

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292034

研究課題名(和文)植物絶対共生菌の革新的遺伝子サイレンシング法が開く菌根共生の分子基盤

研究課題名(英文) New insight into plant acid tolerance: physiological and molecular mechanisms of acid tolerance through mycorrhizal formation

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) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：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、宿主から炭素源を受け取る代わりに、土壌中のリン酸を供給する。この共生的リン酸供給のプロセスにおいて、共生菌側の分子機構は未だほとんどわかってない。本研究では、世界で初めて植物ウイルスを用いてAM菌の遺伝子をノックダウンする方法を確立し、AM菌水輸送体が菌糸内に植物方向への水の流れを作り出してリン酸を輸送していることを証明した。また、AM菌から植物へのリン酸の放出に関わる排出型リン酸輸送体遺伝子を特定し、同様にウイルスを用いたノックダウン実験により、この輸送体を介してAM菌は植物にリン酸を受け渡していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Arbuscular mycorrhizal fungi associate with more than 80% of land plants, deliver phosphate to the host, and, in return, receive photosynthate from the host. The molecular mechanism underlying the symbiotic phosphate delivery, however, has yet to be elucidated. For the first time, we have established a gene silencing technique in the fungi using plant viral vector (i. e. virus-induced gene silencing) in this study. With this technique, we demonstrated that a fungal aquaporin mediates long-distance phosphate translocation through hyphae, which is driven by water flow created primarily by transpiration. A phosphate exporter responsible for phosphate transfer from the fungal cell to plant cell is also identified and characterized in this study.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：アーバスキュラー菌根菌 遺伝子サイレンシング 共生 植物ウイルスベクター リン酸

## 1. 研究開始当初の背景

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、宿主から炭素源を受けとる代わりに、土壤中のリン酸を供給する。リン酸は土壤中での移動速度が遅いため、AM菌との共生による吸収表面積の増大は、極めて重要なリン酸の獲得戦略であり、陸上植物が4億年もの間、この菌との共生を捨てなかった最大の理由である(江沢ら2004 *土肥誌*)。植物は菌根形成すると、根からのリン酸吸収を担うリン酸輸送体遺伝子の発現を低下させ、代わってAM菌からリン酸を受取る「菌根経路」に関わる遺伝子群を発現させる(Poulsen et al, 2005 *New Phytol*)。この共生的リン酸獲得における植物側の遺伝子発現制御機構については、変異体解析などにより、ここ数年、飛躍的に理解が進んだ。一方、AM菌側では共生が成立すると、土壤中に展開した菌糸からリン酸(Pi)を吸収し、ポリリン酸として液胞内への濃縮分解を繰り返しながら根内まで長距離輸送して植物細胞に受け渡す(移行)という大まかなプロセス(Ezawa et al. 2002 *Plant Soil*)は理解されているものの、その分子機構は未だほとんどわかっていない。その最大の理由は、この菌が培養できない絶対共生菌であるため、分子解析に必要な i) 充分量の菌体を得られないこと、さらに多核性生物であることから、特定の遺伝子を欠損 or 破壊した ii) 変異体 or 組換え体クローンが得られないことにある。

その中でも、我々のグループでは、開放系ながら菌種選択と栽培方法の改良により、ほぼ純粋に近いAM菌菌糸の大量培養系を確立しており、共生的リン酸獲得のAM菌生理について、先進的な知見を得ている(Tani et al, 2009 *Appl Environ Microbiol*; Hijikata et al, 2010 *New Phytol*)。また、本培養系の応用により、世界で初めてAM菌におけるウイルスの存在とその進化的な特異性を示した(Ikeda et al, 2012 *Mol Plant-Microbe Interact*; Kitahara, et al., 投稿中)。さらに、大量培養菌糸から高品質のmRNAを調製し、次世代シーケンサーを用いた解析により1万種類以上の完全長配列を含むcDNA配列情報を得た(H22-24 科研費)。本解析によって、リン酸の吸収・濃縮過程では、リン酸輸送体に加えて陽イオン輸送体の遺伝子群も発現させ、大量のリン酸が保持する負電荷を陽イオンにより中和する分子機構が存在することが明らかになった。ここで得られたcDNA情報は、国際ゲノムコンソーシアムのもものと比べて質、量共に格段に優れていることから、この分野の我々の国際的な優位性を少なくとも数年間担保する。一方、リン酸の長距離輸送に関しては、従来は単純な拡散ないし原形質流動により駆動されていると考えられていた(Smith & Read, 2008)。しかし、我々が行った輸送解析では、それら古典的モデルでは説明できないレベルの早い速度で植物方向に輸送されていたこと(Hijikata et al, 2010 *New Phytol*)、また、

