

信州大学審査学位論文

RNA-seq 解析によるアーバスキュラー
菌根共生の形成メカニズムの解明

平成 29 年 3 月

生物・食料科学専攻

杉村 悠作

目次

| | |
|----------------------------------|-----|
| 第1章 緒論 | 1 |
| 第2章 トマトとミヤコグサの菌根における比較トランスクリプトーム | 6 |
| 緒言 | 6 |
| 材料と方法 | 9 |
| 結果 | 12 |
| 考察 | 28 |
| 第3章 同期的菌根抑制系を用いた宿主の菌根形成遺伝子の解析 | 31 |
| 緒言 | 31 |
| 材料と方法 | 34 |
| 結果 | 41 |
| 考察 | 93 |
| 第4章 菌根抑制系を用いた菌根菌の共生関連遺伝子の抽出 | 101 |
| 緒言 | 101 |
| 材料と方法 | 104 |
| 結果 | 106 |

| | |
|----|-----|
| 考察 | 117 |
|----|-----|

| | |
|----------|-----|
| 第5章 総合考察 | 121 |
|----------|-----|

| | |
|------|-----|
| 引用文献 | 126 |
|------|-----|

| | |
|----|-----|
| 謝辞 | 151 |
|----|-----|

| | |
|----|-----|
| 要旨 | 153 |
|----|-----|

第1章 緒論

リン資源およびリン酸質肥料

リンは植物の多量必須元素のひとつであり、DNA や細胞膜、生体エネルギーのアデノシン三リン酸（ATP）の原料である。戦後、日本では大量のリン酸質肥料が圃場に投入され、作物の収量増加に貢献した。しかし、日本はリン酸質肥料の原料となるリン鉱石やリン安（リン酸アンモニウム）の全量を海外に依存している。リン酸質肥料の価格は世界情勢の影響を強く受け、近年はリン酸質肥料の価格が高騰し農業生産費を押し上げている。さらに、リン鉱石の埋蔵量は有限であり、長期的には枯渇も懸念されている。日本の畑地の約半分は火山灰土壌の黒ボク土に立地しており、リン酸は黒ボク土に含まれるアルミニウムや鉄と強く結合して大部分が不可給態となる。そのため、作物のリン酸質肥料の利用効率は施肥量の 10%程度と極めて低い（西尾, 2005）。リン酸質肥料の効率的な利用法の確立が求められており、そのひとつとして菌根共生を利用した生産システムの構築が期待されている。

アーバスキュラー菌根共生の利用

アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は、作物を含む 7 割以上の陸上植物種と共生関係を築く。AM 共生は約 4 億年前から成立している共生系と考えられており、これは植物が陸上に進出した時期と重なることから（Remy et al., 1994; Taylor et al., 1995; Brundrett, 2002）、この共生系は陸上植物の生存に寄与したと考えられている。AM 共生が成立すると、植物の光合成によって固定された炭素化合物の一部が AM 菌に供給される。一方で、AM 菌は植物にリンの供給や乾燥ストレス

耐性の付与を通して宿主に対して成長促進効果（菌根効果）を示す。しかし、菌根効果は栽培条件や環境条件によって大きく変動する。例えば、菌根の形成は土壌中のリン酸濃度の影響を強く受けており、低リン酸濃度条件では菌根が発達する一方で、高リン酸濃度条件では菌根形成は強く阻害される。外部環境によって菌根の発達や菌根効果が変動するために、農業での利用は限定的である。菌根効果を圃場レベルで評価する報告はこれまでも見られるが、菌根効果変動するという課題を解決する根本的な手段はまだない。アーバスキュラー菌根共生の形成メカニズムを解明することによって、安定的な菌根形成や共生機能発現に寄与できる可能性がある。

アーバスキュラー菌根共生の形成メカニズム

AM 菌は、宿主植物根の表皮から侵入して根内に内生菌糸を伸長させたあとに、皮層細胞内に枝分かれ構造をした樹枝状体を形成する（Parniske, 2008; Harrison, 2012; Gutjahr and Parniske, 2013）。樹枝状体は、宿主植物と AM 菌との間の養分交換の器官である。近年、遺伝学的解析によってアーバスキュラー菌根共生の形成メカニズムが少しずつ明らかにされてきた。低リン酸濃度条件では植物根から分泌されるストリゴラクトンの量が増加し（Yoneyama et al., 2007）、AM 菌の菌糸分岐や代謝活性が高められる（Akiyama and Hayashi, 2005; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008）。AM 菌は根の表面に菌足を形成し、植物が形成するトンネル様構造である pre-penetration apparatus (PPA) を通して根内に侵入する（Genre et al., 2005）。マメ科植物では、菌根共生および根粒共生に重要なコモン SYM シグナル伝達経路が同定されている（Kistner and Parniske, 2002; Parniske, 2008; Oldroyd et al., 2013）。宿主植物は AM 菌が合成するリポキト多糖やキチン

オリゴマーを受容する。これらのシグナル分子はコモン SYM シグナル伝達経路を活性化し、根の表皮細胞で Ca^{2+} スパイクを誘導する (Sun et al., 2015)。コモン SYM シグナル伝達経路の下流では、菌根形成に必要な *RAM1* 遺伝子などの転写因子の遺伝子発現が誘導される (Pimprakar et al., 2016)。RAM1 を代表とした転写因子は、菌糸侵入や樹枝状体形成、共生機能に関わる重要な遺伝子群を誘導すると考えられている (Gobbato et al., 2012)。しかし、その具体的な分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。

アーバスキュラー菌根共生は、植物だけでなく AM 菌からの作用も加わって成立する。しかし、AM 菌は純粋培養できない難培養性微生物であり、遺伝学的な解析が困難であることから、分子レベルでの AM 菌の作用についてはほとんど分かっていない。ただ最近、植物を介して絶対寄生菌の遺伝子発現を抑制する host-induced gene silencing (HIGS) 法が開発され (Nowara et al., 2010)、AM 菌の単糖輸送体遺伝子 (*MST2*) の機能解析にも応用されている (Helber et al., 2011)。*MST2* 遺伝子は菌根で強く発現しており、HIGS で発現を抑制すると未成熟な樹枝状体が生じる (Helber et al., 2011)。これは *MST2* が減少することで、植物から供給される単糖を AM 菌が取り込めなくなったためと考えられている。HIGS を用いた別の報告として、AM 菌の strigolactone-induced putative secreted protein 1 (*SIS1*) 遺伝子の機能解析がある (Tsuzuki et al., 2016)。*SIS1* 遺伝子は菌根中の菌糸やストリゴラクトンを処理した菌糸で強く発現し、HIGS によって発現を低下させると菌根菌感染率が低下したほか、未成熟な樹枝状体が生じた (Tsuzuki et al., 2016)。*SIS1* は AM 菌が放出する分泌ペプチドであり、植物あるいは AM 菌に作用して、AM 菌の感染を促進していると考えられている。

次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析

次世代シーケンス技術を用いた RNA-seq 解析は、トランスクリプトーム解析において強力なツールとなっている (Wang et al., 2009; Nookaew et al., 2012)。最近、RNA-seq 技術による菌根のトランスクリプトーム解析が行われ、非感染根と感染根の比較によって 3,000 個以上もの発現変動遺伝子がミヤコグサから抽出された (Handa et al., 2015)。これらの発現変動遺伝子の中には、脂質代謝酵素やトランスポーター、転写因子をコードする遺伝子が含まれており、菌根形成において重要な役割を果たしていると考えられている。マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析も重要なツールであるが、マイクロアレイによって得られる菌根の発現変動遺伝子は数百レベルであり (Liu et al., 2003; Hohnjec et al., 2005; Gomez et al., 2009; Guether et al., 2009a; Benedito et al., 2010; Hogenkamp et al., 2011; Gaude et al., 2012; Bonneau et al., 2013; Hogenkamp and Küster, 2013)、RNA-seq で得られる発現変動遺伝子の数に比べて少ない (Handa et al., 2015)。この理由として、RNA-seq で使われているリファレンス配列には遺伝子数が多いことや、低発現遺伝子の検出に優れていることがあげられる (Wang et al., 2014; Handa et al., 2015)。最近、AM 菌 *Rhizophagus irregularis* のゲノムが解読され (Tisserant et al., 2013)、RNA-seq 解析によって宿主側だけでなく AM 菌側の遺伝子発現プロファイルも解析することが可能となった。特に、菌根のような植物と AM 菌が混在する試料であっても、それぞれのゲノム配列に RNA-seq データをマッピングすることで、植物と AM 菌の遺伝子発現プロファイルを区別して解析することができる。

本研究の目的

本研究では、遺伝子発現情報を網羅的に調べることができる RNA-seq 解析を用いて、アーバスキュラー菌根共生の形成メカニズムを解明することを目的としている。本研究では、大きく分けて 3 つの研究テーマを設定した。第 2 章では、トマトとミヤコグサの菌根応答性遺伝子の比較を行うことで、菌根応答性遺伝子の宿主植物間での共通性と独自性を調査した。第 3 章では、高濃度リン酸添加で樹枝状体形成を同期的に抑制し、RNA-seq 解析から樹枝状体の形成に関わるミヤコグサ遺伝子の網羅的抽出を行った。第 4 章では、高濃度リン酸添加後の AM 菌の RNA-seq 解析を実施し、菌根形成に関わる AM 菌遺伝子の抽出を試みた。第 5 章では、第 2 章～第 4 章の 3 つの研究テーマで得られた知見を整理し、アーバスキュラー菌根共生の形成メカニズムについて考察するとともに、AM 菌の農業利用に向けた展望について議論した。

第2章 トマトとミヤコグサの菌根における比較トランスクリプトーム

緒言

AM 菌はリンや窒素、硫黄、亜鉛、銅などの無機養分を植物に供給し、植物の成長を促進させる。陸上植物の 70%以上の種が AM 菌と共生することが可能であり (Brundrett et al., 2009)、菌根形成に関わる遺伝子群は多くの植物種で保存されている (Delaux et al., 2015)。

菌根形成は、植物と AM 菌との間におけるシグナル分子の認識によって始まる。植物根から分泌されたストリゴラクトンは AM 菌によって受容され、AM 菌の菌糸分枝や代謝が活性化する (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008)。一方、AM 菌はリポキト多糖やキチンオリゴマーを放出し、それらは植物によって受容されて、植物細胞内でコモン SYM シグナル伝達経路 (CSSP) が起動する (Maillet et al., 2011; Genre et al., 2013)。CSSP は AM 菌や根粒菌との共生の初期過程に関与しており、これまでに受容体キナーゼ (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002)、イオンチャネル (Ané et al., 2004; Imaizumi-Anraku et al., 2005; Charpentier et al., 2008; Charpentier et al., 2016)、ヌクレオポリン (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Groth et al., 2010)、カルシウム-カルモジュリンキナーゼ CCaMK (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004; Tirichine et al., 2006)、CYCLOPS/IPD3 (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008; Singh et al., 2014) などが同定されている。CSSP を構成する遺伝子は当初、ミヤコグサやタルウマゴヤシなどのマメ科植物の共生変異体の解析によって同定されてきた (Gutjahr et al., 2013; Parniske, 2008; Oldroyd et al., 2013)。現在では、被子植物や裸子植物、シダ

植物、コケ植物を含む菌根性植物に CSSP 遺伝子が保存されていることが分かっている (Banba et al., 2008; Gutjahr et al., 2009; Wang et al., 2010; Delaux et al., 2015)。CSSP の下流では、菌根形成や共生機能に関わる遺伝子の発現が誘導される (Pimprakar et al., 2016)。マメ科植物および非マメ科植物のマイクロアレイや RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から、トランスポーターやペプチド、転写因子、受容体キナーゼ、ジャーミン様タンパク質などをコードする遺伝子が、いずれの植物種でも菌根形成によって強く発現誘導されることが明らかとなった (Liu et al., 2003; Wulf et al., 2003; Manthey et al., 2004; Güimil et al., 2005; Hohnjec et al., 2005; Kistner et al., 2005; Gomez et al., 2009; Guether et al., 2009; Benedito et al., 2010; Hoge-kamp et al., 2011; Gaude et al., 2012; Hoge-kamp, 2013; Handa et al., 2015)。ところが、トマトとタルウマゴヤシの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析で比較したところ、菌根形成時に誘導される遺伝子は植物間でほとんど共通していなかった (Fiorilli et al., 2009)。これは、マイクロアレイのプロブセットがそもそも植物間であまりオーバーラップしていなかったためと考えられている (Fiorilli et al., 2009)。現在のところ、植物種間における菌根応答性遺伝子 (非感染根に対して感染根で発現が誘導または抑制される遺伝子) の共通性と独自性についてはほとんど明らかとされていない。

近年、次世代シーケンサーによる RNA-seq がトランスクリプトーム解析に用いられるようになってきた。RNA-seq はマイクロアレイ等に比べて遺伝子の網羅性や定量性が高い方法である。Handa ら (2015) は、ミヤコグサの RNA-seq データを用いて *de novo* トランスクリプトームアセンブリと発現解析を行い、非感染根と比較して感染根で数千個の遺伝子が発現変動することを明らかにした。また近年、トマトでは高精度のゲノム配列が決定されており (Tomato Genome Consortium, 2012)、網羅性の高いデータを用いて遺伝子発現を解析することが可

能となっている。本研究では、菌根応答性遺伝子の植物種間の共通性と独自性を調べるために、トマトとミヤコグサで菌根形成時の遺伝子発現プロファイルと比較した。さらに、トマトとミヤコグサに感染した AM 菌 *Rhizophagus irregularis* の発現プロファイルも解析した。

材料と方法

生物材料と栽培条件

トマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) とミヤコグサ (*Lotus japonicus* MG-20) の実生をオートクレーブ処理した川砂に移植し、1 個体あたり 500 胞子の *R. irregularis* DAOM 197198 (Mycorise, Premier Tech, Rivière-du-Loup, Canada) を接種した。接種および非接種サンプルを用意し、液肥として 1/2 濃度のホーグランド溶液 (0.1 mM KH₂PO₄, 2.5 mM KNO₃, 2.5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 2.5 mg Fe L⁻¹ Fe(III)-EDTA, 0.25 mg B L⁻¹ H₃BO₃, 0.25 mg Mn L⁻¹ MnCl₂, 0.025 mg Zn L⁻¹ ZnSO₄, 0.01 mg Cu L⁻¹ CuSO₄, and 0.005 mg Mo L⁻¹ NaMoO₂) を 2 日に 1 度施用した。25°C、明期 16 時間・暗期 8 時間に設定したグロースチャンバー内で植物を 4 週間栽培した。採取したサンプルを液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

RNA-seq 解析

RNA-seq 解析の手順は、Handa ら (2015) の方法に従った。RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan) と Fruit-mate™ for RNA Purification (Takara) を用いて凍結サンプルから RNA を抽出した。RNA 溶液から DNA を除くため RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Germany) で処理し、さらに RNeasy Spin Column で精製した。RNA の品質を Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) で確認した後、TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、Illumina HiSeq 2000 Sequencing System によるペアードエンド・シーケンス (2 × 100 bp) を行った。シーケンスデータは、DDBJ Sequence

Read Archive（アクセッション番号：DRA005187）に登録した。

トマトおよびミヤコグサから得られたシーケンスデータについては、トマトのリファレンス配列（International Tomato Annotation Group release ITAG2.4（https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome; Tomato Genome Consortium. 2012））またはミヤコグサのリファレンス配列（Handa et al., 2015）に対して TopHat（Trapnell et al., 2009）を用いてマッピングした。ミヤコグサのリファレンス配列は、ミヤコグサゲノム *L. japonicus* genome assembly build 2.5 のコード領域（Lj2.5, <http://www.kazusa.or.jp/lotus/release2/>）と Cufflinks assembly によって新たに推定された Lj2.5 上のコード領域（<http://mycorrhiza.nibb.ac.jp>）、*de novo* トランスクリプトームアセンブリによって予想された Lj2.5 でカバーされていないコード領域（<http://mycorrhiza.nibb.ac.jp>）を含んでいる。*R. irregularis* のゲノム情報は JGI MycoCosm database（<http://genome.jgi.doe.gov/Gloin1/Gloin1.home.html>; Tisserant et al., 2013）を使用した。このデータベースには複数の rRNA 遺伝子（protein ID: 67218, 67222, 73108, 102514, 235478, 247295, 336739）が含まれており、それらの遺伝子は解析から除外した。

次に、iDEGES/edgeR（Sun et al., 2013）を用いてリードカウント数を正規化し、非感染根と感染根の間で発現変動するミヤコグサ遺伝子を edgeR（Robinson et al., 2010）で抽出した（ $n = 2$ ）。その際、false discovery rate（FDR）が 0.01 以下の遺伝子を発現変動遺伝子とした。AM 菌側については、トマトとミヤコグサの感染根で発現変動する遺伝子を抽出した（FDR < 0.01）。トマトとミヤコグサのオルソログを抽出するために、ミヤコグサのコード配列（Handa et al., 2015）とトマトのコード配列（Tomato Genome Consortium, 2012）を利用して双方向 BLAST を行った。一方の植物の遺伝子配列をクエリーとし、もう一方の植物の遺伝子配

列をデータベースとして TBLASTX (e-value < 1e-6) を行い、その逆の組み合わせについても TBLASTX を行った。両方の解析でトップヒット同士の遺伝子をオルソログとした。また、トマトとミヤコグサの感染根で発現変動する AM 菌遺伝子の機能を推定するために、TopGO (Alexa and Rahnenführer, 2016) を用いて GO 解析を行った。AM 菌の GO アノテーションは、JGI MycoCosm database (Tisserant et al., 2013) に従った。

AM 菌感染率の測定

根を 10% KOH で透明化し、2%塩酸で中和後、0.05%トリパンプルー乳酸溶液で染色した (Phillips and Hayman, 1970)。McGonigle ら (1990) の方法で菌根菌感染率、樹枝状体形成率、のう状体形成率を測定した。得られた感染率データについては、 JMP7 (SAS Institute, NC, USA) を用いて学生 t 検定 ($P \leq 0.05$) で分析した。

結果

トマトとミヤコグサにおける菌根形成時の発現変動遺伝子

トマトとミヤコグサの両植物において、*R. irregularis* は高いレベルで感染しており、いずれの感染パラメーターにおいても植物種間で有意な差は見られなかった（図 2.1a）。ただし、AM 菌接種によってミヤコグサの地上部乾重は増加するものの、トマトでは乾重の増加が見られなかった（図 2.1b）。トマトとミヤコグサで菌根応答性遺伝子を検出するために、感染根と非感染根を用いて RNA-seq 解析を実施したところ、55–88%のリードがトマトまたはミヤコグサのリファレンス配列に対してユニークにマップされた（表 2.1）。非感染根と感染根との間で発現変動する遺伝子を調べたところ、トマトで 928 個、ミヤコグサで 1,697 個の発現変動遺伝子が抽出された（表 2.2）。これは、タンパク質をコードする全遺伝子の約 3%に相当する。抽出された発現変動遺伝子の大部分は、AM 菌感染によって発現が上昇する遺伝子であった。菌根誘導性遺伝子の植物間での共通性を調べるために、それぞれの植物の菌根誘導性遺伝子を TBLASTX (e-value < 1e-6) で比較した。トマトの 744 個の菌根誘導性遺伝子のうち、対応する遺伝子がミヤコグサのゲノムに存在するものは 700 遺伝子であった（表 2.2）。逆に、ミヤコグサの 1,024 個の発現誘導性遺伝子のうち、対応する遺伝子がトマトに存在するものは 818 遺伝子であった。両植物で共通して発現誘導される遺伝子は、それぞれの植物の菌根誘導性遺伝子のうち 24%のみであった。また、共通して発現抑制される遺伝子は 4%以下であった。

菌根形成によって発現変動する遺伝子の発現プロファイルをトマトとミヤコグサで比較するために、one-to-one reciprocal best Blast hit (RBH) でオルソログ

遺伝子を推定し、その発現量を解析した。トマトとミヤコグサのオルソログ遺伝子として 11,631 個の RBH 遺伝子ペア (TBLASTX, $e\text{-value} < 1e\text{-6}$) を同定した。そのうち、92 個の RBH 遺伝子ペアは両植物の菌根で共通して発現誘導され、これはトマトの菌根誘導性遺伝子の 34%、ミヤコグサの菌根誘導性遺伝子の 27% に相当する (図 2.2a)。一方で、両植物で共通して発現低下する RBH 遺伝子ペアは 3 個のみであった (図 2.2a)。共通して発現誘導される RBH 遺伝子ペアの発現誘導率は低誘導率から高誘導率までほぼ一様に分布し、トマトとミヤコグサの間で正の相関が見られた (スピアマンの順位相関 $\rho = 0.437$, $P < 0.0001$; 図 2.2b)。これらの遺伝子の中には、菌根形成に関与する遺伝子が含まれていた (表 2.3)。代表的な遺伝子としては、菌根特異的リン酸トランスポーター *PT4* (Javot et al., 2007; Yang et al., 2012)、ABCG トランスポーター *STR/STR2* (Zhang et al., 2010; Gutjahr et al., 2012; Kojima et al., 2014)、アシル-ACP チオエステラーゼ *FatM* (Bravo et al., 2016)、GRAS 転写因子 *RAMI* (Gobbato et al., 2012; Rich et al., 2015; Xue et al., 2015; Pimprikar et al., 2016) および *RADI* (Xue et al., 2015; Pimprikar et al., 2016)、Exocyst 複合体構成因子 *Exo70II* (Zhang et al., 2015) などである。一方、数百個の RBH 遺伝子ペアは植物種特異的に発現誘導されており、その大部分は低い誘導率を示す遺伝子であった (図 2.2b)。

トマトとミヤコグサ菌根での AM 菌遺伝子の発現プロファイルの比較

R. irregularis ゲノムに対してシーケンスリードをマップし、トマトとミヤコグサ菌根での AM 菌遺伝子の発現プロファイルを解析した。AM 菌由来のリードの割合は 10%未満であり (表 2.1)、これは過去の報告と類似した値であった (Tisserant et al., 2013; Handa et al., 2015; Sugimura and Saito, 2016)。AM 菌遺伝子

の発現量は、トマトとミヤコグサの間で強い正の相関を示した（スペアマンの順位相関 $\rho = 0.833$, $P < 0.0001$; 図 2.3）。しかし、少数ながらも、428 個の AM 菌遺伝子（タンパクをコードする遺伝子の 1.4%相当）がトマトとミヤコグサの間で発現変動した（図 2.3）。GO 解析を行ったところ、ミヤコグサ菌根で高く発現する遺伝子には ATP 合成に関わる GO（ATP synthesis coupled electron transport, cellular respiration, ATP synthesis coupled proton transport, NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity and proton-transporting ATP synthase complex）が濃縮されており（表 2.4）、ミトコンドリア電子伝達系複合体をコードする AM 菌遺伝子がミヤコグサ菌根で強く発現していた（図 2.4）。逆に、トマト菌根で強く発現する AM 菌遺伝子には、ステロール代謝に関わる GO が濃縮されていた（表 2.4）。

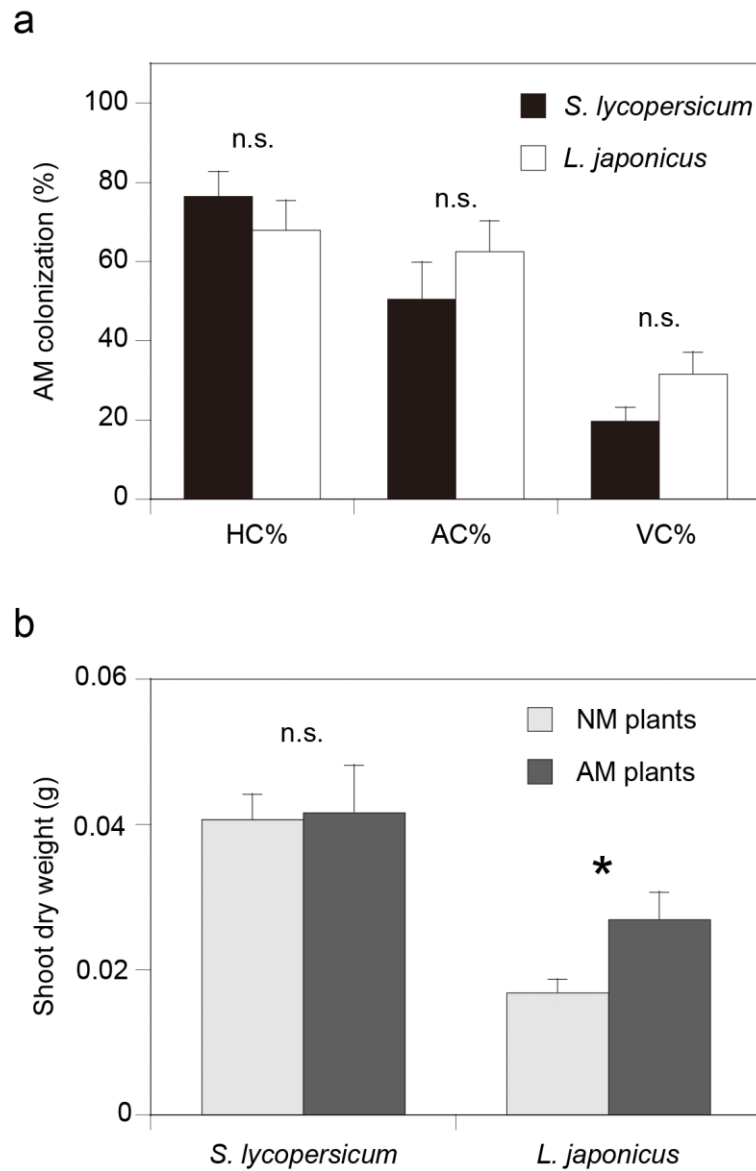
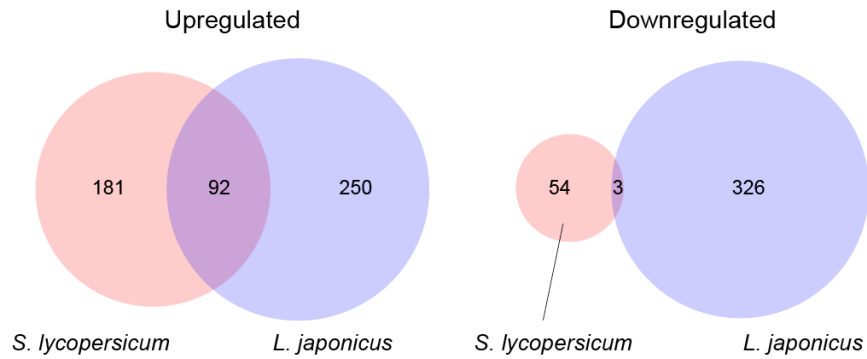


図 2.1. *R. irregularis* 接種 4 週間後のトマト (*S. lycopersicum*) とミヤコグサ (*L. japonicus*) の菌根菌感染率 (a) と地上部乾重 (b) .

菌根菌感染率 (HC%)、樹枝状体形成率 (AC%)、のう状体形成率 (VC%)。平均 ± 標準誤差 ($n = 5$)。* $P < 0.05$ 、n.s. 有意差なし (スチューデントの t 検定)。

a



b

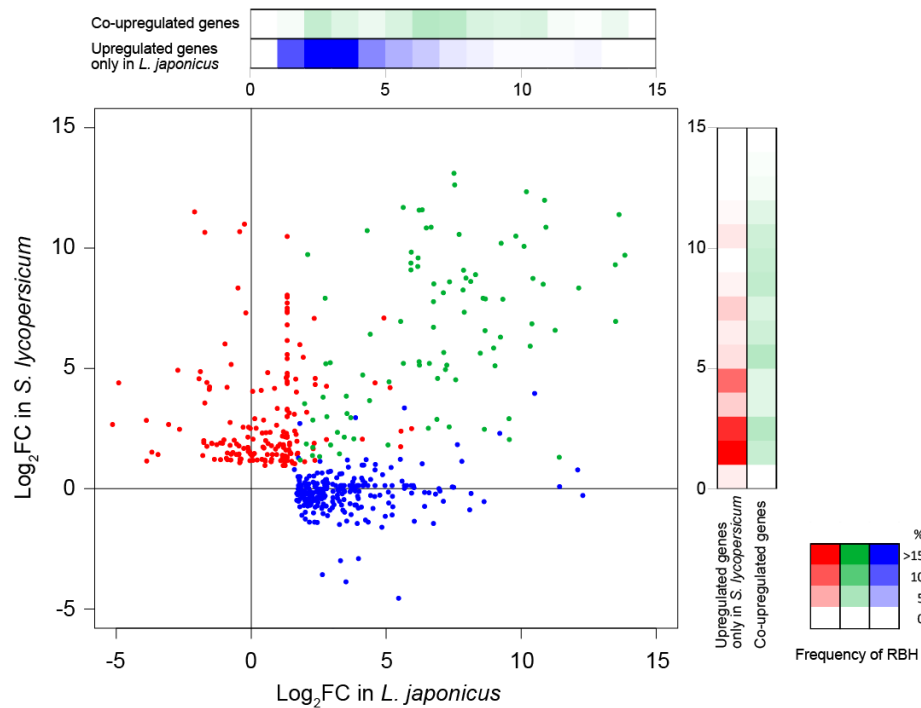


図 2.2. トマトとミヤコグサのオルソログにおける遺伝子発現の比較.

(a) トマトとミヤコグサで発現上昇または低下する遺伝子のベン図。双方向ベストヒット (RBH) によってトマトとミヤコグサの間でオルソログの関係にある 11,631 個の遺伝子を抽出した。そのうちトマトでは 330 個、ミヤコグサでは 671 個の遺伝子が AM 菌感染によって発現変動した ($\text{FDR} < 0.01$)。 (b) トマト

あるいはミヤコグサ菌根で発現誘導される RBH ペアの発現誘導率。緑：トマトとミヤコグサで共に発現誘導される遺伝子。赤：トマトのみで発現誘導される遺伝子。青：ミヤコグサのみで発現誘導される遺伝子。ヒートマップは、トマトあるいはミヤコグサの発現誘導遺伝子の誘導率に対する相対度数分布を表す。

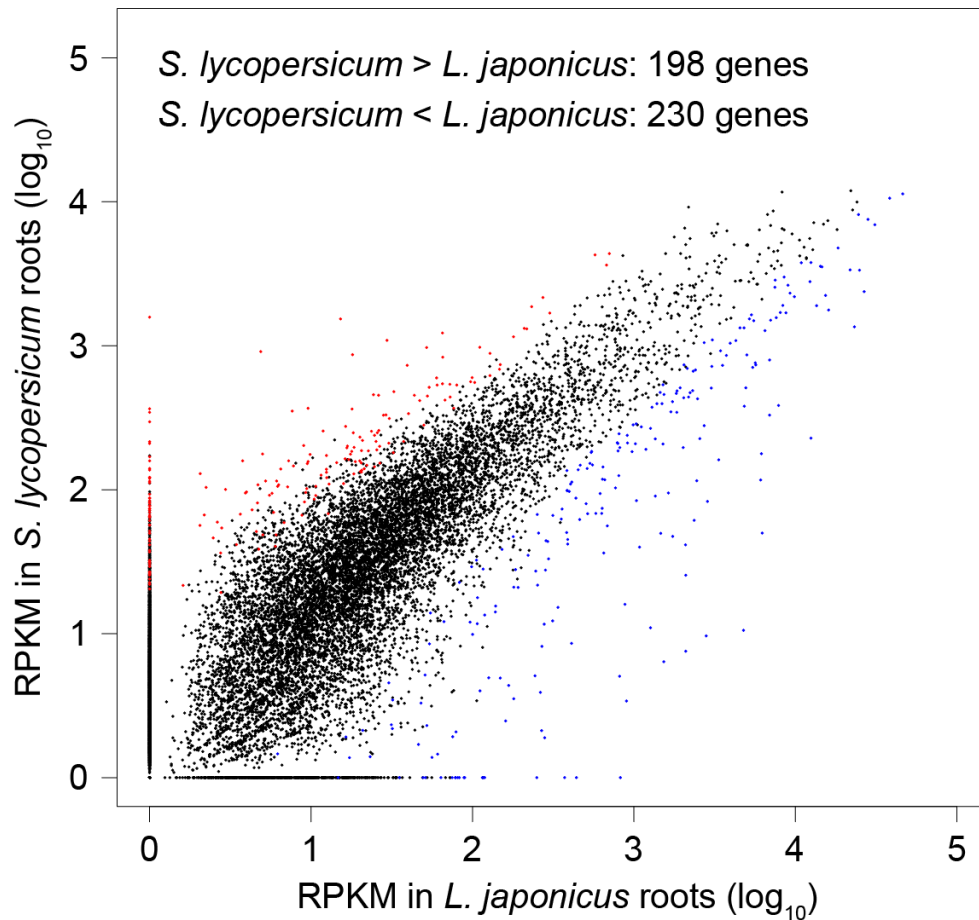


図 2.3. トマトとミヤコグサに感染した *R. irregularis* の遺伝子発現プロファイル.
 AM 菌の遺伝子発現量を Reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) で
 表した。赤：トマト根に感染する AM 菌で有意 ($FDR < 0.01$) に高い発現量を示
 す遺伝子。青：ミヤコグサ根に感染する AM 菌で有意 ($FDR < 0.01$) に高い発現
 量を示す遺伝子。

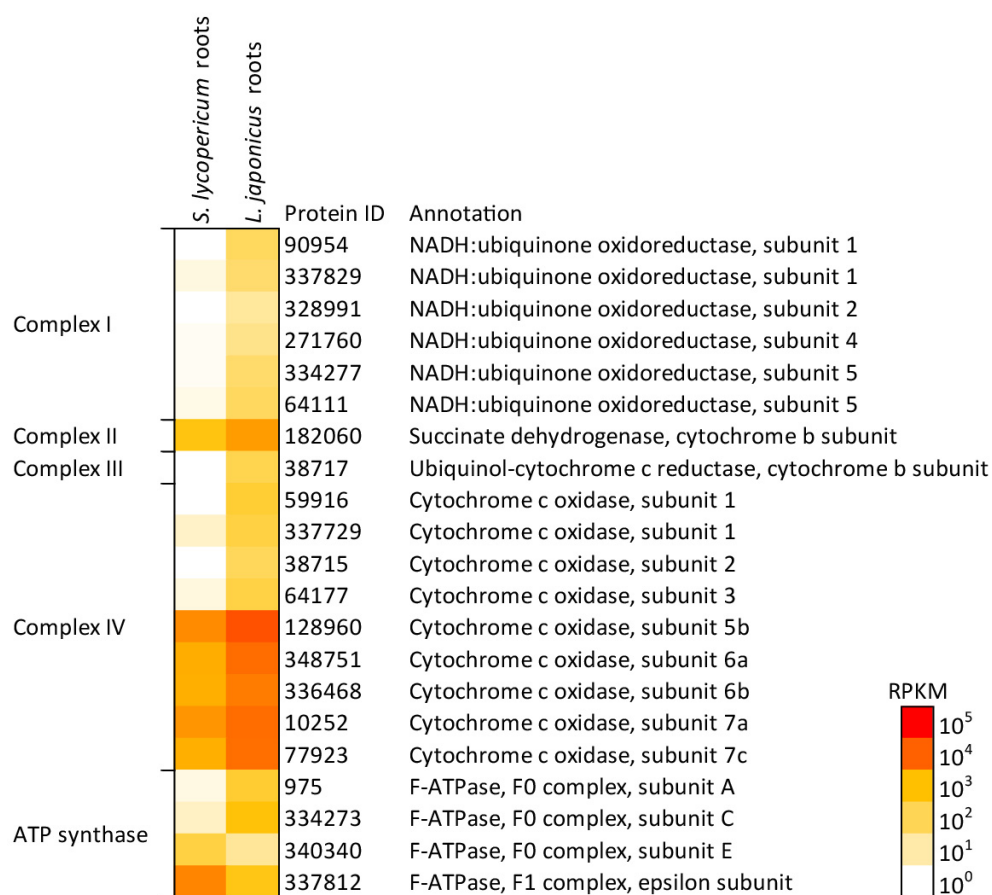


図 2.4. *R. irregularis* の電子伝達系関連遺伝子の発現プロファイル.

