

## 1 研究の背景と目的

アーバスキュラー菌根菌（以下、菌根菌）は、植物の根に共生器官を形成し、光合成産物などの炭素源を与える代わりにリンを供給する相利的相互作用「菌根共生」を築く。この菌根共生による養分供給は宿主植物の生育を大きく促進する効果を持つことから、微生物肥料としての農業利用に注目されている。しかし、共生菌である菌根菌は宿主植物なしに生活環を完結できない絶対共生菌であることや、多核体かつヘテロカリオン（異核共存体）であることなどから、菌側からの菌根共生成立に関する分子機構の解明はほとんど進んでいない。そのような現状の中、我々はトランスクリプトーム解析によって、宿主植物の感染過程に関与する菌根菌共生遺伝子 *Strigolacton induced small protein 1 (SIS1)* を同定している。

本研究では、この SIS1 の機能解析によって、菌根共生の成立に重要な菌根菌を宿主植物が受け入れる「受容機構」の解明を目的とする。

## 2 研究方法・研究内容

本研究では、SIS1 遺伝子を同定した菌根菌 *Rhizophagus irregularis* の宿主植物として、植物側の共生機構の解明が進んでいるマメ科モデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いた。ミヤコグサは、多くの研究者が植物側からの菌根共生研究に用いており、それらの知見を菌側からの共生機構の解明に向けた研究に用いることができる。また、先に述べたように、菌根菌自体の分子機構の解析ツールは乏しいが、共生パートナーである宿主植物側の改変によって菌側に作用させることや、植物の状態から菌の変化を観ることが可能である。そこで、これらのツールを用いて SIS1 の機能解析を行った。

SIS1 は宿主植物が分泌する共生シグナル分子ストリゴラクトンの受容によって菌根菌内で誘導される共生遺伝子である。SIS1 は 149 アミノ酸残基ほどの small protein をコードし、N 末端に 20 アミノ酸残基ほどの分泌シグナルを持つ以外は、データベースに登録されている特徴的なドメインなどは見られない (図 1)。しかし、病原応答などでは、small protein が植物に作用するエフェクターとしての機能することが知られており、SIS1 も菌根菌側から宿主植物に作用する共生エフェクターとしての機能を持つことが期待される。そのため、宿主植物内でのタンパク質局在や過剰発現により、共生応答や菌根菌感染率の変化を生じさせうるかについて詳細な解析を行う。

### 3 研究成果

#### 1. SIS1 タンパク質の局在解析

##### SIS1 分泌シグナルの機能確認

SIS1 はタンパク質配列から分泌シグナルを持つことが推定されている。この分泌シグナルの機能を確認するため、SIS1 と蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作成し (図 1A)、SIS タンパク質の局在解析を行った。ここで、菌根菌自体は形質転換が不可能であるため、菌根菌にはこのコンストラクトを導入することはできない。そこで、この局在解析では、菌根菌遺伝子の局在解析に用いられたことがある病原糸状菌のイモチ病菌 (*Pyricularia oryzae*) に (*Agrobacterium tumefaciens*) 法によってコンストラクトを導入し、分泌シグナルの機能の確認を行った。

形質転換イモチ病菌は抗生物質抵抗性で選抜し、孢子誘導を行って得られた孢子を蛍光顕微鏡下で観察した。GFP での蛍光が孢子中 (3 細胞) すべての細胞の内部で見られたのに対して、SIS1-GFP の蛍光は細胞同士を区切る隔壁周辺にその蛍光が集中していた。そして逆に細胞内部ではあまり蛍光が見られなかった。このことから SIS1 のもつ分泌シグナルが働き細胞膜の外側に分泌され、隔壁周辺に集まったものと考えられる。よって推定であった分泌シグナルが生体内で働く分泌シグナルであることを明らかとした。

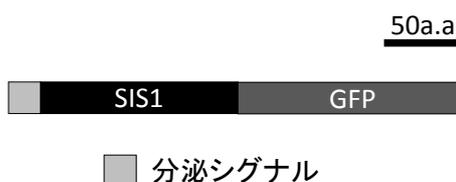


図 1. SIS1 の局在解析に用いた GFP 遺伝子との融合コンストラクト

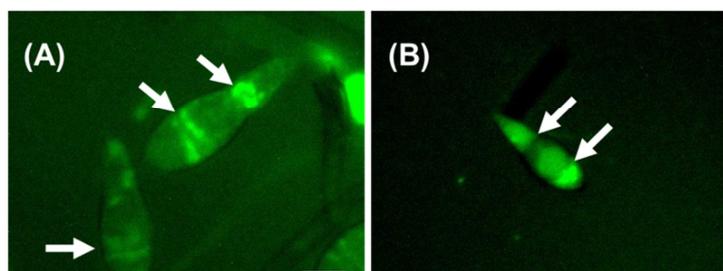


図 2. SIS1-GFP を発現した形質転換イモチ病菌

*P. oryzae* に (A) SIS1-GFP および (B) GFP 単体を導入し、蛍光顕微鏡により GFP 蛍光を検出した。矢印が孢子の各区域を分ける隔壁を表す。スケールバーは 10 $\mu$ m を示す。