宿主の蒸散を抑制すると菌糸内の(ポリ)リン酸輸送速度が低下したことから、菌糸内には蒸散により駆動される水の流れが存在し、それによってリン酸が植物方向へ長距離輸送されるとの仮説を立てた(菊池ら, 2013 植微研; 本申請課題で検証)。

AM菌において形質転換体や変異体を得られないことは、現代生物学において多くの成果を挙げてきた逆遺伝学的手法が適用できないことを意味する。一方、増田(分担研究者)らは、植物遺伝子の迅速な機能解析のためにウイルス誘導性遺伝子サイレンシング(virus-induced gene silencing, VIGS)に用いる広域宿主ベクターを開発した(Otagaki et al, 2006 *Plant Biotech*)。この方法では、キュウリモザイクウイルス(CMV)に標的遺伝子(mRNA)の相同配列を挿入し、これを植物に接種すると、CMVの全身感染に伴って植物自身のサイレンシング機構により、標的mRNAが分解される。我々は予備実験において、CMVにAM菌の遺伝子部分配列を挿入し、宿主植物に接種したところ、その根に共生するAM菌の標的遺伝子をノックダウン可能であることを突き止めた。この方法の最大の利点は、長期間を要する-最低でも半年以上-遺伝子組換え植物の作製作業が不要であり、ウイルスベクター作製からノックダウンに至る一連の実験が2-3か月以内に終了可能な点(大幅な期間短縮)、および野生型植物を用いるために多くの反復個体が確保できる点(実験の信頼性向上)にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、AM菌がリン酸を吸収・濃縮後、植物まで長距離輸送し、それを植物に受け渡す(移行)までの一連の過程、すなわち共生的リン酸獲得の全体像を分子レベルで明らかにすることを最終目標とする。そのために本申請課題では、AM菌遺伝子のノックダウン法としての i) VIGS を汎用技術として確立する、さらに、我々が持つcDNA情報およびVIGS技術を応用して、これまでまったく情報が得られていない ii) リン酸の長距離輸送および植物への移行の分子機構を明らかにすると共に、リン酸供給システムの全体を制御している司令塔となる遺伝子を特定する。

本研究において最も独創的な点は、VIGSにAM菌の遺伝子機能解析法としての可能性を見出し、これを世界で初めてこの分野に応用する点にある。培養や遺伝子組換えが困難な絶対共生(寄生)菌の遺伝子機能解析において、汎用的な技術が確立されれば、共生微生物の研究分野のみならず、植物病理学など広く植物-微生物・動物相互作用の研究分野に貢献することが期待される。AM菌は、陸生生態系におけるリン循環を担う重要な微生物であることに加え、農業生産や荒地植生の成立において、生物肥料として重要な機能を果たしていることから、共生的リン酸獲得

の分子基盤を明らかにすることは、学術的に大きなインパクトを持つだけでなく、数十年後に枯渇が懸念されるリン資源を有効利用するための菌根利用能を強化した作物の育種やリン供給効率の高い菌株の選抜などに重要な遺伝情報を提供するものと期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン酸長距離輸送における水輸送体遺伝子の役割

本研究における宿主植物としては、これまで用いてきたミヤコグサに加え、VIGSに適している野生タバコを用いた。接種 AM 菌としては、これまで当研究室において多くの生理および遺伝子情報が蓄積されてきた *Rhizophaga clarus* HR1 株 (MAFF520076) を用いた。VIGS においては、標的遺伝子の発現量が低いと、ノックダウン効率も低く、ノックダウン効果が表現形質に現れにくいことが、予備検討から分かっていた。そこで、アクアポリン遺伝子の発現量を高く維持させるため、培土(砂)の粒度、水分管理および施肥量など、AM 菌の活性に影響する環境条件を最適化した。また、CMV ベクターの接種後、植物体内でウイルス粒子が再構成され、感染が全身に拡大するまでに 1 週間を要し、その後のノックダウン効率の最大期および持続期間は、標的遺伝子の発現量や経時変化パターン、ウイルスベクターの存在量などの個体間差の影響を受ける。そこで、複数のノックダウン実験を繰り返して集めたデータを解析し、最適時期・持続期間の標準的な傾向を洗い出した。