トマトとミヤコグサに感染する AM 菌の間で発現変動する遺伝子を抽出した (FDR < 0.01)。ヒートマップは *R. irregularis* 遺伝子の RPKM 値を示す。

表 2.1. トマト、ミヤコグサ、*Rhizaophagus irregularis* のリファレンス配列に対する感染根 (AM) と非感染根 (NM) のリードのマッピング.

| | <i>S. lycopersicum</i> | | <i>L. japonicus</i> | |
|--|------------------------|------------|---------------------|------------|
| | AM roots | NM roots | AM roots | NM roots |
| Total raw reads | 25,554,717 | 24,200,612 | 8,923,628 | 10,029,123 |
| < <i>S. lycopersicum</i> / <i>L. japonicus</i> > | | | | |
| Mapped reads against the <i>S. lycopersicum</i> reference sequence | 21,306,768 | 21,337,381 | - | - |
| Mapped reads against the <i>L. japonicus</i> reference sequence | - | - | 4,891,691 | 6,910,383 |
| Mapped reads / total raw reads (%) | 83 | 88 | 55 | 69 |
| < <i>R. irregularis</i> > | | | | |
| Mapped reads against the <i>R. irregularis</i> reference sequence | 1,076,008 | - | 772,325 | - |
| Mapped reads / total raw reads (%) | 4 | - | 9 | - |

表 2.2. トマトとミヤコグサで AM 菌感染によって発現変動する遺伝子の数 (FDR < 0.01) .

| | <i>S. lycopersicum</i> | <i>L. japonicus</i> |
|--|------------------------|---------------------|
| Putative protein-coding genes | 34,725 | 57,103 |
| <Upregulation> | | |
| Upregulated genes | 744 | 1,024 |
| Upregulated genes with a significant tblastx hit against the database of the other species (A) | 700 | 818 |
| Co-upregulated genes between <i>S. lycopersicum</i> and <i>L. japonicus</i> (B) | 168 | 194 |
| B/A (%) | 24 | 24 |
| <Downregulation> | | |
| Downregulated genes | 184 | 673 |
| Downregulated genes with a significant tblastx hit against the database of the other species (C) | 143 | 624 |
| Co-downregulated genes between <i>S. lycopersicum</i> and <i>L. japonicus</i> (D) | 6 | 9 |
| D/C (%) | 4 | 1 |

表 2.3. 菌根形成時にトマトとミヤコグサで共通して発現誘導する双方向ベストヒット (RBH) ペア.

| RBH | <i>S. lycopersicum</i> | | <i>L. japonicus</i> | | Annotation in <i>L. japonicus</i> |
|-------|------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|--|
| | Gene ID | Log ₂ FC [†] | Gene ID | Log ₂ FC [†] | |
| RBH01 | Solyc04g050940.1.1 | 13.1 | CM0105.260.r2.a | 7.5 | Serine-threonine protein kinase |
| RBH02 | Solyc11g007970.1.1 | 12.6 | CM0909.780.r2.m | 7.5 | 4-coumarate-CoA ligase |
| RBH03 | Solyc02g090080.1.1 | 12.3 | TCONS_00041135 | 10.2 | Unknown protein |
| RBH04 | Solyc05g053750.1.1 | 12.0 | LjT47N10.60.r2.a | 10.9 | Triacylglycerol lipase 2 |
| RBH05 | Solyc07g054700.2.1 | 11.7 | CM0432.310.r2.a | 5.6 | LysM domain containing protein |
| RBH06 | Solyc02g083160.1.1 | 11.6 | LjB12E19.100.r2.d | 6.3 | GDSL esterase/lipase |
| RBH07 | Solyc12g096380.1.1 | 11.6 | LjT04I16.80.r2.d | 6.2 | High affinity cationic amino acid transporter 1 |
| RBH08 | Solyc06g051860.1.1 | 11.4 | CM2121.10.r2.a | 13.6 | AM-induced phosphate transporter <i>LjPT4</i> |
| RBH09 | Solyc05g008570.1.1 | 10.9 | CM0328.70.r2.d | 10.9 | Palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase <i>LjFatM</i> |
| RBH10 | Solyc03g117460.1.1 | 10.9 | CM0573.170.r2.m | 6.7 | Major allergen Mal d 1 |
| RBH11 | Solyc07g065240.1.1 | 10.8 | LjT48A12.120.r2.d | 6.5 | Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase |
| RBH12 | Solyc03g110950.1.1 | 10.7 | CM1864.540.r2.m | 4.3 | GRAS family transcription factor <i>LjRAD1</i> |
| RBH13 | Solyc09g098410.1.1 | 10.6 | CM0177.350.r2.m | 7.7 | ABCG transporter <i>LjSTR2</i> |
| RBH14 | Solyc08g062140.1.1 | 10.5 | TCONS_00007973 | 9.8 | Serine-threonine protein kinase |
| RBH15 | Solyc12g007220.1.1 | 10.2 | CM0617.810.r2.d | 9.3 | Peptide transporter |
| RBH16 | Solyc07g054570.1.1 | 10.1 | LjSGA_003462.2 | 10.1 | Kelch-like protein |
| RBH17 | Solyc07g006940.1.1 | 9.8 | CM0244.1000.r2.m | 5.9 | Cysteine-rich receptor-like protein kinase |
| RBH18 | Solyc06g007860.1.1 | 9.7 | CM0127.320.r2.m | 2.1 | Unknown protein |
| RBH19 | Solyc10g081520.1.1 | 9.7 | CM0104.2930.r2.a | 13.8 | Blue copper protein |
| RBH20 | Solyc08g077000.1.1 | 9.6 | CM0021.530.r2.m | 6.2 | Palmate-like pentafoliata 1 transcription factor |
| RBH21 | Solyc12g010490.1.1 | 9.4 | CM0041.30.r2.a | 5.9 | AP2 domain-containing transcription factor |
| RBH22 | Solyc11g068580.1.1 | 9.3 | LjSGA_022237.1 | 13.5 | Germin-like protein <i>LjGLP</i> |
| RBH23 | Solyc03g097860.1.1 | 9.2 | CM0042.2530.r2.d | 6.2 | Potassium transporter |
| RBH24 | Solyc03g115620.1.1 | 9.1 | CM0087.740.r2.m | 5.9 | Unknown protein |
| RBH25 | Solyc03g119900.2.1 | 9.1 | TCONS_00033391 | 7.9 | Unknown protein |
| RBH26 | Solyc02g085060.1.1 | 8.9 | CM0249.1340.r2.m | 8.3 | Replication factor C subunit 5 |
| RBH27 | Solyc12g089230.1.1 | 8.7 | CM0195.70.r2.d | 7.9 | Peptide transporter PTR1 |
| RBH28 | Solyc03g005950.1.1 | 8.7 | CM0046.1690.r2.m | 10.4 | Peptide/nitrate transporter |

表 2.3. Continued

| | | | | | |
|-------|--------------------|-----|--------------------|------|---|
| RBH29 | Solyc03g117170.1.1 | 8.6 | LjSGA_026747.2 | 8.1 | Unknown protein |
| RBH30 | Solyc02g089150.2.1 | 8.6 | CM0163.300.r2.d | 7.3 | PI-PLC X domain-containing protein |
| RBH31 | Solyc02g069550.1.1 | 8.5 | CM0797.40.r2.m | 6.8 | Prune homolog |
| RBH32 | Solyc08g079780.1.1 | 8.5 | CM0104.2940.r2.a | 10.8 | Blue copper protein |
| RBH33 | Solyc12g056000.1.1 | 8.3 | LjB03G07.10.r2.a | 12.1 | Cysteine proteinase |
| RBH34 | Solyc09g072720.1.1 | 8.3 | TCONS_00120316 | 7.8 | Exocyst complex component |
| RBH35 | Solyc04g077760.1.1 | 8.1 | CM0096.900.r2.d | 7.1 | Exocyst complex component <i>LjExo70I1</i> |
| RBH36 | Solyc01g105080.2.1 | 7.9 | CM0314.250.r2.d | 8.6 | Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase |
| RBH37 | Solyc01g111790.1.1 | 7.9 | CM1439.100.r2.d | 2.7 | Serine/threonine protein phosphatase 2A |
| RBH38 | Solyc01g097430.2.1 | 7.9 | CM0042.2570.r2.d | 8.7 | ABCG transporter <i>LjSTR</i> |
| RBH39 | Solyc07g007080.1.1 | 7.9 | comp286719_c0_seq1 | 9.3 | Unknown protein |
| RBH40 | Solyc08g007960.1.1 | 7.8 | TCONS_00114768 | 6.8 | Nuclear transcription factor Y subunit C-1 <i>LjCbf</i> |
| RBH41 | Solyc11g008030.1.1 | 7.3 | CM0909.730.r2.m | 7.9 | Monocopper oxidase-like protein SKU5 |
| RBH42 | Solyc01g094450.1.1 | 6.9 | CM0284.730.r2.d | 13.5 | Ripening-related protein |
| RBH43 | Solyc09g061240.1.1 | 6.9 | CM0105.270.r2.a | 5.5 | Unknown protein |
| RBH44 | Solyc01g010260.2.1 | 6.8 | CM0318.690.r2.d | 10.4 | Cytochrome P450 93A1 |
| RBH45 | Solyc06g066390.1.1 | 6.7 | CM0608.1100.r2.m | 6.8 | AP2 domain-containing transcription factor |
| RBH46 | Solyc01g095250.1.1 | 6.6 | CM0105.320.r2.a | 11.3 | Acidic chitinase |
| RBH47 | Solyc04g080400.1.1 | 6.6 | CM0071.1240.r2.a | 8.7 | Reticuline oxidase |
| RBH48 | Solyc07g020870.1.1 | 6.4 | CM0617.800.r2.d | 4.4 | U-box domain-containing protein |
| RBH49 | Solyc02g092400.1.1 | 6.3 | LjSGA_134299.1 | 9.2 | Unknown protein |
| RBH50 | Solyc02g094340.1.1 | 5.9 | CM1852.30.r2.m | 10.3 | GRAS family transcription factor <i>LjRAM1</i> |
| RBH51 | Solyc11g072830.1.1 | 5.9 | CM0616.310.r2.d | 9.0 | Chitinase 2 |
| RBH52 | Solyc07g064120.1.1 | 5.7 | CM1543.140.r2.m | 7.1 | ABCB transporter |
| RBH53 | Solyc07g006610.2.1 | 5.6 | comp12648_c0_seq1 | 8.5 | PTI1-like tyrosine-protein kinase |
| RBH54 | Solyc09g072780.1.1 | 5.3 | CM0295.1000.r2.m | 6.2 | Peptide transporter |
| RBH55 | Solyc09g091700.2.1 | 5.2 | CM1323.380.r2.d | 2.9 | NADP-dependent alkenal double bond reductase |
| RBH56 | Solyc01g081080.1.1 | 5.2 | CM0017.1160.r2.a | 6.6 | Replication factor C subunit |
| RBH57 | Solyc01g068380.2.1 | 5.2 | CM0127.890.r2.m | 5.6 | Purple acid phosphatase |
| RBH58 | Solyc00g170200.1.1 | 5.2 | CM0153.40.r2.d | 2.8 | Alpha/beta-hydrolases superfamily protein |

表 2.3. Continued

| | | | | | |
|-------|--------------------|-----|-------------------|-----|---|
| RBH59 | Solyc09g008360.2.1 | 5.1 | CM0012.1760.r2.d | 6.2 | Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase |
| RBH60 | Solyc03g112110.1.1 | 5.1 | LjSGA_012459.1 | 7.2 | Unknown protein |
| RBH61 | Solyc05g009960.2.1 | 5.1 | CM0124.80.r2.d | 9.0 | Unknown protein |
| RBH62 | Solyc02g088310.1.1 | 4.9 | comp41326_c0_seq1 | 7.2 | Ethylene-responsive transcription factor |
| RBH63 | Solyc03g080020.2.1 | 4.7 | TCONS_00022353 | 4.1 | Major facilitator superfamily transporter |
| RBH64 | Solyc08g062200.1.1 | 4.6 | CM0133.890.r2.m | 6.9 | Unknown protein |
| RBH65 | Solyc08g067170.1.1 | 4.5 | TCONS_00048122 | 7.6 | U-box domain-containing protein |
| RBH66 | Solyc09g011700.1.1 | 4.4 | LjT44L17.30.r2.d | 5.1 | Copper transporter |
| RBH67 | Solyc03g114080.1.1 | 3.8 | LjT46F11.70.r2.a | 3.5 | Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase |
| RBH68 | Solyc05g009430.2.1 | 3.8 | CM0903.40.r2.d | 2.7 | Nuclease S1 |
| RBH69 | Solyc09g065040.1.1 | 3.7 | TCONS_00091213 | 4.4 | Antifungal protein ginkbilobin-2 |
| RBH70 | Solyc02g086820.2.1 | 3.5 | CM0081.350.r2.m | 2.0 | Carbonic anhydrase |
| RBH71 | Solyc01g095720.2.1 | 3.1 | CM0105.760.r2.a | 3.5 | Unknown protein |
| RBH72 | Solyc02g083700.2.1 | 3.0 | comp13066_c0_seq1 | 2.8 | Lysosomal alpha-mannosidase |
| RBH73 | Solyc09g065750.2.1 | 2.9 | CM0375.30.r2.m | 3.7 | Unknown protein |
| RBH74 | Solyc09g009610.1.1 | 2.9 | CM0010.40.r2.d | 9.5 | Purple acid phosphatase |
| RBH75 | Solyc04g080480.1.1 | 2.9 | LjSGA_124844.1 | 6.9 | AMP-dependent synthetase and ligase |
| RBH76 | Solyc08g082620.2.1 | 2.9 | CM0004.1640.r2.a | 2.3 | Beta-ketoacyl-ACP synthase I |
| RBH77 | Solyc02g084940.1.1 | 2.6 | CM0249.1160.r2.d | 7.3 | Unknown protein |
| RBH78 | Solyc01g111050.2.1 | 2.5 | CM0113.40.r2.a | 6.6 | COBRA-like protein 1 |
| RBH79 | Solyc02g092060.1.1 | 2.5 | LjSGA_065775.1 | 8.6 | NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein |
| RBH80 | Solyc09g015430.2.1 | 2.3 | TCONS_00085591 | 3.2 | Unknown protein |
| RBH81 | Solyc08g062950.2.1 | 2.1 | CM0133.560.r2.m | 3.4 | Cytochrome P450 711A1 |
| RBH82 | Solyc01g006380.2.1 | 2.1 | CM0017.760.r2.a | 3.8 | U-box domain-containing protein |
| RBH83 | Solyc03g031830.1.1 | 2.1 | CM0367.670.r2.d | 9.6 | Unknown protein |
| RBH84 | Solyc07g062810.2.1 | 1.9 | LjSGA_054315.1 | 2.0 | Unknown protein |
| RBH85 | Solyc08g066650.2.1 | 1.8 | LjB19M02.90.r2.m | 2.9 | Carotenoid cleavage dioxygenase 8 <i>LjCCD8</i> |
| RBH86 | Solyc10g083180.1.1 | 1.8 | comp63373_c1_seq1 | 5.1 | Momilactone A synthase |
| RBH87 | Solyc03g117470.2.1 | 1.7 | comp40972_c0_seq1 | 2.3 | Unknown protein |
| RBH88 | Solyc01g059900.2.1 | 1.4 | comp62669_c0_seq1 | 3.3 | Dirigent protein |

表 2.3. Continued

| | | | | | |
|-------|--------------------|-----|-------------------|------|---|
| RBH89 | Solyc01g081620.2.1 | 1.4 | comp65143_c0_seq1 | 2.3 | Unknown protein |
| RBH90 | Solyc02g081050.2.1 | 1.3 | CM0367.820.r2.m | 2.5 | LysM type receptor kinase |
| RBH91 | Solyc06g069530.2.1 | 1.3 | CM1882.210.r2.a | 11.4 | Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein |
| RBH92 | Solyc04g081400.2.1 | 1.2 | comp64780_c0_seq1 | 1.8 | Hexokinase |

† 非感染根に対する感染根での発現誘導率。

表 2.4. トマトとミヤコグサ感染根で発現量が異なる AM 菌遺伝子の GO 解析.

| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
|--|--|-----------------|---------|
| <i>R. irregularis</i> genes showing higher transcript levels in <i>L. japonicus</i> roots | | | |
| Biological process | | | |
| GO:0042773 | ATP synthesis coupled electron transport | 4 | 2.5E-05 |
| GO:0045333 | cellular respiration | 7 | 7.7E-05 |
| GO:0015986 | ATP synthesis coupled proton transport | 3 | 7.6E-04 |
| GO:0006334 | nucleosome assembly | 3 | 1.7E-03 |
| GO:0006366 | transcription from RNA polymerase II promoter | 2 | 3.3E-03 |
| GO:0006621 | protein retention in ER lumen | 1 | 8.0E-03 |
| GO:0015703 | chromate transport | 1 | 8.0E-03 |
| GO:0046087 | cytidine metabolic process | 1 | 8.0E-03 |
| Molecular function | | | |
| GO:0015078 | hydrogen ion transmembrane transporter activity | 13 | 5.9E-14 |
| GO:0008137 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity | 5 | 1.8E-07 |
| GO:0020037 | heme binding | 9 | 4.8E-04 |
| GO:0005506 | iron ion binding | 8 | 1.1E-03 |
| GO:0005507 | copper ion binding | 3 | 3.6E-03 |
| GO:0004126 | cytidine deaminase activity | 1 | 8.2E-03 |
| GO:0015109 | chromate transmembrane transporter activity | 1 | 8.2E-03 |
| GO:0046923 | ER retention sequence binding | 1 | 8.2E-03 |
| GO:0008398 | sterol 14-demethylase activity | 2 | 8.3E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0045259 | proton-transporting ATP synthase complex | 4 | 8.4E-04 |
| <i>R. irregularis</i> genes showing higher transcript levels in <i>S. lycopersicum</i> roots | | | |
| Biological process | | | |
| GO:0042364 | water-soluble vitamin biosynthetic process | 3 | 4.1E-04 |
| Molecular function | | | |
| GO:0033764 | steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor | 5 | 3.9E-05 |
| GO:0050051 | leukotriene-B4 20-monooxygenase activity | 2 | 1.4E-03 |
| GO:0000253 | 3-keto sterol reductase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0004495 | mevaldate reductase activity | 3 | 3.9E-03 |

表 2.4. Continued

| | | | |
|--------------------|---|---|---------|
| GO:0008875 | gluconate dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0018451 | epoxide dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0018452 | 5-exo-hydroxycamphor dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0018453 | 2-hydroxytetrahydrofuran dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0032442 | phenylcoumaran benzylic ether reductase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0043713 | (R)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0048258 | 3-ketoglucose-reductase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0051990 | (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase activity | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0000252 | C-3 sterol dehydrogenase (C-4 sterol decarboxylase) activity | 3 | 4.3E-03 |
| GO:0033765 | steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-CH group of donors | 3 | 4.8E-03 |
| GO:0004448 | isocitrate dehydrogenase activity | 3 | 5.2E-03 |
| GO:0004033 | aldo-keto reductase (NADP) activity | 3 | 6.3E-03 |
| GO:0046933 | proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism | 3 | 7.5E-03 |
| GO:0046961 | proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism | 3 | 8.1E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0016469 | proton-transporting two-sector ATPase complex | 3 | 9.6E-03 |

考察

マイクロアレイや RNA-seq 解析を用いた感染根と非感染根との比較によって、これまでに多くの菌根関連遺伝子が抽出されている (Liu et al., 2003; Manthey et al., 2004; Güimil et al., 2005; Hohnjec et al., 2005; Fiorilli et al., 2009; Gomez et al., 2009; Benedito et al., 2010; Hogeekamp et al., 2011; Handa et al., 2015)。本研究では、トマトとミヤコグサの比較トランスクリプトーム解析によって、それぞれの植物種における菌根誘導性遺伝子のうち 1/4 から 1/3 しか共通しないことが明らかとなった。また、菌根で共通して発現抑制される遺伝子はほとんどなかった。菌根誘導性遺伝子に注目すると、共通して発現誘導された RBH 遺伝子ペアには菌根形成や共生機能に重要な遺伝子が含まれていた。このことは、AM 菌感染によって誘導される転写制御機構は、2 つの植物種間である程度保存されていることを示している。一方、植物種独自の菌根誘導性遺伝子も抽出したが、これらの発現誘導率はさほど大きくなかった。植物種独自で誘導される遺伝子にはコモン SYM シグナル伝達経路の下流ではたらく遺伝子もあるかもしれないが、大部分は各植物種の生理的な違いに起因して発現変動する遺伝子と考えられる。感染根と非感染根の遺伝子発現プロファイルを単純に比較するだけでは、菌根の形成や維持、共生機能に必要な遺伝子を効率的かつ網羅的に抽出することは難しい。今後、さらに多くの植物種間で比較トランスクリプトーム解析を行うことや同調的な菌根菌感染システムを用いた時系列トランスクリプトーム解析を行うことで、植物側の菌根関連遺伝子を効率的に抽出できるかもしれない。

AM 菌の孢子、内生菌糸および外生菌糸は形態的にも生理的にも分化している (Bago et al., 2002)。これらの分化に伴って、各器官の遺伝子発現パターンも異

なる (Tisserant et al., 2012; Tisserant et al., 2013; Tang et al., 2016)。内生菌糸では、膜輸送や分泌ペプチド、脂質代謝、糖代謝、DNA 複製に関連する遺伝子が強く発現する (Tisserant et al., 2012; Tisserant et al., 2013; Tang et al., 2016)。特に、ショ糖トランスポーター、アクアポリン、分泌ペプチドおよび細胞周期関連遺伝子は宿主根への感染や共生機能発現に関与することが報告されている (Helber et al., 2011; Ait Lahmidi et al., 2016; Fiorilli et al., 2016; Kikuchi et al., 2016; Sugimura and Saito, 2016; Tsuzuki et al., 2016)。AM 菌は多くの植物種と共生関係を成立させることができる (Smith and Read, 2008)。しかも、内生菌糸の遺伝子発現プロファイルは、ミヤコグサとタルウマゴヤシのどちらに感染していてもほとんど変わらない (Handa et al., 2015)。本研究でも、トマトとミヤコグサの間で *R. irregularis* の遺伝子発現パターンは類似していることを明らかにした。このことは、感染する宿主が異なっても AM 菌の遺伝子プロファイルが基本的には類似していることを意味する。一方、トマトとミヤコグサの間で数百個の AM 菌遺伝子が発現変動した。抽出された発現変動遺伝子の特徴として、電子伝達系に関わる遺伝子がトマト根よりもミヤコグサ根で高く発現している点が挙げられる。AM 菌 *Gigaspora margarita* の内生細菌である *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* が菌糸内に存在したり、*G. margarita* の発芽胞子にストリゴラクトンを添加することで、ミトコンドリア電子伝達系遺伝子の発現が誘導されて、その結果 ATP 合成量が増加することが認められている (Salvioli et al., 2016)。もしかすると、ミヤコグサ菌根では *R. irregularis* の電子伝達系に関わる遺伝子が発現誘導されることによって、菌糸内の ATP 産生が高められているのかもしれない。今回、ミヤコグサの成長は AM 菌感染によって促進されたが、トマトではそういった促進効果が見られなかった。今後、AM 菌感染による植物成長効果と AM 菌内のエネルギー生産との関係を解析することで、菌根効果の変動するひとつの要

因を特定できるかもしれない。

第3章 同期的菌根抑制系を用いた宿主の菌根形成遺伝子の解析

緒言

樹枝状体は、植物と AM 菌の間の養分交換の場所として重要な構造体である。AM 菌が植物根に感染し菌糸が皮層に到達すると、細胞内に樹枝状体が形成される。樹枝状体は太い菌糸からなるトランク部位とその先端に形成される細い菌糸のファインブランチからなる。また、樹枝状体は植物由来の膜から構成されるペリアーバスキュラー膜に囲まれている。形成された樹枝状体は養分交換などの機能を果たしながら構造が維持されるものの、形成してから数日のうちに崩壊する (Alexander et al., 1989)。

樹枝状体は、特定の宿主遺伝子サブセットが協調して働くことで形成される。樹枝状体の形成は大きく分けて、菌糸が侵入し Birdfoot 様のトランク菌糸（分枝が進んでいない初期の樹枝状体の形態）を形成するまでの初期段階と、Birdfoot から菌糸の分枝が進み高度に分枝したファインブランチを形成する成熟段階の 2 つに分けられる (Gutjahr and Parniske, 2013)。初期段階には、コモン SYM シグナル伝達経路遺伝子である *CCaMK* や *CYCLOPS*、*vapyrin*、サブチラーゼの *SbtMI* 遺伝子が関与する (Demchenko et al., 2004; Kistner et al., 2005; Reddy et al., 2007; Yano et al., 2008; Takeda et al., 2009; Pumplin et al., 2010)。樹枝状体の成熟段階に関与する遺伝子もいくつか同定されている。ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである Stunted Arbuscule (STR) と STR2 は、ペリアーバスキュラー膜に局在し、輸送する基質は明らかになっていないがファインブランチの形成に関与する (Zhang et al., 2010; Gutjahr et al., 2012; Kojima et al., 2014)。また、

菌根特異的リン酸トランスポーター*PT4* の変異体では樹枝状体が未成熟のまま
で崩壊し、リン酸トランスポーターは養分の輸送だけでなく樹枝状体の維持に
もはたしている (Javot et al., 2007; Yang et al., 2012)。樹枝状体で機能する植物
のトランスポーターは、小胞輸送によってペリアーバスキュラー膜まで輸送さ
れる。樹枝状体が形成される皮層細胞では、小胞輸送は膜の供給機能を担うこ
とから、樹枝状体形成に必要不可欠な役割を果たしている。また、樹枝状体の
形成にはダイナミックな発現誘導が重要であり、樹枝状体形成に関わる転写因
子として GRAS タンパク質の *RAM1* が同定されている。最近、CYCLOPS が
DELLA タンパク質と結合し、CCaMK-CYCLOPS-DELLA 複合体として *RAM1*
遺伝子のプロモーター領域に結合して発現を制御することが報告されている
(Pimprakar et al., 2016)。そのほかにも GRAS 転写因子である *RADI* 遺伝子
(Gobbato et al., 2012; Rich et al., 2015; Xue et al., 2015) や AP2/ERF 転写因子であ
る *MtERF1* 遺伝子 (Devers et al., 2013) が樹枝状体形成の制御に関与する。さら
に、樹枝状体の形成に関わる脂肪酸や脂質の代謝酵素の遺伝子も同定されてお
り、*RAM1* の下流で機能するグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ
をコードする *RAM2* 遺伝子 (Wang et al., 2012; Gobbato et al., 2013) や、アシル-ACP
チオエステラーゼをコードする *FatM* 遺伝子 (Bravo et al., 2016) が知られている。
AM 菌のゲノムには脂肪酸合成酵素遺伝子が存在しないことから、AM 菌は新規
に脂肪酸を合成することができないと考えられている (Wewer et al., 2014; Tang
et al., 2016)。植物の脂肪酸合成関連遺伝子が共生においてどのような働きをし
ているか興味深い。ここまで見てきたように、樹枝状体形成に関わる遺伝子が
遺伝学や逆遺伝学的に同定されつつある。しかし、樹枝状体形成の全体像を解
明するには至っていない。

Bravo ら (2016) は、phylogenomics 解析から菌根性植物だけに保存されてい

る遺伝子を 138 個抽出した。その中には *FatM* など樹枝状体形成に必要な遺伝子が含まれており、菌根形成に関与する可能性のある遺伝子を網羅的に抽出することに成功している (Bravo et al., 2016)。菌根形成に関わる遺伝子を網羅的に抽出するその他の手法として、マイクロアレイや RNA-seq によるトランスクリプトーム解析が使われている (Liu et al., 2003; Wulf et al., 2003; Manthey et al., 2004; Güimil et al., 2005; Hohnjec et al., 2005; Kistner et al., 2005; Gomez et al., 2009; Guether et al., 2009; Benedito et al., 2010; Hogenkamp et al., 2011; Gaude et al., 2012; Hogenkamp, 2013; Handa et al., 2015)。菌根で誘導される遺伝子や樹枝状体で発現する遺伝子は多く存在し、その中には菌根形成に関与する遺伝子も存在する。しかし、第 2 章で明らかになったように、菌根で発現誘導される遺伝子には菌根形成に関与する遺伝子だけでなく、二次的な影響で変動する遺伝子も多く存在する。非感染根と感染根の単純な比較だけで、菌根形成や維持に主要な役割を果たす遺伝子群を絞り込むのは困難である。

最近、イネの菌根に高濃度リン酸を添加すると、数時間のうちに樹枝状体形成率が減少することが報告されている (Kobae et al., 2016)。この菌根抑制の際、既に発達している樹枝状体はそのサイズや代謝活性は維持されており、樹枝状体の老化が早まったわけではなく、樹枝状体の新規形成が抑制されたと考えられている (Kobae et al., 2016)。このとき、樹枝状体形成に関わる遺伝子の発現が同調的に低下すると予想され、トランスクリプトーム解析によって樹枝状体に関わる発現変動を効率的に抽出できるかもしれない。本研究では、樹枝状体の形成や維持に関わる植物の候補遺伝子を効率的かつ網羅的に抽出するために、ミヤコグサ菌根に高濃度リン酸添加して短時間のサンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。

材料と方法

生物材料と栽培条件

ミヤコグサ (*Lotus japonicus* B-129 Gifu) 実生を川砂 (粒子サイズ: 0.5–2.0 mm) に移植し、1 個体あたり 500 胞子の *R. irregularis* DAOM 197198 (Mycorise, Premier Tech, Rivière-du-Loup, Canada) を接種した。AM 菌接種個体については、液肥として低濃度 (0.1 mM KH_2PO_4) のリン酸を含む 1/2 濃度ホーグランド溶液を 2 日に 1 度施用した。非接種個体については、接種個体とのリン栄養レベルの差を小さくするために、最初の 3 週間は低濃度のリン酸を含む液肥を施用し、その後の 1 週間は高濃度 (0.5 mM) のリン酸を含む液肥を施用した。高濃度リン酸処理として、接種個体にはサンプリングの 0, 3, 6, 12, 24 時間、7 日前に 0.5 mM KH_2PO_4 を含む液肥を添加し、非接種個体には 0, 6, 24 時間前に添加した。すべての個体を接種または移植から 4 週間グロースチャンバー内 (25°C、明期 16 時間・暗期 8 時間) で生育させた。サンプリング後の菌根試料については液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

Ljram2-1 変異体 (accession number: 30000742) については、*LORE1* 挿入変異系統集団 (Fukai et al., 2012; Urbanski et al., 2012) から選抜し、*R. irregularis* を接種し、低濃度のリン酸を含む液肥を施用しながらグロースチャンバー内で 4 週間栽培した。

RNA-seq 解析

第 2 章で示した方法に従って RNA 抽出と cDNA ライブラリー作製、Illumina HiSeq 2000 Sequencing System によるペアードエンド・シークエンス (2 × 100 bp)

を行った。ショートリードのマッピングから発現変動遺伝子の抽出までも第 2 章で示した方法で行った。ただし、false discovery rate (FDR) が 0.001 未満の遺伝子を発現変動遺伝子とした ($n = 2$)。発現変動遺伝子の階層クラスタリングについては、正規化したリード数をもとに平均連結法で作成した。遺伝子発現パターンの解析のために、MBCluster.Seq (Si, 2012) を用いて k-means 非階層クラスタリングを行った。さらに、k-means 法で分類された遺伝子の機能を推定するために、TopGO (Alexa and Rahnenführer, 2016) を用いて GO 解析を行った。ミヤコグサの GO アノテーションは、Handa ら (2015) に従った。

分子系統解析

シロイヌナズナのアミノ酸配列 (The Arabidopsis Information Resource 10, <https://www.arabidopsis.org/>) をクエリーとして Blastp や tBlastn を行い、着目した遺伝子のアミノ酸配列を抽出した。このとき、次のデータベースに対して Blast 検索を行った。ミヤコグサ : Handa ら (2015) の論文で構築されたリファレンス配列 ; タルウマゴヤシ : Medicago Truncatula Genome Project v4.0 (<http://jcvi.org/medicago/>) ; トマト : International Tomato Annotation Genome (release ITAG 2.3) (https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome) ; ポプラ : Populus trichocarpa v3.0 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Ptrichocarpa) ; イネ : MSU Rice Genome Annotation Project Release 7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) ; ブラキポディウム : Brachypodium distachyon v3.1 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Bdistachyon) ; ソ

ル ガ ム : Sorghum bicolor v3.1

(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Sbicolor)。シロイヌナズナとイネの ABCG トランスポーターについては、Verrier ら (2008) が報告した遺伝子を用いた。シロイヌナズナとミヤコグサの AP2/ERF 転写因子については、Nakano ら (2006) と Handa ら (2015) が報告した遺伝子を用いた。抽出したアミノ酸配列を ClustalW (Thompson et al., 1994) でアライメントし、近隣結合法 (ブートストラップ 1,000 反復) で系統樹を作成した。系統樹作成には MEGA6 (Tamura et al., 2013) を使用した。

qRT-PCR

精製した RNA 溶液を TURBO DNase (Thermo Fisher Scientific) で処理し、ゲノム DNA を除去した。High Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA から cDNA を合成した。StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、cDNA を鋳型にして Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) で qRT-PCR を行った。PCR の反応条件は、95°C 10 分のプレヒート後、95°C 15 秒、60°C 1 分のセットを 40 サイクルとした。qRT-PCR 解析用の遺伝子特異的プライマーは、Primer Express Software (Thermo Fisher Scientific) を用いて設計した。内部標準として *LjUBC* と *LjEF2* 遺伝子を用いて $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ 法に基づいて、相対発現量を計算した。

レーザーマイクロダイセクション

R. irregularis を接種して 4 週間後のミヤコグサ根を使用した。レーザーマイクロダイセクションは、Gomez ら (2009) と Hogekamp ら (2011) の方法を参照

した。まず、ファーマー固定液(エタノール: 酢酸 = 3:1 (v/v))が入った RNase-free バイアル瓶に根断片を移し、4°Cで 14 時間インキュベートした。固定した根をエタノールシリーズ (75% (v/v), 85%, 95%, 100%×2; 15 分間ずつ) で脱水した。Steedman ワックス (ポリエチレングリコール 400 ジステアレート: 1-ヘキサデカノール = 9:1 (v/v)) を調製し、根をエタノールと Steedman ワックスを 1 対 1 で混合した溶液で 37°C・2 時間で置換したあと、さらに 100%ワックスで 2 時間ずつ 3 回置換した。サンプルを室温に戻しワックスを固化させたあと、4°Cで保存した。約 15 μ m の厚さの切片を作製し、UV 処理した PEN-membrane カバースライド (Carl Zeiss) に張り付けた。切片を張り付ける際、RNA の分解を防ぐため RNasesecure RNase Inactivation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を数滴滴下した。切片を減圧下で乾燥させたあと、一時的に 4°Cで保存した。切片から細胞を切り出す前に、切片を 100%エタノールで脱ワックス処理し、38°C のスライドウォーマーで乾燥させた。Zeiss P.A.L.M system (Carl Zeiss) を用いて、以下の 4 つのタイプの細胞を単離した。樹枝状体を含む皮層細胞 (arbuscule-containing cortical cells; ARB)、樹枝状体周辺の非感染皮層細胞 (non-colonized cortical cells around arbuscules; NAC)、AM 菌感染が見られない皮層細胞 (cortical cells without fungal infection; COR) および AM 菌感染が見られない表皮細胞 (epidermal cells without fungal infection; EPI)。1 サンプルから 1,500 以上の細胞を回収した。単離した細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR で遺伝子発現量を測定した。その際、リファレンス遺伝子として *LjEF2* 遺伝子を用いた。

リピドーム解析

RNA-seq 解析で用いたサンプルと同様に、サンプリング前に高濃度リン酸を

添加したサンプルを調製した。ただし、AM 菌接種個体については、サンプリングの 0, 6, 24 時間、7 日前に高濃度リン酸処理を行った。*ram2-1* 変異体についても、表現型解析と同様の方法で根を調製した。質量分析には、高速液体クロマトグラフ - 四重極飛行時間型質量分析計 (LC-Q-TOF-MS) を使用した。

***LjERM* 遺伝子の発現抑制**

LjERM2 (693 bp) と *LjERM3* (782 bp) のオープンリーディングフレームの一部を PCR 増幅し、pENTR D/TOPO (Thermo Fisher Scientific) に組み込んだ。Gateway 法により、それぞれの遺伝子の部分領域を RNAi 用のバイナリーベクターである pUB-GWS-Hyg (Maekawa et al., 2008) に組み込んだ。バイナリーベクターを導入した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いてミヤコグサの形質転換を行った (Handberg and Stougaard, 1992; Stiller et al., 1997)。形質転換体に *R. irregularis* を接種し、*LjERM1*, *LjERM2*, *LjERM3* 遺伝子の発現量を qRT-PCR で調べた。

プロモーター解析

LjERM2 のプロモーター領域 (3,057 bp) を PCR 増幅し、pENTR D/TOPO に組み込んだ。pGWB3 (Nakagawa et al., 2007) の *Hind*III 部位に *sGFP* 遺伝子 (Niwa et al., 1999) を挿入し、バイナリーベクター pGWB-sGFP を作製した。Gateway 法によりプロモーター配列を pGWB-sGFP に組み込んだ。Takeda ら (2013) の方法に従って、バイナリーベクターを導入した *Agrobacterium rhizogenes* AR1193 を用いてミヤコグサの毛状根形質転換を行った。形質転換体に *R. irregularis* を接種して栽培し、サンプリング後に蛍光実体顕微鏡 (SZX12; Olympus) を用いて

GFP 蛍光を指標に形質転換根を選抜した。形質転換根を 37°C の GUS 染色液で処理したのち、Alexa Fluor 594 標識小麦胚芽アグルチニンで AM 菌を染色した (Takeda et al., 2009)。

菌根菌感染率

感染根を 10% KOH で洗浄し 2% HCl で中和したあと、0.05%トリパンブルー乳酸溶液で染色した (Phillips and Hayman, 1970)。菌根菌感染率は、Trouvelot ら (1986) の方法を改変して測定した。1 個体から約 10 本の根断片を用意し、顕微鏡下で 1 視野 (直径 1.28 mm) あたりの感染程度を 6 段階の感染密度と 3 段階の樹枝状体密度で評価した。100 視野分の観察に基づき、根全体での菌根菌感染率 (F%, frequency of mycorrhiza in the root system) ; 根全体での菌糸密度 (M%, intensity of the mycorrhizal colonization in the root system) ; 根断片あたりの菌糸密度 (m%, intensity of the mycorrhizal colonization in the root fragments) ; 根全体での樹枝状体密度 (A%, arbuscule abundance in the root system) ; 根断片あたりの菌糸密度 (a%, arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments) を算出した。

