

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780062

研究課題名(和文)アーバスキュラー菌根のリン酸輸送メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of phosphate transport in arbuscular mycorrhiza

研究代表者

齋藤 勝晴(SAITO, Katsuharu)

信州大学・農学部・准教授

研究者番号：40444244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：菌根のリン酸輸送の分子メカニズムを明らかにするため、ミヤコグサの菌根特異的酸性ホスファターゼ遺伝子LjPAP3をノックダウンしたところ、リン吸収が抑制され菌根菌中にポリリン酸が蓄積してしまうことを明らかにした。このことからLjPAP3が共生のリン酸輸送に関与することが示唆された。また、菌根菌のポリリン酸合成酵素遺伝子VTC1、VTC2、VTC4を同定し、VTC4はポリリン酸を合成することを示した。

研究成果の概要(英文)：Phenotype of LjPAP3 knockdown in *Lotus japonicus* was evaluated to elucidate the molecular mechanism of phosphate transport in arbuscular mycorrhiza. The knockdown plants were defective in phosphate uptake. Arbuscular mycorrhizal fungi colonized in the knockdown plants had much more polyphosphate than in the wild-type plants. These results suggested that LjPAP3 is involved in phosphate transport via a mycorrhizal symbiosis. Polyphosphate polymerases of arbuscular mycorrhizal fungus were identified: VTC1, VTC2 and VTC4. The VTC4 generated polyphosphate from ATP.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：共生 菌根 リン酸 ポリリン酸 酸性ホスファターゼ ミヤコグサ 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

菌根菌は、植物の根に感染し、土壌から吸収したリン酸を植物に供給する。菌系内のリンはオルトリン酸の形で放出され植物に吸収されると考えられてきたが、これまでの我々の研究から、リンはポリリン酸の形で放出されることが示唆された (Kuga et al. 2008)。また、我々は、ポリリン酸を分解すると思われる植物のホスファターゼ遺伝子を同定した。本研究では、菌根のリン酸輸送の分子メカニズムを明らかにするため、同定したホスファターゼ遺伝子をノックダウンし、ポリリン酸の挙動を追うとともに、植物と菌根菌双方のポリリン酸代謝に関わる酵素の機能解析を行い、菌根のリン酸輸送のモデルを構築する。

2. 研究の目的

菌根は、菌根菌と呼ばれる真菌類と植物根との共生である。植物は菌根菌と共生することで、リン酸の吸収が増加する。ここ数年リン酸質肥料の価格は高騰し農業生産費を押し上げている。長期的には、リン鉱石の枯渇や化学肥料生産によるCO₂排出量の増大が懸念されている。リン酸肥料の利用効率は10%程度と特に低く、申請者は菌根を利用した肥料利用効率の高い生産システムの構築を目指している。しかし、圃場で菌根の働きを評価する有効な指標は今のところない。本研究では、菌根機能を評価する有効な指標を見出すため、リン酸輸送に関わる植物と菌根菌の遺伝子・タンパク質・生体分子を解析し、菌根のリン酸輸送の分子メカニズムを明らかにする。

具体的には、我々がここ数年間で得た知見から「菌根菌は細胞壁成分としてポリリン酸を分泌し、植物の酸性ホスファターゼによりポリリン酸はオルトリン酸に分解され、それを植物が吸収する」という作業仮説を立て検証を進める。従来の仮説は、「オルトリン酸が菌のリン酸トランスポーターによって排出され、それを植物が吸収する」というものであり、この仮説は全く新しいアイデアに基づいたものである。本研究では、リンの輸送を(Ⅰ)菌根菌と(Ⅱ)境界域そして(Ⅲ)植物に分けて作業仮説を検証する。

(Ⅰ) 菌根菌

植物の養分交換の場である樹枝状体には、ポリリン酸が蓄積する (Funamoto et al. 2007)。ポリリン酸は菌系内で分解と合成を繰り返していると考えられるが、それらに関わる酵素は菌根菌では同定されておらず、ポリリン酸の代謝は不明である。近年、酵母から真核生物で初めてポリリン酸合成酵素 VTC が同定されて (Hothorn et al. 2009)、菌根菌もポリリン酸合成酵素 VTC のホモログ遺伝子を持っている可能性がある。

(Ⅱ) 境界域

我々は、菌系の細胞壁にもポリリン酸が蓄積することを明らかにし、リンがポリリン酸

の形で菌系から放出される可能性を示した (Kuga et al. 2008)。しかし、樹枝状体の細胞壁にはポリリン酸が蓄積しておらず、境界域の強い酸性ホスファターゼ活性によりポリリン酸が分解されている可能性がある。また、ミヤコグサの樹枝状体で発現する菌根特異的パープル酸性ホスファターゼ遺伝子 *LjPAP3* を同定しており、*LjPAP3* がポリリン酸分解に関与するかどうか検討が必要である。

