

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380052

研究課題名（和文）植物-微生物共生を支える普遍的宿主因子の解明

研究課題名（英文）The universal factor of host plant for symbiosis between plant and microorganisms

研究代表者

小島 知子 (KOJIMA TOMOKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所・草地管理研究領域・主任
研究員

研究者番号：70355080

研究成果の概要（和文）：

ミヤコグサのアーバスキュラー菌根共生特異的変異株の表現型解析と連鎖解析を行った。自殖F3世代の菌根形成について、変異株ME778とME966は根の皮層細胞や表皮細胞で侵入が阻害され、ME2329株は、樹枝状体のトランクは形成されるがファインブランチの形成が異常であった。連鎖解析により、ME2329の原因遺伝子は4染色体の南側に、ME778とME966は第2染色体上にあることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Some symbiotic mutants of *Lotus japonicus*, specific for arbuscular mycorrhiza (AM), were analyzed by the linkage mapping and the phenotypic characterization. As the results of phenotypic characterization of back-crossed F3 generation, AM formation was inhibited around entry points in ME778 and ME966. On the other hand, trunk hyphae of arbuscule were formed in roots of ME2329, but fine branches were abnormal. By the linkage mapping, mutation point of ME2329 was mapped on southern part of chromosome 4 and those of ME778 and ME966 were mapped on chromosome 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

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、ミヤコグサ

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular

mycorrhizal fungi, 以下AM菌) は、多くの陸上植物の根に共生し、リン酸などの無機養分

の吸収促進、病害や環境ストレス耐性の付与などを通じて植物の生育を改善する。AM 共生能は陸上植物の出現期に確立し、現在も80%以上の植物種に保存されている重要形質であるが、そのメカニズムは明らかにされていない。AM 共生系より取扱いが容易な根粒共生では多くの共生変異株が分離され、共生メカニズムの解明がなされてきた(図1)。近年、根粒共生変異株の一部はAM 共生能をも失っている事が示され、進化的に新しい根粒共生が菌根共生を基盤に形成されたことが示唆された。つまりAM 共生は微生物-植物共生系のプロトタイプであると位置づけられる。共生経路の全貌を解明するには根粒共生は正常で菌根共生にのみ異常を示す「AM 特異的共生変異体」の解析が重要であるが、肉眼で識別可能な根粒を形成する根粒共生とは異なり、菌根形成の判定には根の染色と顕微鏡観察が必要なため、マメ科のAM 特異的共生変異体は報告されていない。申請者らはこれまでにマメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の変異株集団約2万株を選抜し、11株のAM 特異的共生変異体の分離に成功している。これら変異株の遺伝的解析はこの分野で我が国の優位性を確立するために重要である。

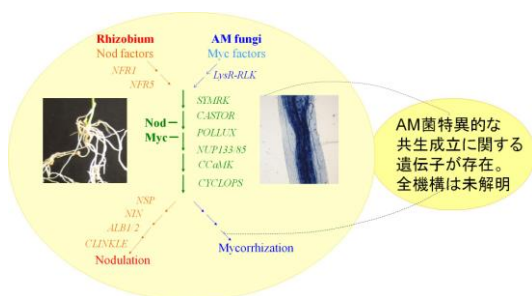


図1 根粒共生と菌根共生に関わる遺伝子

2. 研究の目的

ミヤコグサのAM 特異的共生変異体の原因遺伝子を複数(4株以上)、遺伝子マッピングを経て同定する。また戻し交配によって遺伝的背景を浄化した変異株を用いて詳細な表現型解析を行う。さらに同定された菌根共生を担う遺伝子群が他のAM 宿主植物でどのように保存されているか、あるいは非AM 植物でどのように改変されているのかを主要な鍵遺伝子の比較によって考察する。

AM 特異的共生変異体の分離と原因遺伝子の同定により、これまで未知であったAM 共生成立の分子メカニズムが明らかとなる。AM 共生系は多くの植物種が進化の過程で共通して維持してきた重要形質であり、その分子基盤の多様性や保存性は植物と植物共生微生物の共進化を考える上で重要である。更に、よ