植物体リン濃度の測定

植物体を 70°C で 48 時間乾燥させた後、乾重を測定した。乾燥試料を硫酸－過酸化水素水中で 200°C、120 分間処理した。湿式灰化した試料のリン濃度をアスコルビン酸-モリブデンブルー法 (Watanabe and Olsen, 1965) で測定し、地上部リン含量を算出した。

アクセッション番号

得られたシーケンスデータについては、DDBJ Sequence Read Archive（アクセッション番号：DRA004207）に登録した。また、転写産物発現プロファイルについては、ArrayExpress database（アクセッション番号：E-MTAB-4992）に登録した。

結果

高濃度リン酸が菌根形成に与える影響

イネ菌根に高濃度リン酸を添加すると、数時間のうちに樹枝状体の新規形成が抑制される (Kobae et al., 2016)。ミヤコグサ菌根でも同様な抑制が起きるかどうかを調査するために、接種4週間後の感染根に 500 μ M Pi を含む液肥を添加し、0, 6, 24 時間後の感染密度を測定した。また、高濃度リン酸が菌根形成や共生の維持に与える中期的な影響も評価するために、高濃度リン酸を添加して 7 日目の試料についても感染密度を調査した。根全体での菌根菌感染率 (F%) はリン酸添加後も 85%以上の高い感染率で推移した (表 3.1)。菌糸の感染密度を示す M%と m%はリン酸添加後から 24 時間まではほとんど変化がなかったが、7 日目にはリン酸添加 0 時間と比較して約 10%低下していた (表 3.1)。一方で、樹枝状体の感染密度を示す A%と a%は、リン酸添加後から徐々に低下し、24 時間後にはリン酸添加 0 時間に比べて 15%程度低下した (表 3.1)。以上から、高濃度リン酸の影響は短時間で起こり、特に樹枝状体の密度に影響が現れやすいことが明らかとなった。

高濃度リン酸による菌根形成抑制に伴う菌根誘導性遺伝子の発現低下

高濃度リン酸を与えて短時間のうちに発現変動する遺伝子を抽出するために、リン酸添加した菌根を用いて RNA-seq 解析を行った。得られたシーケンスリードをマップしたところ、66-72%のリードがミヤコグサのリファレンス配列にマップされた (表 3.2)。RNA-seq で推定した遺伝子発現量の妥当性を評価するため、45 個のミヤコグサ遺伝子について qRT-PCR で発現量を調査した。RNA-seq

で推定した発現変動率（リン酸添加 0 時間の発現量に対する各時間経過後の相対発現量）と qRT-PCR で測定した発現変動率の間には高い正の相関関係があった（ $r = 0.894$, $P < 0.001$; 図 3.2）。高濃度リン酸の添加によって発現変動するミヤコグサ遺伝子は 2,189 個であった（図 3.1a）。発現変動遺伝子の reads per kilobase per million mapped reads （RPKM）値をもとにサンプル間でクラスタリング解析を行ったところ、高濃度リン酸添加後 3 時間および 6 時間のフェーズ II、12 時間および 24 時間のフェーズ III、7 日目のフェーズ IV にクラスターが分かれ、リン酸処理後の時間経過とともに発現プロファイルが変化していた（図 3.1b）。

高濃度リン酸による発現変動遺伝子には、菌根形成や維持、菌根機能に関わる遺伝子だけでなく、リン酸自体に応答する変動遺伝子も含まれていると考えられる。リン酸自体に応答する遺伝子を調べるために、非感染根に高濃度リン酸処理し発現変動遺伝子を抽出した。非感染根のサンプルを調製するにあたって、感染根と非感染根でリン栄養が同等レベルになるように、非感染根にはサンプリング 1 週間前から 500 μM リン酸を含む液肥を施用した（図 3.3）。非感染根では 1,575 個の遺伝子が高濃度リン酸に応答して発現変動したが、感染根での発現変動遺伝子とオーバーラップした遺伝子は 286 個のみであった（図 3.1a）。

感染根で発現変動する 2,189 個の遺伝子の発現パターンを大まかに分類するために、k-means 非階層クラスタリングを行った。その結果、大きく 5 つの異なる発現パターン（グループ A～E）に分類することができた（図 3.1c）。グループ A はリン酸添加によって徐々に発現が低下する遺伝子グループであり、これは高濃度リン酸による樹枝状体密度の低下と一致する。グループ A 遺伝子の 65% は AM 菌感染で発現が誘導される遺伝子でもあった（図 3.1d）。グループ A に含まれる菌根誘導性遺伝子には、*LjAMT2;2* や *LjPT4*、*LjRAD1*、*LjRAM1*、*LjRAM2*、*LjSTR*、*LjSTR2*、*LjVpyl* など、菌根形成に関わることが既に知られる多くの遺伝

子が含まれていた（図 3.4）。グループ B はフェーズ II（3、6 時間）で一過的に発現し、グループ C はフェーズ III（12、24 時間）で発現が上昇した。グループ B には extracellular region や cell wall、cysteine-type peptidase activity に関わる GO が濃縮されており、具体的にはシステインプロテアーゼやキチナーゼ、パーブール酸性ホスファターゼをコードする遺伝子が含まれていた（表 3.3）。これらは分泌タンパクであり、樹枝状体のペリアーバスキュラースペースで機能するタンパク質かもしれない。グループ C には、xyloglucan: xyloglucosyl transferase activity や oxidation-reduction process に関わる GO が濃縮されていた（表 3.3）。グループ D は、リン酸添加後 24 時間までは発現量が低下し、その後はもとのレベルにまで発現量が回復した。グループ D には、alcohol dehydrogenase activity や response to high light intensity に関わる GO が濃縮されていた（表 3.3）。グループ E はリン酸添加して 7 日目に比較的高い発現レベルを示す遺伝子群であり、photosystem に関わる GO が濃縮された（表 3.3）。

高濃度リン酸によって発現低下するグループ A 遺伝子

高濃度リン酸で発現低下するグループ A 遺伝子の多くが菌根誘導性であり、なおかつ菌根形成マーカー遺伝子も見られることから、グループ A には菌根形成や維持、菌根機能に関わる遺伝子のコアセットが含まれていると考えられる。グループ A 遺伝子の特徴を調べるために GO 解析を行ったところ、グループ A には脂肪酸や脂質生合成に関与する acetyl-CoA/malonyl-CoA metabolism や glycerol-3-phosphate metabolism の GO が濃縮されていた（表 3.3）。特に、脂肪酸合成やクチン/スベリン生合成に関わる遺伝子が多く見られた（表 3.4）。これらの遺伝子について次のセクションでさらに詳しく解析した。

グループ A にはトランスポーター遺伝子も濃縮されていた (表 3.5)。抽出された多くのトランスポーター遺伝子は AM 菌感染によって発現誘導され、ミネラル (リン酸やアンモニウム、硫黄、亜鉛、鉄、重金属トランスポーター) や有機物 (糖、尿素、アミノ酸、オリゴペプチド)、水 (アクアポリン) などの輸送やプロトン濃度勾配の生成 (H^+ -ATPase) に関与するタンパク質をコードしていた (表 3.5)。また、グループ A には、*LjSTR* と *LjSTR2* をはじめとする ABC トランスポーターも多く見られた。

ジベレリンやストリゴラクトン、アブシジン酸、ミコラディシンの生合成に関わる複数の遺伝子が、リン酸添加によって発現低下した (表 3.6)。これは、ペチュニアを用いたマイクロアレイの結果と一致する (Breuillin et al., 2010)。これらの二次代謝産物は、プラスチドの非メバロン酸経路やカロテノイド合成経路で合成される。特に、非メバロン酸経路の第 1 番目の酵素である 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸合成酵素 (DXS) やカロテノイド合成経路の第 1 番目であるファイトエン合成酵素 (PSY) も、高濃度リン酸添加によって発現が低下した。

植物ホルモンやミコラディシン、脂肪酸はプラスチド内で合成される。多くのプラスチドタンパク質は核ゲノムにコードされており、細胞質で翻訳されたあとに、葉緑体の外膜および内膜に局在する 2 つのトランスロコン (TOC 複合体と TIC 複合体) を通してプラスチドに輸送される (Kovács-Bogdan et al., 2010)。TIC 複合体のひとつのサブユニットをコードする *LjTIC32;1* (CM0368.30.r2.a) 遺伝子の発現はリン酸添加してから 6 時間後に半分以下にまで低下した (図 3.5a)。また、*LjTIC32;1* 遺伝子は菌根で誘導され、樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現した (図 3.5b)。

4-クマル酸 CoA リガーゼ (4CL) の 1 つである *Lj4CL1* 遺伝子は、AM 菌感染

によって強く発現誘導された（表 3.6）。4CL はフェニルプロパノイド経路の鍵となる酵素であり、フラボノイドやリグニン、クマリン、リグナンを代表としたフェノール化合物の合成に必要な *p*-クマロイル CoA の生成に関与する（Yonekura-Sakakibara et al., 2008; Fraser and Chapple, 2011）。4CL の下流のカルコン合成酵素遺伝子 *LjCHS13* やカルコンイソメラーゼ遺伝子 *LjCHI4* もまた、菌根で発現上昇した（表 3.6）。さらに、イソフラボン 3'水酸化酵素やイソフラボノイド糖転移酵素といった遺伝子も菌根で強く発現することから（表 3.6）、AM 菌感染によってイソフラボノイド生合成経路の遺伝子発現が活性化したと考えられる。

脂肪酸およびクチン/スベリン様物質生合成経路

脂肪酸やクチン/スベリン合成に関与する遺伝子の中には、高濃度リン酸添加によって発現が低下する遺伝子が存在し、その多くが菌根誘導性であった（表 3.4）。クチンおよびスベリンは、ヒドロキシ長鎖脂肪酸の重合体である。クチンは地上部の表皮細胞表面を覆うクチクラ層の構成因子である。一方、スベリンは、水分の組織への透過を防ぐために根の内皮の細胞壁に蓄積するカスパリー線の原料である。クチン/スベリンのモノマーは長鎖脂肪酸（C16 や C18）から合成されるが、長鎖脂肪酸はプラスチド内の脂肪酸合成経路で作られる。プラスチドで合成された長鎖脂肪酸は、小胞体（ER）に輸送されそこで水酸化などの修飾を受ける。修飾された脂肪酸は細胞外へ分泌されて、クチン/スベリン重合体となる。

まず、脂肪酸合成の過程では、プラスチドに局在するアセチル CoA カルボキシラーゼ（ACCase）の作用によって、アセチル CoA がカルボキシル化されマロ

ニル CoA になる。植物のヘテロ型 ACCase は 4 個のサブユニット（ビオチンカルボキシラーゼ (BC), ビオチンカルボキシル化キャリアタンパク質 (BCCP), α -カルボキシルトランスフェラーゼ (α -CT), β -カルボキシルトランスフェラーゼ (β -CT)) から成る。ミヤコグサのゲノムには、1 個の BC とそれぞれ複数個の BCCP, α -CT, β -CT 遺伝子が存在する。RNA-seq の結果から、ACCase の 1 セット (*LjBC*, *LjBCCP2*, *Lj α -CT1*, *Lj β -CT1*) が AM 菌感染によって発現誘導されたことから (表 3.4)、これら 4 つのタンパク質が ACCase 複合体を形成して菌根形成を制御している可能性がある。脂肪酸の伸長反応には、縮合反応を触媒する 3-ケトアシル ACP 合成酵素 (KAS)、エノイル ACP 還元酵素 (ENR)、ケトアシル ACP 還元酵素 (KAR)、ヒドロキシアシル ACP デヒドラーゼ (HAD) が関与する。KASIII はアセチル CoA とマロニル ACP の縮合を触媒し、次に KASI がアセチル CoA に 2 つの炭素ユニットを連続的に付加される。パルミトイル-ACP (C16:0) からステアロイル-ACP (C18:0) への変換には、KASII が関与する。脂肪酸伸長に関わる遺伝子では、*LjKASI-like 1* や *LjKASIII*、*LjENR1* 遺伝子が AM 菌感染で発現が誘導され、*LjKASI-like 1* と *LjKAR* 遺伝子はリン酸添加によって発現低下した (表 3.4)。LjKASI-like 1 は KASI と高い相同性を示すものの、ミヤコグサの KASI とは独立していた (図 3.6a)。LjKASI-like 1 はイネ以外の菌根性植物に保存されていた。ステアロイル-ACP からオレイル-ACP への不飽和化に関与するステアロイル-ACP デサチュラーゼ遺伝子の発現はリン酸添加でほとんど変動しなかった。アシル ACP (C16 や C18) がアシル ACP チオエステラーゼの作用によって加水分解されると、脂肪酸合成は終結する。*LjFatM* 遺伝子は菌根で顕著に発現誘導されるアシル ACP チオエステラーゼをコードしており (Wewer et al., 2014; Handa et al., 2015)、その発現は高濃度リン酸によって低下した (表 3.4)。FatM は菌根性植物に保存されており、脂肪酸合成の終結に関

わる典型的な FatA や FatB とは異なるクレードを形成した (図 3.6b)。

クチン/スベリン生合成では、プラスチドから放出された遊離脂肪酸が長鎖アシル CoA 合成酵素 (LACS) によって CoA エステルと結合することで活性化され、シトクロム P450 (CYP) によって酸化反応を受け、その後にグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) の作用でグリセロール-3-リン酸と結合する。今回、グループ A には 2 つの LACS 遺伝子 (*LjLACS2;1* および *LjLACS9* 遺伝子) が含まれていた (表 3.4)。 *LjLACS2;1* は、シロイヌナズナのクチクラの発達に関与する LACS2 (Schnurr et al., 2004) に系統的に近縁であった (図 3.6c)。しかし、*LjLACS2;1* 遺伝子の発現量は感染根と非感染根のどちらでも非常に低かった。一方、*LjLACS9* は感染根で強く発現誘導された (表 3.4)。グループ A のうち、21 個の遺伝子は CYP 遺伝子であった (表 3.4)。クチンやスベリン単量体の合成に必要な酸化反応は、CYP77 や CYP86 ファミリーに属する酵素によって触媒される。しかし、CYP77 や CYP86 をコードする遺伝子はグループ A に含まれていなかった。グループ A 遺伝子の GPAT は菌根誘導性を示す *LjRAM2* 遺伝子であり (表 3.4)、そのホモログであるタルウマゴヤシの *RAM2* は菌足や樹枝状体形成に必要な遺伝子である (Wang et al., 2012)。グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) はグリセロール-3-リン酸を生成する反応を触媒する。リン酸添加によって発現低下する 2 つの *GPDH* 遺伝子が抽出された (表 3.4)。

シロイヌナズナやトマトでは、複数の ABCG トランスポーターや脂質輸送タンパク質 (LTP)、GDSL リパーゼがクチン/スベリン単量体の輸送や合成に関わることが知られている。グループ A には、*LjSTR* と *LjSTR2* を含む 4 つの ABCG トランスポーター遺伝子が存在した (表 3.5)。シロイヌナズナでクチクラ形成に関わる ABCG トランスポーターは AtABCG11, AtABCG12, AtABCG13, AtABCG32 であるが (Pighin et al., 2004; Bird et al., 2007; Panikashvili et al., 2007;

McFarlane et al., 2010; Panikashvili et al., 2010; Bessire et al., 2011; Kang et al., 2011; Panikashvili et al., 2011)、これらと高い相同性を示すグループ A 遺伝子はなかった (図 3.7)。さらに、グループ A には 2 つの *LTP* 遺伝子 *LjLTP1*、*LjLTP2* が含まれていた (表 3.4)。*LjLTP1* と *LjLTP2* 遺伝子は、高濃度リン酸を添加してから急速に発現が低下した (表 3.4)。*LjLTP1* は菌根で強く発現誘導されたが、*LjLTP2* は逆に発現低下した。*LjLTP1* は、クチクラ形成に関与することが知られるシロイヌナズナの *AtLTPG1* や *AtLTPG2* と系統的に近縁でなかった。グループ A 遺伝子には菌根誘導性の *GDSL* 遺伝子が見られたが、いずれもクチン合成に必要な *GDSL* リパーゼと近縁でなかった。

グループ A 遺伝子の発現部位を特定するため、レーザーマイクロダイセクションで細胞を切り出し qRT-PCR で発現解析を行った。菌根のマーカー遺伝子として用いたリン酸トランスポーター遺伝子 *LjPT4* は樹枝状体を含む皮層細胞とその周辺で発現し、MYB 転写因子 *LjMAMI* 遺伝子は樹枝状体を含む皮層細胞で顕著に発現した (図 3.8)。これは、これまでの報告と一致するものであった (Guether et al., 2009; Gaude et al., 2012)。解析したそのほかの遺伝子は、樹枝状体周辺の皮層細胞や表皮細胞で比較的強く発現する遺伝子も見られたものの、どの遺伝子も非感染細胞と比較して樹枝状体を含む皮層細胞で高く発現した (図 3.8)。

高濃度リン酸が与えられた菌根における脂肪酸蓄積量の解析

高濃度リン酸の添加によって脂肪酸合成・修飾関連の遺伝子発現が低下していたことから、菌根中の脂溶性物質の変化を調べるため、LC-Q-TOF-MS を用いてリピドーム解析を行った。菌根で検出された遊離脂肪酸 (FFA) のうち、16:1

(炭素数：不飽和結合数)と 18:1–18:3 FFA がリン酸濃度の上昇に伴って含量が変動した (図 3.9a)。特に、16:1 はリン酸添加後急速に減少し、0 時間と比較して 24 時間後で 58%、1 週間後で 35%にまで低下した。16:1 は AM 菌の主要な遊離脂肪酸であり、ミヤコグサ非感染根ではほとんど検出されなかったことから (図 3.9a)、16:1 は AM 菌由来の脂肪酸かもしれない。いくつかのヒドロキシ脂肪酸 (HFA) 分子種の含量もリン酸添加によって顕著に変動した (図 3.9b)。特に、16:0-HFA の含量はリン酸を添加してから 6 時間後に約半分まで低下し、その後に添加前の水準にまで回復した。リン脂質や糖脂質の組成もリン添加で変動したが、16:1-FFA や 16:0-HFA ほどの大きな変化は見られなかった (図 3.9c, d)。

樹枝状体形成に対するグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ *LjRAM2* の機能解析

高濃度リン酸添加によって発現が低下する脂肪酸合成・修飾関連遺伝子の中で、*RAM2* 遺伝子は菌足や樹枝状体形成に必要なことがタルウマゴヤシで知られている (Wang et al., 2012)。樹枝状体形成に対する *RAM2* の関与をミヤコグサでさらに詳しく調べるために、*LjRAM2* のエキソンに内在性レトロトランスポゾン *LORE1a* が挿入された変異系統 (*Ljram2-1*) を選抜し機能解析を行った (図 3.10a)。野生型と比較して *Ljram2-1* 変異体の菌根菌感染率は低いものの、*Ljram2-1* 変異体の根に AM 菌が感染すると皮層細胞の細胞間隙に菌糸を広げた (図 3.10b, c)。しかし、*Ljram2-1* 変異体では成熟した樹枝状体は見られなかった (図 3.10b, c)。皮層細胞では、トランク菌糸様の構造は形成されるものの、樹枝状体の分枝は顕著に阻害されていた (図 3.10c)。 *Ljram2-1* 変異体の脂肪酸誘導体の含量をリピドーム解析で調べたところ、野生型の感染根に比べて 16:0-HFA や 18:1-FFA の

含量は顕著に低く、野生型の非感染根とほぼ同じ発現レベルであった(図 3.10d)。また、*Ljram2-1* 変異体の 16:1-FFA、20:3-FFA、24:1-HFA 含量は野生型の感染根と比較して顕著に低かったが、これらの脂肪酸分子種は非感染根で検出されなかったことから、AM 菌由来の脂肪酸分子種と考えられる。

樹枝状体形成に対する AP2/ERF 転写因子 *LjERM* の機能解析

高濃度リン酸を添加した菌根で転写因子の発現プロファイルを調査したところ、93 個の遺伝子が発現変動していた(表 3.7)。グループ A には 26 個の転写因子が含まれており、その中には GRAS 転写因子の *LjRAM1* や *LjRAD1* などの樹枝状体形成の鍵となる制御因子が存在した。さらに、菌根で高い発現を示す GRAS 転写因子の *LjSCR3* や MYB 転写因子の *LjMAMI* もグループ A に見られた。同じくグループ A に分類される AP2/ERF 転写因子の *LjERM1*, *LjERM2*, *LjERM3* は菌根形成に伴って発現が強く誘導され、なおかつ高濃度リン酸添加によって発現が低下した(表 3.7)。*LjERM1-3* はお互い系統的に近い関係にあり、2 つの AP2 ドメインを持つ AP2 サブファミリーの中で独立したクレードを形成し、そのクレードには非菌根性植物であるシロイヌナズナの遺伝子が見られなかった(図 3.11)。過去に報告されているミヤコグサやタルウマゴヤシ、イネのトランスクリプトーム解析でも、このクレードに属する遺伝子は AM 菌感染によって発現誘導されており(Gaude et al., 2012; Gutjahr et al., 2015; Handa et al., 2015)、その中のひとつのタルウマゴヤシ *MtERF* は樹枝状体形成に関与することが示されている(Devers et al., 2013)。私たちは *LjERM* 以外に 2 つの菌根誘導性 AP2/ERF 転写因子(*LjWRI3*, *LjWRI4* 遺伝子)を同定した。これらの遺伝子はグループ D に含まれ、高濃度リン酸添加後 24 時間以内に発現が低下した(表 3.7)。*LjWRI3*

と *LjWRI4* は *LjERM1-3* の姉妹群に属しており、脂肪酸合成の制御に関わるシロイヌナズナ *WRIKLED* のホモログである (図 3.11)。菌根形成における *LjERM* 遺伝子の機能を調べるために、遺伝子発現の局在解析と逆遺伝学的解析を行った。*LjERM1*, *LjERM2*, *LjERM3* は樹枝状体を含む皮層細胞で特異的に発現していた (図 3.12a)。このことは、*LjERM2* のプロモーターGUS 解析からも裏付けられた (図 3.12b)。私たちは、*LjERM* 遺伝子をターゲットとする RNAi 系統を作製し、3 つの系統 (RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3) を確立した。RNAi-1 系統では、3 つの *LjERM* 遺伝子の発現が野生型と比較して低下していた (図 3.12c)。RNAi-2 系統では、*LjERM1* と *LjERM3* 遺伝子の発現が抑制され、*LjERM2* 遺伝子も有意差はないものの発現が低下した。一方、RNAi-3 系統では、*LjERM2* 遺伝子の発現が低下する傾向はみられたものの、*LjERM1* と *LjERM3* 遺伝子の発現は野生型感染根と同等レベルであった。今回の解析では、RNAi-3 系統をコントロール区として使用した。菌根菌感染率 (M%, m%) は RNAi による影響を受けなかったが、RNAi-1 および RNAi-2 系統では樹枝状体密度 (A%, a%) が野生型や RNAi-3 系統と比較して顕著に低下した (図 3.12d)。RNAi-1 と RNAi-2 系統ではトランク部位からのファインブランチの発達が阻害されており (図 3.12e)、*LjERM* 遺伝子は正常な樹枝状体の形成に必要であることが明らかとなった。

LjERM 遺伝子の発現抑制によってミヤコグサ共生遺伝子の発現量に変化が生じるかどうかを評価するために、qRT-PCR で共生遺伝子の発現を解析した。AM マーカー遺伝子である *LjPT4* と *LjAMT2;2* 遺伝子は AM 菌感染によって強く発現誘導されるが、RNAi-1 と RNAi-2 系統での発現レベルは野生型や RNAi-3 系統に比べて有意に低下した (図 3.12f)。これは、正常な樹枝状体形成が阻害されているためであると考えられる。*LjERM* は脂肪酸合成に関わるシロイヌナズナ *WRIKLED* と系統的に近いため、脂肪酸誘導体の生合成を制御している可能性が

ある。そこで、*LjERM* RNAi 系統を用いて脂肪酸合成やクチン/スベリン経路に関わるグループ A 遺伝子の発現量を評価した。全体として、RNAi-1 と RNAi-2 系統の脂肪酸合成やクチン/スベリン合成遺伝子の発現量は、野生型 (AM) や RNAi-3 と比較して発現が低下した。特に、脂肪酸伸長反応に関わる *LjKASI-like 1*、*LjLACS9*、*LjGPDH1*、*LjGPDH2* 遺伝子はコントロールに比べて RNAi-1 や RNAi-2 系統で発現が低下しており、非接種の野生型 (NM) と同等レベルの発現量を示した (図 3.12f)。

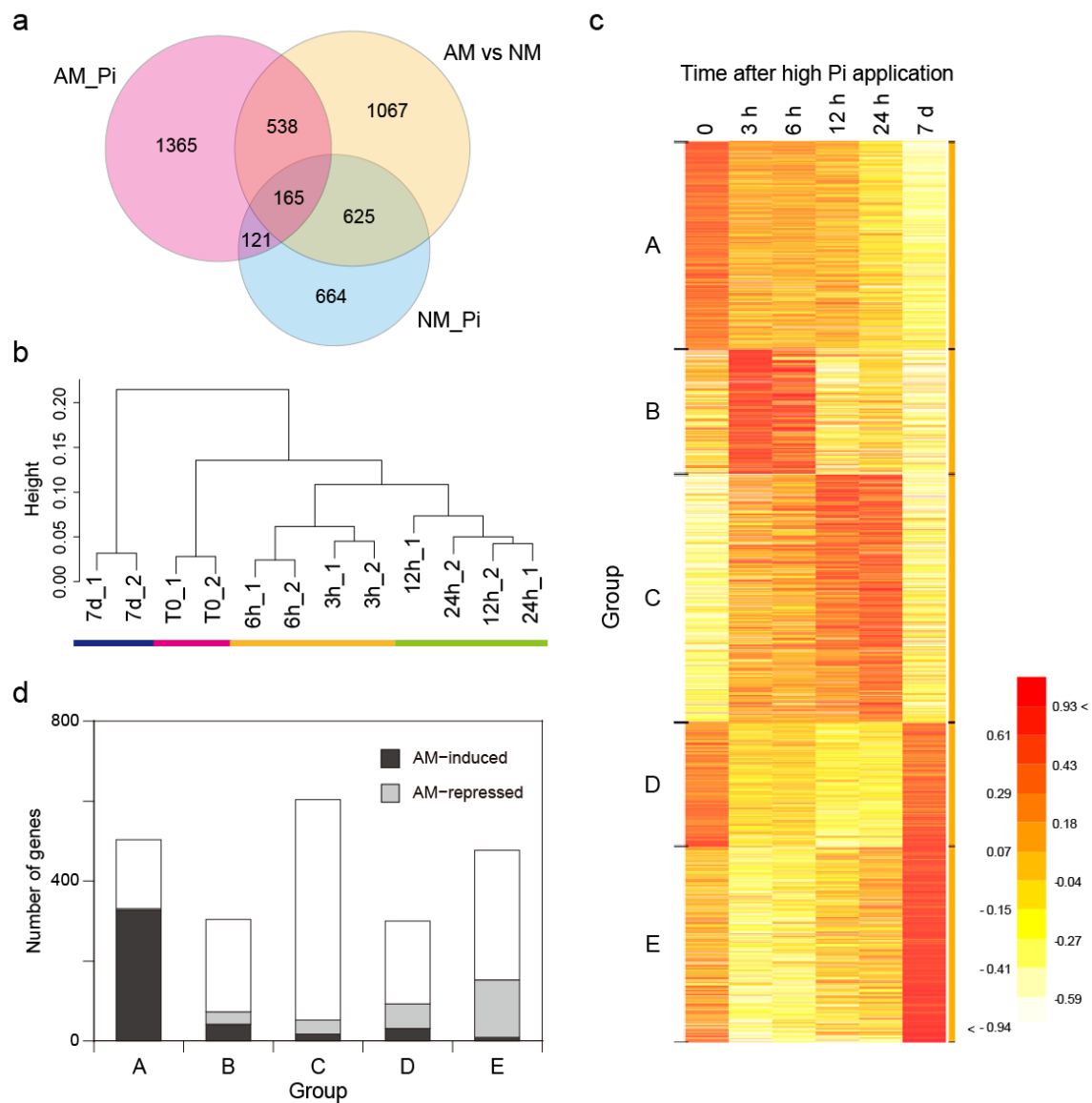


図 3.1. ミヤコグサの発現変動遺伝子 (DEG) .

(a) リン酸処理した感染根 (AM_Pi) と非感染根 (NM_Pi) の発現変動遺伝子、感染根と非感染根間の発現変動遺伝子におけるオーバーラップ.

(b) リン酸処理した感染根の発現変動遺伝子の階層クラスタリング.

(c) k-means クラスタリングによる高濃度リン酸処理した菌根の発現変動遺伝子の分類. 6 つのタイムでの平均発現量を基準とした log2-fold を示す。色合いは、白色（低発現）から黄色を通して赤色（高発現）を示す。

(d) k-means 法で分類された各遺伝子グループにおける、AM 菌感染で発現上昇する遺伝子と低下する遺伝子数.

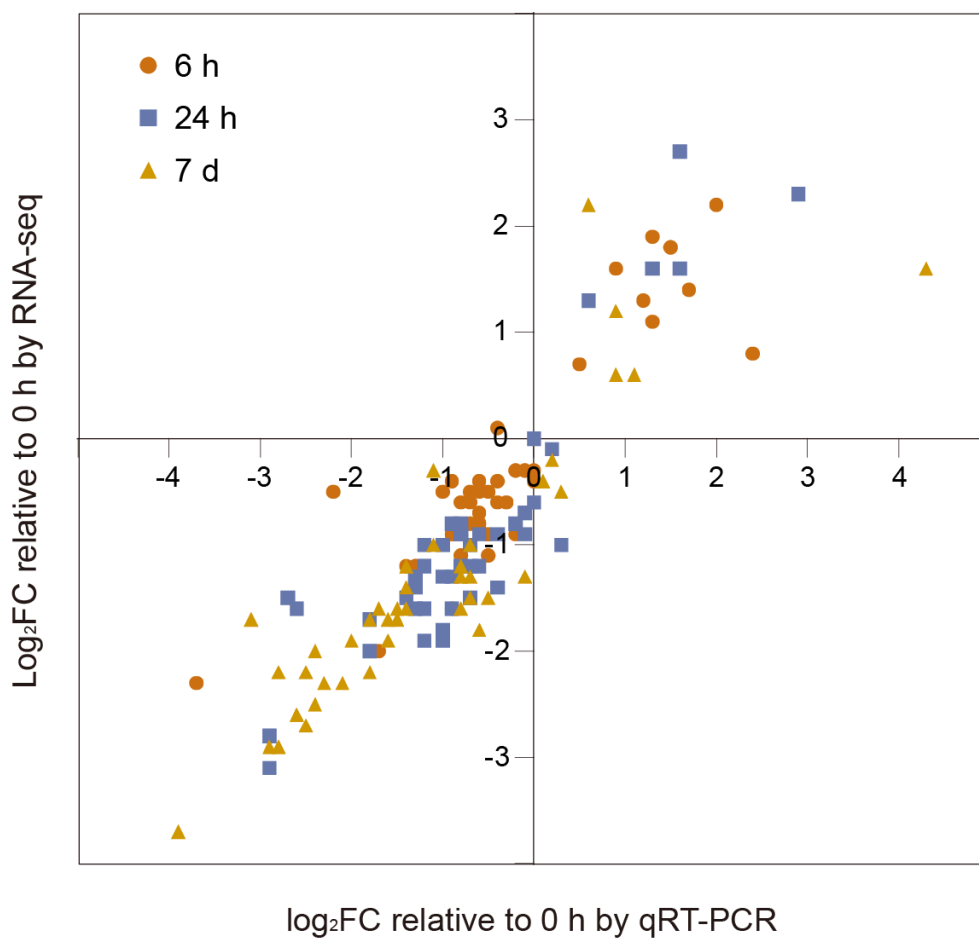


図 3.2. RNA-seq で推定された遺伝子発現量の qRT-PCR による検証.

45 個のミヤコグサ遺伝子を対象に、高濃度リン酸添加による発現変動をプロットした。RNA-seq では、発現変動量 (Log_2FC) の算出に RPKM 値を用いた。qRT-PCR では、発現変動量を ΔCt 値から算出した。RNA-seq では 2 反復、qRT-PCR では 3 反復で発現解析を行った。

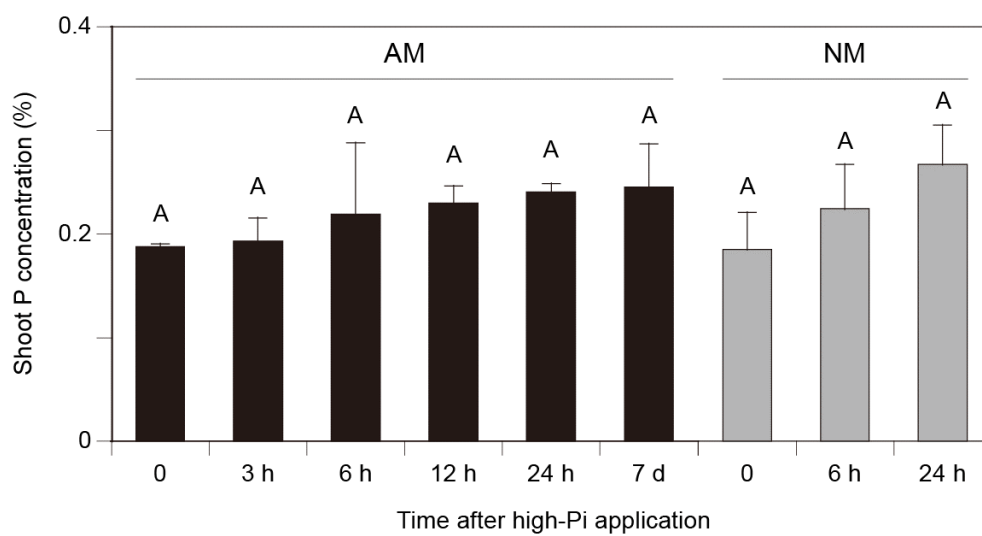


図 3.3. RNA-seq 解析で用いたミヤコグサ植物体の地上部リン濃度.

高濃度リン酸添加した AM 菌感染サンプル (AM) と非感染サンプル (NM) における、各時間でのリン濃度を表す。平均 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。Tukey-Kramer 検定で、異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

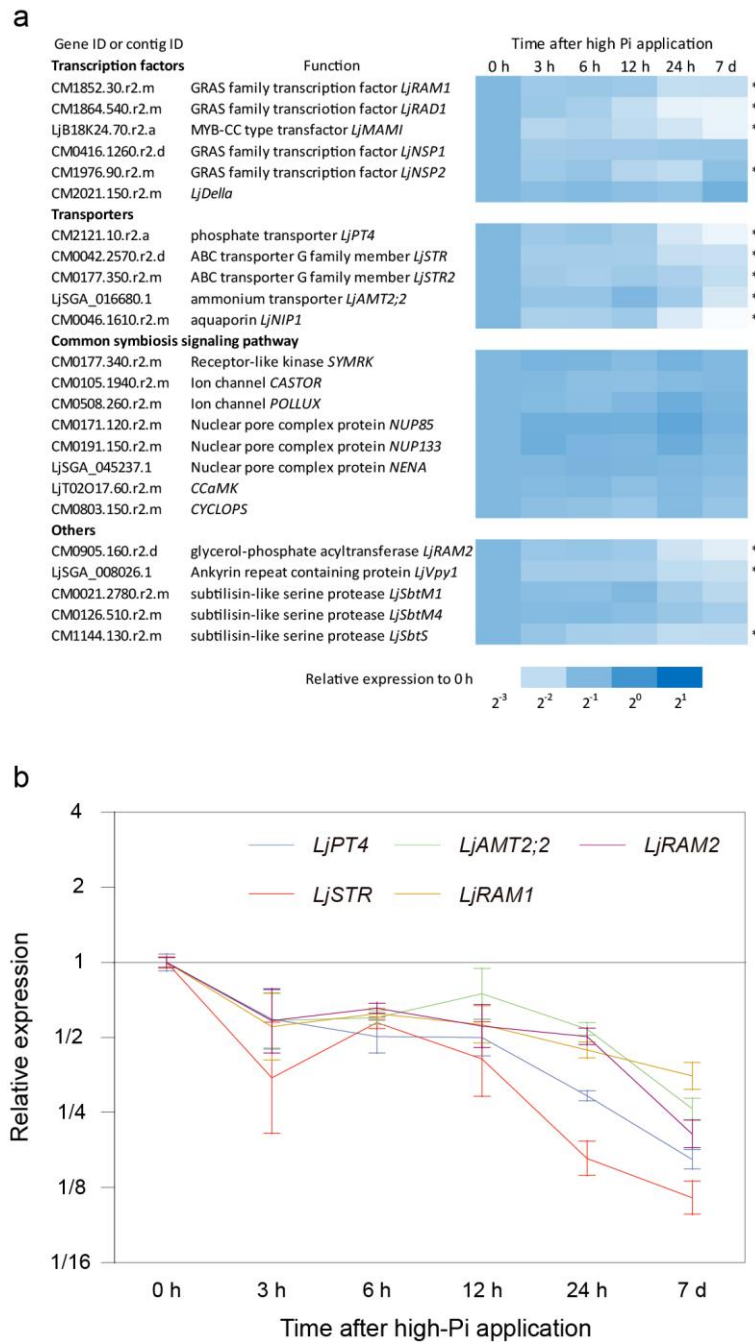


図 3.4. AM 共生のマーカー遺伝子の発現変化.