(Ⅲ) 植物

境界領域のオルトリン酸は植物のリン酸トランスポーター (PT) によって植物細胞に取り込まれることが多く報告されている (Harrison et al. 2002; Maeda et al. 2006)。

菌根のリン酸輸送の分子メカニズムを明らかにするため、2つの課題に取り組んだ。

(1) 菌根菌のポリリン酸分解・合成酵素の同定と機能解析。菌根菌のゲノム情報を利用し、ポリリン酸合成酵素 VTC と分解酵素 PPN のクローニングを行った。次に、VTC を大腸菌で発現させ、生化学的にポリリン酸代謝特性を解析した。(2) ミヤコグサ酸性ホスファターゼのポリリン酸代謝。ミヤコグサの *LjPAP3* ノックダウンシステムを作製し、ポリリン酸可視化技術で菌根のポリリン酸局在を電顕で解析した。さらに、免疫電顕による *LjPAP3* の局在解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 菌根菌のポリリン酸分解・合成酵素の同定と機能解析

菌根菌ゲノムプロジェクトで得られたゲノム情報をもとに菌根菌のポリリン酸合成酵素 VTC と分解酵素 PPN のクローニングを行った。各遺伝子の塩基配列から相同性解析と系統解析を行った。大腸菌または酵母のタンパク質発現系を用いて VTC または PPX タンパク質を発現・精製する。VTC は膜タンパク質であるため、可溶性の活性部位のみを発現させる。各タンパク質のポリリン酸代謝特性を調べるため、親和性や基質特異性、活性剤・阻害剤の効果を解析する。

(2) ミヤコグサ酸性ホスファターゼのポリリン酸代謝

ミヤコグサの菌根特異的酸性ホスファターゼ *LjPAP3* の RNAi ノックダウンシステムを作製し、菌根菌のポリリン酸局在を解析した。RNAi システムはアグロバクテリアを用いた形質転換法により作製した。ポリリン酸ラベリングは、菌根切片をポリリン酸結合タンパク質でインキュベートし、次にポリリン酸結合タンパク質を認識する抗体で免疫染色することで局在を可視化した。さらに、*LjPAP3* の局在を明らかにするため、*LjPAP3* のペプチド抗体を作製し免疫電顕を行った。

4. 研究成果

(1) 菌根菌のポリリン酸分解・合成酵素の同定と機能解析

ポリリン酸代謝に関わるポリリン酸合成酵素 VTC とエンドポリホスファターゼ PPN 遺伝子について遺伝子同定を行った。対象菌根菌は、ゲノム解読が進行している *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 である。VTC については VTC1, VTC2, VTC4 をクローニングし、PPN については PPN1, PPN2, PPN3, PPN4 をクローニングした。遺伝子発現量を RNA-seq で解析したところ、VTC4 は内生菌系と外生菌系でほとんど同じ発現レベルであり、ポリリン酸合成は両組織で行われていると考えられる。PPN1 と PPN2 は内生菌系で高い遺伝子発現量を示し、これらの遺伝子産物は内生菌系で主に働いていると考えられる。

ポリリン酸合成活性を示すと考えられる VTC4 を大腸菌タンパク質発現系を用いて発現・精製し酵素活性の評価を行った。pTrc ベクターにアーバスキュラー菌根菌 *R. irregularis* の VTC4 を導入し、*E. coli* ArcticExpress を用いて VTC4 タンパク質を発現させた。アフィニティーカラムクロマトグラフィで約 35kDa の VTC4 タンパク質を精製しポリリン酸合成能を評価したところ、VTC4 は ATP を基質としてポリリン酸を合成することを明らかにした。ポリリン酸合成酵素はこれまで出芽酵母でしか詳細な解析は行われていないが、本研究から酵母以外の菌類で VTC の活性を示すことができた。出芽酵母は VTC1/VTC2/VTC4 複合体と VTC1/VTC3/VTC4 複合体を形成することが知られているが、菌根菌のポリリン酸合成酵素は VTC1, VTC2, VTC4 からなる複合体を形成し、ATP を基質としてポリリン酸を合成すると考えられた。

