

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03824

研究課題名(和文) 外生菌根菌 *Cenococcum geophilum* における耐塩性の分子基盤の解析研究課題名(英文) Molecular analysis of salt tolerance in an ectomycorrhizal fungus, *Cenococcum geophilum*

研究代表者

練 春蘭 (Lian, Chunlan)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授

研究者番号：40376695

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)：津波などの被害を受けた海岸マツ林を再生復元するため、樹木成長にとって不可欠な外生菌根菌に着目した。広域分布種である *Cenococcum geophilum* を南極以外の大陸の異なる生育環境から計450菌株を分離・培養し、菌株ごとの耐塩性を評価した。また、耐塩性の強、弱株を用いて、*C. geophilum* 耐塩性の生理的メカニズムの解明とトランスクリプトーム解析により耐塩性に関連する候補遺伝子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で分離した *C. geophilum* の高耐塩性菌株は、塩濃度が高まった海岸林の再生復元に応用が期待できる。また、全球のおよび異なる生育環境から分離・培養した450の *C. geophilum* 菌株は、将来的に外生菌根菌の生態や生理機能の解明を目指したゲノミクス研究や他の荒廃地植生回復に向けた研究にも利用可能な、貴重な遺伝資源となる。

研究成果の概要(英文)：Ectomycorrhizal (ECM) fungi form mutualistic associations with host trees, which enhances the tolerances of host plants to different extreme environments. To effectively restore the coastal forests damaged by tsunamis or typhoons, the isolates of *Cenococcum geophilum*, a widely distributed ECM fungus were isolated at the global scale and their salt tolerances were evaluated. The salt-tolerant mechanisms of *C. geophilum* by comparing the differences of physiological response and gene expression between salt-sensitive and tolerant isolates of *C. geophilum* under salt stress were investigated.

研究分野：森林生態遺伝学・森林共生生物学

キーワード：*Cenococcum geophilum* 外生菌根菌 耐塩性 トランスクリプトーム解析 ゲノムワイド関連解析 GWA S解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、東日本大震災による津波被害により東北地方太平洋岸のマツ林が大きな被害を受け、その再生復元が喫緊の課題となっている。しかし、津波被害を受けた土壌では、従来よりも塩濃度が高いところも少なくなく、従来の海岸林造成技術では現在の問題を解決できない可能性がある。森林の主要な樹木の根には菌根菌という土壌微生物が共生している。菌根菌は樹木から光合成産物を分けてもらう代わりに、土壌中から効率的に養分を吸収し、植物に供給する働きを持つ。菌根菌から供給される養分は植物にとって不可欠なものであり、菌根菌と共生しない樹木が野外において生き残ることは無い。そのような背景の中、ホストである樹木の養分吸収を担い、耐塩性の付与を行うことのできる菌根菌について注目が集まっている。海岸マツ林で優占する菌根菌としては、*Cenococcum geophilum* 菌 (以下 Cg) が挙げられる。本種は広域分布する普通種であり、しばしばマツ類と共生する。また、Cg 菌には産地や系統によって耐塩性に差があり、分離培養系では塩濃度を高めた培地で培養することによる耐塩性評価が行えるようになっている。しかし、菌根菌を分離培養するには非常に手間と時間がかかり、効率的に高耐塩性菌株を選抜することは難しい。本研究では、塩濃度が高い培地で Cg 菌を培養し、塩処理前後でトランスクリプトーム解析を行えば、耐塩性の高い菌株と低い菌株を比較することにより、耐塩性の分子基盤に迫ることができると考えた。この分子基盤を解明できれば、関連する遺伝変異をマーカー化してゲノム情報を抽出することにより、分離培養をすることなく、高耐塩性菌株を選抜できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、海岸林に生息するマツと共生する菌根菌で広域分布種である Cg 菌に着目し、Cg 菌の耐塩性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。まず、分離培養系で Cg 菌の耐塩性試験を行い、耐塩性を持つ菌株を選抜する。次に、それをマツの苗に接種した共生系を通じて、接種されたマツの耐塩性が向上するかを検証し、Cg 菌における耐塩性の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 異なる生育環境から採取・分離培養した Cg 菌を対象に、高塩濃度と通常の培地で培養し、菌株ごとの耐塩性を評価する共に、各菌株の DNA を抽出し、Cg 菌の耐塩性に関わる遺伝子を探索するため、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行う。
- (2) 耐塩性の強・中・弱の菌株を用いて、高塩処理に対する Cg 菌の生理的応答を調べる。
- (3) 強耐塩性株と弱耐塩性株の塩類処理前、処理後からそれぞれ RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析による Cg 菌の耐塩性に関わる遺伝子を探索する。
- (4) 耐塩性の異なる菌株をマツ苗に接種し、温室内で栽培するとともに、塩類を処理し、Cg・マツの共生系における Cg の耐塩性に関わる遺伝子の発現解析を行う。
- (5) 得られた耐塩性に関連する遺伝変異をマーカー化して、分離培養せずにゲノム情報から高耐塩性菌株を選抜するジェノミック選抜の基盤を創出する。

4. 研究成果

(1) Cg 菌の採取と分離培養

北半球 6 地域、日本 (北海道、岩手、新潟、埼玉、千葉、長野、静岡、山梨、京都、和歌山、宮崎、沖縄、243 菌株)、中国 (黒竜江、遼寧、内モンゴル、西寧、新疆ウイグル自治区、雲南、重慶、河南、江蘇、福建、海南、173 菌株)、フィンランド (7 菌株)、カナダ (4 菌株)、アメリカ (2 ヲ所、17 菌株)、タイ (6 菌株) の針葉樹林と広葉樹林から、Cg の菌根および菌核を採取し、計 450 の Cg 菌株を分離した。