り高効率な共生能を植物に賦与したり、一部の種において進化の過程で失われた共生能を復活させることが可能となる。それによってAM 共生系をより有効に活用する事ができるようになり、低投入持続型農業技術の確立に貢献できる。

3. 研究の方法

Ethyl methanesulfonate(EMS)処理変異種子集団 (*L. japonicus* MG-20 由来) から得られた菌根共生変異株のうち、主に表現型が比較的安定していた4変異株 (ME778、ME823、ME966、ME2329) について解析を進めた。

(1) 最初に AM 菌共生特異的変異株候補 (*L. japonicus* MG-20 由来) について、野生株 MG-20 と戻し交配を行った自殖のF2株について変異型の分離比を計算した。変異型を示した株の後代F3についてAM 菌共生/根粒菌共生の変異型を光学顕微鏡や共レーザー共焦点顕微鏡などで確認し、AM 菌の共生がどの段階で阻害されているか、根粒菌の共生について微視的レベルにおいても異常がないか、明らかにした。

(2) 対象の変異株と野生株 B-129 との交配で得た F2 株集団を既報の SSR マーカーを用いて分析し、座乗染色体の決定とラフマッピングを行った。AM 菌胞子 (*Rhizophagus irregularis* DAOM197198) を接種し、培土には滅菌済みのバーミキュライトまたは川砂を用いた。人工気象器で栽培し、約4週間後にポットを解体した。根を染色した後、実体顕微鏡にて観察し、低感染または非感染の株を選抜した。葉 DNA を用い、各染色体について4~9の SSR マーカーで連鎖解析を行った。ラフマッピングと表現型の解析から重要と考えられるものから優先的にファインマッピングを行った。AM 共生変異の形質検定に時間がかかることを考慮し、2500のF2個体を変異点を挟む遺伝子距離1cM未満の2つのマーカーにより選抜した。選抜された約200株の個体について更に詳細なマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) *L. japonicus* MG-20 との戻し交配した自殖 F2 世代の変異形質を示す株の分離比は、ME823、ME966 および ME2329 では約 1/4、ME778 株は約 1/2 であった。これらの変異株4株について、F3 世代において菌根共生変異を確認し、さらに野生型と同程度の根粒形成が認められ、AM 共生特異的であると考えられた。

(2) 自殖 F3 世代での菌根形成を共焦点レーザー顕微鏡などで観察した結果、ME778 と ME966 は皮層細胞や表皮細胞で侵入が阻害され、一度侵入すると野生型と同様に樹枝状体

を形成することが観察された。ME2329 株は野生株と比較し感染率はほぼ同じか低めであった。特に、樹枝状体形成に異常が認められ、野生株と比べ樹枝状体の形成率が低く、トランク菌糸は形成されるがそこから分枝するファインブランチの形成に異常が見られた。ME823 については野生株と比べ、低感染であるだけで、安定した詳細な表現型は観察不可能であった。

(3) 自殖 F3 世代での根粒形成を共焦点レーザー顕微鏡などで観察した結果、ME2329 と ME778 の根粒形成とその微細構造は野生株とほぼ同じであった。ME966 の根粒形成は野生型に比べて遅れる傾向にあったが、ME966 は野生型に比べて生育速度が遅く、根粒形成の遅延は生育の遅さによる二次的な影響と考えられた。

(4) マッピングにより、ME2329 の原因遺伝子は 4 染色体の南側にあることがわかった。また ME778 は第 2 染色体上にあることが示されたが詳細な位置は判別不可能であった。ME966 の位置は第 2 染色体の南側、ME823 の変異点は第 5 染色体の 12-15cM の近傍にあると絞られていたが (図 2)、菌根表現型が不安定なため、さらなる絞り込みが困難であった。