以上の予備検討に加え、mRNA の網羅的配列決定(トランスクリプトーム解析)を行い、AM 菌の水チャネル遺伝子 *RcAQP1*、*RcAQP2* および *RcAQP3* を同定した。これらのうち、植物根内でもっとも発現量の高い遺伝子を選んで酵母に導入し、水輸送活性の確認を行うと共に、VIGS によるノックダウン実験を行って、菌糸内のポリリン酸輸送速度および植物のリン酸吸収量を測定した。

#### (2) 共生菌から植物へのリン酸放出を担うリン酸排出輸送体の同定

これまでに、菌根のトランスクリプトーム解析から、液胞型リン酸輸送体遺伝子 *PHO91* およびリン酸放出型輸送体遺伝子 *PHO1* の相同遺伝子が根内の AM 菌菌糸で特異的に発現していることがわかっていた。本プロジェクトでは、*PHO91* が液胞から細胞質へのリン酸放出に、*PHO1* が細胞質から細胞外へのリン酸放出に関わる輸送体であるとの仮説を立て、VIGS によるこれら遺伝子のノックダウンを行い、ポリリン酸輸送速度および植物のリン酸吸収量を測定した。また、*PHO1* をノックダウンした個体および対照個体の根から mRNA (AM 菌根内菌糸および植物双方のものを含む) を調製し、Illumina HiSeq による

100 bp ペアエンドシーケンスを行った。得られたリードを *N. benthamiana* のゲノム (公開情報) にマッピング後、残りを *R. clarus* HR1 の cDNA 配列情報にマッピングすることで、植物と AM 菌のリードを振分けた。各遺伝子にマップされたリード数をノックダウンおよび対照個体間で比較し、発現が有意に上昇/低下した遺伝子群を統計的に抽出した。

### 4. 研究成果

#### (1) リン酸長距離輸送に関わる水輸送体遺伝子の同定

AM 菌 *R. clarus* の水輸送体遺伝子 *RcAQP3* の水輸送活性を酵母発現系により確認した。また、VIGS により、この AM 菌遺伝子をノックダウンできることが世界で初めて示された。さらに、この *RcAQP3* のノックダウンにより AM 菌のリン酸輸送速度が低下し、植物へのリン酸供給量も低下したことから、この水輸送体が菌糸内のリン酸輸送の駆動力を伝える役割を担っていることが強く示唆された (Kikuchi et al., 2016)。

#### (2) 共生菌から植物へのリン酸放出を担うリン酸排出輸送体の同定

トランスクリプトーム解析から見つかった *RcPHO1* は、植物のリン酸排出輸送体遺伝子と相同性が高く、AM 菌から植物根細胞へのリン酸移行を担うと予測された。そこで、この遺伝子をノックダウンしたところ、植物へのリン酸供給量が低下し、AM 菌の形態形成や感染量にも変化が観察された。また、いもち病菌の持つ *PHO1* 相同遺伝子をノックアウトすると、培地中へのリン酸放出が止まると共に、このノックアウト株に *RcPHO1* を形質転換するとリン酸放出活性が復活した。これらのことは、*RcPHO1* が AM 菌においてリン酸放出を担う輸送体遺伝子をコードしていることを示している。さらに、*RcPHO1* の細胞内局在性を調べるために、*RcPHO1* の C 末端合成ペプチドに対する抗体を作製し、免疫電顕による観察や GFP タグを連結した *RcPHO1* をいもち病菌に形質転換したものの、細胞内での局在性は特定できなかった (論文準備中)。

### 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 7 件)

1. Kikuchi, Y., Hijikata, N., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., Masuta, C. and Ezawa, T. (2016) Aquaporin-mediated long-distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 211, 1202-1208. doi: 10.1111/nph.14016 ( 査読有り )

