

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 杉村 悠作 |
| 学位の種類 | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 甲 第 71 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 29 年 3 月 20 日 |
| 学位授与の要件 | 信州大学学位規程第 5 条第 1 項該当 |
| 学位論文題目 | 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 |
| 論文審査委員 | 主査 准教授 齋藤 勝晴 教授 井上 直人 准教授 渡邊 修 准教授 加藤 新平 教授 川口 正代司（基礎生物学研究所） |

論 文 内 容 の 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壌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。