菌根菌と根で共生し、土壤養分を効率よく吸収しているが、この共生は「発達」と「崩壊」を繰り返す。本研究は、数日の短い期間における「発達」と「崩壊」サイクルの分子メカニズムに着目してきたが、さらし長いタイムスパンの「発達」と「崩壊」についても考慮した。すなわち、若い栄養生長期の実生の生長ステージに加えて、開花期、子実の登熟期、作物以外の冬季の草（冬草：雑草）、枯死した根などまで解析の対象とした。その結果、驚いたことに、通常の菌根菌（アーバスキュラー菌根菌）とは逆の感染サイクルを持つ菌根菌を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの一般的な菌根菌がコインの表だとすれば、本研究で見出した菌根菌は裏面である。時間あるいは日単位で考えていた菌根の共生サイクルが、もっと長い時間軸で調べられなければ、実際の農業の生産現場には、実践的に応用できない可能性がある。とくに、化学肥料や農薬の使用を前提とする慣行的な農業を見直し、これからの持続的で低投入型の農業を実践するためには、本研究で明らかとなった、有機的で、低投入の圃場における生態システムの理解が今後一層必要になる。

研究成果の概要（英文）：Plants symbiose with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in their roots to efficiently absorb soil nutrients, and this symbiosis repeatedly "develops" and "collapses". This study has focused on the molecular mechanism of the "development" and "collapse" cycles over a short period of a few days, but we also considered "development" and "collapse" over a longer time span. In other words, in addition to the growth stages of young seedlings, we also included the flowering stage, the seedling ripening stage, winter grasses other than crops (winter grasses: weeds), and dead roots in our analysis. Surprisingly, we found a mycorrhizal fungus with a colonization cycle opposite to that of normal AMF.

研究分野：土壤肥料学

キーワード：菌根共生

1. 研究開始当初の背景

植物はアーバスキュラー菌根菌と根で共生し、土壤養分を効率よく吸収しているが、これまでには菌根の「発達」に研究の焦点が当てられていた。しかし実際は、この共生は「発達と崩壊を繰り返す」のであり、かつその繰り返しのサイクルが早いこと、すなわち新陳代謝が早いことが、菌根の発達そのものに重要であることが、申請者のライブイメージングなどから予想されていた。このことは、当然ながら発達メカニズムの理解だけでは、菌根の本当の発達メカニズムを理解するためには不十分であり、崩壊のメカニズムの理解もあわせて進める必要があった。

しかし根の中における菌根の発達は、複数の菌根菌の同時感染によって進行する。すなわち、一つの根には(1 cmの根の断片の中にさえ)、何種類もの(何個体もの)菌根菌が重複して感染しており、それぞれの菌根菌が、根の皮層細胞にそれぞれ感染し、異なる感染ステージの細胞内共生栄養交換器官である樹枝状体を形成する。その配置に規則性はなく、隣接する細胞が、異なる菌根菌の異なる共生ステージの樹枝状体を含んでいることが通常である。したがって、「崩壊」ステージの菌根共生に関する分子メカニズムを、遺伝子発現プロファイルから理解しようとする場合、それぞれの共生ステージ(発達から崩壊)までの細胞を区別してサンプリングする必要がある。

菌根菌が感染した根の組織切片を用いて、レーザーマイクロダイセクション法で、微量 RNA からその遺伝子発現情報を得る試みは以前から行われていたが、ある程度の限界が認められた。すなわち、その細胞内共生のステージを正確に区別することが困難であり、またその RNA の収量も微量であることから、きわめて大きな時間的、金銭的、人的コストを要するのが問題である。申請者は、独自の調査により細胞内共生のステージを簡便に識別できる蛍光タンパク質マーカーを発現するイネを作出しており、このイネの栽培を高精度に行うことで、共生ステージを区別することが可能と考えた。すなわち、イネを播種してごく初期(2週間以内)に感染を開始する菌根菌は、多くの場合一菌体であり、その感染部位(感染単位)に関しては、比較的均一な共生ステージの細胞内共生細胞群から構成されている。この感染単位の大きさは、5 mm 以内であり、多数の根の断片を得ることも難しくはない。そして予備的実験として、その根の断片を用いて、RNA 抽出、逆転写、PCR でイネの菌根共生特異的遺伝子の発現を、検出することを可能にしていた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発した独自の菌根共生の共生ステージマーカーイネを用いて、菌根共生の発達だけでなく崩壊ステージの遺伝子発現をモニターし、その崩壊特異的な遺伝子発現プロファイルから、菌根の発達につながる崩壊のメカニズム、そしてその生物学的な意義にまで理解を進めようとするものである。