- (a) リン添加 0 時間に対する倍率変化. 倍率変化は RPKM 値をもとに算出した。
アスタリスクは高濃度リン酸添加で発現変動する遺伝子 (FDR < 0.001) を示す。
- (b) qRT-PCR による AM 共生マーカー遺伝子の発現解析. 平均 ± 95%信頼区間
($n = 3$)。

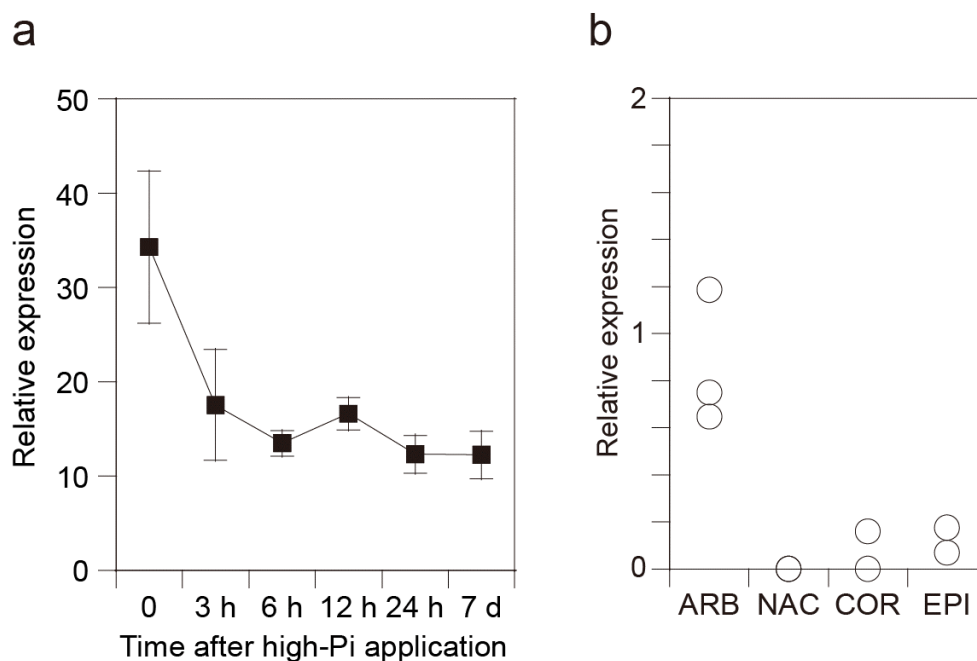


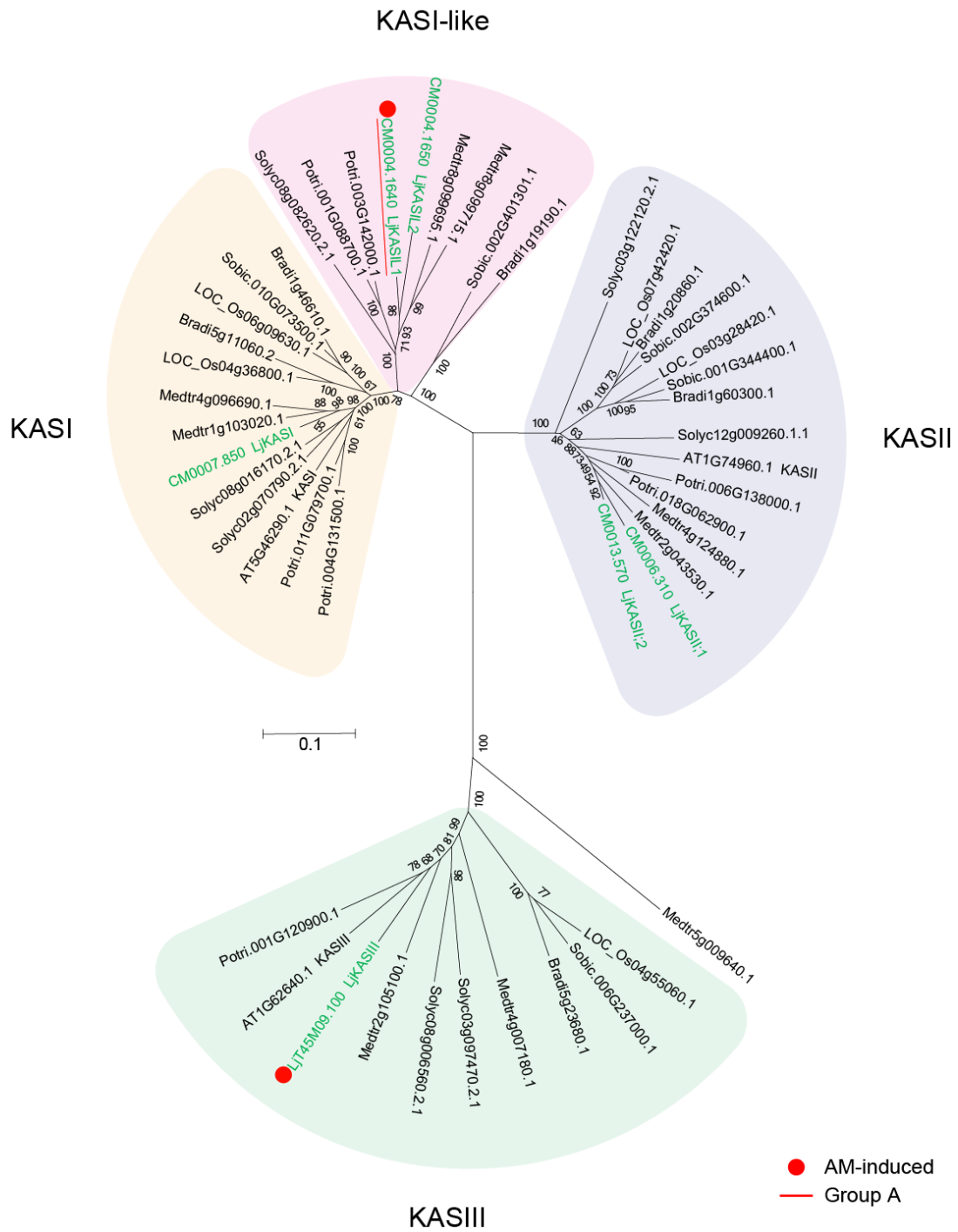
図 3.5. qRT-PCR による *LjTIC32;1* 遺伝子の発現解析.

(a) 高濃度リン酸添加した菌根の *LjTIC32;1* 遺伝子の発現. 発現量は非感染根に対する相対発現量で表した. 平均 \pm 標準誤差 ($n = 3$).

(b) 細胞種類別の *LjTIC32;1* 遺伝子の発現解析. レーザーマイクロダイセクションで樹枝状体を含む皮層細胞 (ARB)、樹枝状体周辺の非感染皮層細胞 (NAC)、AM 菌感染が見られない皮層細胞 (COR)、AM 菌感染が見られない表皮細胞 (EPI) を単離した. *LjEF2* 遺伝子に対する発現量をプロットした ($n = 2-3$).

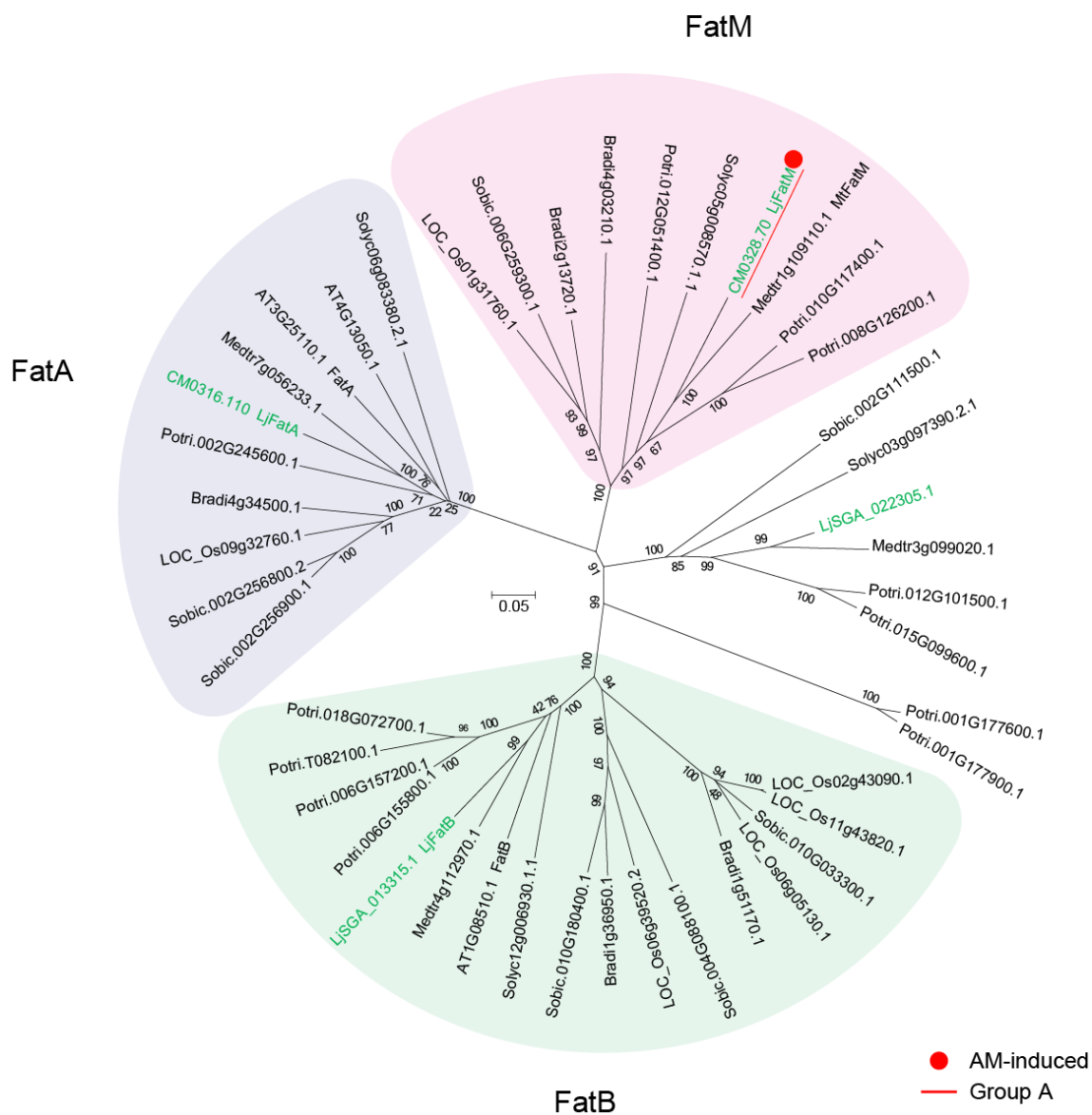
a

3-Ketoacyl-ACP synthase (KAS)



b

Acyl-ACP thioesterase (Fat)



Long chain acyl-CoA synthetase (LACS)

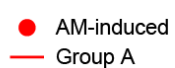


図 3.6. 3-ケトアシル ACP 合成酵素 (KAS)、アシル ACP チオエステラーゼ (Fat) および long chain acyl-CoA synthetase (LACS) の系統解析.

ミヤコグサ（緑）の KAS (a)、Fat (b)、LACS (c) のアミノ酸配列と、シロイヌナズナ (AT)、タルウマゴヤシ (Medtr)、トマト (Solyc)、ポプラ (Potri)、イネ (LOC)、ブラキポディウム (Bradi) およびソルガム (Sobic) の配列とともに近隣結合法によって系統樹を作成した。バーは遺伝距離を示す。ブートストラップ値を分枝に表記した。

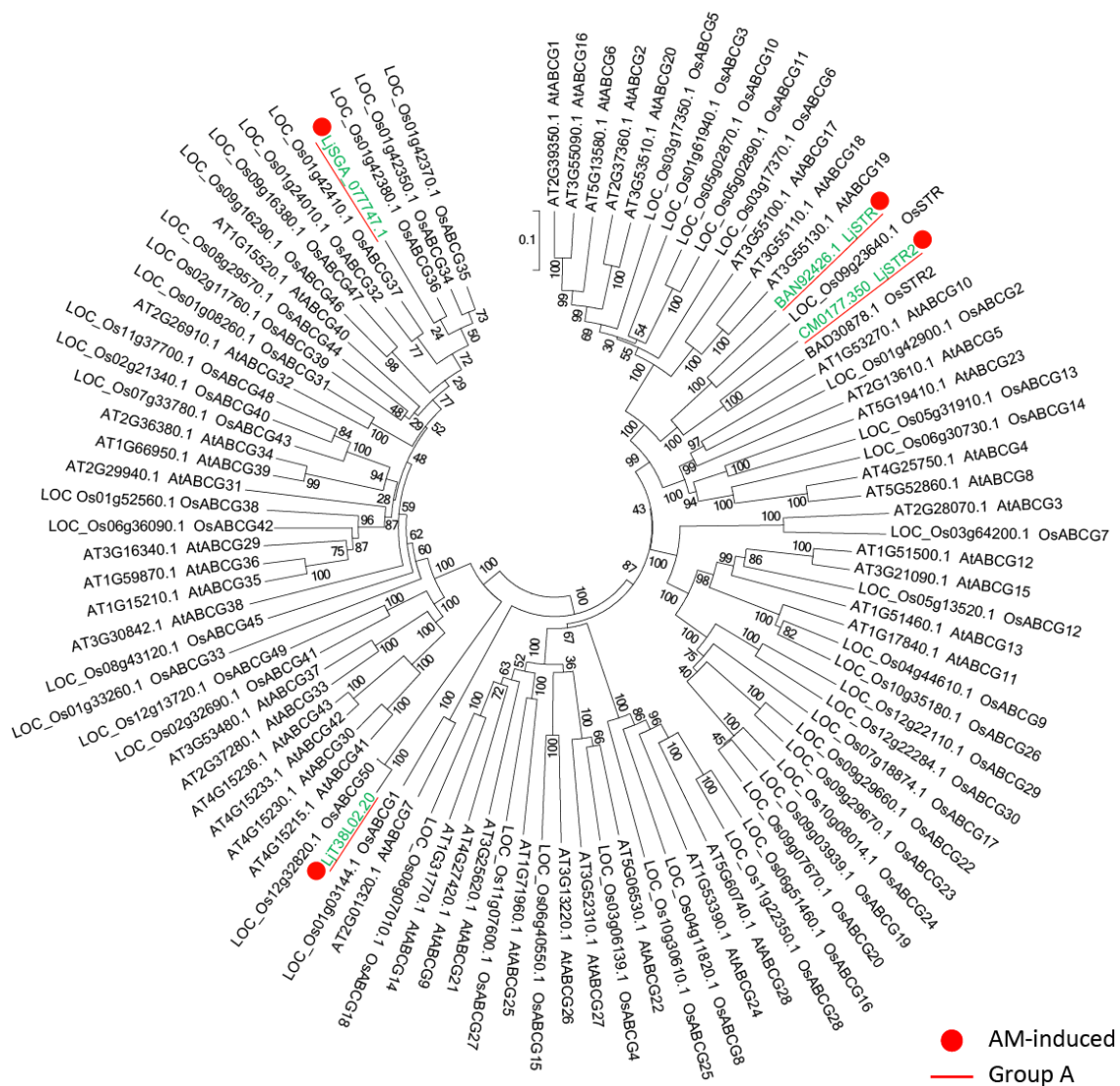


図 3.7. グループ A に含まれる ABCG トランスポーターの系統解析.

ミヤコグサ（緑）の ABCG トランスポーターのアミノ酸配列と、シロイヌナズナ（AT）、タルウマゴヤシ（Medtr）およびイネ（LOC）の配列とともに近隣結合法によって系統樹を作成した。シロイヌナズナとイネの ABCG トランスポーターは、Verrier ら（2008）の命名法にしたがった。バーは遺伝距離を示す。ブートストラップ値を分枝に表記した。

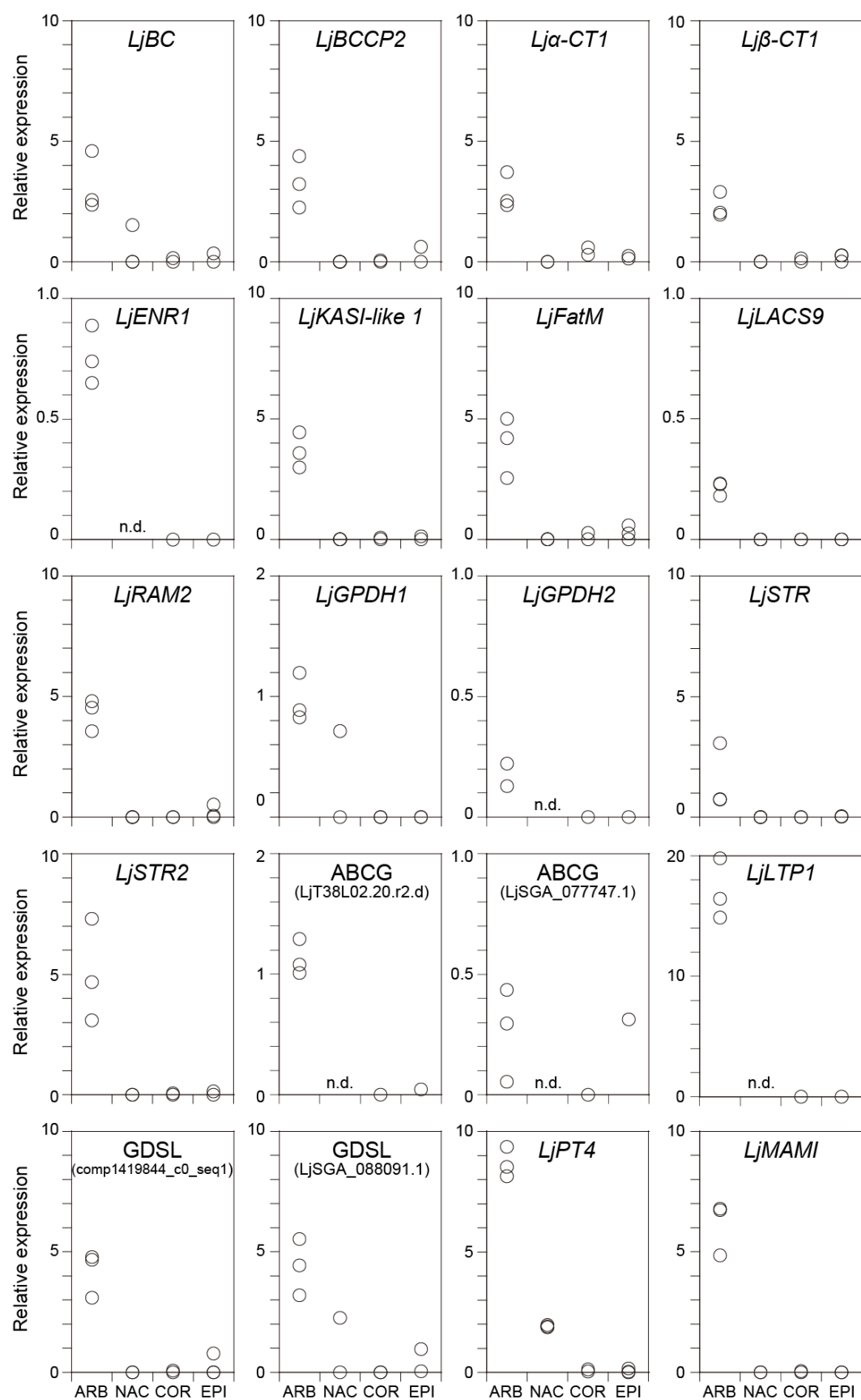


図 3.8. レーザーマイクロダイセクションによる細胞種類別の遺伝子発現.

脂肪酸やクチン/スベリン様物質生合成関連遺伝子、トランスポーター遺伝子の発現量を qRT-PCR で測定した。樹枝状体を含む皮層細胞 (ARB)、樹枝状体周辺の非感染皮層細胞 (NAC)、AM 菌感染が見られない皮層細胞 (COR)、AM 菌感染が見られない表皮細胞 (EPI)。 *LjEF2* 遺伝子の発現量を基準として、各サンプルでの発現量を求めた (*LjEF2* 発現量 = 1) ($n = 1-3$)。40 サイクルを超えても PCR 増幅が見られない場合は、発現量を 0 とした。n.d., not determined.

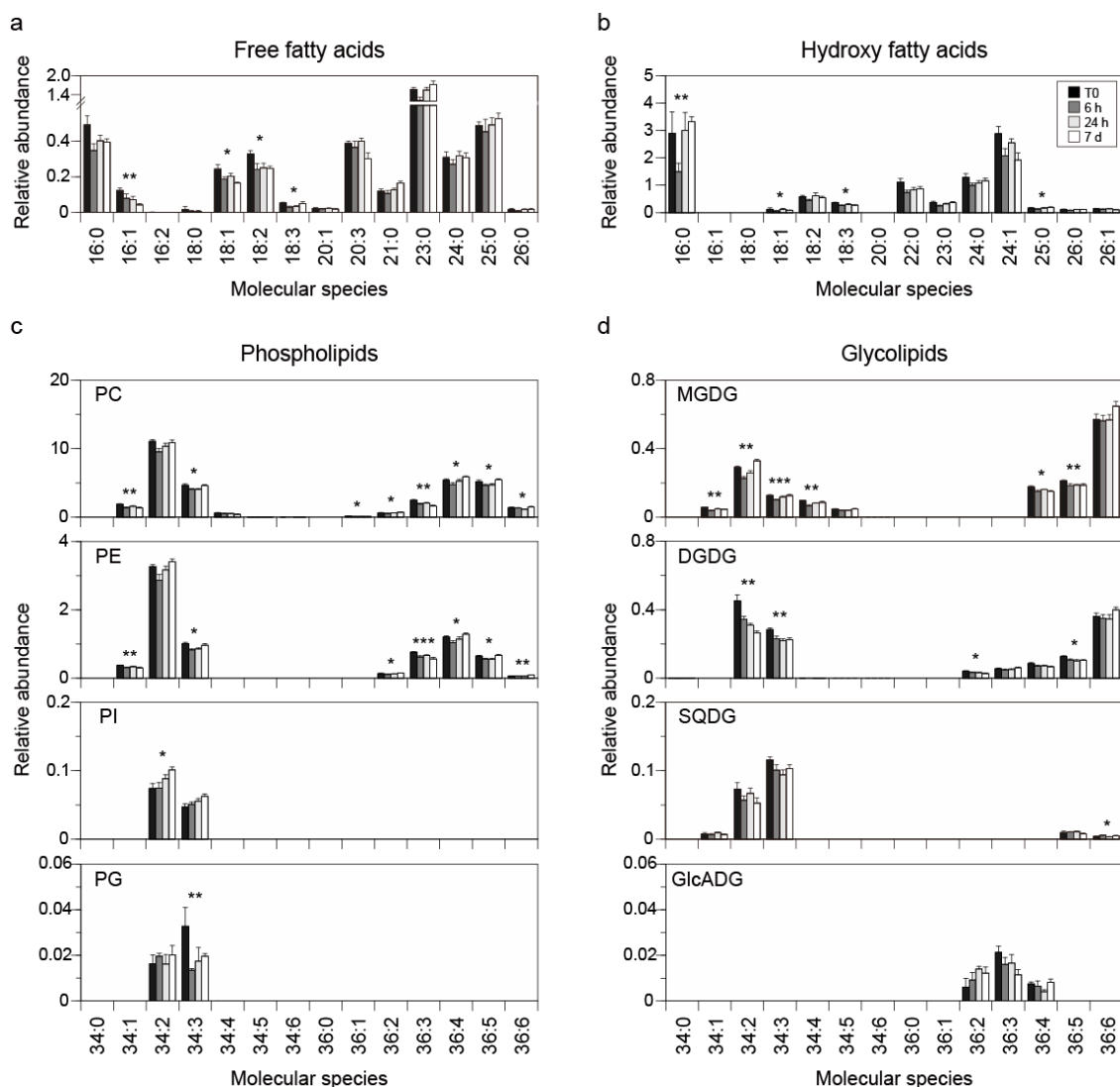
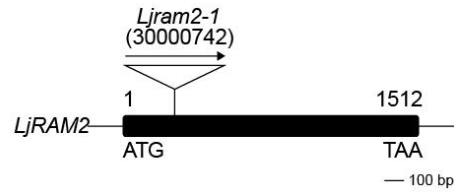


図 3.9. ミヤコグサ菌根のリピドーム解析。

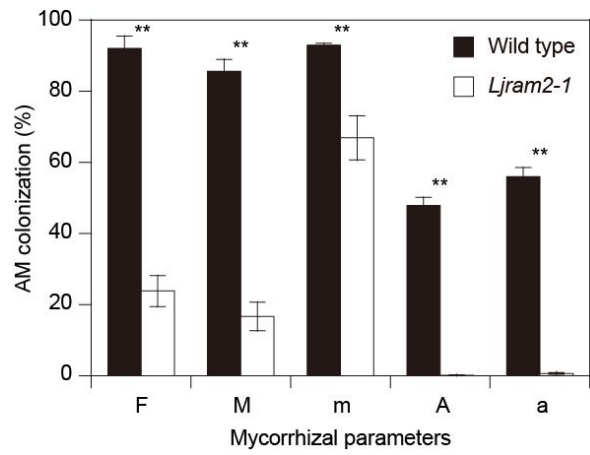
リン酸処理したミヤコグサ菌根における脂肪酸 (a)、ヒドロキシ脂肪酸 (b)、リン脂質 (c) や糖脂質 (d) の含量を示す。内部標準に対する各分子種 (炭素数 : 不飽和結合数) の相対量を算出した。平均 \pm 標準誤差 ($n = 6$)。一元配置分散分析で検定を行った: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。PC, ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PI, ホスファチジルイノシトール; PG, ホスファチジルグリセロール; MGDG, モノガラクトシルジアシル

グリセロール; DGDG, ジガラクトシルジアシルグリセロール; SQDG, スルホキノボシルジアシルグリセロール; GlcADG, グルクロノシルジアシルグリセロール.

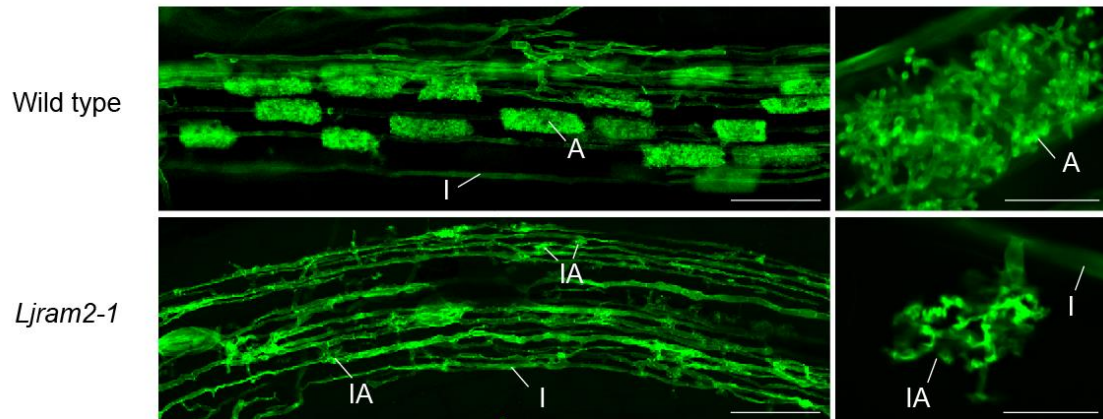
a



b



c



d

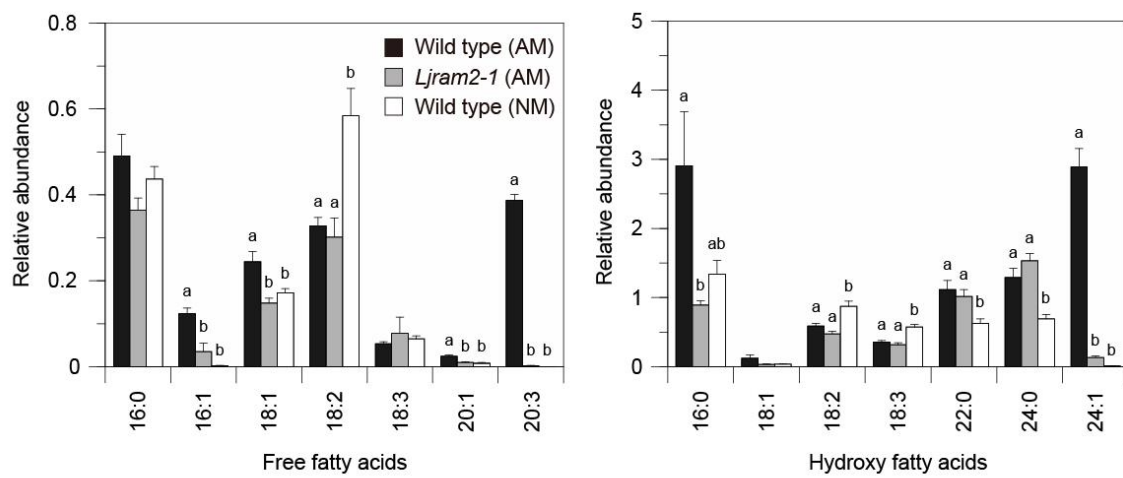


図 3.10. *Ljram2* 変異体の菌根表現型解析.

(a) *LjRAM* 遺伝子の *LORE1* 挿入。*Ljram2-1* 変異体 (Plant line ID: 30000742) では、開始コドンから第 264 番目と 265 番目の間のエキソン領域に *LORE1* が挿入されている。

(b) *Ljram2-1* 変異体の菌根菌感染率。菌根菌感染率の測定方法は Trouvelot ら (1986) にしたがった。平均 \pm 標準誤差 ($n = 5$)。

(c) *R. irregularis* が感染したミヤコグサ根の WGA 染色像。感染形態 (左) と樹枝状体形態 (右) を示した。スケールバーは 50 μm (左) と 10 μm (右) を表す。成熟した樹枝状体 (A), 未発達な樹枝状体 (IA), 内生菌糸 (I)。

(d) 野生型と *Ljram2-1* 変異体の感染根および野生型の非感染根における遊離脂肪酸とヒドロキシ脂肪酸の含量。平均 \pm 標準誤差 ($n = 6$)。Tukey-Kramer 検定において、異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

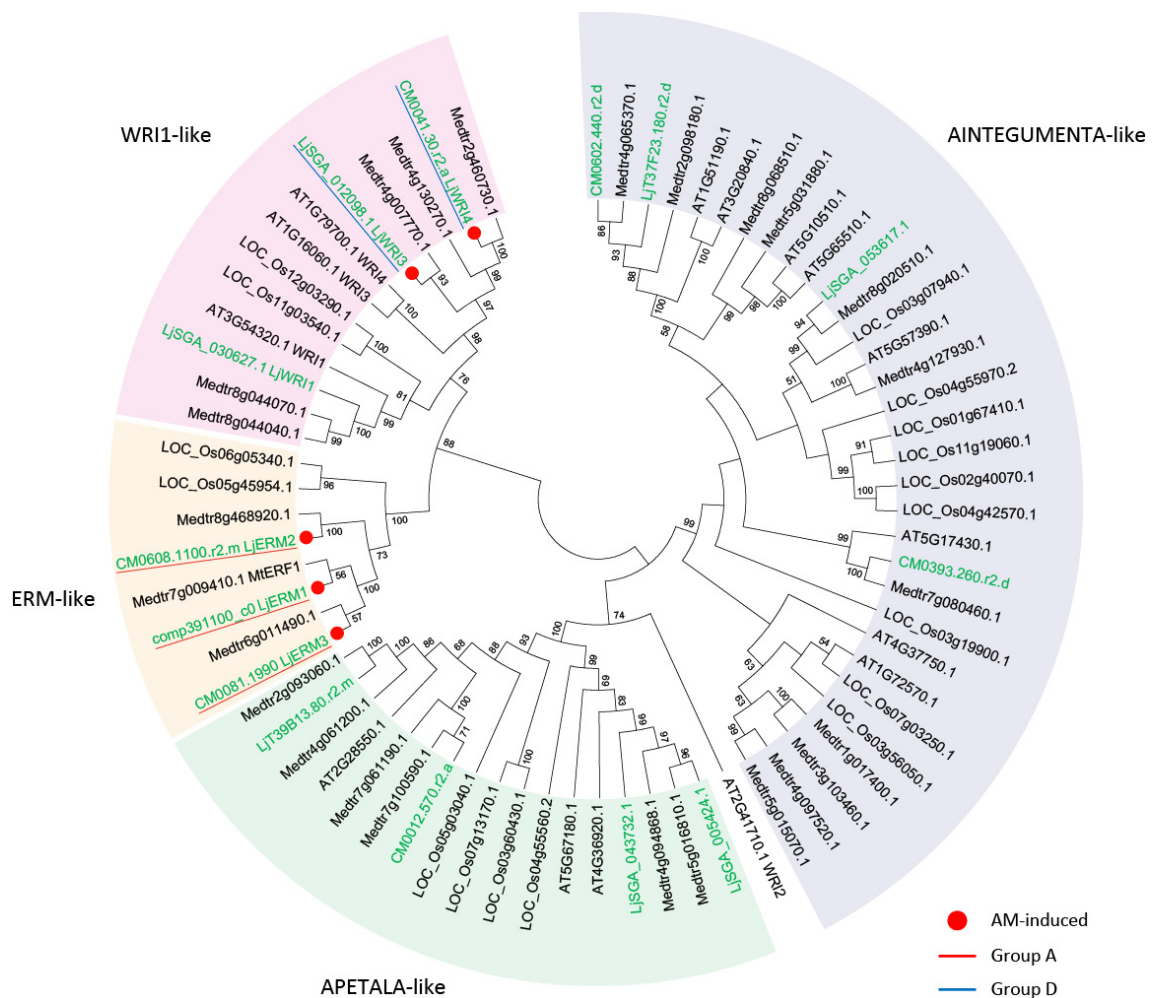


図 3.11. AP2/ERF 転写因子の分子系統解析.

ミヤコグサ (緑)、シロイヌナズナ (AT)、タルウマゴヤシ (Medtr) およびイネ (LOC) から、2 個の AP2 ドメインを持つ AP2 サブファミリーのアミノ酸配列を抽出し、近隣結合法によって系統樹を作成した。シロイヌナズナとミヤコグサは、Nakano ら (2008) と Handa ら (2015) の報告にしたがった。バーは遺伝距離を示す。ブートストラップ値を分枝に表記した。

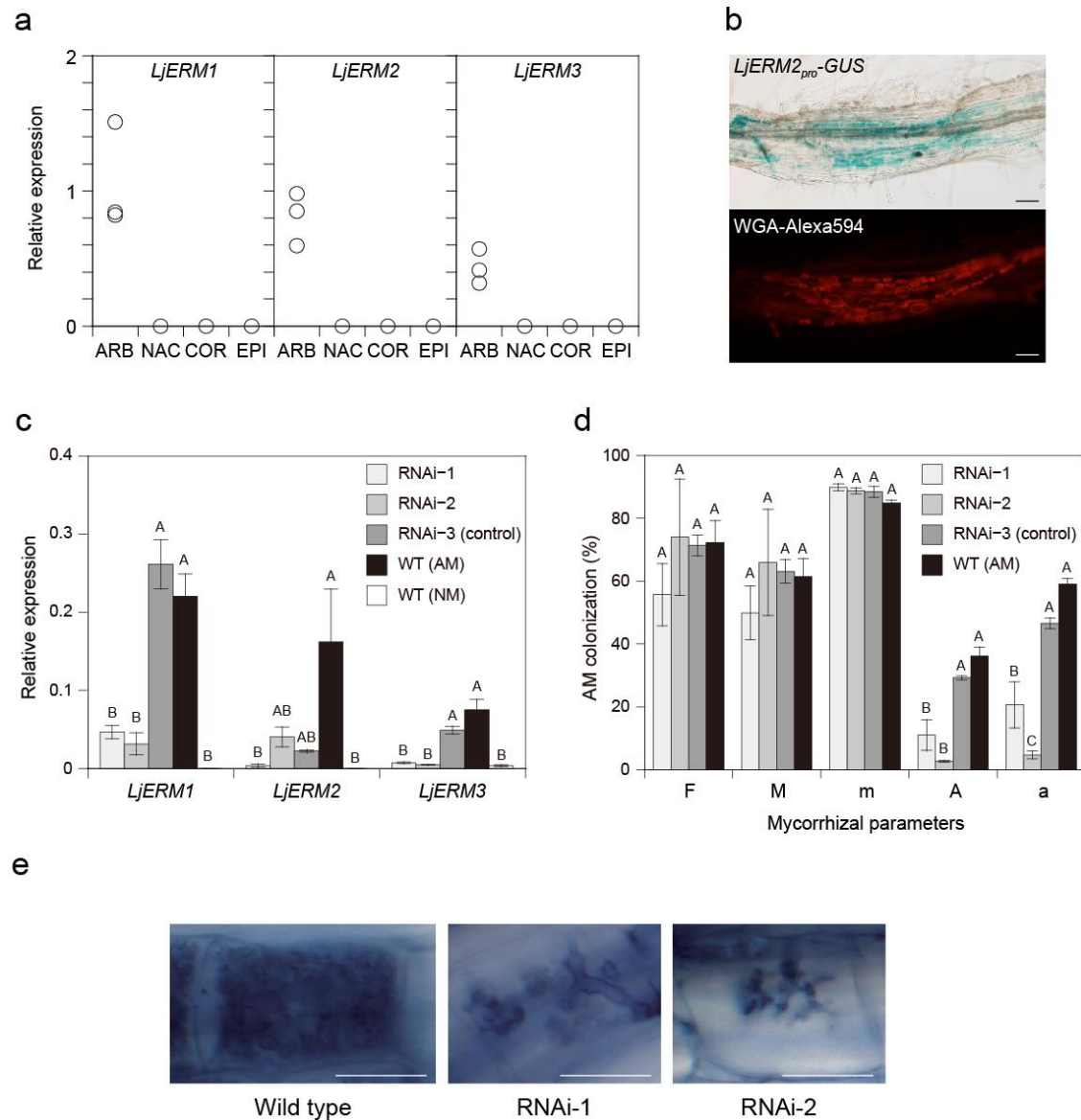


図 3.12. *LjERM1-3* 遺伝子発現解析と *LjERM* RNAi 系統の菌根表現型解析.