(2) ミヤコグサ酸性ホスファターゼのポリリン酸代謝

菌根菌感染で発現上昇するパープル酸性ホスファターゼ *LjPAP3* 遺伝子について機能解析を行った。*LjPAP3* 遺伝子の発現を抑制したミヤコグサを作製するため、RNAi 形質転換を試みた。RNAi 系統の表現型の解析を行った。RNAi 系統の *LjPAP3* 遺伝子発現レベルを確認したところ、空ベクターを導入したコントロール系統に比べ発現量が 3-12% にまで抑制されていた。*LjPAP3* RNAi 系統の菌根菌感染率はコントロール系統に比べて若干低下するものの、菌系の感染形態には異常は見られなかった。RNAi 系統の乾物生産とリン吸収量を調査したところ、菌根菌非接種の条件では乾重、リン含量ともコントロールと違いは見られなかった。一方で、菌根菌を接種した場合には、RNAi 系統の乾物とリン吸収量はコントロールに比べ有意に低下した。これらのことから、ミヤコグサの *LjPAP3* 遺伝子は菌根を介したリン吸収や乾物生産に関与することが示唆された。また、RNAi 系統に感染する菌根菌のポリリン酸局在を免疫電顕で調査したところ、野生型では樹枝状体のファインブランチと呼ばれる菌糸体にポリリン酸が認められなかったのに対し、RNAi 系統では菌糸内部や細胞壁にポリリン酸が観察された。こ

のことは、野生型ではポリリン酸が樹枝状体まで運ばれ、菌糸内や細胞壁まで輸送されるものの、*LjPAP3* の作用をうけて加水分解するため、野生型では樹枝状体にポリリン酸が検出されないと考えられる。さらに詳細に RNAi 系統の表現型を解析したところ、感染する菌根菌のポリリン酸局在が樹枝状体のファインブランチと呼ばれる養分交換の場所に蓄積していることが分かった。ポリリン酸はファインブランチの菌糸内に分布するとともに細胞壁にも蓄積していることが観察された。細胞壁にポリリン酸が存在するということは、菌体中のリンがポリリン酸として細胞外に分泌されていることを意味している。空ベクターを導入したコントロール植物ではファインブランチにポリリン酸が観察されなかったことから、*LjPAP3* はポリリン酸の分解に直接あるいは間接的に関与することで、菌根菌から植物へのリンの流入に重要な役割を果たしていると考えられる。

従来の仮説では、ポリリン酸は菌糸内でオルトリン酸まで分解され、何らかのメカニズムでオルトリン酸が菌体から放出されると考えられてきたが、我々の観察ではリンがポリリン酸として菌体外に放出されることを明らかとした(図1)。植物はパープル酸性ホスファターゼでポリリン酸をオルトリン酸まで分解し吸収しているのかもしれない。今後、*LjPAP3* の生化学的解析を行い、ポリリン酸代謝に関与するかどうか検証が必要である。

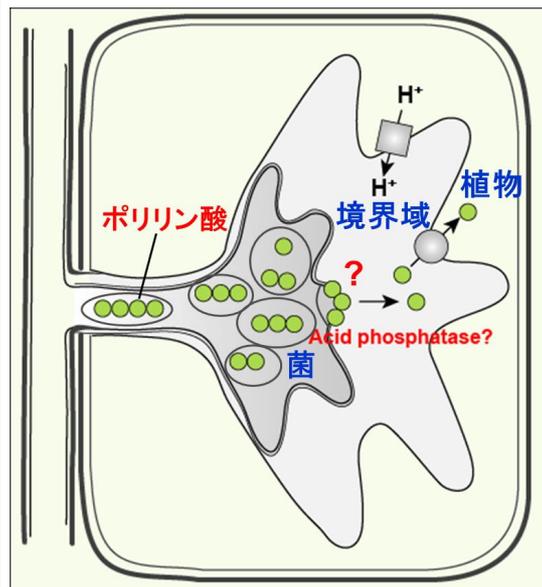


図1. 菌根の樹枝状体におけるリン酸輸送のモデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Funamoto R., K. Saito, H. Oyaizu, T.