研究を開始して分かったことは、次項で述べる通り、感染単位から、各共生ステージの遺伝子発現プロファイルを調べることは困難ということであった。一方で、本研究の目的の一つは、基礎的研究を超えて、圃場レベルでこの共生の発達を理解し、実践的に応用しようとするものであり、その場合、土着の菌根菌の存在についても考慮する必要があった。土着の菌根菌は極めて多種多様であり、その個別の感染動態を追跡して、その遺伝子発現プロファイルを、未知の菌根菌についても調べられることが、本研究計画の強みであり、ユニークな点であった。実際、圃場など野外の土を用いて共生マーカーイネを栽培した場合、その根にはモデル菌根菌で観察してきたシンプルな形態はパターンとは異なり、全く異なる共生のライフサイクルを有する菌根菌も存在することに気付くことになった。モデル菌根菌はあくまで実験的に使いやすいという意味で、それが実際の圃場生態系を代表するものではない。そこで、本研究のもう一つの目的として、土着の菌根菌の共生ステージについても解析を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 当初の計画における方法

まず、共生ステージマーカー(GFP-SCAMP)イネにモデル菌根菌である *Rhizophagus irregularis* を接種して人工気象室内で栽培した。予備的試験の通り、感染ステージ(初期・中期・後期)を区別することができ、それぞれのステージを主に含む根の断片を切り出した。根の断片から RNA を抽出し、逆転写、PCR を行った。PCR のターゲットとしては、きわめて転写産物量が多いと見込まれるイネの菌根特異的なリン酸トランスポーター遺伝子、アンモニウムトランスポーター遺伝子に加え、申請者が以前菌根で発現上昇することを認めていたストリゴラクトン生合成経路に関する遺伝子群等についても解析対象とした。予備試験の結果に反して、5 mm に満たない根の断片から RT-PCR を成功させることは容易ではなく、定量性と再現性は極めて低かった。そこで、RNA 抽出についてキットやその方法を複数検討し、また逆転写や PCR についても複数のマーカーのキットを試してみたが、安定して PCR を行うことができなかった。そこで一本の根の断片から通出するという戦略を変更し、5本の根をまとめて RNA を抽出することにした。しかしながら、それでも RT-PCR を安定して行うことは難しく、感染単位から、各共生ステージの遺伝子

発現解析を行うことは、本申請の方法では困難だと判断した。

(2) 変更した実験計画の方法

円安やウクライナ問題等により、化学肥料の価格がこの研究期間中に 2 倍に上がるという事態になっていた。菌根菌に対する化学肥料削減への期待が一段と高くなっていった。実際に圃場で菌根を最大限活用するためには、化学肥料や農薬を使用しない有機農業や自然栽培(に近い低投入型栽培)が不可欠であることから、実践的な応用を見越して、本研究の計画でも、実験材料を人工的な土ではなく、有機的な、多様な菌根菌を含む自然栽培の農家の土を用いることにした。南は静岡県から北は北海道まで、20 カ所近くの自然栽培農家の土や作物の根を用いて、土着菌根菌の感染動態、菌種を調査した。菌根菌の菌系染色や GFP-SCAMP などの共生マーカーに加えて、その代謝活性のバイタルステイニング、菌根菌に蓄積されている脂質のナイルレッド蛍光染色などから、根に感染する土着菌根菌のライフサイクルについて調査した。そして土着菌が持つユニークな共生メカニズムや、そこにいる新規の菌根菌の特定を目指した。

4. 研究成果

(1) 当初の計画における成果

上述した通り、当初の方法では感染単位レベルでの遺伝子発現解析は困難であり、成果を上げることはできなかった。研究期間中、世界の情勢は急変し、モデル菌根菌と、人工的な栽培での実験だけでは、研究成果を社会に還元するという、すなわち「菌根の理解から農業に資すること」が、当初の研究計画では不十分であることも、同時に明らかとなった。