(a) qRT-PCR による *LjERM1*、*LjERM2*、*LjERM3* 遺伝子の発現解析。レーザーマイクロダイセクションで樹枝状体を含む皮層細胞 (ARB)、樹枝状体周辺の非感染皮層細胞 (NAC)、AM 菌感染が見られない皮層細胞 (COR)、AM 菌感染が見られない表皮細胞 (EPI) を単離した。 *LjEF2* 遺伝子の発現量を基準として、

各サンプルの発現量を求めた (*LjEF2* 発現量 = 1) ($n = 2-3$)。40 サイクル超えても PCR 増幅が見られない場合は、発現量を 0 とした。

(b) *LjERM2* pro-GUS を発現させたミヤコグサ感染根における GUS 染色像 (上) と WGA-Alexafluor 594 染色像 (下)。スケールバーは 100 μm を表す。

(c) 野生型および *LjERM* RNAi 系統での *LjERM1*, *LjERM2*, *LjERM3* 遺伝子の発現解析。野生型では感染根 (WT (AM)) と非感染根 (WT (NM))、*LjERM* RNAi 系統では感染根における発現量を測定した。平均 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。Tukey-Kramer 検定において、異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

(d) *LjERM* RNAi 系統での菌根表現型解析。菌根菌感染率の測定方法は、Trouvelot ら (1986) にしたがった。平均 \pm 標準誤差 ($n = 3$)。Tukey-Kramer 検定において、異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

(e) 野生型、RNAi-1 および RNAi-2 系統における樹枝状体形態。トリパンブルー染色によって AM 菌を染色した。スケールバーは 10 μm を示す。

f

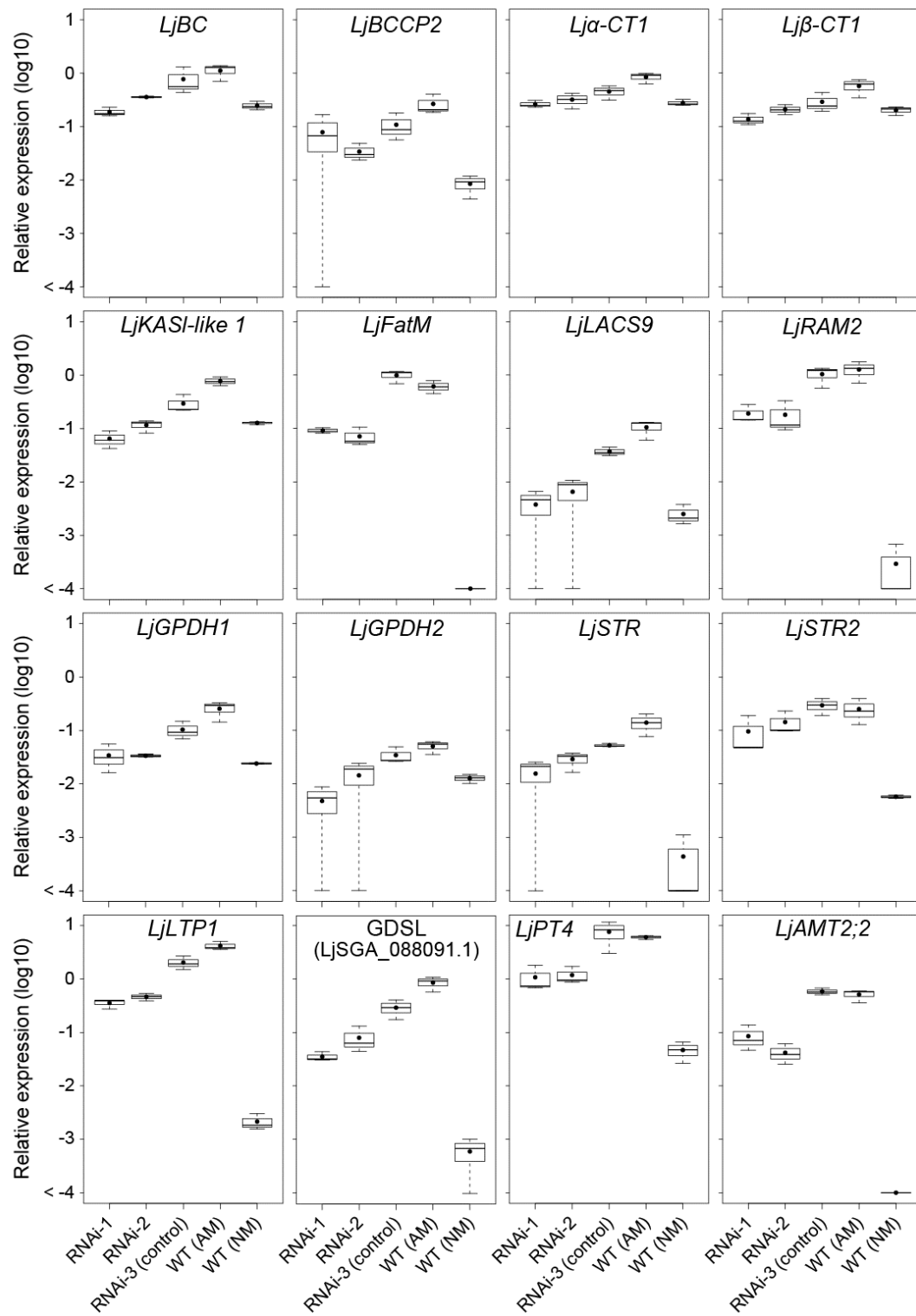


図 3.12. Continued

(f) *LjERM* RNAi 系統における菌根マーカー遺伝子とクチン/スベリン様物質合成遺伝子の発現解析。箱の上辺は第 3 四分位点、下辺は第 1 四分位点を示す。箱内の横線は中央値、黒点は平均値を表す。箱の上部にある横線は最大値、箱の下部にある横線は最小値を示す。40 サイクル超えても PCR 増幅が見られない場合は、発現量を 10^{-4} とした。

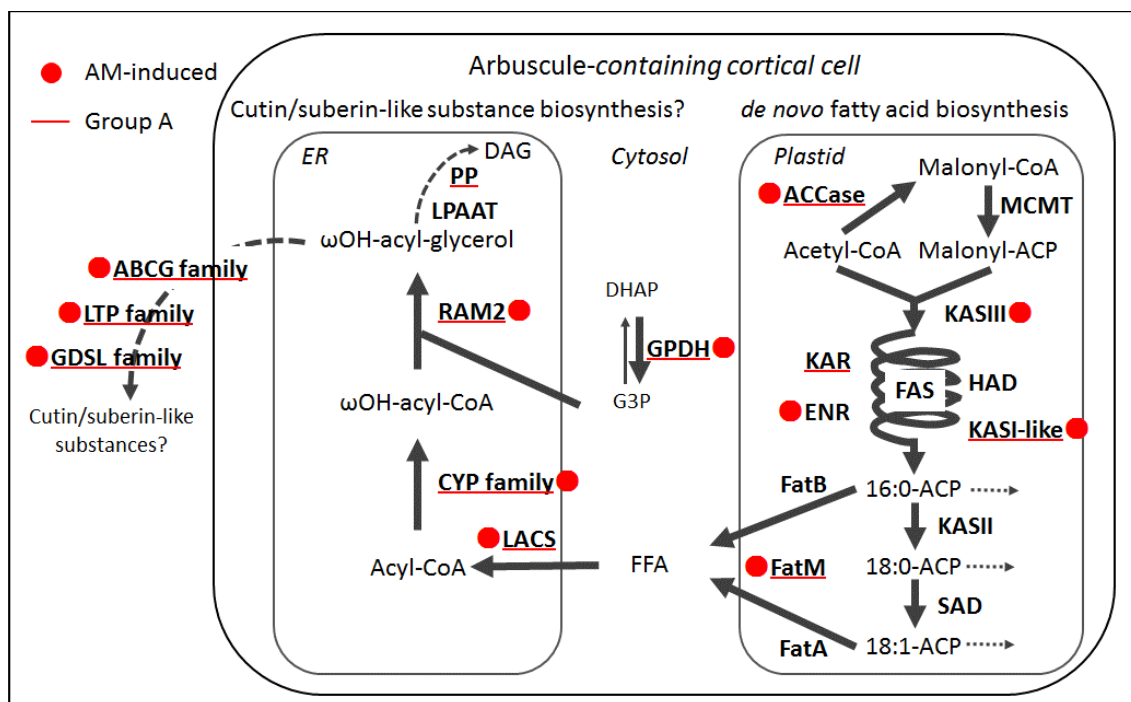


図 3.13. 本研究で提唱するクチン/スベリン様物質生合成と輸送のモデル図。

ABCG family, ATP-binding cassette transporter G subfamily; ACCase, acetyl-CoA carboxylase; ACP, acyl carrier protein; CoA, coenzyme A; CYP family, cytochrome P450 family; DAG, diacylglycerol; DHAP, dihydroxyacetonephosphate; ENR, enoyl-ACP reductase; FAS, fatty acid synthase; Fat, fatty acyl thioesterase; FFA, free fatty acid; G3P, glycerol 3-phosphate; GDSL family, GDSL esterase/lipase family; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; GPDH, glycerol-phosphate dehydrogenase; HAD, 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase; KAR, 3-ketoacyl-ACP reductase; KAS, 3-ketoacyl-ACP synthase; LACS, long-chain acyl-CoA synthetase; LTP family, lipid transfer protein family; MCMT, malonyl-CoA: ACP malonyltransferase; LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; PP, phosphatidate phosphatase; RAM2, reduced arbuscular mycorrhization 2; SAD, stearoyl-ACP desaturase.

表 3.1. 高濃度リン酸溶液を与えた後の菌根菌感染率の変化

| Time after | | | | | | | | | | |
|-------------|------------|----|------------|---|------------|---|------------|----|------------|----|
| high-Pi | F% | | M% | | m% | | A% | | a% | |
| application | | | | | | | | | | |
| 0 | 99.0 ± 0.4 | a | 88.3 ± 1.1 | a | 89.2 ± 0.8 | a | 53.5 ± 2.0 | a | 60.5 ± 1.6 | a |
| 6 h | 98.2 ± 0.6 | a | 85.6 ± 1.5 | a | 87.1 ± 1.1 | a | 47.9 ± 2.6 | ab | 56.0 ± 2.9 | ab |
| 24 h | 94.8 ± 2.3 | ab | 82.6 ± 3.6 | a | 87.0 ± 1.9 | a | 38.5 ± 3.8 | bc | 46.3 ± 3.4 | c |
| 7 d | 88.4 ± 1.6 | b | 67.8 ± 4.1 | b | 75.6 ± 3.8 | b | 33.3 ± 2.8 | c | 49.2 ± 2.7 | bc |

菌根菌感染率の測定法は Trouvelot ら (1986) に従った。

平均 ± 標準誤差 ($n = 4-5$)。

Tukey-Kramer test により異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

F%, frequency of mycorrhiza in the root system (根全体での菌根菌感染率); M%, intensity of the mycorrhizal colonization in the root system (根全体での菌糸密度); m%, intensity of the mycorrhizal colonization in the root fragments (根断片あたりの菌糸密度); A%, arbuscule abundance in the root system (根全体での樹枝状体密度); a%, arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments (根断片あたりの菌糸密度)。

表 3.2. ミヤコグサのリファレンス配列（Handa et al., 2015）に対するマッピング情報.

| | Arbuscular mycorrhizal roots | | | | | | Non-mycorrhizal roots | | |
|--------------------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
| | 0 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h | 7 d | 0 h | 6 h | 24 h |
| Total raw reads | 31,964,910 | 28,591,786 | 44,942,208 | 41,679,782 | 49,125,426 | 34,800,882 | 31,900,050 | 32,074,674 | 27,924,970 |
| Mapped reads to the <i>L.</i> | | | | | | | | | |
| <i>japonicus</i> reference sequences | 21,831,607 | 20,008,515 | 32,407,269 | 27,705,525 | 34,492,594 | 23,847,325 | 15,489,533 | 18,082,589 | 18,149,635 |
| Mapped reads/total raw reads (%) | 68.3 | 70.0 | 72.1 | 66.5 | 70.2 | 68.5 | 48.6 | 56.4 | 65.0 |

表 3.3. グループ A-E に分類される発現変動遺伝子の GO 解析.
有意に濃縮されている GO を示した ($P < 0.01$) .

| Group A | | | |
|--------------------|---|-----------------|---------|
| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
| Biological process | | | |
| GO:0055114 | oxidation-reduction process | 66 | 3.1E-07 |
| GO:0046168 | glycerol-3-phosphate catabolic process | 4 | 2.7E-06 |
| GO:0006817 | phosphate ion transport | 5 | 1.8E-05 |
| GO:0046167 | glycerol-3-phosphate biosynthetic process | 3 | 3.6E-05 |
| GO:0072488 | ammonium transmembrane transport | 4 | 3.7E-05 |
| GO:0006200 | ATP catabolic process | 15 | 5.2E-04 |
| GO:0016036 | cellular response to phosphate starvation | 4 | 7.0E-04 |
| GO:0009873 | ethylene-activated signaling pathway | 4 | 8.8E-04 |
| GO:0009611 | response to wounding | 7 | 1.3E-03 |
| GO:0006071 | glycerol metabolic process | 3 | 3.1E-03 |
| GO:0018108 | peptidyl-tyrosine phosphorylation | 4 | 3.9E-03 |
| GO:2001295 | malonyl-CoA biosynthetic process | 2 | 5.2E-03 |
| GO:0006308 | DNA catabolic process | 2 | 9.2E-03 |
| Molecular function | | | |
| GO:0016705 | oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen | 33 | 1.6E-09 |
| GO:0005506 | iron ion binding | 27 | 4.9E-07 |
| GO:0004497 | monooxygenase activity | 22 | 6.5E-07 |
| GO:0020037 | heme binding | 24 | 2.6E-06 |
| GO:0004367 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity | 4 | 2.7E-06 |
| GO:0008519 | ammonium transmembrane transporter activity | 4 | 3.6E-05 |
| GO:0003989 | acetyl-CoA carboxylase activity | 4 | 9.3E-05 |
| GO:0051213 | dioxygenase activity | 14 | 1.3E-04 |
| GO:0030145 | manganese ion binding | 5 | 6.2E-04 |
| GO:0008889 | glycerophosphodiester phosphodiesterase activity | 3 | 7.5E-04 |
| GO:0010333 | terpene synthase activity | 4 | 1.7E-03 |
| GO:0051287 | NAD binding | 6 | 3.0E-03 |
| GO:0030151 | molybdenum ion binding | 2 | 3.0E-03 |

表 3.3. Continued

| GO:0016884 | carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor | 4 | 3.6E-03 |
|--------------------|--|-----------------|---------|
| GO:0004185 | serine-type carboxypeptidase activity | 5 | 3.6E-03 |
| GO:0004096 | catalase activity | 2 | 4.0E-03 |
| GO:0004713 | protein tyrosine kinase activity | 4 | 4.1E-03 |
| GO:0045735 | nutrient reservoir activity | 4 | 7.2E-03 |
| GO:0004867 | serine-type endopeptidase inhibitor activity | 2 | 7.7E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0009331 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex | 4 | 2.3E-06 |
| GO:0009317 | acetyl-CoA carboxylase complex | 3 | 2.7E-04 |
| GO:0031224 | intrinsic component of membrane | 51 | 6.1E-04 |
| GO:0005955 | calcineurin complex | 1 | 1.9E-02 |
| Group B | | | |
| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
| Biological process | | | |
| GO:1901599 | (-)-pinoselinol biosynthetic process | 3 | 2.3E-06 |
| GO:0044550 | secondary metabolite biosynthetic process | 9 | 1.6E-05 |
| GO:0006869 | lipid transport | 7 | 3.3E-05 |
| GO:0006629 | lipid metabolic process | 21 | 4.4E-05 |
| GO:0006308 | DNA catabolic process | 2 | 2.4E-03 |
| GO:0000041 | transition metal ion transport | 4 | 5.9E-03 |
| Molecular function | | | |
| GO:0042349 | guiding stereospecific synthesis activity | 3 | 2.6E-06 |
| GO:0008234 | cysteine-type peptidase activity | 10 | 3.1E-06 |
| GO:0018685 | alkane 1-monooxygenase activity | 2 | 2.5E-04 |
| GO:0033897 | ribonuclease T2 activity | 2 | 1.4E-03 |
| GO:0046906 | tetrapyrrole binding | 12 | 2.1E-03 |
| GO:0008081 | phosphoric diester hydrolase activity | 4 | 2.4E-03 |
| GO:0003993 | acid phosphatase activity | 3 | 2.7E-03 |
| GO:0004553 | hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds | 12 | 6.8E-03 |

表 3.3. Continued

| GO:0016705 | oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen | 14 | 7.7E-03 |
|--------------------|---|-----------------|---------|
| GO:0004553 | hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds | 12 | 6.8E-03 |
| GO:0016705 | oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen | 14 | 7.7E-03 |
| GO:0008271 | secondary active sulfate transmembrane transporter activity | 2 | 8.0E-03 |
| GO:0005506 | iron ion binding | 11 | 8.1E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0005576 | extracellular region | 26 | 1.1E-09 |
| GO:0005618 | cell wall | 8 | 6.3E-04 |
| GO:0000324 | fungus-type vacuole | 2 | 4.7E-03 |
| Group C | | | |
| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
| Biological process | | | |
| GO:0055114 | oxidation-reduction process | 82 | 7.2E-10 |
| GO:0010951 | negative regulation of endopeptidase activity | 7 | 7.5E-08 |
| GO:0009074 | aromatic amino acid family catabolic process | 5 | 6.9E-05 |
| GO:0006558 | L-phenylalanine metabolic process | 4 | 2.8E-04 |
| GO:0030418 | nicotianamine biosynthetic process | 2 | 5.9E-04 |
| GO:0009800 | cinnamic acid biosynthetic process | 3 | 2.0E-03 |
| GO:0007018 | microtubule-based movement | 8 | 2.0E-03 |
| GO:0006166 | purine ribonucleoside salvage | 2 | 2.9E-03 |
| GO:0019354 | siroheme biosynthetic process | 2 | 4.0E-03 |
| GO:0015698 | inorganic anion transport | 6 | 4.4E-03 |
| GO:0009095 | aromatic amino acid family biosynthetic process, prephenate pathway | 2 | 5.3E-03 |
| GO:0006566 | threonine metabolic process | 2 | 6.7E-03 |
| GO:0009851 | auxin biosynthetic process | 3 | 7.8E-03 |
| GO:0015671 | oxygen transport | 2 | 8.3E-03 |
| GO:0010200 | response to chitin | 5 | 9.1E-03 |
| GO:0009620 | response to fungus | 7 | 9.9E-03 |

表 3.3. Continued

| Molecular function | | | |
|--------------------|---|----|---------|
| GO:0016762 | xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity | 8 | 7.1E-08 |
| GO:0004866 | endopeptidase inhibitor activity | 7 | 5.9E-06 |
| GO:0004553 | hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds | 27 | 8.7E-05 |
| GO:0016705 | oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen | 25 | 8.7E-05 |
| GO:0010181 | FMN binding | 6 | 1.7E-04 |
| GO:0016210 | naringenin-chalcone synthase activity | 4 | 2.3E-04 |
| GO:0030410 | nicotianamine synthase activity | 2 | 5.8E-04 |
| GO:0019202 | amino acid kinase activity | 3 | 1.6E-03 |
| GO:0016491 | oxidoreductase activity | 83 | 1.9E-03 |
| GO:0045548 | phenylalanine ammonia-lyase activity | 3 | 1.9E-03 |
| GO:0003777 | microtubule motor activity | 8 | 2.1E-03 |
| GO:0016682 | oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor | 4 | 2.1E-03 |
| GO:0070008 | serine-type exopeptidase activity | 6 | 2.4E-03 |
| GO:0004851 | uroporphyrin-III C-methyltransferase activity | 2 | 2.8E-03 |
| GO:0043115 | precoirrin-2 dehydrogenase activity | 2 | 2.8E-03 |
| GO:0005315 | inorganic phosphate transmembrane transporter activity | 3 | 3.0E-03 |
| GO:0008171 | O-methyltransferase activity | 5 | 3.2E-03 |
| GO:0016774 | phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor | 3 | 3.9E-03 |
| GO:0004421 | hydroxymethylglutaryl-CoA synthase activity | 2 | 3.9E-03 |
| GO:0016671 | oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor | 3 | 4.4E-03 |
| GO:0004351 | glutamate decarboxylase activity | 2 | 6.6E-03 |
| GO:0008429 | phosphatidylethanolamine binding | 2 | 6.6E-03 |
| GO:0032403 | protein complex binding | 9 | 7.5E-03 |
| GO:0004350 | glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase activity | 2 | 8.1E-03 |
| GO:0004372 | glycine hydroxymethyltransferase activity | 2 | 9.8E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0005576 | extracellular region | 36 | 9.3E-08 |
| GO:0030089 | phycobilisome | 3 | 1.6E-05 |

表 3.3. Continued

| GO:0005618 | cell wall | 13 | 2.7E-04 |
|--------------------|---|-----------------|---------|
| GO:0005871 | kinesin complex | 8 | 5.3E-04 |
| GO:0005874 | microtubule | 8 | 3.5E-03 |
| Group D | | | |
| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
| Biological process | | | |
| GO:0009644 | response to high light intensity | 5 | 2.1E-04 |
| GO:0006829 | zinc ion transport | 3 | 2.7E-04 |
| GO:0042542 | response to hydrogen peroxide | 5 | 1.1E-03 |
| GO:0009873 | ethylene-activated signaling pathway | 3 | 1.7E-03 |
| GO:0009408 | response to heat | 6 | 1.8E-03 |
| GO:0046685 | response to arsenic-containing substance | 2 | 2.4E-03 |
| GO:0006351 | transcription, DNA-templated | 30 | 6.7E-03 |
| GO:0019432 | triglyceride biosynthetic process | 1 | 6.8E-03 |
| GO:0030011 | maintenance of cell polarity | 1 | 6.8E-03 |
| GO:0055092 | sterol homeostasis | 1 | 6.8E-03 |
| GO:0006857 | oligopeptide transport | 3 | 8.2E-03 |
| GO:0009686 | gibberellin biosynthetic process | 2 | 9.6E-03 |
| Molecular function | | | |
| GO:0004022 | alcohol dehydrogenase (NAD) activity | 3 | 2.3E-04 |
| GO:0003700 | sequence-specific DNA binding transcription factor activity | 17 | 6.8E-04 |
| GO:0005385 | zinc ion transmembrane transporter activity | 2 | 5.7E-03 |
| GO:0043178 | alcohol binding | 2 | 5.7E-03 |
| GO:0016705 | oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen | 12 | 5.8E-03 |
| GO:0043565 | sequence-specific DNA binding | 10 | 6.2E-03 |
| GO:0004679 | AMP-activated protein kinase activity | 1 | 6.7E-03 |
| GO:0010314 | phosphatidylinositol-5-phosphate binding | 1 | 6.7E-03 |
| GO:0043325 | phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate binding | 1 | 6.7E-03 |
| GO:0070273 | phosphatidylinositol-4-phosphate binding | 1 | 6.7E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0032541 | cortical endoplasmic reticulum | 1 | 7.0E-03 |

表 3.3. Continued

| Group E | | | |
|--------------------|--|-----------------|---------|
| GO ID | GO term | Number of genes | P-value |
| Biological process | | | |
| GO:0015979 | photosynthesis | 48 | 3.0E-18 |
| GO:0009765 | photosynthesis, light harvesting | 13 | 6.7E-17 |
| GO:0010207 | photosystem II assembly | 9 | 2.4E-07 |
| GO:0019344 | cysteine biosynthetic process | 8 | 6.6E-07 |
| GO:0015994 | chlorophyll metabolic process | 8 | 5.8E-06 |
| GO:0035304 | regulation of protein dephosphorylation | 6 | 1.0E-05 |
| GO:0006779 | porphyrin-containing compound biosynthetic process | 7 | 1.3E-04 |
| GO:0042548 | regulation of photosynthesis, light reaction | 3 | 1.5E-04 |
| GO:0006364 | rRNA processing | 9 | 1.7E-04 |
| GO:0009414 | response to water deprivation | 7 | 4.7E-04 |
| GO:0051258 | protein polymerization | 5 | 7.9E-04 |
| GO:0009060 | aerobic respiration | 5 | 1.3E-03 |
| GO:0009686 | gibberellin biosynthetic process | 3 | 1.3E-03 |
| GO:0009657 | plastid organization | 10 | 1.4E-03 |
| GO:0010617 | circadian regulation of calcium ion oscillation | 2 | 1.4E-03 |
| GO:0009308 | amine metabolic process | 7 | 1.9E-03 |
| GO:0009773 | photosynthetic electron transport in photosystem I | 3 | 2.1E-03 |
| GO:0015977 | carbon fixation | 3 | 2.4E-03 |
| GO:0009785 | blue light signaling pathway | 2 | 2.6E-03 |
| GO:0015986 | ATP synthesis coupled proton transport | 4 | 3.2E-03 |
| GO:0006597 | spermine biosynthetic process | 2 | 3.4E-03 |
| GO:0009740 | gibberellic acid mediated signaling pathway | 3 | 3.5E-03 |
| GO:0010044 | response to aluminum ion | 2 | 4.2E-03 |
| GO:0018298 | protein-chromophore linkage | 3 | 4.2E-03 |
| GO:0048509 | regulation of meristem development | 5 | 4.9E-03 |
| GO:0055114 | oxidation-reduction process | 50 | 4.9E-03 |
| GO:0032880 | regulation of protein localization | 3 | 6.3E-03 |
| GO:0010027 | thylakoid membrane organization | 5 | 9.5E-03 |
| GO:0010019 | chloroplast-nucleus signaling pathway | 1 | 9.9E-03 |

表 3.3. Continued

| Molecular function | | | | |
|--------------------|---|----|---------|--|
| GO:0016168 | chlorophyll binding | 6 | 2.6E-06 | |
| GO:0004519 | endonuclease activity | 13 | 7.5E-06 | |
| GO:0008131 | primary amine oxidase activity | 4 | 9.7E-06 | |
| GO:0004365 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity | 2 | 3.1E-04 | |
| GO:0009496 | plastoquinol--plastocyanin reductase activity | 2 | 3.1E-04 | |
| GO:0016984 | ribulose-bisphosphate carboxylase activity | 3 | 4.3E-04 | |
| GO:0004108 | citrate (Si)-synthase activity | 2 | 6.1E-04 | |
| GO:0048038 | quinone binding | 5 | 1.9E-03 | |
| GO:0004325 | ferrochelatase activity | 2 | 2.1E-03 | |
| GO:0009882 | blue light photoreceptor activity | 2 | 2.1E-03 | |
| GO:0046872 | metal ion binding | 81 | 2.8E-03 | |
| GO:0046961 | proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism | 3 | 2.8E-03 | |
| GO:0004014 | adenosylmethionine decarboxylase activity | 2 | 3.5E-03 | |
| GO:0046933 | proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism | 3 | 4.2E-03 | |
| GO:0016161 | beta-amylase activity | 2 | 4.4E-03 | |
| GO:0003913 | DNA photolyase activity | 2 | 9.9E-03 | |
| Cellular component | | | | |
| GO:0009521 | photosystem | 38 | 1.0E-30 | |
| GO:0042651 | thylakoid membrane | 28 | 4.9E-13 | |
| GO:0009536 | plastid | 54 | 5.6E-06 | |
| GO:0009535 | chloroplast thylakoid membrane | 15 | 6.2E-06 | |
| GO:0019898 | extrinsic component of membrane | 7 | 1.5E-05 | |
| GO:0009533 | chloroplast stromal thylakoid | 2 | 7.6E-04 | |
| GO:0045261 | proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) | 3 | 3.8E-03 | |

表 3.4. グループ A に含まれる脂肪酸生合成・修飾に関わる遺伝子の発現変動.

^a0 時間に対する相対発現量 (log2) .RPKM をもとに算出. ^biDEGES/edgeR で正規化されたリードカウント数から算出 (log2) .*FDR < 0.001.

| Gene ID | Annotation | Gene name | Fold changes | | | Fold change in expression in AM versus NM ^b |
|---------------------|--|----------------------|--|------|------|--|
| | | | after high-Pi application in AM roots ^a | | | |
| | | | 6 h | 24 h | 7 d | |
| CM0004.2010.r2.m | Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase | <i>LjBC</i> | -0.9 | -0.9 | -1.3 | 3.3* |
| CM1882.210.r2.a | Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein | <i>LjBCCP2</i> | -0.7 | -1.6 | -1.7 | 6.1* |
| LjSGA_008658.1 | Acetyl-CoA α-carboxylase carboxyltransferase | <i>Ljα-CT1</i> | -0.3 | -0.6 | -1.8 | 4.9* |
| LjSGA_008659.1 | Acetyl-CoA β-carboxylase carboxyltransferase | <i>Ljβ-CT1</i> | -0.3 | -0.7 | -1.6 | 3.2* |
| CM0004.1640.r2.a | 3-ketoacyl-ACP synthase I | <i>LjKASl-like 1</i> | -0.9 | -1.2 | -1.7 | 4.0* |
| LjSGA_019091.2 | Ketoacyl-ACP reductase | <i>LjKAR</i> | -0.8 | -1.5 | -1.1 | 1.6 |
| CM0328.70.r2.d | Acyl-ACP thioesterase | <i>LjFatM</i> | -0.8 | -1.5 | -2.7 | 10.9* |
| LjSGA_037278.1 | Long-chain acyl-CoA synthetase 9 | <i>LjLACS9</i> | 0.1 | -1.3 | -2.2 | 7.0* |
| CM0091.510.r2.m | Long-chain acyl-CoA synthetase 2 | <i>LjLACS2;1</i> | 0.0 | -0.6 | -1.4 | 0.5 |
| CM1788.310.r2.m | Cytochrome P450 (CYP) 71 subfamily | | -0.9 | -1.0 | -1.7 | 7.6* |
| LjSGA_018247.1 | CYP71 | | -0.6 | -1.3 | -1.4 | 4.1* |
| CM0007.30.r2.d | CYP72 | | 0.2 | -0.3 | -1.0 | 2.4* |
| CM0797.140.r2.d | CYP72 | | 0.4 | 0.0 | -0.9 | 1.0 |
| LjT06P13.100.r2.d | CYP76 | | -0.9 | -1.6 | -1.3 | 7.8* |
| CM0378.230.r2.m | CYP76 | | -0.5 | -2.0 | -1.2 | -1.0 |
| LjSGA_046308.1 | CYP81 | | -0.3 | -1.3 | -1.4 | 4.3* |
| LjSGA_065168.2 | CYP81 / isoflavone 3'-hydroxylase | | -0.7 | -2.4 | -1.5 | 4.5* |
| LjSGA_080540.1 | CYP81 | | -0.2 | -1.6 | -1.8 | 2.5* |
| CM0451.580.r2.d | CYP88 | | -0.6 | -2.8 | -3.5 | 0.9 |
| TCONS_00048278 | CYP88 | | -0.4 | -2.2 | -2.6 | 1.4 |
| CM0314.520.r2.d | CYP93 | | -0.4 | -1.3 | -1.5 | 2.0 |
| LjT40P18.30.r2.m | CYP701 | | -0.8 | -1.6 | -1.6 | 1.0 |
| LjT40P18.40.r2.m | CYP701 / <i>ent</i> -kaurene oxidase | | -0.7 | -0.1 | -1.3 | 4.3 |
| comp1902537_c0_seq1 | CYP707 | | -0.8 | -1.5 | -2.3 | 8.6* |
| CM0318.680.r2.d | CYP712 | | -0.1 | -0.9 | -1.1 | 0.7 |

表 3.4. Continued

| | | | | | | |
|---------------------|--|----------------|------|------|------|-------|
| LjSGA_008031.1 | CYP714 | | -0.5 | -0.8 | -1.4 | 4.0* |
| LjSGA_013296.2 | CYP714 | | -0.5 | -1.0 | -1.1 | 3.2 |
| LjSGA_055194.1 | CYP716 | | -0.3 | -1.3 | -1.8 | 0.9 |
| comp1458088_c0_seq1 | CYP722 | | -0.7 | -1.2 | -2.2 | 8.6* |
| CM0131.430.r2.d | CYP722 | | -1.3 | -3.0 | -3.2 | 1.4 |
| CM0905.160.r2.d | Glycerol-3-phosphate acyl transferase | <i>LjRAM2</i> | -0.5 | -1.8 | -2.3 | 7.9* |
| LjSGA_041824.1 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] | <i>LjGPDH1</i> | -0.6 | -1.6 | -2.3 | 5.4* |
| CM0398.610.r2.a | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] | <i>LjGPDH2</i> | -0.5 | -0.9 | -1.5 | 4.0* |
| CM0042.2570.r2.d | ABCG transporter | <i>LjSTR</i> | -0.9 | -1.6 | -1.7 | 8.2* |
| CM0177.350.r2.m | ABCG transporter | <i>LjSTR2</i> | -0.9 | -1.0 | -1.5 | 7.3* |
| LjT38L02.20.r2.d | ABCG transporter | | -0.7 | -0.8 | -1.4 | 8.0* |
| LjSGA_077747.1 | ABCG transporter | | -0.7 | -1.2 | -1.6 | 3.5* |
| CM0460.270.r2.d | Lipid transfer protein | <i>LjLTP1</i> | -1.1 | -2.6 | -3.3 | 9.4* |
| CM0091.770.r2.d | Lipid transfer protein | <i>LjLTP2</i> | -2.8 | -2.9 | -3.8 | -9.8* |
| LjSGA_088091.1 | GDSL esterase/lipase | | -0.9 | -1.4 | -1.6 | 11.7* |
| comp1419844_c0_seq1 | GDSL esterase/lipase | | -0.8 | -1.2 | -1.9 | 10.2* |
| LjB12E19.100.r2.d | GDSL esterase/lipase | | -0.9 | -1.4 | -1.5 | 7.0* |
| LjSGA_107965.1 | GDSL esterase/lipase | | -0.5 | -0.8 | -2.1 | 6.7* |
| CM0013.380.r2.d | GDSL esterase/lipase | | -0.7 | -1.0 | -1.5 | 4.6* |
| LjSGA_096799.1 | GDSL esterase/lipase | | 0.1 | -0.2 | -1.6 | 2.3* |
| LjSGA_028144.1 | GDSL esterase/lipase | | -0.5 | -0.3 | -2.2 | 0.4 |

表 3.5. グループ A に含まれるトランスポーター遺伝子の発現変化.

