

氏 名 都築 周作

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1845 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 アーバスキュラー菌根菌 *Rhizophagus irregularis* の共生確立
に要求されるストリゴラクトン誘導型推定分泌性タンパク質の
同定

論文審査委員 主 査 教授 長谷部 光泰
教授 川口 正代司
准教授 重信 秀治
教授 秋山 康紀 大阪府立大学大学院

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis is the most widespread mutualistic association between plants and fungi. Through this symbiosis, AM fungi provide host plants with inorganic nutrients such as phosphorus and nitrogen compounds from the soil. In return, the AM fungi receive carbohydrates derived from photosynthetic products from the plants. Root colonization by AM fungi greatly promotes the growth of host plants, especially in oligotrophic soils.

In the pre-symbiotic stage, AM fungi randomly elongate hyphae to explore host roots. When the hyphae come close to plant roots, they perceive strigolactones (SLs) that are present in the rhizosphere. SLs are a kind of phytohormone that was identified as a signal factor for AM fungi. SLs enhance metabolic processes and increase hyphal branching and elongation in the AM fungi. These processes facilitate direct contact between the AM fungi and host plants. After hyphal entrance into the host root, AM fungi form a characteristic densely-branched hyphal structure called the arbuscule in the cortical tissue of the root, where the nutrient exchange is undertaken.

AM fungi are difficult to be studied because they are obligate symbionts that do not produce next generation spores without symbiosis with host plants. Therefore, molecular mechanisms of AM fungal infection of plant roots are poorly understood. To provide novel insights into the molecular mechanisms of AM symbiosis, I screened and investigated genes of the AM fungus *Rhizophagus irregularis* that contribute to the infection of host plants.

To compare comprehensive gene expression profiles of *R. irregularis* between the pre-symbiotic and symbiotic stages, RNA-sequencing (RNA-seq) analysis was performed in the non-symbiotic germinating spores (control), SL-treated germinating spores, and symbiotic hyphae outside host roots. Carrot (*Daucus carota*) roots were used as the host roots. The RNA-seq analysis revealed that 19 genes are up-regulated by both treatment with SL and symbiosis. It was interesting that 11 of the 19 genes were predicted to encode small proteins with secretory signal peptides at their N-terminal ends. Then I performed real-time quantitative reverse transcription (qRT)-PCR analysis to verify the result of the RNA-seq analysis. The qRT-PCR analysis demonstrated that at least 5 genes of the 11 genes are induced during both SL treatment and symbiosis.

Among the 5 putative secreted protein genes, *SL-induced putative secreted protein 1* (*SIS1*) showed the largest induction under the both conditions. To analyze the functions of *SIS1* during AM symbiosis, *SIS1* was then characterized by a reverse genetic approach using host-induced gene silencing (HIGS) because a method for the direct transformation of AM fungi has not yet been developed. HIGS causes RNAi in the fungus via the host plant. I designed a *SIS1*-HIGS construct and transformed *Medicago truncatula* hairy roots with this construct. These transgenic hairy root lines were used for co-culture with *R. irregularis*, and RNAi of *SIS1* was caused within *R. irregularis*-infected host roots. As a result, colonization levels were

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

significantly lower in the SIS1-HIGS roots than in an empty vector (EV) control root line. In accordance with this result, the spore formation numbers in the co-culture with SIS1-HIGS roots were significantly lower than those in the EV control. Furthermore, qRT-PCR analysis confirmed that *SIS1* expression levels in the inner hyphal tissues of the SIS1-HIGS roots were significantly suppressed compared with those in the EV controls. Therefore, the presence of the SIS1-HIGS RNAi construct suppressed expression of *SIS1*, and this suppression was associated with reduced colonization by *R. irregularis* within the SIS1-HIGS host roots. These results imply that *SIS1* is required for infection of host roots by *R. irregularis*.