- Aono and M. Saito. Vacuolar pH of living hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. (in press) doi: 10.1007/s00572-014-0588-1 査読有
2. 小八重善裕・東樹宏和・山本哲史・竹本大吾・江沢辰広・河原愛・荒川竜太・齋藤勝晴・中川知己. 菌根共生からみる植物栄養の新時代. 日本土壌肥科学雑誌. 印刷中. 査読無
 3. 齋藤勝晴 (2014) 草地・耕地生態系の菌根の生理生態と利用 はじめに .日本草地学会誌 . 59, 261-262.
 4. Kojima, T., K. Saito, H. Oba, Y. Yoshida, J. Terasawa, Y. Umehara, N. Suganuma, M. Kawaguchi and R. Ohtomo. (2014) Isolation and phenotypic characterization of *Lotus japonicus* mutants specifically defective in arbuscular mycorrhizal formation. *Plant and Cell Physiology*. 55, 928-941. doi:10.1093/pcp/pcu024 査読有
 5. Tisserant, E., M. Malbreil, A. Kuo, A. Kohler, A. Symeonidi, R. Balestrini, P. Charron, N. Duensing, N. F. dit Frey, V. Gianinazzi-Pearson, B. Gilbert, Y. Handa, J. Herr, M. Hijri, R. Koul, M. Kawaguchi, F. Krajinski, P. Lammers, F. G. Masclaux, C. Murat, E. Morin, S. Ndikumana, M. Pagni, D. Petitpierre, N. Requena, P. Rosikiewicz, R. Riley, K. Saito, H. S. Clemente, H. Shapiro, D. van Tuinen, G. Bécard, P. Bonfante, U. Paszkowski, Y. Shachar-Hill, G. A. Tuskan, J. P. W. Young, I. R. Sanders, B. Henrissat, S. A. Rensing, I. V. Grigoriev, N. Corradi, C. Roux and F. Martin (2013) The genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insights into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 20117-20122. doi:10.1073/pnas.1313452110. 査読有
 6. Gomes, F. M., D. B. Carvalho, A. C. Peron, K. Saito, K. Miranda and E. A. Machado. (2012) Inorganic polyphosphates are stored in spherites within the midgut of *Anticarsia gemmatalis* and play a role in copper detoxification. *Journal of Insect Physiology*. 58, 211-219. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.09.008. 査読有
 7. 坂本一憲・秋山康紀・林英雄・磯部勝孝・江沢辰広・菊池裕介・土方野分・俵谷圭太郎・伊豆進・齋藤勝晴 (2012) アーバスキュラー菌根菌:研究の最前線と土壌肥料分野への貢献. 日本土壌肥科学雑誌. 83, 216-221. 査読無
 8. Ramos, I., F. Gomes, C. M. Koeller, K. Saito, N. Heise, H. Masuda, R. Docampo, W. de Souza, E. A. Machado and K. Miranda. (2011) Acidocalcisomes as calcium- and polyphosphate-storage compartments during embryogenesis of the insect *Rhodnius prolixus* Stahl. *PLoS One*. 6, e27276. doi:10.1371/journal.pone.0027276. 査読有
 9. 齋藤勝晴・林誠 (2011) アーバスキュラー菌根菌との共生. 細胞工学. 30, 149-154. 査読無
- [学会発表](計6件)
1. Saito, K., Osada, Y., Nakiri, K., Saito, M. and Ezawa, T. (2013.1.6-11) *LjPAP3* encoding purple acid phosphatase involved in P-transfer in the plant-fungal interface of arbuscular mycorrhiza. 7th International Conference on Mycorrhiza (ICOM7). India Habitat Centre. New Delhi, India.
 2. 齋藤勝晴・名切孝介・松本忠太・齋藤雅典・江沢辰広 (2012・9・4) 菌根誘導性パープル酸性ホスファターゼの RNAi 系統を用いたポリリン酸局在解析. 日本土壌肥科学会鳥取大会
 3. Saito, K., Osada, Y., Nakiri, K., Nishimura, A., Matsumoto, C., Saito, M. and Ezawa, T. (2012.7.29-8.2) Localization of polyphosphate in arbuscular mycorrhizal fungus colonizing in *Lotus japonicus*. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions 2012 XV International Congress. Kyoto
 4. 齋藤勝晴・長田泰幸・西村あおい・上原洋平・名切孝介・間瀬ひろみ・松本忠太・齋藤雅典・江沢辰広 (2011・12・10) 菌根共生で誘導されるパープル酸性ホスファターゼ *LjPAP3* の機能解析. 菌根研究会. 広島大学.
 5. 長田泰幸・名切孝介・齋藤勝晴 (2011・9・20) 菌根の樹枝状体におけるポリリン酸局在と酸性ホスファターゼ活性の相関. 植物微生物研究会. 岡山大学.
 6. 上原洋平・江沢辰広・齋藤勝晴 (2011・8・8) 菌根共生で誘導されるパープル酸性ホスファターゼ *LjPAP3* の局在解析. 日本土壌肥科学会. つくば
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
齋藤 勝晴 (SAITO, Katsuharu)
信州大学・農学部・准教授
研究者番号: 40444244