2. 江沢辰広 (2016) 第二,第三次技術革新が開くアーバスキュラー菌根共生研究—栄養共生機構・生態・ビジネス展望—. *日本土壤肥料学雑誌*, 87, 64-69. (査読有り)
  3. Yoneyama, K., Arakawa, R., Ishimoto, K., Kim, H.-I., Kisugi, T., Xie, X., Nomura, T., Kanampiu, F., Yokota, T., Ezawa, T. and Yoneyama, K. (2015) Difference in strigolactone secretion profile, but not in compatibility and host preference in arbuscular mycorrhizal symbiosis in two maize cultivars. *New Phytologist*, 206, 983-989. doi: 10.1111/nph.13375 (査読有り)
  4. Sato, T., Ezawa, T., Cheng, W. and Tawaraya, K. (2015) Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61, 269-274. doi: 10.1080/00380768.2014.993298 (査読有り)
  5. Kobae, Y., Kawachi, M., Saito, K., Kikuchi, Y., Ezawa, T., Maeshima, M., Hata, S. and Fujiwara, T. (2015) Up-regulation of genes involved in N-acetylglucosamine uptake and metabolism suggests a recycling mode of chitin in intraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 25, 411-417. doi: 10.1007/s00572-014-0623-2 (査読有り)
  6. Yoneyama, K., Kisugi, T., Xie, X., Arakawa, R., Ezawa, T., Nomura, T. and Yoneyama, K. (2015) Shoot-derived signals other than auxin are involved in systemic regulation of strigolactone production in roots. *Planta*, 241, 687-698. doi: 10.1007/s00425-014-2208-x (査読有り)
  7. Ezawa, T., Ikeda, Y., Shimura, H., Masuta, C. (2015) Detection and characterization of mycoviruses in arbuscular mycorrhizal fungi by deep-sequencing. In: I. Uyeda and C. Masuta eds. *Plant Virology Protocols*, Methods in Molecular Biology, 1236, 171-180, Springer, New York. (査読有り)
- [学会発表](計 27件)
1. Takumi Sato, Tatsuhiko Ezawa, Weiguo Cheng and Keitaro Tawaraya. Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* under low P condition. Organic Phosphorus Workshop 2016, Windermere, Lake District, United Kingdom, 2016年9月5-9日
  2. 丸山隼人・横山楓・菊池裕介・中西夏輝・阿部歩・曾根輝雄・齋藤勝晴・増田 税・江沢辰広.アーバスキュラー菌根菌から宿主へのリン酸供給機構:PHO1リン酸排出輸送体の機能.日本土壤肥料学会,佐賀大学(佐賀市),2016年9月20-22日.
  3. 鈴木芽以・前田太郎・小林裕樹・川口正代司・俵谷圭太郎・増田 税・江沢辰広.アーバスキュラー菌根菌大陸間隔離株における:同一ウイルスの存在が示唆する宿主—ウイルス共生の起源.日本土壤肥料学会,佐賀大学(佐賀市),2016年9月20-22日.
  4. 中西夏輝・江沢辰広.アーバスキュラー菌根菌における耐酸性形質の分子基盤へのアプローチ.日本土壤肥料学会,佐賀大学(佐賀市),2016年9月20-22日.
  5. 港 翔平・中西夏輝・丸山隼人・永野 惇・江沢辰広.菌根経路からのリン酸吸収に対するネギのトランスクリプトーム応答.菌根研究会大会,千葉大学(千葉市),2016年12月10日.
  6. 中西夏輝・丸山隼人・江沢辰広.アーバスキュラー菌根菌における耐酸性形質の分子基盤:比較トランスクリプトーム解析を利用した耐酸性遺伝子の探索.菌根研究会大会,千葉大学(千葉市),2016年12月10日.
  7. 丸山隼人・横山 楓・菊池裕介・中西夏輝・阿部歩・曾根輝雄・齋藤勝晴・増田 税・江沢辰広.アーバスキュラー菌根菌におけるPHO1型リン酸排出輸送体は宿主へのリン酸移行に関与する.菌根研究会大会,千葉大学(千葉市),2016年12月10日.
  8. 鈴木芽以・中西夏輝・丸山隼人・俵谷圭太郎・増田 税・江沢辰広.*Rhizophagus clarus*—ウイルス間相互作用に駆動される酸性土壌適応:大陸間隔離株の共通ウイルスは酸性土壌において正の選択圧を受ける.菌根研究会大会,千葉大学(千葉市),2016年12月10日.
  9. Tatsuhiko Ezawa, Yusuke Kikuchi, Nowaki Hijikata, Kaede Yokoyama, Ryo Ohtomo, Masayoshi Kawaguchi, Katsuharu Saito and Chikara Masuta, Towards a comprehensive understanding of the molecular mechanism of phosphate acquisition through the mycorrhizal pathway. 8th International Conference on Mycorrhiza, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA, 2015年8月3-7日.
  10. Mei Suzuki, Hanako Shimura, Chikara Masuta, Keitaro Tawaraya and Tatsuhiko Ezawa. Metagenomic analysis of viromes in intercontinental isolates of *Rhizophagus clarus* suggests a long history of coevolution between glomeromycotan fungi and double-stranded RNA viruses. 8th International Conference on Mycorrhiza, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA, 2015年8月3-7日.
  11. Sato, T., T. Ezawa, W. Cheng, and K. Tawaraya. Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus* under low P condition. 8th International Conference on Mycorrhiza, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA, 2015年8月3-7日.
  12. Ai Kawahara, Riko Sato, Yusuke Kikuchi,