To further characterize the effects of SIS1-HIGS on AM fungal colonization, I observed in detail the hyphal structures of *R. irregularis* within the SIS1-HIGS hairy roots. The arbuscules in EV control hairy roots were mature and finely branched, whereas the majority of arbuscules in the SIS1-HIGS hairy roots displayed defective morphology. The stunted arbuscules are an indication of incomplete AM symbiosis. These results suggest that SIS1 contributes to the establishment of AM symbiosis in *R. irregularis*.

It can be concluded that SIS1 is a novel putative secreted protein that is induced by both SL treatment and AM symbiosis in *R. irregularis*, and that it positively regulates AM colonization. It is not yet clear how and where SIS1 functions, however, further characterizations of SIS1 functions lead to a better understanding of the mechanisms controlling the establishment of AM symbiosis.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌は多くの陸上植物と相利共生関係を結ぶことが知られている。AM 共生を通して、宿主植物は AM 菌からリンや窒素などの土壌中の無機栄養を受け取り、AM 菌は宿主植物から光合成産物由来の炭素源を受け取る。このような栄養交換によって、無機栄養の乏しい土壌においては、宿主植物の生育が顕著に促進されることが知られている。また、AM 共生は植物の陸上進出初期まで遡ると推定されており、これまで知られている最も古くに成立した菌根共生である。したがって、陸上植物と菌類の共生の成り立ちを理解する上で、AM 共生に関する基礎研究は重要である。出願者は、AM 菌が宿主植物と共生を確立させるメカニズムを解明するため、共生に関与する AM 菌遺伝子の同定を行った。

出願者は、植物シグナル分子であるストリゴラクトン (SL) が AM 菌 *Rhizophagus irregularis* の菌糸伸長を促進することを発見し、SL 添加で発現上昇する遺伝子を RNA-seq 法を用いて網羅的に解析した。次に、ニンジンの根を用いた人工共生系を確立し、共生前後で発現上昇する遺伝子を同様に同定した。そして、両実験で共通に発現上昇する 19 遺伝子を選抜した。予想外に、19 遺伝子のうち 11 遺伝子は、推定分泌タンパク質をコードしており、そのうち 5 遺伝子はリアルタイム qRT-PCR 法によって有意に両条件で発現上昇していることが確認された。

出願者は、これらの 5 遺伝子の中で最も発現上昇率が高く、どの既知遺伝子とも顕著な類似性が見られなかった新規遺伝子を、*SL-induced putative secreted protein 1 (SIS1)* と命名した。AM 共生における *SIS1* の機能を解析するため、宿主植物に siRNA を産生させることで、感染した微生物菌類等に RNAi を引き起こす host-induced gene silencing (HIGS) 法を用いて、*SIS1* の機能抑制実験を行った。その結果、HIGS 法によって *SIS1* を標的にした HIGS を引き起こさせた植物根 (*SIS1*-HIGS 根) に感染させた *R. irregularis* において、確かに *SIS1* の発現量が減少していた。さらにその *SIS1*-HIGS 根内の *R. irregularis* の感染レベルは、コントロール根よりも有意に抑制されていた。また出願者は皮層細胞内に形成される栄養交換器官である樹枝状体の形態を詳細に観察したところ、コントロール根では植物細胞を満たすように菌糸が十分に発達しているのに対して、*SIS1*-HIGS 根ではほとんどの樹枝状体は発達不全であることを発見した。この発達不全の樹枝状体は不完全な AM 共生が起こっていることを示すものである。これらの結果から、*SIS1* が *R. irregularis* の正常な宿主根感染に必要であることが示唆された。

広範な宿主植物域を持つ AM 菌の分泌タンパク質は、宿主植物との相互

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

作用において重要な役割を担う因子として注目されているものの、それらの機能に関する知見は未だ乏しい。出願者の発見した **SIS1** は、**SL** 受容時と共生時に発現が誘導され、かつ感染を正に制御することが示された初めての推定分泌タンパク質であり、今後 **SIS1** の作用機作を明らかにすることによって、**AM** 菌の共生成立のメカニズムの一端が明らかになることが期待される。以上より、本研究は学位授与に相応しいと審査委員全員が一致して判断した。