(2) 菌糸培養系で Cg 菌の耐塩性評価

15 集団から 129 の Cg 菌株を異なる塩濃度 (0、50、125、250、500 mM NaCl) で培養

し、耐塩性の評価を行った。40 日培養後、129 株のうち 35 菌株が、対照処理(0 mM NaCl) と比べて 250 mM NaCl 処理において菌糸成長量が 60%以上減少し、50 菌株は成長が 0~50%減少した。一方、44 菌株では対照区より成長が促進され、このうち 7 菌株が 500 mM NaCl 処理においても菌糸成長が顕著に促進された。集団間の耐塩性の多様性は、同じ地域の山地の集団に比べて海岸林の Cg 集団は有意に耐塩性が高く、集団内の耐塩性の分散が小さいことが分かった。一方、山地林から採取した Cg 菌株の耐塩性は多様で、同じ集団から採集した菌株であっても、耐塩性が強いものもから弱いものまで見られた(未発表)。

(3) 高塩処理に対する Cg 菌株の生理的応答

耐塩性を評価した Cg 菌株のうち、耐塩性の低い 6 株(125 mM の培地で成長がみられない 3 株および 250 mM 培地で成長がみられない 3 株)(以下、弱)、250 mM 培地で成長が 0~50%減少し 500 mM 培地で成長が見られなかった中程度の 3 株(以下、中)、250 mM 培地で成長が促進された 3 株(以下、好塩)を実験に用いた。液体培地で培養した菌株菌糸をそれぞれ 0 mM と 250 mM NaCl の液体培地でさらに 2 週間培養した。培養後、液体培地の pH、各菌株菌糸の水分、Na、K、Ca、P および H₂O₂ の含量、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)とペルオキシダーゼ(POD)の活性を測定し、耐塩性の異なる Cg 菌株の生理的応答を明らかにした(Li et al., 投稿準備中)。

(4) Cg 菌の耐塩性に関わる遺伝子の探索

(3) の Cg 材料のうち、耐塩性の弱(3)、中(2)と好塩の株(1)を用いた。それぞれの株について 0 mM と 250 mM NaCl の液体培地で 48 時間培養した菌糸から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。解析の結果、計 541 の発現の異なる遺伝子(DEG)が同定され、うち 78 遺伝子のアノテーションが得られた。GO term が付けられた遺伝子は 35 で、19 のパスウェイに分類された。このうち、多くの遺伝が含まれたパスウェイは catalytic activity(7)、hydrolase activity(2)、transporter activity(3)、protein kinase activity(4)、monooxygenase activity(3)であった。また、qPCR を用いて 8 遺伝子の発現を検証したところ、RNA-seq 解析とほぼ同様の傾向が得られた(Li et al., 投稿準備中)。

(5) 異なったマツ樹種の耐塩性の評価

マツ材線虫病抵抗性と耐塩性の両方が高い材料を作成するため、アカマツ、クロマツとアイグロマツ(クロマツ×アカマツ雑種由来)の実生を対象に、海水を用いて耐塩性を調べた。耐塩性は、クロマツ>アイグロマツ>アカマツの順であり、アイグロマツは比較的耐塩性があり、かつマツ材線虫病に対して一定の抵抗性を示し、海岸林再生の材料として利用できる可能性がある(米道ら、2020)。

(6) その他

- ・現在、上述の耐塩性を評価した 129 菌株に加え、さらに 170 菌株の耐塩性の評価をほぼ完了した。
- ・集められた菌株のうち 300 菌株から DNA を抽出し、次世代シーケンサでゲノム解読をした。今後、ゲノム全体にわたる遺伝変異(SNPs)と耐塩性とを比較解析することで、耐塩性と関連したゲノム領域の解明への研究展開を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 米道学・塚越剛史・軽込勉・久本洋子・大森良弘・練春蘭・佐藤光彦・佐々木崇徳・松尾歩・陶山佳久・後藤晋	4. 巻 102
2. 論文標題 クロマツ×アカマツ推定雑種から得られた実生苗の耐塩性 海岸林再生に用いる材料としての利用可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日林誌	6. 最初と最後の頁 101
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 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 Vaario Lu-Min, Asamizu Shumpei, Sarjala Tytti, Matsushita Norihisa, Onaka Hiroyasu, Xia Yan, Kurokochi Hiroyuki, Morinaga Shin-Ichi, Huang Jian, Zhang Shijie, Lian Chunlan	4. 巻 80
2. 論文標題 Bioactive properties of streptomycetes may affect the dominance of Tricholoma matsutake in shiro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s13199-020-00678-9	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

1. 著者名 Zhang Shijie, Vaario Lu-Min, Xia Yan, Matsushita Norihisa, Geng Qifang, Tsuruta Momi, Kurokochi Hiroyuki, Lian Chunlan	4. 巻 29
2. 論文標題 The effects of co-colonising ectomycorrhizal fungi on mycorrhizal colonisation and sporocarp formation in <i>Laccaria japonica</i> colonising seedlings of <i>Pinus densiflora</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycorrhiza	6. 最初と最後の頁 207 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s00572-019-00890-6	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 該当する

〔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 Jiali Li, Ruiyang Xu, Norihisa Matsushita, Chunlan Lian
2. 発表標題 Salt-tolerance mechanisms of <i>Cenococcum geophilum</i> , an ectomycorrhizal fungus
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 王化庸・松下範久・練春蘭
2. 発表標題 異なる地域由来のCenococcum geophilumに白樺に対する感染の違いがあるか？
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	松下 範久 (Matsushita Norihisa) (00282567)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	後藤 晋 (Goto Susumu) (60323474)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	森長 真一 (Morinaga Shin-Ichi) (80568262)	日本大学・生物資源科学部・助教 (32665)	