

平成23年5月11日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380040

研究課題名（和文） 植物－菌類共生系におけるリン酸輸送の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanism of phosphate transport in plant-fungal symbiosis

研究代表者

江澤 辰広（EZAWA TATSUHIRO）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40273213

研究成果の概要（和文）：アーバスキュラー菌根菌における主要なリン酸輸送形態がポリリン酸であること、ポリリン酸の最大蓄積時には全リンの60-70%に達すること、このとき電荷バランスをとるために、同時に Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの陽イオンも取り込まれることを明らかにした。ポリリン酸蓄積時に関わる遺伝子群をクローニングするための前段階として、リン酸吸収時に菌糸で発現しているmRNA（cDNA）の効率的抽出法を確立した。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that i) polyphosphate is the main storage of phosphorus in arbuscular mycorrhizal fungi, ii) polyphosphate consists of 60-70% of total cellular phosphorus at maximum, and iii) Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} are also accumulated during polyphosphate accumulation to neutralize negative charge of polyphosphate. An efficient method to extract RNA from hyphae has been established for large scale sequencing of mRNA expressed during polyphosphate accumulation in hyphae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

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、共生、リン酸、オルガネラ、ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

アーバスキュラー菌根菌は糸状菌の一種で、土壤中に普遍的に存在しており、陸上植物の80%と共生関係を持つことができる。この菌と植物との共生は、およそ4億年前、原始植物が陸上に進出した時代に始まり、現在

までその形態をほとんど変えていない。この菌は土壤中の希薄なリンを濃縮して宿主に供給する機能を持っているため、リン酸の有効化を通じて陸域生態系を支える極めて重要な役割を果たしている。しかしながら、人工培養が困難なことから、その生態や物質輸

送の分子機構はほとんどわかっていない (Ezawa et al, 2002)。この共生系におけるリン酸獲得のメカニズムは以下のように推定されている：土壤中に張り巡らせた菌糸ネットワークに取り込まれたリン酸(Pi)は、無機ポリリン酸(P~P~P)の形で液胞(未同定オルガネラ)に濃縮され、これが原形質流動などにより宿主植物根内の樹枝状体まで運ばれる(リン酸のオルガネラ輸送)と、再び Pi に加水分解されて、根のアポプラストに放出される(江沢ら, 2004)。

ポリリン酸とは Pi が高エネルギーリン酸結合により 3~1,000 残基程度まで直鎖状に連なった無機高分子であり、原核~真核生物の細胞中に普遍的に見出される化合物である。特に微生物においては、主にリンの貯蔵形態として重要な役割を果たしており、原核生物では合成・代謝・分解に関わる遺伝子が数多く同定されている。一方、アーバスキュラー菌根菌や酵母などの真核微生物においても、極めて多量のポリリン酸を細胞内に蓄積する(e.g.酵母では最大で乾重の 10%)ことが知られているものの、細胞性粘菌(Gomez-Garcia and Kornberg, 2004)以外では遺伝子はおろか合成酵素の活性すら検出された例は無く、真核生物におけるポリリン酸合成経路の解明がこの分野における最重要課題の一つとなっている(Kornberg et al, 1999)。

アーバスキュラー菌根菌は、ポリリン酸合成システムを持っていることで、自らが必要とする以上の大過剰のリン酸を吸収・蓄積することが可能であり、このシステムこそが宿主植物へのリン酸供給プロセスにおいて中心的な役割を果たしていると考えられる。申請者らはこれまでに世界で初めて生きたままの菌根菌の液胞形態の観察に成功する(Uetake et al, 2002)と共に、菌体内の微量のポリリン酸を定量するシステムを確立し、菌糸におけるリン酸の吸収とそれに続くポリリン酸の合成が驚異的な速さで起こることを明らかにした(Ezawa et al, 2003)。さらに菌糸の細胞分画法を確立し、特定の画分において ATP を基質としたポリリン酸の合成活性が存在することを見出した(H17-18 科研費)。本合成活性の検出は真核生物では細胞性粘菌に次いで 2 例目、多細胞生物では世界で初めての例であり、H18 年度にはいくつかの国際学会において発表した。一方、我々は菌根菌から放出されたリン酸の獲得に関与する宿主(ミヤコグサ)のリン酸トランスポーター遺伝子(LjPT3)の発現抑制変異体入手し、菌から宿主へのリン酸移行が抑制されることで樹枝状体でのポリリン酸分解が抑制され、菌糸内のリン酸代謝に関連する遺伝子の発現も変化することを認めた。この変異体を用いると菌糸内でのリン酸代謝に関連する遺伝子の発現を抑えることができるため、サブト

ラクション法などの応用により、これまで困難であった菌側の遺伝子を獲得できる可能性が高まった。

菌根共生系の研究は基礎と応用の両側面から、その重要性が認められているものの、世界的には研究の容易な植物側の生理・分子応答などに関するものが多く、培養困難な菌側の生理・生化学研究に真正面から取り組んでいるグループは少ない。その中で申請者らの研究は、最も重要なリン酸代謝に焦点をあてて前述のようなトップレベルの成果を上げ続けていることから、世界的にも注目されている。