^a0 時間に対する相対発現量 (log2) .RPKM をもとに算出. ^biDEGES/edgeR で正規化されたリードカウント数から算出 (log2) . *FDR < 0.001.

| Gene ID | Annotation | Gene name | Fold changes after high-Pi application in AM roots ^a | | | Fold change in expression in AM versus NM ^b |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------|---|------|------|--|
| | | | 6 h | 24 h | 7 d | |
| CM0416.610.r2.a | ABCB transporter | | -0.8 | -1.2 | -1.3 | 6.0* |
| CM1543.140.r2.m | ABCB transporter | | -0.5 | -0.9 | -1.5 | 5.5* |
| LjSGA_023222.1 | ABCB transporter | | -0.4 | -1.3 | -2.3 | 5.1* |
| LjSGA_014888.1 | ABCB transporter | | -0.3 | -1.2 | -1.6 | 5.0* |
| CM0042.2570.r2.d | ABCG transporter | <i>LjSTR</i> | -0.9 | -1.6 | -1.7 | 8.2* |
| CM0177.350.r2.m | ABCG transporter | <i>LjSTR2</i> | -0.9 | -1.0 | -1.5 | 7.3* |
| LjT38L02.20.r2.d | ABCG transporter | | -0.7 | -0.8 | -1.4 | 8.0* |
| LjSGA_077747.1 | ABCG transporter | | -0.7 | -1.2 | -1.6 | 3.5* |
| LjSGA_121101.1 | ABC protein | | -1.0 | -1.2 | -0.8 | 2.8 |
| LjSGA_016680.1 | Ammonium transporter | <i>LjAMT2;2</i> | -0.5 | -0.8 | -1.9 | 11.1* |
| LjB06H14.30.r2.m | Ammonium transporter | | -0.7 | -1.2 | -1.5 | 0.1 |
| CM0046.1610.r2.m | Aquaporin | <i>LjNIP1</i> | -1.0 | -2.1 | -2.8 | 9.9* |
| LjSGA_141991.1 | Aquaporin | <i>LjXIP1</i> | -0.6 | -1.9 | -2.6 | 7.3* |
| LjT04I16.80.r2.d | Cationic amino acid transporter | | -0.5 | -1.1 | -1.9 | 9.5* |
| CM0435.1060.r2.a | Cyclic nucleotide-gated ion channel | | -1.0 | -0.5 | -1.5 | 4.8* |
| LjSGA_014542.1 | Cyclic nucleotide-gated ion channel | | -0.9 | -0.8 | -1.3 | 3.5* |
| LjSGA_023995.1 | H ⁺ -ATPase | <i>LjHA1</i> | -0.6 | -0.7 | -2.0 | 11.7* |
| CM0410.470.r2.m | H ⁺ -ATPase | | -0.8 | -0.6 | -0.9 | 0.0 |
| TCONS_00013182 | LHT-type amino acid transporter | | -0.7 | -1.5 | -1.2 | 9.2* |
| LjSGA_057161.1 | MATE transporter | | -0.7 | -1.0 | -1.2 | 2.1 |
| CM0055.40.r2.m | Metal transporter | | -1.6 | -0.9 | -1.9 | 8.4* |
| CM0249.1160.r2.d | Metal transporter | | -1.1 | -1.3 | -1.0 | 5.1* |
| CM0050.420.r2.d | Nucleobase-ascorbate transporter | | -1.2 | -1.8 | -1.8 | 0.8 |
| CM0617.810.r2.d | Oligopeptide transporter | | 0.2 | -0.9 | -2.4 | 8.7* |
| CM0118.580.r2.m | Oligopeptide transporter | | -0.5 | -1.2 | -2.1 | 8.3* |
| CM0021.2200.r2.m | Oligopeptide transporter | | -1.0 | -1.6 | -2.1 | 5.7* |
| CM0170.290.r2.m | Oligopeptide transporter | | -1.4 | -1.3 | -1.5 | 4.1* |
| LjT15I01.230.r2.d | Oligopeptide transporter | | -0.4 | -0.4 | -0.3 | 2.2 |

表 3.5. Continued

| | | | | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|------|------|------|-------|
| CM2121.10.r2.a | Phosphate transporter | <i>LjPT4</i> | -0.5 | -2.0 | -2.6 | 10.0* |
| LjSGA_027372.1.1 | Sugar transporter SWEET | | -2.5 | -1.4 | -2.4 | 5.2* |
| LjSGA_011755.1 | Sulfate transporter | <i>LjSultr1;2</i> | -0.7 | -1.1 | -1.7 | 5.3* |
| CM0803.290.r2.m | Urea transporter | | -1.0 | -1.2 | -1.8 | 3.8* |
| CM0337.590.r2.m | Vacuolar iron transporter homolog | <i>LjSen1</i> | 0.2 | -0.6 | -2.5 | 7.4* |
| CM0081.800.r2.a | Zinc transporter | | -0.5 | -1.2 | -1.8 | 5.1* |

表 3.6. グループ A に含まれるフラボノイドおよびカロテノイド生合成、代謝に関わる遺伝子の発現変動.

^a0 時間に対する相対発現量 (log2) .RPKM をもとに算出. ^biDEGES/edgeR で正規化されたリードカウント数から算出 (log2) .

*FDR < 0.001.

| Gene ID | Annotation | Gene name | Fold changes after high-Pi | | | Fold change in |
|---|---|------------|--------------------------------------|------|------|------------------------|
| | | | application in AM roots ^a | | | expression in AM |
| | | | 6 h | 24 h | 7 d | versus NM ^b |
| Methylerythritol 4-phosphate and carotenoid pathway | | | | | | |
| LjSGA_147689.1 | 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) | | -1.1 | -1.4 | -1.7 | 2.6* |
| CM0323.550.r2.d | Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGDS) | | -0.3 | -2.2 | -2.0 | -0.1 |
| LjSGA_059008.1.1 | Phytoene synthase (PSY) | | -1.2 | -1.7 | -2.0 | 3.7* |
| CM1323.130.r2.m | zeta-carotene desaturase (ZDS) | | -0.8 | -1.1 | -1.2 | 0.9 |
| Gibberellin biosynthesis | | | | | | |
| LjT40P18.40.r2.m | ent-kaurene oxidase | | -0.7 | -0.1 | -1.3 | 4.3 |
| LjSGA_024348.1 | Gibberellin 3-oxidase | LjGA3ox-1 | -0.2 | -0.9 | -1.2 | -0.4 |
| CM0200.220.r2.m | Gibberellin 20-oxidase | LjGA20ox-1 | -0.4 | -1.0 | -1.0 | 3.9* |
| LjSGA_113869.1 | Gibberellin 2-oxidase | LjGA2ox-1 | -1.6 | -1.5 | -1.8 | 6.1* |
| CM0088.930.r2.m | Gibberellin 2-oxidase | LjGA2ox-2 | -0.1 | -1.3 | -1.8 | 6.4* |
| CM0113.1050.r2.d | | | -0.4 | -1.1 | -1.3 | 4.4* |
| Strigolactone and mycoraddicin biosynthesis | | | | | | |
| CM0375.30.r2.m | D27 | | -0.9 | -1.2 | -1.7 | 1.9* |
| LjSGA_131670.1 | CCD7 | | -0.6 | -1.5 | -2.0 | 2.3 |
| LjSGA_049641.1 | CCD1 | | -0.4 | -0.9 | -1.2 | 2.9* |
| ABA biosynthesis | | | | | | |
| LjSGA_061479.1 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) | | -0.1 | -0.7 | -1.6 | 2.6 |
| Flavonoid biosynthesis | | | | | | |
| LjSGA_030709.1 | 4-coumarate:CoA ligase | Lj4CL1 | -1.1 | -1.8 | -2.2 | 9.8* |
| CM0018.1150.r2.m | Chalcone synthase | LjCHS14 | -0.9 | -1.1 | -0.9 | 2.4* |
| CM0180.680.r2.m | Chalcone isomerase | LjCHI4 | -1.5 | -2.8 | -2.2 | 3.6* |
| LjSGA_065168.2 | Isoflavone 3'-hydroxylase | | -0.7 | -2.4 | -1.5 | 4.5* |
| CM0387.340.r2.d | Isoflavonoid glucosyltransferase | | -1.5 | -2.1 | -1.8 | 5.8* |
| CM0387.390.r2.d | Isoflavonoid glucosyltransferase | | -0.5 | -1.8 | -2.0 | 6.1* |

表 3.7. リン酸添加による転写因子遺伝子の発現変化.

^a0 時間に対する相対発現量 (log2) .RPKM をもとに算出. ^biDEGES/edgeR で正規化されたリードカウント数から算出 (log2) .

*FDR < 0.001.

| Gene ID | Annotation | Gene name | Fold changes after high-Pi application in AM roots ^a | | | Expression pattern (FDR < 0.001) | Fold change in expression in AM versus NM ^b |
|--------------------|------------|-----------------|---|------|------|--|---|
| | | | 6 h | 24 h | 7 d | | |
| comp391100_c0_seq1 | AP2/ERF | <i>LjERM1</i> | -0.6 | -0.9 | -2.2 | Group A | 5.1* |
| CM0608.1100.r2.m | AP2/ERF | <i>LjERM2</i> | -0.4 | -1.3 | -2.9 | Group A | 8.4* |
| CM0081.1990.r2.m | AP2/ERF | <i>LjERM3</i> | -0.6 | -0.9 | -2.6 | Group A | 8.3* |
| CM0905.90.r2.d | AP2/ERF | | -0.8 | -0.6 | -1.8 | Group A | 0.2 |
| CM0118.1050.r2.a | AP2/ERF | | -0.5 | -1.0 | -1.1 | Group A | 4.0* |
| CM0075.50.r2.m | AP2/ERF | | -1.0 | -1.1 | -1.0 | Group A | 6.2* |
| CM0126.2330.r2.a | AP2/ERF | | -2.1 | -1.3 | -1.8 | Group A | 0.9 |
| CM0029.1590.r2.a | ARF | | -0.5 | -0.9 | -2.0 | Group A | 6.8* |
| CM0314.840.r2.d | bZIP | | -1.2 | -1.1 | -1.3 | Group A | 0.8 |
| LjSGA_032180.1 | C2H2 | | -0.5 | -1.1 | -2.0 | Group A | 6.6* |
| CM2079.250.r2.m | C2H2 | | -1.6 | -1.0 | -2.5 | Group A | 0.3 |
| CM0087.940.r2.d | C2H2 | | -0.9 | -0.9 | -1.5 | Group A | 1.5 |
| LjB18K24.100.r2.a | G2-like | | -1.3 | -1.5 | -1.6 | Group A | 7.1* |
| CM0698.550.r2.m | G2-like | | -0.2 | -0.6 | -1.7 | Group A | 5.1* |
| CM1852.30.r2.m | GRAS | <i>LjRAM1</i> | -0.6 | -1.6 | -1.6 | Group A | 10.9* |
| CM1864.540.r2.m | GRAS | <i>LjRAD1</i> | -0.9 | -2.4 | -2.5 | Group A | 1.3 |
| CM2163.230.r2.m | GRAS | <i>LjSCL3-2</i> | -0.8 | -1.9 | -2.9 | Group A | 9.7* |
| CM2163.240.r2.m | GRAS | <i>LjSCL3-1</i> | -0.9 | -1.3 | -2.2 | Group A | 7.3* |
| CM0127.880.r2.m | GRAS | | -0.7 | -1.1 | -1.8 | Group A | 5.5* |
| CM0239.240.r2.m | GRAS | | -0.7 | -0.8 | -1.7 | Group A | 6.6* |
| LjB18K24.70.r2.a | MYB | <i>LjMAMI</i> | -1.1 | -1.9 | -2.5 | Group A | 10.7* |
| CM0012.840.r2.m | NAC | | -0.8 | -1.2 | -2.6 | Group A | 5.9* |
| CM0111.130.r2.d | NAC | | -1.1 | -1.5 | -2.3 | Group A | 5.7* |
| LjSGA_036303.1 | NAC | | -0.8 | -1.8 | -1.8 | Group A | -2.0 |
| LjT41F16.60.r2.d | WRKY | | -0.6 | 0.1 | -2.0 | Group A | 2.6* |
| CM0004.1290.r2.m | WRKY | | -1.3 | -0.5 | -1.3 | Group A | 2.2 |
| CM0070.320.r2.m | bHLH | | -0.3 | -0.7 | -0.3 | Group B | -0.6 |

表 3.7. Continued

| | | | | | | | |
|-------------------|-------------|---------------|------|------|------|---------|-------|
| LjSGA_105845.1 | bHLH | | -2.4 | -1.1 | -0.7 | Group B | -0.9 |
| CM0147.640.r2.d | bHLH | | -0.4 | -0.4 | 0.0 | Group B | -0.1 |
| LjSGA_045015.1 | GRAS | | 0.6 | -1.1 | -0.9 | Group B | 3.3* |
| CM0118.530.r2.m | LSD | | 2.0 | 0.0 | 0.0 | Group B | -1.8 |
| CM1835.10.r2.m | NAC | | 1.7 | -0.2 | -0.6 | Group B | 0.4 |
| CM0909.290.r2.m | AP2/ERF | | 0.6 | 0.6 | -0.3 | Group C | -1.1 |
| LjSGA_147935.1 | AP2/ERF | | 0.3 | 1.7 | -1.5 | Group C | 0.3 |
| CM0200.2550.r2.m | bHLH | | 0.9 | 1.2 | -0.6 | Group C | -3.4 |
| LjSGA_036476.1 | bHLH | | 0.0 | 0.5 | 0.0 | Group C | -2.8 |
| CM0096.490.r2.m | C2H2 | | -0.1 | 0.3 | -1.1 | Group C | -0.6 |
| CM0002.160.r2.m | C3H | | -0.3 | 0.3 | -1.0 | Group C | 0.1 |
| CM1285.320.r2.d | C3H | | 0.7 | 1.2 | 0.0 | Group C | 0.2 |
| TCONS_00033315 | G2-like | | 0.9 | 1.0 | 0.7 | Group C | 5.0* |
| LjT16G06.130.r2.d | G2-like | | 0.6 | 1.6 | 0.8 | Group C | -0.1 |
| CM0619.20.r2.d | GRAS | | -0.3 | 0.7 | -0.5 | Group C | 1.3 |
| LjT05B18.50.r2.d | HD-ZIP | | -0.7 | 0.5 | -0.4 | Group C | -1.3 |
| CM0244.980.r2.m | HD-ZIP | | -0.7 | 1.2 | 0.1 | Group C | -0.4 |
| CM0021.630.r2.m | LSD | | 0.8 | 0.9 | -0.3 | Group C | 0.5 |
| comp13127_c0_seq1 | MYB | | 1.6 | 2.6 | 0.2 | Group C | -3.3* |
| TCONS_00002102 | MYB | | 0.3 | 1.0 | 0.3 | Group C | -0.2 |
| CM0133.340.r2.m | MYB_related | | -0.8 | -0.2 | -1.8 | Group C | 1.3 |
| LjT06B21.210.r2.d | NAC | | 0.6 | 1.4 | -0.8 | Group C | -0.1 |
| CM0460.20.r2.d | NAC | | 0.7 | 0.9 | -0.8 | Group C | 2.2 |
| CM0042.2540.r2.d | NF-X1 | | 0.1 | 2.6 | 1.8 | Group C | -1.2 |
| CM0282.920.r2.m | SBP | | 1.2 | 2.2 | 1.4 | Group C | 2.5 |
| CM0466.100.r2.d | Trihelix | | 0.3 | 0.2 | -0.9 | Group C | 1.4 |
| CM0378.200.r2.a | Trihelix | | 0.7 | 0.9 | -0.7 | Group C | 5.3* |
| LjSGA_046833.1 | WRKY | | -0.6 | 0.6 | -1.1 | Group C | 1.0 |
| CM0032.170.r2.d | WRKY | | -0.8 | 0.8 | 0.3 | Group C | 2.2 |
| CM0243.470.r2.m | WRKY | | 1.1 | 1.7 | 0.9 | Group C | 1.6 |
| comp13156_c0_seq1 | WRKY | | -0.3 | -0.6 | -0.4 | Group C | 2.3 |
| LjSGA_012098.1 | AP2/ERF | <i>LjWRI3</i> | -1.6 | -1.5 | -1.2 | Group D | 3.9* |
| CM0041.30.r2.a | AP2/ERF | <i>LjWRI4</i> | -1.9 | -1.1 | -1.1 | Group D | 7.4* |

表 3.7. Continued

| | | | | | | | |
|-------------------|-------------|---------------|------|------|------|---------|-------|
| CM0104.2670.r2.m | AP2/ERF | <i>LjERN1</i> | -1.1 | -1.7 | -0.3 | Group D | 0.4 |
| comp13274_c0_seq1 | AP2/ERF | | -0.1 | -1.6 | -0.6 | Group D | 1.0 |
| CM0105.1010.r2.m | AP2/ERF | | -1.1 | -1.3 | 0.4 | Group D | -3.1* |
| CM0227.40.r2.d | AP2/ERF | | -2.6 | -2.2 | -1.1 | Group D | 2.9 |
| CM1616.250.r2.d | bHLH | | -0.9 | -1.4 | -1.1 | Group D | 0.3 |
| CM0328.960.r2.d | C2H2 | | -0.5 | -1.5 | 0.1 | Group D | -1.8 |
| LjSGA_078086.1 | C3H | | -0.7 | -1.7 | -0.5 | Group D | -2.1 |
| CM0004.2380.r2.d | C3H | | -1.2 | -2.2 | 0.3 | Group D | -1.6 |
| LjSGA_027183.1 | Dof | | -1.2 | -1.1 | -0.7 | Group D | 0.3 |
| CM0644.100.r2.d | GATA | | -0.7 | -0.9 | -0.3 | Group D | 1.3 |
| CM1976.90.r2.m | GRAS | <i>LjNSP2</i> | -0.5 | -1.5 | -0.3 | Group D | -4.5* |
| LjSGA_085595.1 | GRAS | | -0.7 | -1.6 | -0.4 | Group D | -1.0 |
| CM0021.180.r2.m | HD-ZIP | | -0.5 | -0.9 | 0.1 | Group D | -0.3 |
| CM0200.2670.r2.d | LBD | | -0.6 | -1.6 | 0.3 | Group D | -1.0 |
| TCONS_00114768 | NF-YC | <i>LjCbf1</i> | -1.2 | -1.9 | -1.2 | Group D | 5.9* |
| CM0282.500.r2.a | TCP | | -0.8 | -0.8 | 0.1 | Group D | 2.5* |
| CM1729.40.r2.a | TCP | | -1.2 | -1.4 | -0.1 | Group D | -1.2 |
| CM0046.1360.r2.d | WRKY | | -0.8 | -0.9 | 0.0 | Group D | -0.7 |
| CM0307.180.r2.m | AP2/ERF | | 0.2 | 0.1 | 1.2 | Group E | -1.6 |
| CM0021.1480.r2.a | AP2/ERF | | -1.5 | -1.4 | 0.2 | Group E | -0.5 |
| CM0318.640.r2.d | bHLH | | -0.2 | 0.1 | 0.5 | Group E | 0.3 |
| CM0040.410.r2.m | CO-like | | -0.4 | -0.4 | 1.0 | Group E | -1.2 |
| LjSGA_015804.1 | CO-like | | -0.3 | -0.3 | 1.4 | Group E | 1.8 |
| CM0087.1770.r2.m | Dof | | -0.4 | -0.3 | 0.3 | Group E | -1.8 |
| CM0160.640.r2.d | G2-like | | -0.7 | 0.0 | 1.0 | Group E | 0.0 |
| CM0088.550.r2.d | LBD | | -0.3 | 0.2 | 1.2 | Group E | 0.2 |
| LjSGA_021740.1 | LSD | | -0.9 | -0.8 | 0.6 | Group E | -1.2 |
| CM0096.100.r2.m | MYB | | -0.8 | -1.1 | 0.6 | Group E | -3.2* |
| comp12809_c0_seq1 | MYB | | -0.9 | 0.1 | 0.1 | Group E | 0.3 |
| comp31955_c0_seq1 | MYB | | 0.0 | 0.1 | 0.0 | Group E | 0.8 |
| CM0269.1200.r2.a | MYB_related | | -1.3 | -0.6 | 0.1 | Group E | 0.4 |
| CM0087.290.r2.d | NAC | | -0.6 | -0.5 | 0.5 | Group E | 1.2 |
| LjSGA_040439.1 | NAC | | 0.0 | 0.0 | 1.0 | Group E | 1.7 |

考察

リン酸を短時間添加した菌根を用いたアーバスキュラー菌根共生遺伝子の網羅的抽出

植物と AM 菌の間の養分交換の場となる樹枝状体がどのように形成されるか、その分子メカニズムを明らかにすることは重要である。最近、イネの菌根に高濃度のリン酸を与えると短時間のうちに成熟した樹枝状体の密度が低下し、その原因が樹枝状体の新規形成の抑制であることが報告されている (Kobae et al., 2016)。本研究のミヤコグサ菌根の解析でも、高濃度リン酸の添加によって短時間のうちに樹枝状体の密度が減少することが明らかとなった。イネと同様にミヤコグサ菌根においても、高濃度リン酸によって新規の樹枝状体形成が短時間で抑制されたのかもしれない。本研究の目的は、この菌根抑制系を用いて、菌根形成、特に樹枝状体形成に関わる候補遺伝子のセットを網羅的に抽出することであった。高濃度リン酸添加によって徐々に発現低下するグループ A 遺伝子は、AM 菌感染によって発現上昇する遺伝子と高いオーバーラップを示し、そこには菌根形成や機能発現に必要な既知の遺伝子が含まれていた。このことから、グループ A には菌根形成、特に樹枝状体形成に関わる遺伝子セットが濃縮されていると考えられる。グループ A に分類された遺伝子を見てみると、脂肪酸・クチン/スベリン生合成、転写因子、トランスポーター、二次代謝やイソフラボノイド合成遺伝子に関与する遺伝子が含まれていた。特に、本研究では、脂肪酸・クチン/スベリン生合成遺伝子と転写因子に注目した。

グループ A に分類された脂肪酸・クチン/スベリン生合成遺伝子の発現部位は樹枝状体を含む皮層細胞であった。もしかすると、この皮層細胞ではクチン/ス

ベリンに類似した脂肪酸誘導体「クチン/スベリン様物質」の合成が活性化し、この物質が樹枝状体の形成や維持に関わっているのかもしれない。リピドーム解析では、リン酸添加で大きく含量が変化する脂肪酸として 16:0-HFA が抽出された。この脂肪酸は *Ljram2* 変異体でも低い含量であった。16:0-HFA はクチンの主成分のひとつであり、16:0-HFA はクチン/スベリン様物質の候補となる可能性がある。AM 菌は新規脂肪酸合成を行う細胞質型の脂肪酸合成酵素遺伝子 (FAS) をゲノムに持っておらず、AM 菌自身でパルミチン酸などの脂肪酸を合成することはできないと考えられている (Trépanier et al., 2005; Wewer et al., 2014; Tang et al., 2016)。ミトコンドリア型の FAS 遺伝子が脂肪酸合成に関与するという報告もあるが (Vijayakumar et al., 2015)、ミトコンドリア型 FAS はリポ酸の合成を触媒し、パルミチン酸等の脂肪酸が合成されたとしても微量だと考えられる (Wewer et al., 2014)。これら知見を合わせて考えると、植物は樹枝状体を含む皮層細胞で「クチン/スベリン様物質」を合成・分泌し、それを AM 菌が栄養として利用しているのかもしれない (図 3.13)。

グループ A には 26 個の転写因子がリストアップされ、そのうち AP2/ERF 転写因子 *LjERMI*, *LjERM2*, *LjERM3* 遺伝子は、樹枝状体で強く発現していた。*LjERM* 遺伝子の発現を RNAi で抑制したところ、樹枝状体のファインブランチの発達が著しく阻害されたことから、*LjERM* は樹枝状体形成に必要な転写因子であることが明らかとなった。*LjERM* RNAi 系統では、*LjKASI-like 1*, *LjLACS9*, *LjGPDH1*, *LjGPDH2* 遺伝子の発現が非感染根のレベルにまで低下していたことから、*LjERM* は脂肪酸代謝遺伝子の発現を制御し樹枝状体の形成に関与していると考えられる。

クチン/スベリン様物質の生合成

クチン/スベリン生合成に関わる遺伝子の発現が、高濃度リン酸を添加してから短時間で抑制された。一般に、クチンは植物のクチクラ層の原料となる脂肪酸の一種であり、その合成は主に葉や茎、生殖器官の表皮細胞で行われる (Beisson et al., 2012; Li-Beisson et al., 2013; Yeats and Rose, 2013; Borisjuk et al., 2014)。また、スベリンは根の内皮細胞の細胞壁に沈着するカスパリ一線の原料である。ところが、今回抽出した遺伝子は樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現していた。抽出された遺伝子は典型的なクチンやスベリン合成遺伝子とは系統的に離れており、しかも *FatM* や *RAM2* などのように菌根性植物に特化した遺伝子も含まれることから、これらの遺伝子は典型的なクチンやスベリン合成ではなく、アーバスキュラー菌根共生の形成に必要な「クチン/スベリン様物質」の合成に関与していると考えられる (図 3.13)。

グループ A には GPAT をコードする *LjRAM2* 遺伝子が含まれている一方で、GPAT の下流で機能しリン脂質合成経路に関わる 1-アシルグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (*LPAAT*) 遺伝子は発現変動しなかった。これに対応するように、リピドーム解析では、高濃度リン酸添加でリン脂質含量の大幅な変化は見られなかった。高濃度リン酸を与えてから短時間のうちでは、膜の合成が抑制されるというよりは、むしろクチン/スベリン様物質といった脂肪酸誘導体の合成が抑制されることが考えられる。

3-ケトアシル ACP 合成酵素 III (KASIII) はアセチル-ACP とマロニル-ACP を結合させる反応を触媒し、KASI は C6:0 から C16:0-ACP までの脂肪酸を合成する脂肪酸伸長反応、KASII は C16:0 から C18:0 への脂肪酸伸長に関わる (Shimakata et al., 1982; Jackowski and Rock, 1987; Clough et al., 1992; Wu and Xue, 2010)。本研

究でグループ A 遺伝子として同定されたミヤコグサの *LjKASI-like 1* 遺伝子は典型的な KASI とは系統的に少し離れたクレードに属し、菌根誘導性の KASI として分化したのかもしれない。

植物のプラスチドで合成される脂肪酸は、プラスチド内のグリセロ脂質を生産するために使われるか、小胞体に輸送されて様々な種類の脂質の生産に使われる。アシル ACP チオエステラーゼ (Fat) は C16-ACP や C18-ACP を遊離脂肪酸と ACP に分解し、なおかつプラスチドから細胞質へ遊離脂肪酸を輸送するタンパク質である (Voelker, 1996)。Fat は主に FatA と FatB の 2 種類に分けられ、FatA は C18:0-ACP や C18:1-ACP に対する基質特異性が高く、FatB は C16:0-ACP に対する基質特異性が高い (Salas and Ohlrogge, 2002; Bonaventure et al., 2003)。シロイヌナズナは、FatA を 2 遺伝子、FatB を 1 遺伝子持っている。本研究でグループ A 遺伝子として同定されたミヤコグサの *LjFatM* 遺伝子は、FatA や FatB とは異なるクレードを形成し、菌根性植物に保存された遺伝子であった。*LjFatM* 遺伝子が菌根特異的に発現する遺伝子であることはこれまでも報告されているが (Wewer et al., 2014; Handa et al., 2015)、本研究から *LjFatM* は樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現する遺伝子であることが明らかとなった。最近になって、タルウマゴヤシにおけるオルソログである *MtFatM* 遺伝子は樹枝状体の形成に関与することが示された (Gomez et al., 2009; Bravo et al., 2016)。LjFatM のホモログであるソルガムの Sobic.006G259300.1 は、C14:0, C16:0, C16:1 を基質としていることが生化学的に示されており (Jing et al., 2011)、菌根でもそれらの脂肪酸が LjFatM によって利用されているのかもしれない。

LACS は遊離脂肪酸を代謝可能なアシル CoA に変換する酵素である。シロイヌナズナでは、*LACSI* から *LACS9* までの 9 遺伝子が同定されており (Shockey et al., 2002)、*LACSI* と *LACS2* はクチクラ合成に関わる一方で (Schnurr et al., 2004;

Bessire et al., 2007; Lü et al., 2009; Weng et al., 2010)、*LACS6* と *LACS7* は脂肪酸の β 酸化に関わると報告されている (Fulda et al., 2002)。LACS の系統解析に基づきグループ A で抽出されたミヤコグサ遺伝子を *LjLACS2;1* 遺伝子と *LjLACS9* 遺伝子と命名した。今回の解析では、*LjLACS9* 遺伝子が AM 菌感染で強く発現誘導された。これまでの報告で、シロイヌナズナの *LACS9* タンパク質はプラスチドに局在し、なおかつ *in vitro* クロロプラストアッセイでは脂肪酸の輸送や脂肪酸と ACP の結合反応に関与すると報告されている (Schnurr et al., 2002)。ところが、*Atlacs9* 変異体には個体成長をはじめとして特別な異常は見られず (Schnurr et al., 2002; Zhao et al., 2010)、*LACS9* の詳細な機能については分かっていない。今後、ミヤコグサ *LACS9* の組織および細胞内局在の解析や *Ljlacs9* 変異体を用いた機能解析を行い、*LjLACS9* と菌根形成との関係性を明らかにしていく必要がある。

RAM2 はグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼをコードし、タルウマゴヤシの *ram2* 変異体では菌足や樹枝状体形成が強く阻害される (Wang et al., 2012)。*ram2* 変異体に炭素 16 個の脂肪酸単量体を添加すると根表面に付着する菌足の形成率が野生型並みまで回復し、クチンが AM 菌に対するシグナル分子としてはたらき、その合成に *RAM2* 遺伝子に関与すると考えられていた (Wang et al., 2012; Murray et al., 2013; Schmitz and Harrison, 2014; Bonfante and Genre, 2015)。しかし、本研究の結果では *RAM2* 遺伝子は樹枝状体を含む皮層細胞で特異的に発現しており樹枝状体のファインブランチの形成に関与していることから、*RAM2* はシグナル分子の生成だけでなく、クチン/スベリン様物質の生合成に関与し樹枝状体形成の制御に関わっている可能性がある。

菌根菌感染で発現が誘導される AP2/ERF 転写因子 *LjERM*

AP2/ERF 転写因子である *LjERM1*, *LjERM2*, *LjERM3* 遺伝子は樹枝状体の形成に必要な遺伝子であることが明らかとなった。これらの遺伝子はシロイヌナズナの *WRINKLED1* (*WRI1*), *WRI3*, *WRI4* 遺伝子との姉妹群に属し、菌根植物に保存されたクレードを形成していた。*WRI1*, *WRI3*, *WRI4* は脂肪酸合成遺伝子の発現制御に関わる AP2/ERF 転写因子として同定されている (Cernac and Benning, 2004; Maeo et al., 2009; To et al., 2012)。*WRI1* は AW-box シスエレメントに結合し、脂肪酸合成に関わる *AtBCCP2* や *AtKASI* 遺伝子の発現を誘導する (Maeo et al., 2009)。シロイヌナズナの *Atwri1* 変異体では、種子のトリアシルグリセロール含量が低下していた (Cernac and Benning, 2004)。一方、*Atwri3* および *Atwri4* 変異体では特に異常は見られないものの、*wri1wri3wri4* 三重変異体ではトリアシルグリセロール含量の低下に加えて、クチン単量体である 10,16-ジヒドロキシパルミチン酸の含量が低下した (To et al., 2012)。

LjERM1 遺伝子のホモログであるタルウマゴヤシ *MtERF* 遺伝子をマイクロ RNA によって発現抑制させると、樹枝状体の形成に異常が生じ (Devers et al., 2013)、本研究で得られた結果と一致する。ただし、Devers らの報告では *MtERF* 遺伝子の 1 遺伝子のみをターゲットとしており、しかも *MtERF* 遺伝子の樹枝状体形成に対する具体的な機能については解析していない。本研究では、RNAi で *LjERM1-3* の発現を抑制すると脂肪酸やグリセロールの代謝に関わる *LjKASI-like 1*, *LjLACS9*, *LjGPDH1*, *LjGPDH2* 遺伝子の発現が非感染根と同等のレベルにまで低下することを明らかにした。*LjERM1-3* がこれらの脂肪酸関連遺伝子の発現を制御している可能性がある。ただし、*LjERM* RNAi 系統では菌根菌感染率が低いために、結果として脂肪酸関連遺伝子の発現が低下した可能性も考えられる。

今後、*LjERM* が菌根形成に果たすはたらきを明らかにするために、例えば *LjERM* を過剰発現させることで発現誘導される遺伝子を抽出したり、ChIP-seq 法で *LjERM* 転写因子が結合する因子を抽出したりすることが必要である。

プラスチドにおける二次代謝

非メバロン酸経路の初期遺伝子である *DXS* 遺伝子、ストリゴラクトンやミコラディシンの合成に関わる *D27* や *CCD1* 遺伝子、ジベレリン合成遺伝子である *GA_{20ox}*, *GA_{2ox}* 遺伝子など、非メバロン酸経路やカロテノイド経路に関わる遺伝子が高濃度リン酸添加で発現低下するグループ A として抽出された。これまでも、菌根形成時に非メバロン酸経路やカロテノイド経路が活性化することが知られており、*DXS* 遺伝子を抑制させると樹枝状体が未成熟うちに崩壊することや (Floss et al., 2008a)、ミコラディシンの合成に関わる *CCD1* 遺伝子も菌根形成に関わることが報告されている (Floss et al., 2008b)。ジベレリンが AM 菌感染に作用することは菌根研究の初期のころから指摘されているほか、最近では、ジベレリンのシグナル伝達経路を介して CCaMK-CYCLOPS-DELLA 複合体が菌根形成に中心的な役割を果たしていることが分かってきた (Floss et al., 2013; Takeda et al., 2015; Pimprikar et al., 2016)。これらのことから、プラスチドにおける非メバロン酸経路やカロテノイド経路が菌根形成において重要な役割を果たしていると考えられる。

グループ A には、フェニルプロパノイド経路やフラボノイド／イソフラボノイド生合成に関わる遺伝子もリストアップされていた。植物根で合成されるフラボノイド類は、根粒共生の成立に重要な役割を果たすことが古くから知られている (Dénarié et al., 1996)。AM 共生では、フェニルアラニンアンモニアリア

ーゼ遺伝子や *CHS* 遺伝子が菌根で強く発現するほか (Harrison and Dixon, 1994)、特定のフラボノイド／イソフラボノイド類がタルウマゴヤシ菌根で蓄積することが知られている (Schliemann et al., 2008)。AM 共生の発達にもフラボノイド類が関与している可能性があり、グループ A に分類されたフェニルプロパノイド経路やフラボノイド／イソフラボノイド生合成遺伝子の機能解析によって、菌根共生におけるフラボノイド類の役割を明らかにできるかもしれない。

グループ A には、プラスチド内膜へのタンパク質輸送に関わる TIC 複合体をコードする *LjTIC32;1* 遺伝子も含まれていた。TIC32 は、TIC 複合体を構成するサブユニットのひとつであり、NADP(H) 結合部位を有し $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 比に応じて TIC 複合体の活性を制御している (Hormann et al., 2004; Chigri et al., 2005)。菌根形成時にはプラスチドタンパク質をコードする多くの遺伝子が発現するが、TIC32 はそれらタンパク質のプラスチド内への輸送に関係しているかもしれない。樹枝状体の形成時には、プラスチドの形態にも変化が生じ、細長い形状のストロミュールとなる (Lohse et al., 2006; Fester et al., 2007)。プラスチドの形態が変化する理由は分かっていないが、樹枝状体の形成にはプラスチドが重要な役割を果たしている可能性がある。菌根共生における *LjTIC32;1* の機能を解析することで、プラスチドと樹枝状体形成の関係が明らかになるかもしれない。

第4章 菌根抑制系を用いた菌根菌の共生関連遺伝子の抽出

緒言

植物と AM 菌の共生は 2 者間の遺伝子レベルでの協調によって成立する。さらにその発達過程は外部環境の影響を強く受け、特に土壌中のリン濃度は菌根形成や共生機能に対して重要な環境因子となっている (Gu et al., 2011; Carbonnel and Gutjahr, 2014)。低濃度リン酸条件では菌根形成が促進され、植物は主に菌根経路を介してリンを吸収することができる。一方、土壌中のリン酸レベルが上昇するにつれて、AM 菌感染率が低下することが古くから知られている (Baylis, 1967; Mosse, 1973; Breuillin et al., 2010; Balzergue et al., 2011; Gu et al., 2011; Carbonnel and Gutjahr, 2014; Kobae et al., 2016)。リン酸レベルに対応して、植物の遺伝子発現は大きく変化しており (第3章)、それと同時に AM 菌の遺伝子発現も大きく変化していると考えられる。

高濃度リン酸による菌根抑制は、菌根形成の初期と後期の両方で見られる (Baylis, 1967; Mosse, 1973; Breuillin et al., 2010; Balzergue et al., 2011; Gu et al., 2011; Carbonnel and Gutjahr, 2014; Kobae et al., 2016)。菌根形成の初期の反応としては、エンドウの菌根が高濃度リン酸に曝されると菌足の形成率が顕著に減少する (Balzergue et al., 2011)。一方、後期の反応としては、高濃度リン酸添加によって菌根内での菌糸伸長の停止や樹枝状体の分枝の顕著な低下が認められる (Branscheid et al., 2010; Breuillin et al., 2010)。また、低濃度リン条件で既に発達した菌根であっても、一旦高濃度リン酸が与えられると菌根形成率は低下する (Kobae et al., 2016)。この菌根抑制は短時間のうちに起こり、すでに発達してい

る菌構造が崩壊するのではなく、新規の菌糸伸長や樹枝状体形成が抑制されることで起こる (Kobae et al., 2016)。さらに、この高濃度リン酸による菌根抑制の一部の機構は地上部を介した制御 (システミック) によって起こることが、根分け実験によって示されている (Balzergue et al., 2010; Breuillin et al., 2010)。システミックな反応に関わる候補因子として菌根形成時に発現するマイクロ RNA miR399 があげられる (Branscheid et al., 2010; Gu et al., 2014)。miR399 のターゲットである PHO2 (リン酸欠乏応答に必要なユビキチン結合酵素をコード) (Liu et al., 2012) が、菌根形成時に低発現であることから、リン酸欠乏状態に保つことで AM 菌の感染を許容していると考えられている (Branscheid et al., 2010)。しかし、miR399 を過剰発現させても高濃度リン酸による菌根抑制が回復しないことから、他の制御機構もあると推測されている (Branscheid et al., 2010)。高濃度リン酸のシグナルが菌根形成機構のどこに作用するかについてはほとんど分かっていない。ただし、高濃度リン酸は Ca^{2+} スパイクの発生には影響しないことから、コモン SYM シグナル伝達経路よりも下流もしくは平行するシグナル伝達経路に影響していると考えられている (Balzergue et al., 2013)。その候補のひとつが、植物ホルモンに関わる菌根形成機構である。高濃度リン酸を添加すると植物のカロテノイド合成系やストリゴラクトン合成系の遺伝子発現が低下することから、AM 菌感染の抑制とストリゴラクトンの間に関係性があると指摘されている (Balzergue et al., 2010; Breuillin et al., 2010)。しかし、高濃度リン酸条件でストリゴラクトンを添加しても完全には感染が回復しなかったことから、ストリゴラクトン以外の関与も考えられている (Balzergue et al., 2010; Breuillin et al., 2010)。ジベレリン/DELLA はコモン SYM シグナル伝達経路の下流で機能し、樹枝状体形成に関係するシグナル伝達経路である (Floss et al., 2013; Foo et al., 2013; Yu et al., 2014; Pimprikar et al., 2016)。この経路が高濃度リン酸による菌根