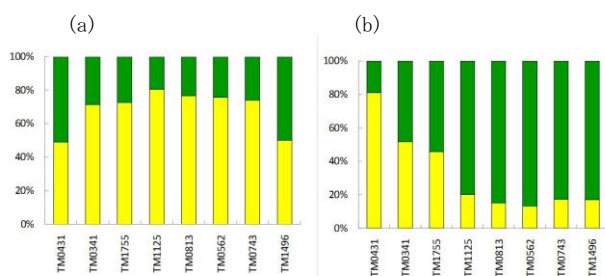


図 2 菌根共生特異的変異株 ME823 のマッピング

ME823 について、第 5 染色体の SSR marker の TM0431 と TM1496 による結果が MG-20 (マーカーの位置の染色体 2 本とも変異株 MG-20 由来) と Hetero (マーカーの位置の染色体が変異株 MG-20 由来と交配した B-129 の各 1 本ずつ) の組み合わせの株を選抜し、(a) ME823 の Myc- : AM 菌の感染が野生株と比べて低い株について、(b) ME823 の Myc+ : AM 菌の感染が野生株と同程度の株について、それぞれマッピングを行った。■ MG-20 ■ Hetero MG-20 の割合が高いマーカー近傍に原因遺伝子が位置していると考えられる。

(5) 日本国内ではマメ科植物において初めて AM 菌共生特異的変異株を単離し、AM 共生成立前期と後期に関与する変異株であることを明らかにした。本研究で得られた菌根共生特異的変異は AM 共生機構に関する研究の発展に貢献できると思われる。今後は、主に

海外における研究で報告された AM 共生の成立に特異的な遺伝子との比較や、得られた変異株の原因遺伝子を決定する必要がある。

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 2 件)

- ① 齋藤勝晴・林誠、アーバスキュラー菌根菌との共生、細胞工学、査読無、Vol. 30、No. 2、2011、149-154
- ② Katsuharu Saito, Kazuo Sugawara, Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungal colonization for coexisting plant in Miscanthus-type semi-natural grassland, Journal of Integrated Field Science、査読無、Vol. 7、2010、29-35

[学会発表] (計 13 件)

- ① 小島知子、大場広輔、齋藤勝晴、菅沼教生、川口正代司、大友量、ミヤコグサ菌根共生特異的変異株 ME2329 と ME778 の表現型と連鎖解析、植物微生物研究会第 22 回研究交流会、2012 年 9 月 25-27 日、神戸大学
- ② 寺澤隼矢・小島知子・川口正代司・大友量・齋藤勝晴ミヤコグサ菌根共生変異体 ME966 の表現型解析、植物微生物研究会第 21 回研究交流会、2011 年 9 月 20-22 日、岡山大学
- ③ 小島知子、大場広輔、齋藤勝晴、菅沼教生、川口正代司、大友量、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 (第 2 報)、植物微生物研究会第 21 回研究交流会、2011 年 9 月 20-22 日、岡山大学
- ④ 齋藤勝晴、菌根共生から根粒共生への進化の分子基盤、日本シダ学会 (招待講演) (日本植物学会第 75 回大会内)、2011 年 9 月 17 日、東京大学
- ⑤ 小島知子、大場広輔、齋藤勝晴、菅沼教生、川口正代司、大友量、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, 2010 年 9 月 20-24 日、青島パームビーチホテル (宮崎県)
- ⑥ 西村あおい・鈴木伊作・江沢辰広・齋藤勝晴、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、日本土壤肥料学会京都大会、2009 年 9 月 15-17 日、京都大

学

- ⑦ 小島知子、大場広輔、齋藤勝晴、菅沼教生、川口正代司、大友量、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、植物微生物研究会第19回交流会、2009年9月8-10日、松本市あがたの森文化会館
- ⑧ Katsuharu Saito、Yumi Isobe、Masayoshi Kawaguchi、Common *SYM* gene *NUP85* affects pollen tube growth in *Lotus japonicus*、6th International Conference on Mycorrhiza、2009年8月9-14日、Convention Centre of Ouro Minas Palace Hotel, Belo Horizonte, Brazil

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 知子 (KOJIMA TOMOKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所・草地管理研究領域・主任研究員
研究者番号：70355080

(2) 研究分担者

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