#### 2. SIS1 の宿主感染時における機能解析

### SIS1 過剰発現体の作成と共生表現型の解析

SIS1 が菌根菌感染に与える影響を調べるため、*SIS1* 遺伝子を過剰発現させたミヤコグサを作成し、菌根菌の感染や共生器官の形成などへの影響について調べた。ここでは *SIS1* 全長と、分泌シグナルを除いた  $\Delta$ *SIS1* などを植物のユビキチンプロモーター制御下で過剰発現させた (図 3 A, B)。また、植物細胞で分泌シグナルとして機能することが知られている *SbtM1* 遺伝子の分泌シグナル配列を  $\Delta$ *SIS1* に融合させたコンストラクト (図 3 C, D) を導入し、過剰発現させた  $\Delta$ *SIS1* を細胞外に分泌させることで、菌根菌から分泌された *SIS1* と同様の

状態を作り、*SIS1* 過剰発現の感染への影響を観察した。*SIS1* は共生時に特異的に誘導される遺伝子であり、感染に対して正の作用を持つことが推測されることから、*SIS1* の過剰発現により、宿主植物内への菌根菌の感染促進効果がみられることが期待された。それぞれの *SIS1* を過剰発現させたミヤコグサに対して AM 菌を感染させ、感染率の測定を行った。どのコンストラクトを過剰発現させた植物体においても、感染率、樹枝状体形成率、感染時の樹枝状体形成率の項目で野生型と比較して上昇傾向はみられたが、有意差は得られなかった。一方、樹枝状体の顕微鏡写真を示したように (図 4)。コンストラクト A と D の植物体において、野生型と比較して樹枝状体が多く形成されている部分では密度が特に高く植物の根の中心柱を覆いつくすような形態が何箇所も見られた。

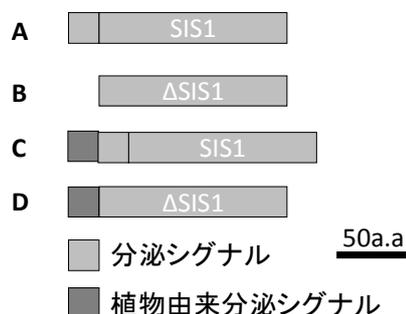


図 3. *SIS1* 過剰発現に用いたコンストラクト

それぞれをユビキチンプロモーターでミヤコグサに過剰発現させた



図 4. *SIS1* 過剰発現体における樹枝状体形成

野生型 (A) と比較して、コンストラクト A、コンストラクト D を導入した植物体において、樹枝状体形成の促進が見られた。

先行研究で行われた *SIS1* ノックダウン状態での共生では感染率の低下や樹枝状体形成

率の低下、樹枝状体形態不全などが見られたことから、過剰発現体では期待された通り、逆の表現型が得られた。

これらのことから、SIS1 は植物と AM 菌との共生において、AM 菌の宿主植物への感染を促進する機能を持つことが確認できた。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

菌根共生機能の利用でまず挙げられるのは、微生物肥料としての農業利用である。リン鉱石を原料とする化成肥料に依存した現代農法では、様々な環境・資源問題を引き起こすが、菌根共生などの微生物肥料は、低環境負荷型の農業技術となりうる。そのため、次世代農業としての共生機能の利用は企業にも注目され、最近では世界最大の種苗会社モンサントなどでも微生物機能の利用に向けた様々な取り組みが行われているなど、微生物機能の利用が注目されている。

現在、生物を取り巻くマイクロバイオータの挙動に関する研究は、自然環境下における生物生態の理解に重要な知見を与えるものとして注目され、発展しつつある分野である。そのため、土壌微生物としての菌根菌の共生機構の解析は、宿主への絶対共生性の特徴など、生物 - 微生物間相互作用のモデル系としての知見を与える基礎研究的な面に加え、菌根菌を活用した作物の生産性の向上など、応用研究にも貢献できる成果となる。