抑制の作用点である可能性もある。

これまでの高濃度リン酸による菌根抑制の報告では、植物による制御や植物側の反応についての研究がほとんどであった。現在のところ、菌根形成抑制時の AM 菌側の分子・遺伝子レベルの反応についてはほとんど分かっていない。高濃度リン酸添加による菌根抑制に伴って、植物の共生関連遺伝子の発現低下がみられることから（第 3 章）、AM 菌においても同様に共生関連遺伝子が発現低下する可能性がある。本研究では、菌根形成に関与する AM 菌の遺伝子を網羅的に抽出するために、菌根抑制時の AM 菌を用いて RNA-seq 解析を実施した。

材料と方法

生物材料と栽培条件

ミヤコグサ (*Lotus japonicus* B-129) 実生を川砂に移植し、1 個体あたり 500 胞子の *R. irregularis* DAOM 197198 (Mycorise, Premier Tech, Rivière-du-Loup, Canada) を接種した。液肥として 1/2 濃度ホーグランド溶液 (100 μ M Pi) を 2 日に 1 度施用し、3 週間栽培した。その後、異なるリン酸濃度 (20, 100, 300, 500 μ M Pi) を含む液肥を 1 週間与えた。すべての植物体を 25°C、明期 16 時間・暗期 8 時間に設定されたグロースチャンバーで生育させた。菌根サンプルを液体窒素で凍結させ、-80°C で保存した。

RNA-seq 解析

第 2 章で示した方法に従って RNA 抽出と cDNA ライブラリー作製、Illumina HiSeq 2000 Sequencing System によるペアードエンド・シークエンス (2 × 100 bp) を行った。ショートリードのマッピングから発現変動遺伝子 (FDR < 0.01) の抽出までも第 2 章で示した方法で行った。ただし、false discovery rate (FDR) が 0.001 未満の遺伝子を発現変動遺伝子とした ($n = 2$)。発現変動遺伝子の階層クラスタリングについては、正規化したリード数をもとに平均連結法で作成した。発現変動遺伝子に濃縮される機能を推定するために、TopGO (Alexa and Rahnenführer, 2016) で GO 解析を行った。なお、シークエンスデータは、DDBJ Sequence Read Archive (アクセス番号: DRA004607) に登録した。

菌根菌感染率の測定

第 2 章にの方法に従って菌根菌感染率を測定した。得られたデータはアークサイン変換したあと、R パッケージを用いて Tukey 多重比較 ($P \leq 0.05$) で分析した。

結果

菌根形成に対するリン酸濃度 (20、100、300、500 μM) の影響を調べるために、成熟した菌根に異なるリン酸濃度の液肥を施用して菌根菌感染率の変化を調査した。菌根菌感染率 (HC%) と嚢状体形成率 (VC%) は、リン酸濃度の違いの影響をほとんど受けなかった (図 4.1)。その一方、樹枝状体形成率 (AC%) は、低リン酸 (20、100 μM) において約 70%以上であるのに対し、高リン酸 (300、500 μM) では 40%前後と大きく低下した (図 4.1)。

高濃度リン酸添加時の *R. irregularis* の遺伝子発現プロファイルを調べるため、RNA-seq 解析を行った。RNA-seq から得られたリードを AM 菌ゲノムデータベースである *Rhizophagus irregularis* DAOM 181602 v1.0 (Gloin 1) (Tisserant et al., 2013) にマップしたところ、マップ率は数%であった (表 4.1)。菌根中の AM 菌の DNA 量は数%と推定されており、このマップ率は妥当な値である。リン酸処理区間で発現変動する遺伝子 (FDR < 0.01) は 163 個であった。抽出された発現変動遺伝子の RPKM 値をもとにサンプル間のクラスタリングを実施したところ、低リン酸 (20、100 μM) と高リン酸 (300、500 μM) のサンプルに大きく分けられた (図 4.2)。さらに、発現変動遺伝子について GO 解析を行ったところ、nucleosome assembly (GO:0006334) や nucleosome (GO:0000786) などのヌクレオソームに関わる GO が抽出された (表 3.2)。これらの GO に関わる 9 個の発現変動遺伝子は、すべてヒストンをコードしていた (図 4.3a)。これらのヒストン遺伝子の発現量は、低リン酸に比べて高リン酸で大きく低下した。ヒストン遺伝子と同様に、今回得られた発現変動遺伝子には、細胞周期の制御に関わるサイクリン依存性キナーゼ遺伝子 (CDK) や DNA 複製に関わる DNA ポリメラーゼ β サブユ

ニット遺伝子 (*Pol δ*)、増殖細胞核抗原遺伝子 (PCNA) やリボヌクレオチド還元酵素遺伝子 (*RNR*) が含まれており、高濃度リン酸条件で発現が低下した (図 4.3a)。さらに、リン酸濃度の影響によって、29 個の分泌タンパク質遺伝子が発現変動しており、これは全発現変動遺伝子の約 18%に相当した (図 4.3b)。抽出された多くの分泌タンパク質遺伝子は高濃度リン酸条件で発現が低下し、その中には *strigolactone-induced putative secreted protein 1 (SIS1)* (Tsuzuki et al., 2016) が含まれていた (図 4.3b)。

一方、呼吸にかかわる遺伝子の発現プロファイルを解析したところ、ほとんどの遺伝子がリン酸濃度の影響を受けていなかった (表 4.3)。さらに、トランスポーター遺伝子を調査すると、リン酸濃度の変化に伴って発現量が変化する遺伝子は 5 個のみであり、ほとんどのトランスポーター遺伝子はリン酸添加の影響を受けなかった (表 4.4)。鉄透過酵素 *FTR1*、アクアポリン *AQP1*、リン酸トランスポーター *GintPT*、ミトコンドリアのオキサロ酢酸輸送タンパク質は低リン酸と比較して高リン酸で発現が低下する一方で、major facilitator superfamily に属するトランスポーター遺伝子 (protein ID: 11960) は高リン酸で発現が上昇した (表 4.4)。

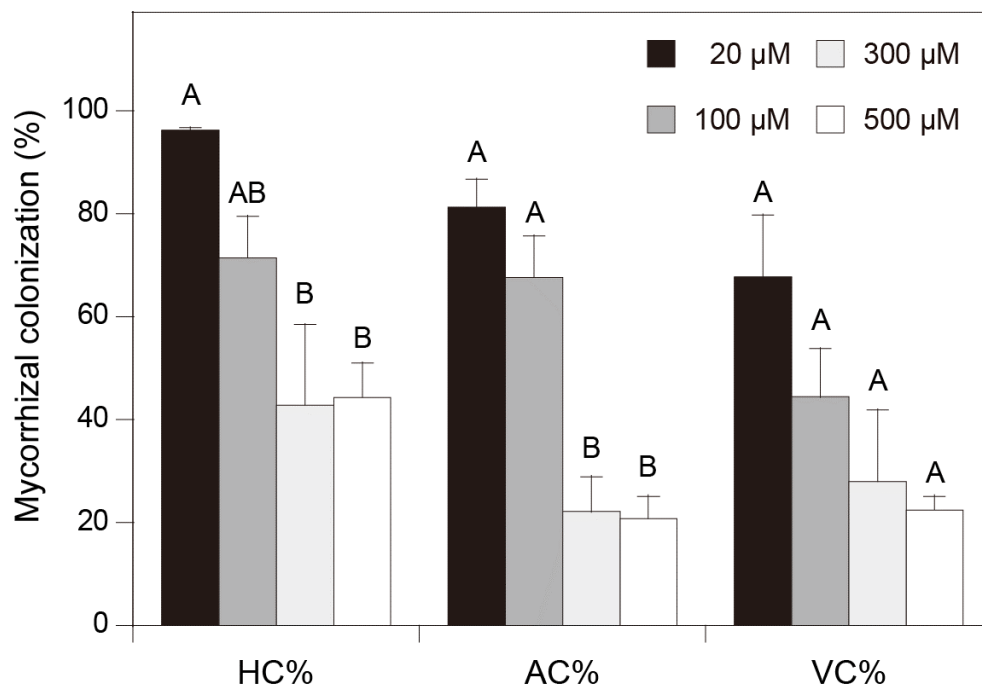


図 4.1. 異なるリン酸濃度で栽培したミヤコグサの菌根菌感染率.

菌根菌感染率 (hyphal colonization: HC%)、樹枝状体形成率 (arbuscular colonization: AC%)、のう状体形成率 (vesicular colonization: VC%) を表す。エラーバーは標準誤差を示す ($n = 3$)。Tukey-Kramer 検定により、異文字間で有意差あり ($P < 0.05$)。

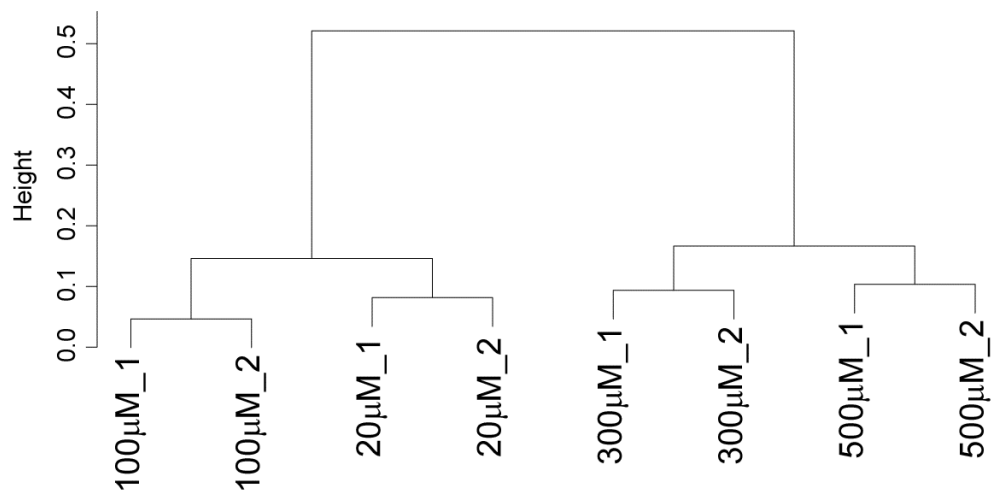


図 4.2. リード数に基づいた発現変動遺伝子のサンプル間階層クラスタリング.

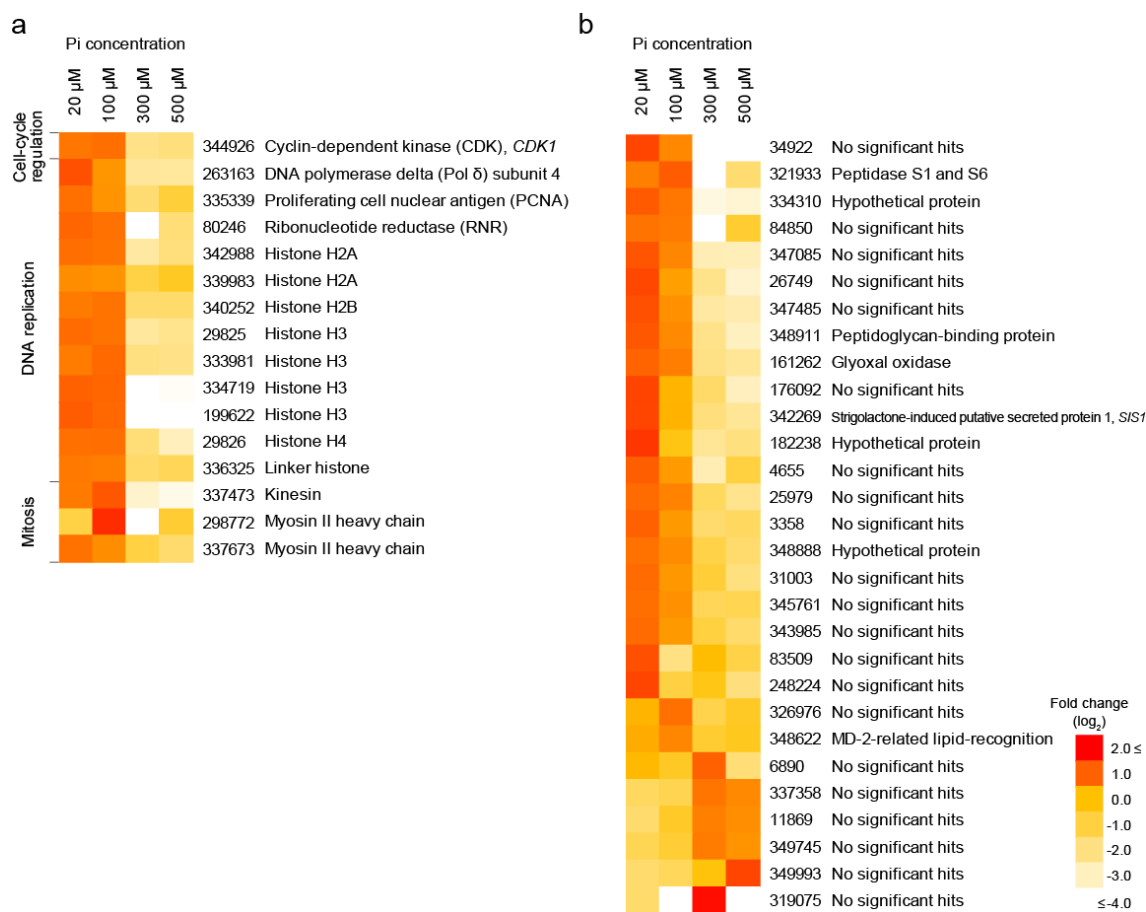


図 4.3. 異なるリン酸濃度で発現変動する細胞周期関連遺伝子 (a) および分泌タンパク質遺伝子 (b) の発現プロファイル.

Tisserant ら (2013) および Sędzielewska Toro and Brachmann (2016) に基づいて分泌タンパク質を抽出した。ヒートマップは、4 つのリン酸濃度条件の平均発現量を基準とした各発現量を表す。

表 4.1. シーケンスデータの基本統計情報と *R. irregularis* DAOM198197 のゲノム配列の対するマッピングの情報.

| Descriptions | Pi concentration | | | |
|--|------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 20 μ M | 100 μ M | 300 μ M | 500 μ M |
| Total raw reads | 32,676,804 | 31,964,910 | 23,071,556 | 34,800,882 |
| Mapped reads to annotated genes without rRNA genes | 409,845 | 1,021,831 | 218,605 | 385,924 |
| Mapped reads/total raw reads (%) | 1.3 | 3.2 | 0.9 | 1.1 |

表 4.2. 異なるリン酸濃度条件で発現変動する AM 菌遺伝子の GO 解析.

| GO ID | GO term | Number of genes | P value |
|--------------------|---|-----------------|---------|
| Biological process | | | |
| GO:0006334 | nucleosome assembly | 9 | 5.1E-12 |
| GO:0006120 | mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone | 2 | 1.4E-03 |
| Molecular function | | | |
| GO:0015078 | hydrogen ion transmembrane transporter activity | 6 | 3.2E-05 |
| GO:0043765 | T/G mismatch-specific endonuclease activity | 2 | 1.6E-03 |
| GO:0016631 | enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018498 | 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-phenylpropionate dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018499 | cis-2,3-dihydrodiol DDT dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018500 | trans-9R,10R-dihydrodiolphenanthrene dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018501 | cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018502 | 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0018503 | trans-1,2-dihydrodiolphenanthrene dehydrogenase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0043786 | cinnamate reductase activity | 2 | 2.0E-03 |
| GO:0003677 | DNA binding | 13 | 2.7E-03 |
| GO:0008137 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity | 2 | 7.2E-03 |
| GO:0008398 | sterol 14-demethylase activity | 2 | 7.2E-03 |
| GO:0003871 | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity | 1 | 7.6E-03 |
| GO:0004123 | cystathionine gamma-lyase activity | 1 | 7.6E-03 |
| GO:0004345 | glucose-6-phosphate dehydrogenase activity | 1 | 7.6E-03 |
| GO:0004556 | alpha-amylase activity | 1 | 7.6E-03 |
| GO:0004781 | sulfate adenyltransferase (ATP) activity | 1 | 7.6E-03 |
| GO:0030337 | DNA polymerase processivity factor activity | 1 | 7.6E-03 |
| Cellular component | | | |
| GO:0000786 | nucleosome | 9 | 2.6E-11 |
| GO:0045259 | proton-transporting ATP synthase complex | 3 | 4.7E-03 |

表 4.3. 呼吸に関与する AM 菌遺伝子の発現プロファイル.

RPKM, reads per kilobase million; FDR, false discovery rate. *FDR < 0.05, **FDR < 0.01, ***FDR < 0.001.

| Protein ID | Annotation | Gene expression (RPKM) | | | | FDR |
|---------------------------|--|------------------------|--------|--------|--------|-----|
| | | 20 μM | 100 μM | 300 μM | 500 μM | |
| Glycolysis | | | | | | |
| 346548 | Hexokinase | 80 | 65 | 75 | 110 | |
| 147891 | Hexokinase | 39 | 49 | 20 | 27 | |
| 193121 | Phosphoglucose isomerase | 58 | 82 | 167 | 186 | |
| 338655 | Phosphofructokinase | 5 | 10 | 10 | 8 | |
| 342398 | Fructose biphosphate aldolase | 806 | 925 | 971 | 884 | |
| 176549 | Triose phosphate isomerase | 443 | 538 | 386 | 366 | |
| 334053 | Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase | 2443 | 2060 | 2428 | 2105 | |
| 92682 | Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 72500 | Phosphoglycerate kinase | 265 | 252 | 306 | 293 | |
| 344364 | Phosphoglycerate mutase | 155 | 131 | 240 | 316 | |
| 349357 | Phosphoglycerate mutase | 0 | 60 | 0 | 32 | |
| 336130 | Phosphoglycerate mutase | 0 | 10 | 43 | 8 | |
| 337051 | Phosphoglycerate mutase | 353 | 348 | 443 | 407 | |
| 341195 | Pyruvate kinase | 102 | 98 | 45 | 56 | |
| Pentose phosphate pathway | | | | | | |
| 14299 | Glucose-6-phosphate dehydrogenase | 115 | 88 | 316 | 297 | ** |
| 337443 | 6-phosphogluconolactonase | 173 | 171 | 165 | 180 | |
| 40197 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | 701 | 551 | 856 | 546 | |
| 18940 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 339749 | Ribose-5-phosphate isomerase | 171 | 89 | 90 | 85 | |
| 342208 | Ribulose-5-phosphate epimerase | 154 | 144 | 187 | 304 | |
| 18332 | Ribulose-5-phosphate epimerase | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 338208 | Transketolase | 124 | 101 | 137 | 85 | |
| 82179 | Transaldolase | 363 | 402 | 580 | 638 | |
| TCA cycle | | | | | | |
| 336663 | Pyruvate dehydrogenase alpha subunit | 85 | 106 | 39 | 55 | |
| 339332 | Pyruvate dehydrogenase alpha subunit | 69 | 50 | 21 | 46 | |
| 340327 | Pyruvate dehydrogenase beta subunit | 168 | 189 | 249 | 265 | |

表 4.3. Continued

| Protein ID | Annotation | Gene expression (RPKM) | | | | FDR |
|---------------|-------------------------------------|------------------------|--------|--------|--------|-----|
| | | 20 μM | 100 μM | 300 μM | 500 μM | |
| TCA cycle | | | | | | |
| 33696 | Pyruvate dehydrogenase beta subunit | 45 | 56 | 66 | 112 | |
| 2373 | Citrate synthase | 44 | 52 | 43 | 37 | |
| 343775 | Aconitase | 261 | 249 | 225 | 227 | |
| 336602 | Aconitase | 19 | 17 | 24 | 20 | |
| 341257 | Isocitrate dehydrogenase | 75 | 143 | 68 | 109 | |
| 336777 | Isocitrate dehydrogenase | 153 | 171 | 188 | 185 | |
| 214587 | Isocitrate dehydrogenase | 37 | 56 | 84 | 42 | |
| 78748 | Isocitrate dehydrogenase | 17 | 59 | 66 | 33 | |
| 85412 | 2-ketoglutarate dehydrogenase | 59 | 51 | 54 | 52 | |
| 4708 | 2-ketoglutarate dehydrogenase | 27 | 23 | 27 | 27 | |
| 74074 | 2-ketoglutarate dehydrogenase | 35 | 33 | 17 | 21 | |
| 340297 | Succinyl-CoA synthetase | 166 | 155 | 121 | 142 | |
| 345426 | Succinyl-CoA synthetase | 57 | 67 | 27 | 28 | |
| 130838 | Succinyl-CoA synthetase | 137 | 128 | 136 | 104 | |
| 346712 | Succinate dehydrogenase (SDH) | 150 | 160 | 210 | 75 | |
| 335540 | Succinate dehydrogenase (SDH) | 500 | 461 | 393 | 603 | |
| 337726 | Fumarase | 91 | 163 | 159 | 37 | |
| 335443 | Malate dehydrogenase | 1393 | 884 | 1611 | 1693 | |
| 79743 | Malate dehydrogenase | 450 | 438 | 301 | 286 | |
| ATP synthesis | | | | | | |
| 345979 | NADH dehydrogenase | 54 | 32 | 16 | 43 | |
| 308381 | NADH dehydrogenase | 49 | 26 | 41 | 15 | |
| 333797 | Ubiquinol-cytochrome-c reductase | 756 | 523 | 832 | 598 | |
| 128960 | Cytochrome c oxidase | 3761 | 2095 | 3459 | 3331 | |
| 59916 | Cytochrome c oxidase | 1569 | 101 | 451 | 521 | |
| 348751 | Cytochrome c oxidase | 1491 | 1144 | 1811 | 1861 | |
| 38715 | Cytochrome c oxidase | 1143 | 102 | 386 | 290 | *** |
| 336468 | Cytochrome c oxidase | 886 | 722 | 324 | 413 | |
| 64177 | Cytochrome c oxidase | 722 | 55 | 149 | 180 | *** |

表 4.3. Continued

| Protein ID | Annotation | Gene expression (RPKM) | | | | FDR |
|---------------|----------------------|------------------------|--------|--------|--------|-----|
| | | 20 μM | 100 μM | 300 μM | 500 μM | |
| ATP synthesis | | | | | | |
| 337729 | Cytochrome c oxidase | 553 | 55 | 295 | 118 | * |
| 46853 | Cytochrome c oxidase | 397 | 63 | 238 | 75 | |
| 223394 | Cytochrome c oxidase | 396 | 638 | 584 | 574 | |
| 347873 | Cytochrome c oxidase | 383 | 713 | 983 | 1027 | |
| 335115 | Cytochrome c oxidase | 375 | 507 | 477 | 501 | |
| 257806 | Cytochrome c oxidase | 358 | 33 | 165 | 195 | |
| 12993 | Cytochrome c oxidase | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 29967 | F-ATPase | 1787 | 1518 | 2210 | 1801 | |
| 975 | F-ATPase | 581 | 41 | 174 | 209 | *** |
| 131507 | F-ATPase | 573 | 737 | 1080 | 1109 | |
| 337610 | F-ATPase | 548 | 736 | 631 | 603 | |
| 337284 | F-ATPase | 530 | 666 | 585 | 628 | |
| 144549 | F-ATPase | 480 | 705 | 847 | 718 | |
| 175263 | F-ATPase | 346 | 358 | 183 | 173 | |
| 345873 | F-ATPase | 334 | 531 | 326 | 382 | |
| 334467 | F-ATPase | 318 | 351 | 300 | 328 | |
| 26871 | F-ATPase | 287 | 445 | 454 | 732 | |
| 87044 | F-ATPase | 73 | 178 | 81 | 99 | |

表 4.4. 異なるリン酸濃度で発現変動するトランスポーター遺伝子の発現プロファイル.

RPKM, reads per kilobase million.

| Protein ID | Annotation | Gene expression (RPKM) | | | |
|------------|--|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 20 μ M | 100 μ M | 300 μ M | 500 μ M |
| 11960 | Major facilitator superfamily | 46 | 28 | 206 | 138 |
| 98222 | Aquaporin <i>AQP1</i> | 561 | 194 | 0 | 0 |
| 345528 | Phosphate transporter <i>GintPT</i> | 479 | 543 | 205 | 170 |
| 347887 | Iron permease <i>FTR1</i> | 706 | 943 | 360 | 355 |
| 349038 | Mitochondrial oxaloacetate transport protein | 53 | 156 | 13 | 24 |

考察

高濃度のリン酸が菌根形成を阻害することは菌根共生研究の初期から知られている (Baylis, 1967; Mosse, 1973; Breuillin et al., 2010; Balzergue et al., 2011; Gu et al., 2011; Carbonnel and Gutjahr, 2014; Kobae et al., 2016)。しかし、菌根が高濃度リン酸条件に置かれたときに、AM 菌にどのような影響が及んでいるかについてはほとんど分かっていない。本研究の結果から、高濃度リン酸条件下の菌根では AM 菌のヒストン遺伝子の発現が低下することが明らかになった。酵母ではヒストン遺伝子の発現が細胞周期の S 期初期に一過的に誘導されることから (Bauer and Burgers, 1990; Kurat et al., 2013)、AM 菌のヒストン遺伝子の発現低下は、高濃度リン酸添加によって細胞周期の制御が変化していることを示している。さらに、細胞周期を制御する *CDK1* 遺伝子、DNA 複製 (*Pol δ*、*PCNA*、*RNR*) や細胞分裂関連遺伝子 (キネシン、ミオシン) の発現が高濃度リン酸条件下で低下していることから、細胞周期の制御変化が起きていると推測される。AM 菌の細胞周期についての知見は非常に限定的である。フローサイトメトリーや細胞周期阻害剤を用いた研究から、休眠孢子ではほとんどの核が G0/G1 期の休止状態であるが、内生菌糸や発達中の孢子では核分裂が起こることが確認されている (Bianciotto and Bonfante, 1993; Bianciotto et al., 1995; Marleau et al., 2011)。菌類の *CDK1* は各種サイクリンと複合体を形成することで細胞周期を駆動する中心的な役割を果たしている。これらの複合体の働きによる細胞周期の進行に伴い、DNA 複製や細胞分裂に関与する主要な遺伝子は周期的に発現変動する (Rustici et al., 2004)。DNA 複製は開始、伸長、終結の 3 つのステップからなる。*Pol δ* は、*PCNA* の存在下で DNA 鎖の伸長を触媒する。*PCNA* は *Pol δ* の補因子

であり、ポリメラーゼの反応性を高める役割を持つ。Pol δ や PCNA をコードする遺伝子の発現は、出芽酵母の S 期初期に一過的に誘導される (Bauer and Burgers, 1990)。また、RNR はリボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチド (DNA の基質) に変換する反応を触媒し、分裂酵母の G1 期に発現が上昇する (Rustici et al., 2004)。ヒストンは核の分裂に伴う DNA 複製の段階で合成されるほか、S 期のみを発現誘導される (Hereford et al., 1981; Kurat et al., 2013)。さらに、DNA 複製関連遺伝子に加えて、細胞分裂に関わるキネシンやミオシン遺伝子も分裂酵母の G1 期で発現上昇する (Rustici et al., 2004)。本研究において、AM 菌の DNA 複製や分裂に関わる遺伝子が高濃度リン酸で発現低下したのは、高濃度リン酸添加によって内生菌糸内の細胞周期が抑制されたためと考えられる。さらに私たちは、高濃度リン酸による菌根形成抑制によって基礎代謝に関わる遺伝子の発現も低下するのではないかと予想した。しかし、呼吸に関連する遺伝子の発現はリン酸処理によって変化しなかった。Kobae ら (2016) は、イネの菌根に高濃度リン酸を与えても成熟した樹枝状体の代謝活性は維持されることを生体染色で示している。さらに、ほとんどのトランスポーター遺伝子の発現は変化しなかったことから、高濃度リン酸条件での菌糸でも輸送活性は維持されていると考えられる。以上より、既に発達した AM 菌の代謝制御や輸送活性に対して高濃度リン酸はほとんど影響しないものの、細胞周期の進行が抑制されることで菌糸伸長や樹枝状体形成が停止したと考えられる。

Kikuchi ら (2014) は、*Rhizophagus* sp. HR1 の外生菌糸に対する高濃度リン酸添加の影響をトランスクリプトームで解析している。私たちはこのデータセットを用いて細胞周期関連遺伝子の発現変化を調べたが、外生菌糸ではそれらの遺伝子の発現はリン酸で抑制されていなかった。このことは、高濃度リン酸が直接的に AM 菌の細胞周期に作用するわけではなく、高濃度リン酸を感知した

植物が間接的に AM 菌の細胞周期に影響を与えていることを示唆している。植物を介した間接的な影響のひとつとして、菌根形成や共生の維持に関わる宿主遺伝子のリン酸による抑制が考えられる。菌根に高濃度リン酸を添加すると、ストリゴラクトン生合成遺伝子の発現抑制 (Breuillin et al., 2010) やストリゴラクトン合成量の低下 (Balzergue et al., 2011) が起こる。第 3 章の結果からも、高濃度リン酸を添加して短時間の内にストリゴラクトン生合成遺伝子の発現が低下した。ストリゴラクトンを発芽菌糸に処理すると菌糸先端の核の数が増加することから、ストリゴラクトンには AM 菌の分裂活性を高めるはたらきがある (Besserer et al., 2008)。これらの知見から、AM 菌の細胞周期の抑制は、高濃度リン酸によるストリゴラクトン生合成量の低下によるものかもしれない。さらに、AM 菌の *SISI* 遺伝子はストリゴラクトン処理によって発現が誘導され、菌根形成に必須の因子であることが報告されている (Tsuzuki et al., 2016)。高濃度リン酸による菌根形成の抑制は、ストリゴラクトン合成量の低下にともなう *SISI* 遺伝子発現の低下に起因するかもしれない。

植物と微生物の間の相互作用には、エフェクターと呼ばれる微生物由来の分泌タンパク質が重要な役割を果たす (Kamoun, 2006)。最近、ゲノムやトランスクリプトーム解析によって、AM 菌由来の多くの分泌タンパク質が同定されている (Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014; Fiorilli et al., 2016; Sędziewska Toro and Brachmann, 2016; Tang et al., 2016; Tsuzuki et al., 2016)。Kloppholz ら (2011) は、AM 菌の SP7 エフェクタータンパク質に注目し、SP7 が宿主細胞の核にある病害関連転写因子 ERF19 と相互作用することによって植物根内への AM 菌の侵入を助けていると報告している。本研究の結果から、高濃度リン酸によって *SISI* をはじめとした多数の分泌タンパク質遺伝子の発現が低下しており、それらは AM 菌の植物根への感染に必要なエフェクターであるかもしれない。

ほとんどのトランスポーター遺伝子の発現量はリン酸処理によって変化しなかったが、鉄透過酵素 FTR1、アクアポリン AQP1、リン酸トランスポーター GintPT、ミトコンドリアのオキサロ酢酸輸送タンパク質をコードする 4 つの遺伝子は高濃度リン酸添加で発現低下した。菌根共生におけるこれらの遺伝子の機能はほとんど明らかにされていない。*AQP1* 遺伝子は外生菌糸よりも内生菌糸で強く発現するが、*AQP1* を卵母細胞で発現させても水輸送の活性は見られず機能は不明である (Aroca et al., 2009)。本研究では、高濃度リン酸によって *AQP1* 遺伝子の発現が完全に抑制されたことから、*AQP1* は菌根形成抑制の分子マーカーとして利用できるかもしれない。*GintPT* を含む高親和性リン酸トランスポーター遺伝子は、外生および内生菌糸の両方で強く発現する (Harrison and van Buuren, 1995; Benedetto et al., 2005; Tisserant et al., 2012; Fiorilli et al., 2013)。高濃度リン酸添加によって *GintPT* は内生菌糸で発現低下することが示されており (Fiorilli et al., 2013)、これは本研究の結果と一致する。*GintPT* 遺伝子の発現低下は、リン酸濃度の上昇によるリン欠ストレスの軽減によるのかもしれない。トランスポーター遺伝子の中で、major facilitator superfamily に属する 1 遺伝子のみが高濃度リン酸条件で高く発現した。このトランスポーター遺伝子は内生菌糸で強く発現することが分かっているが (Tisserant et al., 2012)、輸送する基質は明らかにされていない。もしこのトランスポーターが宿主から放出される栄養の吸収に関与しているなら、菌根形成抑制に伴う栄養供給の減少に応答して発現が変化している可能性がある。

第 5 章 総合考察

AM 菌は多様な植物種の根に共生し、土壌中のリン成分を宿主に供給することで植物の成長を促進させる。しかし、AM 菌による植物成長促進効果(菌根効果)は栽培や環境条件によって大きく変動することが知られている。AM 菌の農業利用を進めるには、安定的な菌根形成の維持や共生機能発現を制御する知見を得ることが重要である。本研究では、アーバスキュラー菌根形成の分子メカニズムを解明するために、アーバスキュラー菌根形成に関わる候補遺伝子を RNA-seq 解析によって網羅的に抽出した。

第 2 章では、菌根性植物であるトマトとミヤコグサを用いて、菌根応答性遺伝子を 2 者間で比較した。従来の菌根のトランスクリプトーム研究と同様に、本研究でも非感染根に対して感染根で発現変動する遺伝子を菌根応答性遺伝子として抽出した。菌根応答性遺伝子のうち 1/4 から 1/3 相当がトマトとミヤコグサで保存されており、それらの遺伝子には菌根形成や樹枝状体形成に関わることが知られる遺伝子が含まれていた。両植物で共通して発現誘導された遺伝子には低誘導率から高誘導率のものまで存在し、誘導率は植物種間で正の相関を示した。一方、植物種独自で発現誘導される遺伝子は、大部分が低誘導率のものであった。さらに、AM 菌側の遺伝子プロファイルをとまとミヤコグサの菌根で比較したところ、どちらの植物に感染していてもほぼ同じ発現プロファイルを示したが、数百個の AM 菌遺伝子は発現変動していた。特に、ミトコンドリア電子伝達系に関わる遺伝子がミヤコグサ菌根で高く発現したことから、高い菌根反応性を示すミヤコグサと *R. irregularis* の組み合わせでは ATP 産生が活発化しているのかもしれない。以上の結果から、トマトとミヤコグサで共通して発現誘導される遺伝子は一定数あり、それらの遺伝子には菌根形成に関わる

遺伝子が濃縮されていることが明らかとなった。しかし、植物種独自で変動する多くの遺伝子は、菌根形成に直接関与する遺伝子ではなく、各植物の生理的な違いに起因して変動する遺伝子である可能性が指摘された。菌根形成に関与する菌根誘導性遺伝子を抽出するには、非感染根と感染根の比較が必ずしも最善な方法ではないと考えられた。

第 3 章では、菌根形成の候補遺伝子をトランスクリプトーム解析から効率的かつ網羅的に抽出するために、高濃度リン酸を添加することで菌根形成を同期的に抑制し、そのサンプルを用いて RNA-seq 解析を実施した。高濃度リン酸を添加してから数時間で樹枝状体の密度が低下することから、樹枝状体の形成に関わる遺伝子が同調的に発現低下することが予想された。RNA-seq 解析の結果、高濃度リン酸添加によって 2,189 遺伝子が発現変動し、その発現パターンは大きく 5 つのグループに分けられた。5 つのグループのうち、リン酸処理によって徐々に発現低下するグループ A には菌根誘導性を示す遺伝子が多く存在し、菌根や樹枝状体形成に関与する遺伝子も多く含まれていた。グループ A には、菌根や樹枝状体形成に関わる遺伝子が濃縮されていると考えられる。本研究では、グループ A 遺伝子であるクチン/スベリン合成遺伝子および AP2/ERF 転写因子をコードする遺伝子に注目した。グループ A 遺伝子として抽出されたクチン/スベリン合成遺伝子発現の局在解析を行ったところ、表皮や内皮ではなく樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現した。また、クチン/スベリン合成遺伝子のひとつである *LjRAM2* 遺伝子の変異体では樹枝状体形成が顕著に阻害された。つまり、これらの遺伝子はクチンまたはスベリンそれ自体の合成に関与しているのではなく、菌根形成に必要な「クチン/スベリン様物質」の合成に関与していると考えられた。さらに、AP2/ERF 転写因子 *LjERMI*, *LjERM2*, *LjERM3* 遺伝子の機能を解析したところ、*LjERM* は樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現するほか、RNAi で遺伝

子発現を抑制すると、ブランチの発達が著しく阻害されることを明らかにした。*LjERM* RNAi 系統では、いくつかのクチン/スベリン生合成遺伝子の発現が非感染根と同じレベルにまで低下していた。最近、AM 菌は脂肪酸合成遺伝子を欠損していることが報告されており、自身では脂肪酸を合成できず、外部から脂肪酸を獲得していると考えられている (Wewer et al., 2014; Tang et al., 2016)。本研究の知見と合わせて考察すると、菌根共生が成立する過程では、*LjERM* 転写因子が「クチン/スベリン様物質」合成遺伝子の一部の発現を誘導し、合成されたクチン/スベリン様物質が植物から AM 菌へ輸送され、AM 菌は栄養源としてそれらを利用している可能性がある。今後、具体的な脂肪酸供給経路の解明が期待される。

第 4 章では、異なるリン酸条件で栽培したミヤコグサ菌根を用いて AM 菌側の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。AM 菌と植物との共生はリン酸濃度の影響を強く受け、リン酸濃度が高まると宿主植物は菌根形成を積極的に抑制する。この抑制に伴って、AM 菌の共生関連遺伝子の発現は低下すると考えられる。RNA-seq で AM 菌の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、高濃度リン酸条件では細胞周期制御遺伝子や DNA 複製、細胞分裂関連遺伝子の発現が低下した。また、20 個以上の分泌タンパク質遺伝子も高濃度リン酸で発現低下しており、その中にはストリゴラクトン添加で誘導される *SISI* も存在した。*SISI* は AM 菌感染を促進する分泌タンパク質として同定されており、一般的に分泌タンパク質は植物と微生物間のコミュニケーションを担うシグナル分子として機能することが知られている (Tsuzuki et al., 2016)。菌糸伸長や樹枝状体が形成されるときには、分泌タンパク質を介したコミュニケーションや核の分裂が活性化し、高濃度リン酸添加による菌根形成抑制に伴って関連する遺伝子の発現が低下すると考えられた。

本研究の全体を通して、AM 共生の形成に関わる遺伝子プロファイルの解析によって、菌根が形成されるときには（1）植物の脂肪酸合成や修飾反応が鍵となることや、（2）AM 菌の分泌タンパク質を介した植物－AM 菌間のコミュニケーションや AM 菌内での核分裂が活性化することが明らかとなった。（1）に関して、植物が合成する脂肪酸と AM 共生との関係はこれまで不明瞭な点が多く、本研究で提唱する「クチン/スベリン様物質」生合成経路は初めての発見である。クチン/スベリン様物質の正確な機能についてはまだ分からないことが多いが、AM 菌の栄養として利用されている可能性がある。AM 菌は絶対共生菌であり、純粋培養ができない難培養微生物である。もしかすると、クチン/スベリン様物質は AM 菌の増殖を促進する物質であるかもしれない。遺伝子解析やリポドーム解析を組み合わせることで、クチン/スベリン様物質の分子種の同定が期待される。（2）に関して、分泌タンパク質や細胞周期・核分裂に関連する AM 菌遺伝子は AM 菌の増殖を示すマーカーとして利用できると考えられる。

本研究の大きな目的は、リン酸質肥料の効率的な利用のため、AM 共生を農業に応用することである。菌根共生を応用するうえで、栽培・環境条件や宿主－AM 菌の組み合わせによって菌根効果が大きく変動することが課題となっている。本研究の結果から、ある種の脂肪酸が菌根形成の鍵になっている可能性が示された。安定的な菌根効果を得るためのひとつの方法として、脂肪酸成分を含む有機質肥料を添加することで、AM 菌の代謝や増殖が活性化され、それに伴って菌根形成の促進や安定的な菌根効果が得られるかもしれない。菌根効果に与える脂肪酸含有機質資材の影響を評価するために、本研究で明らかとなった AM 菌の細胞周期・細胞分裂関連遺伝子が AM 菌の増殖マーカーとして利用できるかもしれない。これまで、多様な栽培・環境条件で菌根効果へ与える影響を適切に評価している研究例は少なく、特に遺伝子情報を組み合わせた報告は

ほとんど見られない。適切に菌根効果を評価するためには、例えば、実験室や圃場の各種の栽培・環境条件において乾重やリン栄養だけでなく本研究で得られた遺伝子発現情報などのデータを収集し、そのデータをもとにして多変量解析などの統計解析手法を用いて「栽培や環境因子」と「菌根効果」の関係性を明らかにするなどが考えられる。もしこれらの方法が有効であれば、菌根効果が期待できる圃場の判別や菌根効果の度をあらかじめ評価できると考えられ、AM 菌を利用した新たな農業の展開につながるかもしれない。

引用文献

- Ait Lahmidi, N., Courty, P.-E., Brulé, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Doidy, J., Berta, G., Lingua, G., Wipf, D., and Bonneau, L.** (2016). Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiology and Biochemistry* **107**, 354-363.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H.** (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824-827.
- Alexa, A., and Rahnenführer, J.** (2016). Gene set enrichment analysis with topGO (R package version 2.24.0).
- Alexander, T., Toth, R., Meier, R., and Weber, H.C.** (1989). Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany* **67**, 2505-2513.
- Ané, J.-M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ayax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J.-M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Dénarié, J., and Cook, D.R.** (2004). *Medicago truncatula* *DMI1* required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**, 1364-1367.
- Aroca, R., Bago, A., Sutka, M., Paz, J.A., Cano, C., Amodeo, G., and Ruiz-Lozano, J.M.** (2009). Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporin described reveals concerted gene expression between salt-stressed and nonstressed mycelium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1169-1178.
- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R.M., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P.J., Pfeffer, P.E., and Shachar-Hill, Y.** (2002). Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128**, 108-124.