申請者らは菌根菌ゲノムプロジェクト国際コンソーシアムのメンバーとして、特に代謝や ATP 結合部位を持つ膜輸送体ファミリー、モータータンパク質のなどのカテゴリーに属する遺伝子の注釈(アノテーション)作業を担当していることから、本申請プロジェクトにおいて、リン酸代謝・輸送に関連する候補タンパク質のアミノ酸配列または遺伝子断片に関する情報が得られれば、即座にゲノム中から候補となる遺伝子を絞り込むことが可能であり、このことは我々が世界をリードする研究を行う上で極めて大きなアドバンテージである。

2. 研究の目的

本申請課題ではアーバスキュラー菌根菌におけるリン酸獲得と宿主への輸送メカニズムを解明するために、以下の 2 つのプロジェクトを設計した。

(1) ポリリン酸合成活性の特性解析と活性局在オルガネラの同定：

H17-18 科研費研究において、菌糸の細胞分画法を確立し、ポリリン酸合成活性を検出することに成功している。本研究では、この成果を発展させるために、本活性の阻害・賦活化剤の探索を行い、酵素化学的特性を調べると共に、電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡によるポリリン酸合成オルガネラの形態的特徴および組織局在性を明らかにする。

(2) ポリリン酸集積プロファイルの解析と合成・分解酵素遺伝子の単離：

アーバスキュラー菌根菌におけるポリリン酸集積の生理プロセスを明らかにすることで、リン酸輸送におけるポリリン酸の役割および集積メカニズム解明へのアプローチ戦略を立てる。

一方、我々は国際コンソーシアムのメンバーとして、代謝や ATP 結合部位を持つタンパク質をコードする遺伝子群に注釈を賦与する作業(アノテーション)を行うことが求められている。本研究ではこの作業を通じて、公表前の塩基配列情報から得られた知見を

いち早く遺伝子の単離・クローン化にフィードバックし、目的遺伝子の絞り込みに利用する。

3. 研究の方法

(1) ポリリン酸合成活性の特性解析と活性局在オルガネラの同定

本研究室で酸性土壌より分離した *Glomus* sp. HR1 株を 2 分画メッシュバッグ栽培法により培養し、得られた外生菌糸より細胞分画法によってポリリン酸合成活性画分を得た。各オルガネラの指標酵素の活性や各種阻害剤への感受性、さらに、電子顕微鏡による観察を行うことで、ポリリン酸合成活性を持つオルガネラを特定した。

(2) ポリリン酸集積プロファイルの解析と合成・分解酵素遺伝子の単離

①ポリリン酸集積プロファイルの解析：

Glomus sp. HR1 株を 3 分画メッシュバッグ栽培法により培養後、再外層の菌糸画分にリン酸を添加してポリリン酸集積の経時変化を測定した。同時に全リンやオルトリン酸の測定も行い、菌糸が獲得する全リンに占めるポリリン酸の割合の変化も算出した。また、ポリリン酸集積に伴う大量の負電荷を中和する対イオンを特定するために、菌糸から無機イオンおよび塩基性アミノ酸を抽出・定量した。

②ポリリン酸合成・分解酵素遺伝子の単離：

トランスクリプトームによる目的遺伝子の一斉配列決定を行うために、まず、2 分画メッシュバッグ栽培法により外生菌糸の大量増殖を行った。次に菌糸からの効率的な RNA 抽出法を確立するため、市販キット、SDS-フェノール法、および CTAB 法による RNA の抽出効率の比較と品質チェックを行った。

また、国際ゲノムコンソーシアムの提供する膨大な配列情報の中から、候補となる遺伝子の塩基配列情報ピックアップし、この後に行う予定のトランスクリプトームのためのリソース整備を行った。

4. 研究成果

(1) ポリリン酸合成活性の特性解析と活性局在オルガネラの同定：

菌糸細胞の分画後、比重 1.06-1.09 の画分に、ATP を基質としたポリリン酸合成活性を検出した。この活性と原形質膜およびミトコンドリア指標酵素との局在が一致しないことから、この活性は液胞膜上に局在することが示唆された。また、電子顕微鏡観察もこのことを指示していた。さらに本活性は V-ATPase 活性阻害剤や H⁺ 脱共役剤 によって阻害されないことから、ATP は直接のリン酸供与体として働くことが示唆された (Tani et al. 2009)。

(2) ポリリン酸集積プロファイルの解析と合成・分解酵素遺伝子の単離

①ポリリン酸集積プロファイルの解析：

外生菌糸ではリン酸施用後、直ちにポリリン酸が蓄積され始め、4-5 時間後には最大値に達し、その後、漸減した。外生菌糸におけるポリリン酸の減少が始まると同時に、植物根内の菌糸におけるポリリン酸の増加が観察されたことから、外生菌糸におけるポリリン酸の減少は内生菌糸へのリン酸輸送によるものと考えられた。このとき、全リン含量の増減はポリリン酸の増減と同調していたのに対し、オルトリン酸含量は常に一定であったことから、菌糸に取り込まれたリン酸は直ちにポリリン酸として蓄積されると考えられた。また、ポリリン酸含量は最大で全リンの 60-70% に達することから、ポリリン酸はアーバスキュラー菌根菌における主要なリン酸輸送形態であることが証明された (Hijikata et al. 2010)。