- and Tatsuhiko Ezawa. Arbuscular mycorrhizal fungi provide an alternative pathway of P uptake for Al-damaged roots. 9th International Symposium on Plant Soil Interactions at Low pH, Dubrovnik, Croatia, 2015 年 10 月 18-23 日.
13. Ai Kawahara, Gi-Hong An, Sachie Miyakawa, Jun Sonoda, and Tatsuhiko Ezawa. Distribution of acid-tolerant arbuscular mycorrhizal fungi along a soil-pH gradient suggests a role in plant community resilience in acidic soil. 9th International Symposium on Plant Soil Interactions at Low pH, Dubrovnik, Croatia, 2015 年 10 月 18-23 日.
14. Takumi Sato, Tatsuhiko Ezawa, Weiguo Cheng, Keitaro Tawaraya. Exudation of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Rhizosphere* 4, Maastricht, the Netherlands. 21-25 June 2015.
15. 菊池裕介・齋藤勝晴・大友量・川口正代司・増田 税・江沢辰広. アーバスキュラー菌根におけるリン酸長距離輸送の駆動力を伝える共生菌水輸送体. 日本土壤肥料学会, 京都大学(京都市), 2015 年 9 月 9-11 日.
16. 丸山隼人・中西夏輝・鈴木芽以・江沢辰広. *Rhizophagus* spp. における protein-coding genes の種間ならびに種内の塩基配列多型評価. 菌根研究会 2015 年度大会, とかちプラザ(帯広市). 10 月 31 日.
17. Yusuke Kikuchi, Nowaki Hijikata, Chiharu Tani, Yoshihiro Handa, Masayoshi Kawaguchi, Katsuharu Saito and Tatsuhiko Ezawa. Transcriptome and cation dynamics revealed activation of inorganic cation uptake and arginine biosynthesis during polyphosphate accumulation in an arbuscular mycorrhizal fungus. 16th Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodes, Greece, 2014 年 7 月 6-10 日.
18. 菊池裕介・横山楓・土方野分・大友量・半田佳宏・川口正代司・齋藤勝晴・江沢辰広. トランスクリプトームのリン応答性から構築されるアーバスキュラー菌根菌のリン酸吸収・代謝・輸送機構の全体像. 日本土壤肥料学会, 東京農工大学(小金井市), 2014 年 9 月 9-11 日.
19. 横山楓・菊池裕介・半田佳宏・川口正代司・齋藤勝晴・増田税・江沢辰広. アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸放出輸送体の探索. 菌根研究会 2014 年度大会, 東京大学(柏市). 2014 年 11 月 29 日.
20. 江沢辰広・河原愛・菊池裕介・横山楓. 菌根経路を通じたリン酸獲得量を評価するための植物分子マーカーの探索. 菌根研究会 2014 年度大会, 東京大学(柏市) 2014 年 11 月 29 日.
1. Ezawa, T., Tani, C., Hijikata, N. and Kikuchi, Y. (2016) Inorganic polyphosphates in mycorrhiza. *In*: T. Kulakovskaya ed., Biological Function of Polyphosphates in Eukaryotic Cells, pp. 49-60, Springer International Publishing, ISBN 9783319410715, Online ISBN: 9783319410739, doi: 10.1007/978-3-319-41073-9\_4
2. Saito, K. and Ezawa, T. (2016) Phosphorus metabolism and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *In*: F. Martin ed., Molecular Mycorrhizal Symbiosis, pp. 197-216, John Wiley & Sons, ISBN 9781118951415, Online ISBN: 9781118951446, doi: 10.1002/9781118951446.ch12

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江澤 辰広 (EZAWA Tatsuhiko)  
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

増田 税 (MASTA Chikara)  
北海道大学・農学部・准教授  
研究者番号: 60281854

(3) 連携研究者

齋藤 勝晴 (SAITO Katsuharu)  
信州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 40444244

(4) 研究協力者

丸山 隼人 (MARUYAMA Hayato)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
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

〔図書〕(計 2 件)