- Balzergue, C., Puech-Pages, V., Becard, G., and Rochange, S.F.** (2011). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1049-1060.
- Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H., and Imaizumi-Anraku, H.** (2008). Divergence of evolutionary ways among common *sym* genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1659-1671.
- Bauer, G.A., and Burgers, P.M.** (1990). Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Research* **18**, 261-265.
- Baylis, G.T.S.** (1967). Experiments on the ecological significance of phycomycetous mycorrhizas. *New Phytologist* **66**, 231-243.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., and Pollard, M.** (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current opinion in plant biology* **15**, 329-337.
- Benedetto, A., Magurno, F., Bonfante, P., and Lanfranco, L.** (2005). Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**, 620-627.
- Benedito, V.A., Li, H., Dai, X., Wandrey, M., He, J., Kaundal, R., Torres-Jerez, I., Gomez, S.K., Harrison, M.J., Tang, Y., Zhao, P.X., and Udvardi, M.K.** (2010). Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiology* **152**, 1716-1730.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., and Séjalon-Delmas, N.** (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* **148**, 402-413.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Bécard, G., and Séjalon-Delmas, N.** (2006).

Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* **4**, 1239-1247.

Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A.C., Humphry, M., Borel, S., Petetot, J.M., Métraux, J.P., and Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO Journal* **26**, 2158-2168.

Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraca, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.C., Métraux, J.P., and Nawrath, C. (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1958-1970.

Bianciotto, V., and Bonfante, P. (1993). Evidence of DNA replication in an arbuscular mycorrhizal fungus in the absence of the host plant. *Protoplasma* **176**, 100-105.

Bianciotto, V., Barbiero, G., and Bonfante, P. (1995). Analysis of the cell cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow cytometry and bromodeoxyuridine labelling. *Protoplasma* **188**, 161-169.

Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., and Samuels, L. (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant Journal* **52**, 485-498.

Bonaventure, G., Salas, J.J., Pollard, M.R., and Ohlrogge, J.B. (2003). Disruption of the *FATB* gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* **15**, 1020-1033.

Bonfante, P., and Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 451-457.

Bonfante, P., and Genre, A. (2015). Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak 'plantish' or 'fungish'? *Trends in Plant Science* **20**, 150-154.

- Bonneau, L., Huguet, S., Wipf, D., Pauly, N., and Truong, H.-N.** (2013). Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **199**, 188-202.
- Borisjuk, N., Hrmova, M., and Lopato, S.** (2014). Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnology Advances* **32**, 526-540.
- Branscheid, A., Sieh, D., Pant, B.D., May, P., Devers, E.A., Elkrog, A., Schauser, L., Scheible, W.R., and Krajinski, F.** (2010). Expression pattern suggests a role of miR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 915-926.
- Bravo, A., York, T., Pumplin, N., Mueller, L.A., and Harrison, M.J.** (2016). Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nature Plants* **2**, 15208.
- Breuillin, F., Schramm, J., Hajirezaei, M., Ahkami, A., Favre, P., Druege, U., Hause, B., Bucher, M., Kretschmar, T., Bossolini, E., Kuhlemeier, C., Martinoia, E., Franken, P., Scholz, U., and Reinhardt, D.** (2010). Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant Journal* **64**, 1002-1017.
- Brundrett, M.** (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**, 37-77.
- Brundrett, M.C.** (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**, 275-304.
- Cernac, A., and Benning, C.** (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Journal* **40**, 575-585.

- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M.** (2008). *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* **20**, 3467-3479.
- Charpentier, M., Sun, J., Martins, T.V., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Véry, A.A., Sanders, D., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E.D.** (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352**, 1102-1105.
- Chigri, F., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant Journal* **42**, 821-831.
- Clough, R.C., Matthis, A.L., Barnum, S.R., and Jaworski, J.G.** (1992). Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-coenzyme A to initiate fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 20992-20998.
- Delaux, P.M., Bécard, G., and Combier, J.P.** (2013). NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytologist* **199**, 59-65.
- Delaux, P.M., Radhakrishnan, G.V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J.D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C.J., Sederoff, H.W., Stevenson, D.W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M.R., Dunand, C., Morris, R.J., Roux, C., Wong, G.K.S., Oldroyd, G.E.D., and Ané, J.M.** (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 13390-13395.
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M., and Pawlowski, K.** (2004). Distinct roles of *Lotus japonicus* *SYMRK* and *SYM15* in root colonization and arbuscule formation. *New Phytologist* **163**, 381-392.
- Denarie, J., Debelle, F., and Prome, J.C.** (1996). Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 503-535.

- Devers, E.A., Teply, J., Reinert, A., Gaude, N., and Krajinski, F.** (2013). An endogenous artificial microRNA system for unraveling the function of root endosymbioses related genes in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology* **13**, 82.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevie, Z., Mihacea, S., Kaló, P., and Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Fester, T., Lohse, S., and Halfmann, K.** (2007). Chromoplast development in arbuscular mycorrhizal roots. *Phytochemistry* **68**, 92-100.
- Fiorilli, V., Lanfranco, L., and Bonfante, P.** (2013). The expression of *GintPT*, the phosphate transporter of *Rhizophagus irregularis*, depends on the symbiotic status and phosphate availability. *Planta* **237**, 1267-1277.
- Fiorilli, V., Catoni, M., Miozzi, L., Novero, M., Accotto, G.P., and Lanfranco, L.** (2009). Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **184**, 975-987.
- Fiorilli, V., Belmondo, S., Khouja, H.R., Abbà, S., Faccio, A., Daghino, S., and Lanfranco, L.** (2016). *RiPEIPI*, a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*, is preferentially expressed in *planta* and may be involved in root colonization. *Mycorrhiza* **26**, 609-621.
- Floss, D.S., Schliemann, W., Schmidt, J., Strack, D., and Walter, M.H.** (2008a). RNA interference-mediated repression of *MtCCD1* in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C₂₇ apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiology* **148**, 1267-1282.
- Floss, D.S., Levy, J.G., Lévesque-Tremblay, V., Pumplin, N., and Harrison, M.J.** (2013). DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, E5025-5034.
- Floss, D.S., Hause, B., Lange, P.R., Kuster, H., Strack, D., and Walter, M.H.** (2008b). Knock-down of the MEP pathway isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced

apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant Journal* **56**, 86-100.

Foo, E., Ross, J.J., Jones, W.T., and Reid, J.B. (2013). Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: an emerging role for gibberellins. *Annals of Botany* **111**, 769-779.

Fraser, C.M., and Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **9**, e0152.

Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S., and Hayashi, M. (2012). Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon *LORE1*. *Plant Journal* **69**, 720-730.

Fulda, M., Shockey, J., Werber, M., Wolter, F.P., and Heinz, E. (2002). Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Journal* **32**, 93-103.

Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M., and Krajinski, F. (2012). Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo a massive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *Plant Journal* **69**, 510-528.

Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., and Barker, D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**, 3489-3499.

Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., and Barker, D.G. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* **198**, 190-202.

Gobbato, E., Wang, E., Higgins, G., Bano, S.A., Henry, C., Schultze, M., and Oldroyd, G.E.D. (2013). *RAM1* and *RAM2* function and expression during

arbuscular mycorrhizal symbiosis and *Aphanomyces euteiches* colonization. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e26049.

Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernié, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S.A., Ratet, P., Mysore, Kirankumar S., Dénarié, J., Schultze, M., and Oldroyd, Giles E.D. (2012). A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Current Biology* **22**, 2236-2241.

Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E., Udvardi, M., and Harrison, M. (2009). *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* **9**, 10.

Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., and Parniske, M. (2010). *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of *Sec13*, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* **22**, 2509-2526.

Gu, M., Chen, A., Dai, X., Liu, W., and Xu, G. (2011). How does phosphate status influence the development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1300-1304.

Gu, M., Liu, W., Meng, Q., Zhang, W.Q., Chen, A.Q., Sun, S.B., and Xu, G.H. (2014). Identification of microRNAs in six solanaceous plants and their potential link with phosphate and mycorrhizal signalings. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 1164-1178.

Guether, M., Balestrini, R., Hannah, M., He, J., Udvardi, M.K., and Bonfante, P. (2009). Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* **182**, 200-212.

Gutjahr, C., Casieri, L., and Paszkowski, U. (2009). *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* **182**, 829-837.

- Gutjahr, C., Sawers, R.J.H., Marti, G., Andrés-Hernández, L., Yang, S.Y., Casieri, L., Angliker, H., Oakeley, E.J., Wolfender, J.L., Abreu-Goodger, C., and Paszkowski, U. (2015).** Transcriptome diversity among rice root types during asymbiosis and interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 6754-6759.
- Gutjahr, C., Radovanovic, D., Geoffroy, J., Zhang, Q., Siegler, H., Chiapello, M., Casieri, L., An, K., An, G., Guiderdoni, E., Kumar, C.S., Sundaresan, V., Harrison, M.J., and Paszkowski, U. (2012).** The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant Journal* **69**, 906-920.
- Güimil, S., Chang, H.S., Zhu, T., Sesma, A., Osbourn, A., Roux, C., Ioannidis, V., Oakeley, E.J., Docquier, M., Descombes, P., Briggs, S.P., and Paszkowski, U. (2005).** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8066-8070.
- Handa, Y., Nishide, H., Takeda, N., Suzuki, Y., Kawaguchi, M., and Saito, K. (2015).** RNA-seq Transcriptional Profiling of an Arbuscular Mycorrhiza Provides Insights into Regulated and Coordinated Gene Expression in *Lotus japonicus* and *Rhizophagus irregularis*. *Plant and Cell Physiology* **56**, 1490-1511.
- Handberg, K., and Stougaard, J. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant Journal* **2**, 487-496.
- Harrison, M.J. (2012).** Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 691-698.
- Harrison, M.J., and Dixon, R.A. (1994).** Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant Journal* **6**, 9-20.

- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., and Liu, J.Y.** (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**, 2413-2429.
- Harrison, M.J., van Buuren, M.L.** (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**, 626-629.
- Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., and Requena, N.** (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* **23**, 3812-3823.
- Hereford, L.M., Osley, M.A., Ludwig, J.R., McLaughlin, C.S.** (1981). Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* **24**, 367-375.
- Hogekamp, C., and Küster, H.** (2013). A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *BMC Genomics* **14**, 306.
- Hogekamp, C., Arndt, D., Pereira, P., Becker, J.D., Hohnjec, N., and Küster, H.** (2011). Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-Box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiology* **157**, 2023-2043.
- Hohnjec, N., Vieweg, M.F., Pühler, A., Becker, A., and Küster, H.** (2005). Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137**, 1283-1301.
- Hormann, F., Kuchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y., and Soll, J.** (2004). Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34756-34762.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka,**

- Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M., and Hayashi, M.** (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**, 527-531.
- Jackowski, S., and Rock, C.O.** (1987). Acetoacetyl-acyl carrier protein synthase, a potential regulator of fatty acid biosynthesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 7927-7931.
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., and Harrison, M.J.** (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1720-1725.
- Jing, F., Cantu, D.C., Tvaruzkova, J., Chipman, J.P., Nikolau, B.J., Yandeau-Nelson, M.D., and Reilly, P.J.** (2011). Phylogenetic and experimental characterization of an acyl-ACP thioesterase family reveals significant diversity in enzymatic specificity and activity. *BMC Biochemistry* **12**, 44.
- Kamoun, S.** (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 41-60.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 359-364.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2011). Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **9**, e0153.
- Kikuchi, Y., Hijikata, N., Yokoyama, K., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., and Ezawa, T.** (2014). Polyphosphate accumulation is driven by transcriptome alterations that lead to near-synchronous and near-equivalent uptake of inorganic cations in an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **204**, 638-649.

- Kikuchi, Y., Hijikata, N., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., Masuta, C., 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.
- Kistner, C., and Parniske, M.** (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science* **7**, 511-518.
- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Webb, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2005). Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* **17**, 2217-2229.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N.** (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* **21**, 1204-1209.
- Kobae, Y., Ohmori, Y., Saito, C., Yano, K., Ohtomo, R., and Fujiwara, T.** (2016). Phosphate treatment strongly inhibits new arbuscule development but not the maintenance of arbuscule in mycorrhizal rice roots. *Plant Physiology* **171**, 566-579.
- Kojima, T., Saito, K., Oba, H., Yoshida, Y., Terasawa, J., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M., and Ohtomo, R.** (2014). Isolation and phenotypic characterization of *Lotus japonicus* mutants specifically defective in arbuscular mycorrhizal formation. *Plant and Cell Physiology* **55**, 928-941.
- Kovács-Bogdan, E., Soll, J., and Bölter, B.** (2010). Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**, 740-747.
- Kurat, C.F., Recht, J., Radovani, E., Durbic, T., Andrews, B., and Fillingham, J.** (2013). Regulation of histone gene transcription in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 599-613.

- Lauressergues, D., Delaux, P.M., Formey, D., Lelandais-Brière, C., Fort, S., Cottaz, S., Bécard, G., Niebel, A., Roux, C., and Combier, J.P.** (2012). The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting *NSP2*. *Plant Journal* **72**, 512-522.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C., and Debelle, F.** (2004). A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., and Ohlrogge, J.** (2013). Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, e0161.
- Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D.G., Mu, D., Pang, E., Cao, H., Cha, H., Lin, T., Zhou, Q., Shang, Y., Li, Y., Sharma, T., van Velzen, R., de Ruijter, N., Aanen, D.K., Win, J., Kamoun, S., Bisseling, T., Geurts, R., and Huang, S.** (2014). Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genetics* **10**, e1004078.
- Liu, J., Blaylock, L.A., Endre, G., Cho, J., Town, C.D., VandenBosch, K.A., and Harrison, M.J.** (2003). Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **15**, 2106-2123.
- Liu, J., Jung, C., Xu, J., Wang, H., Deng, S., Bernad, L., Arenas-Huertero, C., and Chua, N.H.** (2012). Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4333-4345.
- Liu, W., Kohlen, W., Lillo, A., Op den Camp, R., Ivanov, S., Hartog, M., Limpens, E., Jamil, M., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Yang, W.C., Hooiveld, G.J., Charnikhova, T., Bouwmeester, H.J., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2011). Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the

symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23**, 3853-3865.

Lohse, S., Hause, B., Hause, G., and Fester, T. (2006). FtsZ characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1124-1134.

Lu, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O., and Jenks, M.A. (2009). Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal* **59**, 553-564.

Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y., and Hayashi, M. (2008). Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 375–382.

Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., Ishiguro, S., and Nakamura, K. (2009). An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant Journal* **60**, 476-487.

Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Bécard, G., and Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58-63.

Manthey, K., Krajinski, F., Hohnjec, N., Firnhaber, C., Pühler, A., Perlick, A.M., and Küster, H. (2004). Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1063-1077.

- Marleau, J., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., and Hijri, M.** (2011). Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Evolutionary Biology* **11**, 51.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J., Bird, D.A., and Samuels, A.L.** (2010). *Arabidopsis* ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* **22**, 3066-3075.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., and Swan, J.A.** (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **115**, 495-501.
- Messinese, E., Mun, J.H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lounnon, G., Schornack, S., Bono, J.J., Cook, D.R., and Ané, J.M.** (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 912-921.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., and Long, S.R.** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4701-4705.
- Mosse, B.** (1973). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. in soil given additional phosphate. *New Phytologist* **72**, 127-136.
- Murray, J.D., Cousins, D.R., Jackson, K.J., and Liu, C.** (2013). Signaling at the root surface: the role of cutin monomers in mycorrhization. *Molecular Plant* **6**, 1381-1383.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**, 34-41.

- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* **140**, 411-432.
- 西尾道德. (2005) 農業と環境汚染—日本と世界の土壌環境政策と技術. 農山漁村文化協会. 東京.
- Niwa, Y., Hirano, T., Yoshimoto, K., Shimizu, M., and Kobayashi, H.** (1999). Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant Journal* **18**, 455-463.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlen, M., and Nielsen, J.** (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **40**, 10084-10097.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., and Schweizer, P.** (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* **22**, 3130-3141.
- Oldroyd, G.E.D.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 252-263.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2011). The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytologist* **190**, 113-124.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Bocobza, S., Franke, R.B., Schreiber, L., and Aharoni, A.** (2010). The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Molecular Plant* **3**, 563-575.
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Höfer, R., Schreiber, L., Chory, J., and Aharoni, A.** (2007). The Arabidopsis *DESPERADO/AtWBC11* transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology* **145**, 1345-1360.

- Parniske, M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 763-775.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, A.L.** (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**, 702-704.
- Pimprikar, P., Carbonnel, S., Paries, M., Katzer, K., Klingl, V., Bohmer, M.J., Karl, L., Floss, D.S., Harrison, M.J., Parniske, M., and Gutjahr, C.** (2016). A CCaMK-CYCLOPS-DELLA complex activates transcription of RAM1 to regulate arbuscule branching. *Current Biology* **26**, 987-998.
- Pumplin, N., Mondo, S.J., Topp, S., Starker, C.G., Gantt, J.S., and Harrison, M.J.** (2010). *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* **61**, 482-494.
- Reddy D M R, S., Schorderet, M., Feller, U., and Reinhardt, D.** (2007). A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Journal* **51**, 739-750.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H.** (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11841-11843.
- Rich, M.K., Schorderet, M., Bapaume, L., Falquet, L., Morel, P., Vandenbussche, M., and Reinhardt, D.** (2015). The petunia GRAS transcription factor ATA/RAM1 regulates symbiotic gene expression and fungal morphogenesis in arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **168**, 788-797.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K.** (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C.J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P., and Bahler, J.** (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nature Genetics* **36**, 809-817.

- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., and Kawaguchi, M.** (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**, 610-624.
- Salas, J.J., and Ohlrogge, J.B.** (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403**, 25-34.
- Salvioli, A., Ghignone, S., Novero, M., Navazio, L., Venice, F., Bagnaresi, P., and Bonfante, P.** (2016). Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME Journal* **10**, 130-144.
- Schliemann, W., Ammer, C., and Strack, D.** (2008). Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **69**, 112-146.
- Schmitz, A.M., and Harrison, M.J.** (2014). Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**, 250-261.
- Schnurr, J., Shockey, J., and Browse, J.** (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 629-642.
- Schnurr, J.A., Shockey, J.M., de Boer, G.J., and Browse, J.A.** (2002). Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 1700-1709.
- Sędziewska Toro, K., and Brachmann, A.** (2016). The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics* **17**, 101.

- Shimakata, T., and Stumpf, P.K.** (1982). Isolation and function of spinach leaf beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 5808-5812.
- Shockey, J.M., Fulda, M.S., and Browse, J.A.** (2002). Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiology* **129**, 1710-1722.
- Si, Y.** (2012). Model-based clustering for RNA-seq data (R package version 1.0).
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M.** (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* **15**, 139-152.
- Smith, S.E., and Read, D.** (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition) (London: Academic Press).
- Stiller, J., Martirani, L., Tupple, S., Chian, R.J., Chiurazzi, M., and Gresshoff, P.M.** (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1357-1365.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.
- Sugimura, Y., and Saito, K.** (2016). Transcriptional profiling of arbuscular mycorrhizal roots exposed to high levels of phosphate reveals the repression of cell cycle-related genes and secreted protein genes in *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza* doi:10.1007/s00572-016-0735-y.
- Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K.** (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* **14**, 219.

- Sun, J., Miller, J.B., Granqvist, E., Wiley-Kalil, A., Gobbato, E., Maillet, F., Cottaz, S., Samain, E., Venkateshwaran, M., Fort, S., Morris, R.J., Ane, J.M., Denarie, J., and Oldroyd, G.E.** (2015). Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell* **27**, 823-838.
- Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Parniske, M.** (2009). Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **58**, 766-777.
- Takeda, N., Tsuzuki, S., Suzaki, T., Parniske, M., and Kawaguchi, M.** (2013). *CERBERUS* and *NSP1* of *Lotus japonicus* are common symbiosis genes that modulate arbuscular mycorrhiza development. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1711-1723.
- Takeda, N., Handa, Y., Tsuzuki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kawaguchi, M.** (2015). Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **167**, 545-557.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Tang, N., San Clemente, H., Roy, S., Bécard, G., Zhao, B., and Roux, C.** (2016). A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Frontiers in Microbiology* **7**, 233.
- Taylor, T.N., Remy, W., Hass, H., and Kerp, H.** (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* **87**, 560-573.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A.S., Kawaguchi, M.,**

- Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S., and Stougaard, J.** (2006). Deregulation of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**, 1153-1156.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., Croll, D., Da Silva, C., Gomez, S.K., Koul, R., Ferrol, N., Fiorilli, V., Formey, D., Franken, P., Helber, N., Hijri, M., Lanfranco, L., Lindquist, E., Liu, Y., Malbreil, M., Morin, E., Poulain, J., Shapiro, H., van Tuinen, D., Waschke, A., Azcón-Aguilar, C., Bécard, G., Bonfante, P., Harrison, M.J., Küster, H., Lammers, P., Paszkowski, U., Requena, N., Rensing, S.A., Roux, C., Sanders, I.R., Shachar-Hill, Y., Tuskan, G., Young, J.P.W., Gianinazzi-Pearson, V., and Martin, F.** (2012). The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* **193**, 755-769.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frey, N.F.D., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L.B., Handa, Y., Herr, J.R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P.J., Masclauxm, F.G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., Clemente, H.S., Shapiro, H., Van Tuinen, D., Becard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y.Y., Tuskan, G.A., Young, P.W., Sanders, I.R., Henrissat, B., Rensing, S.A., Grigoriev, I.V., Corradi, N., Roux, C., and Martin, F.** (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20117-20122.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., and Baud, S.** (2012). WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 5007-5023.
- Tomato Genome Consortium.** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635-641.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L.** (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-1111.

- Trepanier, M., Becard, G., Moutoglis, P., Willemot, C., Gagne, S., Avis, T.J., and Rioux, J.A.** (2005). Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5341-5347.
- Trouvelot, A., Kough, J.L., and Gianinazzi-Pearson, V.** (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme racinaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi, eds (Paris: INRA Press), 217-221.
- Tsuzuki, S., Handa, Y., Takeda, N., and Kawaguchi, M.** (2016). Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is required for the establishment of symbiosis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**, 277-286.
- Urbański, D.F., Malolepszy, A., Stougaard, J., and Andersen, S.U.** (2012). Genome-wide *LORE1* retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **69**, 731-741.
- Vijayakumar, V., Liebisch, G., Buer, B., Xue, L., Gerlach, N., Blau, S., Schmitz, J., and Bucher, M.** (2016). Integrated multi-omics analysis supports role of lysophosphatidylcholine and related glycerophospholipids in the *Lotus japonicus-Glomus intraradices* mycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell & Environment* **39**, 393-415.
- Voelker, T.** (1996). Plant acyl-ACP thioesterases: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. *Genetic Engineering (N Y)* **18**, 111-133.
- Wang, B., Yeun, L.H., Xue, J.Y., Liu, Y., Ané, J.M., and Qiu, Y.L.** (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist* **186**, 514-525.
- Wang, C., Gong, B., Bushel, P.R., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Xu, J., Fang, H., Hong, H., Shen, J., Su, Z., Meehan, J., Li, X., Yang, L., Li, H., Labaj, P.P., Kreil, D.P., Megherbi, D., Gaj, S., Caiment, F., van Delft, J., Kleinjans,**

- J., Scherer, A., Devanarayan, V., Wang, J., Yang, Y., Qian, H.R., Lancashire, L.J., Bessarabova, M., Nikolsky, Y., Furlanello, C., Chierici, M., Albanese, D., Jurman, G., Riccadonna, S., Filosi, M., Visintainer, R., Zhang, K.K., Li, J., Hsieh, J.H., Svoboda, D.L., Fuscoe, J.C., Deng, Y., Shi, L., Paules, R.S., Auerbach, S.S., and Tong, W. (2014).** The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nature Biotechnology* **32**, 926-932.
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., and Oldroyd, Giles E.D. (2012).** A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology* **22**, 2242-2246.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009).** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* **10**, 57-63.
- Watanabe, F.S., and Olsen, S.R. (1965).** Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in sater and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Science Society of America Journal* **29**, 677-678.
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J., and Browse, J. (2010).** Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* **231**, 1089-1100.
- Wewer, V., Brands, M., and Dörmann, P. (2014).** Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *Plant Journal* **79**, 398-412.
- Wu, G.Z., and Xue, H.W. (2010).** *Arabidopsis* β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase I is crucial for fatty acid synthesis and plays a role in chloroplast division and embryo development. *Plant Cell* **22**, 3726-3744.
- Wulf, A., Manthey, K., Doll, J., Perlick, A.M., Linke, B., Bekel, T., Meyer, F., Franken, P., Küster, H., and Krajinski, F. (2003).** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 306-314.

- Xue, L., Cui, H., Buer, B., Vijayakumar, V., Delaux, P.M., Junkermann, S., and Bucher, M.** (2015). Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **167**, 854-871.
- Yang, S.Y., Grønlund, M., Jakobsen, I., Grotemeyer, M.S., Rentsch, D., Miyao, A., Hirochika, H., Kumar, C.S., Sundaresan, V., Salamin, N., Catausan, S., Mattes, N., Heuer, S., and Paszkowski, U.** (2012a). Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* gene family. *Plant Cell* **24**, 4236-4251.
- Yang, W., Pollard, M., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Feig, M., and Ohlrogge, J.** (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with *sn*-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12040-12045.
- Yang, W., Simpson, J.P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J.B.** (2012b). A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, *sn*-2 preference, and evolution. *Plant Physiology* **160**, 638-652.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., and Parniske, M.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20540-20545.
- Yeats, T.H., and Rose, J.K.** (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* **163**, 5-20.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Matsuda, F., Nakabayashi, R., Takayama, H., Niida, R., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., and Saito, K.** (2008). Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene–metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 2160-2176.

- Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., and Sekimoto, H.** (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**, 1031-1038.
- Yu, N., Luo, D., Zhang, X., Liu, J., Wang, W., Jin, Y., Dong, W., Liu, J., Liu, H., Yang, W., Zeng, L., Li, Q., He, Z., Oldroyd, G.E., and Wang, E.** (2014). A DELLA protein complex controls the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Cell Research* **24**, 130-133.
- Zhang, Q., Blaylock, L.A., and Harrison, M.J.** (2010). Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **22**, 1483-1497.
- Zhang, X., Pumplin, N., Ivanov, S., and Harrison, Maria J.** (2015). EXO70I is required for development of a sub-domain of the periarbuscular membrane during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Biology* **25**, 2189-2195.
- Zhao, L., Katavic, V., Li, F., Haughn, G.W., and Kunst, L.** (2010). Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in Arabidopsis seed oil biosynthesis. *Plant Journal* **64**, 1048-1058.

謝辞

本研究を遂行するにあたって、指導教員である信州大学学術研究院（農学系）齋藤勝晴准教授には終始丁寧かつ熱心なご指導を頂きました。ここに謹んで感謝の意を表します。

また、本論文の提出と審査におきましては、信州大学農学部 植物栄養学研究室 井上直人 教授、雑草学研究室 渡邊修 准教授、植物病理学研究室 加藤新平 准教授、基礎生物学研究所 川口正代司 教授の御高閲と御教示を賜りました。心より深く感謝を申し上げます。

基礎生物学研究所 半田佳宏 研究員、武田直也 助教には、RNA-seq 解析法に関するアドバイスや *LjERM* 遺伝子発現抑制系統の提供、プロモーター解析など、多大なる御助力を頂きました。

リピドーム解析は、「植物科学最先端研究拠点ネットワーク」の支援を受けて、理化学研究所 岡咲洋三 研究員、斉藤和季グループディレクターのご協力を頂きました。

レーザーマイクロダイセクションや共焦点レーザー顕微鏡、バイオアナライザは、信州メディカルシーズ育成拠点の支援を受けました。ミヤコグサとトマト種子および pUB-GWS-Hyg ベクターは宮崎大学ナショナルバイオリソースプロジェクトより、pGWB3 ベクターは島根大学 中川強 教授より分譲していただきました。ミヤコグサ *LORE1* タグラインについては、デンマーク Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling から提供していただきました。この場を借りて、深く感謝いたします。

土壌生物学研究室の皆様には、研究からプライベートに至るまでお世話になりました。充実した研究生活を送ることができたのも、皆様の協力があつてこそです。

最後になりますが、研究生活の充実や学費の工面をして頂いた家族には心より感謝いたします。本当にありがとうございました。

要旨

近年、リン酸質肥料の価格が高騰し農業生産費を押し上げており、長期的には原料のリン鉱石の枯渇も懸念されている。作物のリン酸質肥料の利用効率は施肥量の 10%程度と極めて低いことから、肥料の効率的な利用のため、菌根を利用した生産システムの構築が期待されている。アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は多くの植物種の根に共生して土壤中のリンを植物へ供給し、植物の成長を促進する効果（菌根効果）を持つ。しかし、栽培や環境条件によって菌根共生の発達は大きく変動するため、得られる菌根効果も変動する。特に、高濃度リン酸の土壌では菌根形成が抑制され、菌根効果が低下する。安定的な菌根形成の維持や共生機能発現の制御には、アーバスキュラー菌根共生の形成メカニズムの解明が必要である。

菌根形成の過程で、AM 菌が根の内部に侵入し、皮層細胞内に養分交換の場所である樹枝状体を形成する。このとき植物は、AM 菌から放出されるシグナル分子を受容し共生のシグナル伝達経路を活性化させることで、菌根形成や共生機能に関わる遺伝子の発現を誘導する。本研究では、アーバスキュラー菌根形成の分子メカニズムを解明するため、RNA-seq 解析を用いて菌根形成に関連する遺伝子を網羅的に抽出するとともに、それら遺伝子の機能解析を行った。

第 2 章では、菌根応答性遺伝子の植物種間における共通性と独自性を調べるために、トマトとミヤコグサの菌根応答性遺伝子を比較した。非感染根に対して感染根で誘導される遺伝子を抽出し植物間で比較すると、菌根誘導性遺伝子の約 3 割が植物間で共通していた。これらの遺伝子には菌根形成に関与する遺伝子が多く含まれており、共通して発現誘導される遺伝子には菌根形成遺伝

子が濃縮されていると考えられた。一方、植物種特異的に誘導される遺伝子は低誘導性のものが大部分であったことから、これらの遺伝子の大半は二次的な影響で発現変動したと考えられた。菌根誘導性遺伝子の抽出には、非感染根と感染根の比較が必ずしも最善な方法ではないことが示された。

第 3 章では、より効率的かつ網羅的に菌根形成遺伝子を抽出するため、高濃度リン酸を添加することで菌根形成を同期的に抑制し、そのサンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。高濃度リン酸によって樹枝状体密度が低下し、それに伴って発現が低下する遺伝子群が同定された。この遺伝子群をグループ A 遺伝子とした。グループ A 遺伝子には、クチン/スベリン生合成遺伝子および AP2/ERF 転写因子 *LjERM* 遺伝子が含まれており、樹枝状体を含む皮層細胞で強く発現していた。クチン/スベリン生合成遺伝子の 1 つである *LjRAM2* 遺伝子の変異体や *LjERM* 発現抑制系統では、樹枝状体のファインブランチの発達が著しく阻害され未成熟な状態であった。グループ A 遺伝子には、樹枝状体の形成に関与する遺伝子が濃縮されていると考えられる。*LjERM* の発現レベルを RNAi で抑制すると、いくつかのクチン/スベリン生合成遺伝子では非感染根と同じレベルにまで発現が低下した。最近、AM 菌は脂肪酸合成遺伝子を欠損していることが報告されており、自身では脂肪酸を合成できず、外部から脂肪酸を獲得していると考えられている。本研究の知見と合わせて考察すると、菌根共生が成立する過程では、*LjERM* 転写因子が「クチン/スベリン様物質」合成遺伝子の一部の発現を誘導し、合成されたクチン/スベリン様物質が植物から AM 菌へ輸送され、AM 菌は栄養源としてそれらを利用している可能性がある。

第 4 章では、高濃度リン酸添加した菌根を用いて AM 菌側の RNA-seq 解析を行い、菌根形成に関わる AM 菌遺伝子の抽出を試みた。発現変動する遺伝子を調べると、高濃度リン酸による菌根抑制に伴って、細胞周期制御遺伝子であ

る *CDK1* や DNA 複製遺伝子、細胞分裂関連遺伝子の発現が低下した。また、20 個以上の分泌タンパク質遺伝子も発現低下した。菌根形成が健全に進行するには、分泌タンパク質を介した AM 菌－植物間のコミュニケーションと AM 菌の増殖に伴う核分裂の活性化が必要と考えられた。

第 5 章では菌根形成の分子機構について総合考察を行った。従来、植物の菌根応答性遺伝子の同定に感染根と非感染根の比較によるトランスクリプトーム解析が行われてきたが、この方法は必ずしも最適な方法ではないことを指摘した。この課題を克服するため、高濃度リン酸で同調的に菌根形成を抑制する実験系を構築し、高濃度リン酸で発現低下するグループ A 遺伝子に菌根形成に関与する遺伝子が濃縮されていることが示唆された。さらに、クチン/スベリン合成遺伝子は樹枝状体形成に重要な役割を果たすことが考えられ、クチン/スベリン様物質が植物から AM 菌へ栄養として移行するモデルを提唱した。