ポリリン酸の急速な蓄積と同調的に Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ などの無機陽イオンが蓄積されるのに対し、有機性陽イオンである塩基性アミノ酸の含量はほとんど変化しないこと、また、上記 4 種の陽イオンの合計電荷はポリリン酸の全電荷にほぼ匹敵することから、ポリリン酸蓄積により生じる大量の負電荷は、無機陽イオンにより中和されるものと考えられた (投稿準備中)。

②ポリリン酸合成・分解酵素遺伝子の単離：

RNA 抽出のための菌糸の培養を行った結果、最終的に 5 g 程度の材料を得ることができた。また、RNA の抽出は市販のキット (キアゲン社製) を用いると最も効率的、かつ安定的であることがわかった。この方法で調整した RNA の品質チェックを依頼した (北海道システムサイエンス社) とし、パイロシーケンスを行うに耐えるものであることが示された。また、国際ゲノムコンソーシアムにおけるアノテーション作業を行う過程で、無機元素吸収の輸送体やポリリン酸合成・分解に関与すると予想される遺伝子群をピックアップすることができた。これにより、パイロシーケンス法による mRNA (cDNA) の大規模解析を通じて、リン酸吸収および輸送に関与する遺伝子群のクローニングおよび機能解析を行う準備が整った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hijikata, N., Murase, M., Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M. and **Ezawa, T.** (2010) Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186, 285-289. (査読有り)

2. Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M., **Kuga, Y.** and **Ezawa, T.** (2009) Polyphosphate-synthesizing activity in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus: ATP-dependent but proton gradient-independent synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7044-7050 (<http://hdl.handle.net/2115/43031>). (査読有り)
3. Hossain, M. M., Tani, C., Suzuki, T., Taguchi, F., **Ezawa, T.** and Ichinose, Y. (2008) Polyphosphate kinase is essential for swarming motility, tolerance to environmental stresses, and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72, 122-127. (査読有り)

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 土方野分ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるポリリン酸代謝：潜在的蓄積能とその電荷バランス調節メカニズム. 日本土壤肥料学会, 2009年9月16日, 京都.
2. Hijikata *et al.* Dynamics of inorganic and organic cations during polyphosphate-hyperaccumulation in an arbuscular mycorrhizal fungus. 6th International Conference on Mycorrhiza, 9-14 Aug 2009, Belo Horizonte, Brazil.
3. **Ezawa et al.** Polyphosphate is responsible for the rapid and massive accumulation of phosphorus in arbuscular mycorrhizal fungi. 6th International Conference on Mycorrhiza, 9-14 Aug 2009, Belo Horizonte, Brazil.
4. **江沢辰広**. 植物のリン酸獲得戦略としての菌根形成—リン酸濃縮と長距離輸送メカニズムへのアプローチ—. 東京大学生物生産工学センターシンポジウム, 2008年12月5日, 東京.
5. 土方野分ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸蓄積と同調的に吸収されるカチオンの特定. 菌根研究会, 2008年10月18日, 鶴岡.
6. 谷千春ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸合成システム. 農芸化学会北海道支部会, 2008年8月13日, 札幌.
7. 土方野分ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸の潜在的蓄積能とその対イオンとの関係. 農芸化学会北海道支部会, 2008年8月13日, 札幌.
8. 土方野分ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸輸送のプロファイリング：オルトリン酸の恒常性と全リンおよびポリリン酸の同調的变化. 2007年11月17日, 津.
9. 谷千春ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるATP依存性ポリリン酸合成活性—リン酸による活性誘導とその酵素学的特性—. 植物微生物研究会, 2007年9月20-21日, 鹿児島.

10. 村瀬正剛ほか. アーバスキュラー菌根菌におけるポリリン酸合成および輸送ポテンシャル. 日本土壤肥料学会, 2007年8月24日, 秋田.

〔その他〕

成果掲載ホームページ:

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/botagr/rhizo/RhizoCont/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江澤 辰広 (EZAWA TATSUHIRO)
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

青野 俊裕 (AONO TOSHIHIRO)
東京大学・生物生産工学研究センター・助教
研究者番号: 10372418

(3) 連携研究者

久我 ゆかり (YUKARI KUGA)
信州大学・農学部・准教授
研究者番号: 30232747

(4) 研究協力者

谷 千春 (TANI CHIHARU)
北海道大学・大学院農学研究院・研究員
土方 野分 (HIJIKATA NOWAKI)
北海道大学・大学院農学院・博士課程
村瀬 正剛 (MURASE MASATAKE)
北海道大学・大学院農学院・修士課程