(2) 変更した計画の成果

まず有機的な栽培を行う農家の土壌で、植物をポット栽培し、その菌根の状況を詳細に調べた。有機とは言っても、その程度は様々であり、堆肥などの高養分の有機資材を畑に多投している農家もいれば、全く何もいれない自然栽培の農家もいる。そしてサンプリングの時期も多様であった。春、夏、秋、冬と、四季を通じて菌根の状況を調べたが、このような一年を通して菌根を調べた例は少ない。なぜなら菌根菌が働くのは、その宿主である植物(作物)が多くの養分を要求し、吸収する時期であると考えられるからであり、通常、生長の著しい個体の根が調べられる。

本研究はもともと、数日の短い期間における「発達」と「崩壊」のサイクルに着目してきたが、そのサイクルの駆動力として、植物側からの光合成産物の供給など、植物の栄養生理的な要素も大きく関わると予想されることから、もっと長いタイムスパンの、「発達」と「崩壊」についても考慮した。すなわち、若い栄養生長期の植物サンプルだけでなく、ごく若い実生、生長ステージに加えて、開花期、子実の登熟期、作物以外の冬季の草(冬草:雑草)、枯死した根などまで解析の対象とした。その結果、驚いたことに、通常の菌根菌(アーバスキュラー菌根菌)とは逆の感染サイクルを持つ菌根菌を発見した(図1)



通常の菌根菌は、秋になると孢子をつくり、越冬し、春に植物の根に感染し、暖かい季節のもと光合成産物を大量に供給され、その見返りとしてリン酸などの無機養分を植物に与え、そして植物が枯死し、孢子が再び冬を越す、という周年サイクルが想定されている。これは、植物が生長するというスナップショット的な関係性、つまり、生長するためには養分が必要であり、そのために植物が光合成産物を与え、その見返りに養分を獲るとい、一時的な、1対1の取引関係に基づく。舞台は春から秋である。これまでほぼすべての菌根研究が、この視点に基づいている。しかし本研究が見出した菌根のライフサイクルは、この常識的な菌根菌とは真逆である。冬に共生する。冬には光合成しない。雪の下でサンプリングした植物の根に認められる(図2)。夏には感染していない。これはどういうことであろうか。

このような非常識な感染動態を示す菌根菌の研究をスタートさせる必要がある。これまでの一般的な菌根菌がコインの表だとすれば、本研究で見出した菌根菌は裏面である。時間あるいは日単位で考えていた菌根の共生サイクルが、もっと長い時間軸で調べられなければ、実際の農業の生産現場には、実践的に応用できない可能性がある。とくに、化学肥料や農薬の使用を前提とする慣行的な農業を見直し、これからの持続的で低投入型の農業を实践するためには、本研究で明らかとなった、有機的で、低投入の圃場における生態システムの理解が今後一層必要になる。その点で、本研究の当初の計画では、想定できなかったような大きな成果が、結果的に得られたと言える。今後はこの新しい菌根菌の生物学的、農業的な意義について、研究を深めていく予定である。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小八重善裕	4. 巻 54
2. 論文標題 菌根と地力の関係についての一考察	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 作物生産と土づくり	6. 最初と最後の頁 2-5
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 -

1. 著者名 Sisaphaithong Thongkhoun, Yanase Megumi, Mano Tsubasa, Tanabe Shigeru, Minami Eiichi, Tanaka Aiko, Hata Shingo, Kobae Yoshihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Localized expression of the Dwarf14-like2a gene in rice roots on infection of arbuscular mycorrhizal fungus and hydrolysis of rac-GR24 by the encoded protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 2009998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2021.2009998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小八重善裕、古川穂、武隈瞬也、森川領太
2. 発表標題 雑草が作物菌根に与える影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会北海道支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小八重善裕
2. 発表標題 菌根の共生動態の研究から見えてきた その難しさと面白さ
3. 学会等名 北海道植物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松田結生, 小八重善裕
2. 発表標題 リン酸処理によるアーバスキュラー菌根の貯蔵様態の変化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 米山 忠克、長谷川 功、関本 均	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 232
3. 書名 新植物栄養・肥料学 改訂版	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------