

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

都築 周作

博士 (理学)

総合研究大学院大学
生命科学研究科
基礎生物学専攻

平成27年度
(2015)

博士論文

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

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

都築 周作

目次

1. 略語	4
2. 序論	
2-1. アーバスキュラー菌根 (AM) 菌の利点	5
2-2. AM 共生の起源	7
2-3. 現在までの AM 共生の研究状況	
2-3-1. AM 菌に関する背景知識	8
2-3-2. 植物側の AM 共生応答に関わる遺伝子群	9
2-3-3. AM 共生シグナルとしてのストリゴラクトン	10
2-3-4. AM 菌の生活環	11
2-3-5. AM 菌の遺伝子に関する先行研究	13
2-3-6. Host-induced gene silencing (HIGS)による遺伝子機能解析	15
2-4. 本研究の概要	16
3. 結果	
3-1. <i>R. irregularis</i> に対する SL の効果の解析	18
3-2. SL 処理と AM 共生の両条件下で発現誘導される <i>R. irregularis</i> 遺伝子の同定	18
3-3. <i>SL-induced putative secreted protein 1</i> の同定	20
3-4. 胞子発芽率と <i>SIS1</i> 発現の経時的解析	21
3-5. HIGS による <i>SIS1</i> の機能解析	
3-5-1. <i>SIS1</i> -HIGS コンストラクトと <i>SIS1</i> -HIGS 毛状根の作製	21
3-5-2. <i>SIS1</i> -HIGS 毛状根における <i>R. irregularis</i> の表現型解析	23

4.	考察	
4-1.	<i>R. irregularis</i> の SL 応答	26
4-2.	<i>R. irregularis</i> の推定分泌タンパク質	27
4-3.	<i>SIS1</i> の経時的発現パターン	28
4-4.	AM 共生中の <i>SIS1</i> の機能	
4-4-1.	<i>SIS1</i> -HIGS 実験における <i>R. irregularis</i> の感染レベル抑制	29
4-4-2.	<i>SIS1</i> -HIGS 実験における樹枝状体の発達不全	30
4-4-3.	<i>SIS1</i> を介した SL の AM 共生制御機構	31
4-5.	<i>SIS1</i> の機能の推測	32
4-6.	総括	33
5.	材料と方法	
5-1.	生物試料と培養条件	34
5-2.	菌体の回収と RNA 抽出	35
5-3.	RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析	35
5-4.	リアルタイム qRT-PCR による遺伝子発現解析	36
5-5.	HIGS	37
5-6.	NEXT-RNAi による <i>SIS1</i> -HIGS 実験の <i>in silico</i> 解析	38
5-7.	顕微鏡観察	39
6.	図表	40
7.	参考文献	62
8.	謝辞	81

1. 略語

AM: arbuscular mycorrhizal

BAS: branched absorbing structures

CDS: coding sequence

DEGs: differentially expressed genes

dsRNA: double-stranded RNA

EV: empty vector

HIGS: host-induced gene silencing

LCO: lipochitooligosaccharide

MAMPs: microbe-associated molecular patterns

NV: no vector

PAM: periarbuscular membrane

PPA: prepenetration apparatus

qRT: quantitative reverse transcription

RNAi: RNA interference

siRNA: small interfering RNA

SL: strigolactone

2. 序論

2-1. アーバスキュラー菌根 (AM) 菌の利点

1960年代に始まった緑の革命は、コムギやイネの品種改良によって従来の穀物収量を大幅に増加させた。緑の革命の成功は、人口増加にともなう世界規模の食糧危機の回避に大きく貢献した(Pingali, 2012)。しかしながら、これらの品種による収量増加を実現させるためには化学肥料を継続的に使用する必要があり、緑の革命以降の農業モデルは化学肥料の過剰使用による環境汚染を引き起こしてしまうケースも多く報告されている (Tilman et al., 2001)。また化学肥料の主要な原料であるリン鉱石資源が有限であることや(Van Kauwenbergh, 2010)、多くの地域において淡水資源の枯渇が引き起こされてしまっていることから(Foley et al., 2005)、現状の農業モデルには限界があり、持続可能な新たな農業モデルが求められてきている(Duhamel and Vandenkoornhuyse, 2013)。

アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, 以下 AM 菌) は産業的に重要なコムギ、イネ、トウモロコシ、ダイズなどを含む、陸上植物の大多数の植物種と相利共生関係を結ぶことが知られている(Brundrett, 2009)。AM 菌は土壌中に広く存在し、菌糸を植物根の中に侵入させて、植物の皮層細胞内において菌糸を密に分岐させ、樹枝状体 (アーバスキュル) と呼ばれる特徴的な共生器官を形成する。この樹枝状体において、AM 菌は植物に対してリンや窒素などの土壌中の無機栄養を与え、植物からは光合成産物由来の炭素源を受け取る栄養交換を行う。リンは植物にとって必須な栄養素であるが、リン化合物は土壌へ吸着・固定化して流動性が低くなっていることがあるため、自然環境の土壌ではリンが乏しくなっている領域が普遍的に存在する。土壌中の AM 菌の菌糸は植物根よりもはるかに表面積が大きく、リンを主とする無機栄養の吸

収量が優れていると考えられており (Sylvia et al., 2004)、AM 菌はこの AM 共生を通して、植物に対して効率的に無機栄養を供給することができる。実際に、AM 菌 *Glomus versiforme* (Karsten) Berch and Fortin において植物根の外側に位置する菌糸 (外生菌糸) で発現するリン酸トランスポーターが同定されており (Harrison and van Buuren, 1995)、土壌中のリン酸吸収が活発に行われていると推定される。これらの外生菌糸によって吸収された無機リン酸は、輸送のために無機ポリリン酸に集約されることが報告されている (Ezawa et al., 2004)。また自然環境の土壌中のリン化合物は生物分解物由来の有機体が優占していることもある。AM 菌は根内部の菌糸 (内生菌糸) でアルカリホスファターゼの発現が高いことが報告されており、植物に供与する際に無機体に変換することで植物のリン吸収を助けていると考えられている (Aono et al., 2004; Liu et al., 2013)。肥料によって十分な無機栄養が供給される農地とは異なり、自然環境においては、植物に運ばれるリンのうち最大 70% が AM 菌由来であるとの報告もある (Smith et al., 2003)。これらのことから、特に貧栄養土壌において、AM 菌は感染した植物の生育を促進させる機能を持つと考えられている (van der Heijden et al., 2015)。

このような栄養供給能に加え、AM 共生は宿主植物の生育・環境適応に対してさまざまな利点を与える。まず、AM 共生した植物は病原抵抗性が上昇することが知られている。例えば、AM 共生したトマトの根は植物病原菌 *Phytophthora parasitica* Dastur の感染に応答して細胞壁が厚くなり、かつ根細胞に侵入した菌糸の伸長も停止することが報告されており、これらの応答は AM 菌非感染の根では見られていない (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002)。また AM 共生した根は植物寄生線虫への抵抗性も上がることが示されている (Akkopru and Demir, 2005; Berta et al., 2005; Li et al., 2006)。さらに AM 共生が病原抵抗性を向上させる遺伝子の発現を植物全身において誘導することも報告されている

(Liu et al., 2007)。

さらに、多くの研究から、AM 共生した植物は非共生の植物に比べて乾燥条件で生育がよいことが示されており (Augé, 2001)、AM 菌は感染した植物に水分を供給し、乾燥耐性を向上させる機能を持つことが知られている。実際、乾燥条件において、AM 共生している植物は非感染植物よりも気孔透過率、蒸散能、そして地上部の水分量が高くなっていた (Duan et al., 1996)。これらの結果と一致して、木部液中のアブシジン酸濃度が低くなっていることも報告されており、このことは、AM 共生した植物は非感染植物よりも乾燥ストレスを受けていないことを示している (Duan et al., 1996)。また AM 共生によって発現が誘導されるアクアポリン遺伝子がインゲンにおいて同定されており、AM 共生における水輸送に関わっていることが指摘されている (Aroca et al., 2007)。一方、AM 菌側においてもアクアポリンが同定されており、宿主植物の乾燥耐性に寄与していることも報告されている (Aroca et al., 2009; Li et al., 2013)。

以上のことから、AM 菌の持つ生育促進効果を農業に利用できれば、化学肥料・殺菌剤・淡水資源の使用を抑えることができ、収量を確保しながら持続可能な環境低負荷型農業の達成に貢献し得ると考えられている (Duhamel and Vandenkoornhuyse, 2013)。しかしながら AM 菌の研究はまだ発展途上であり、栄養・物質輸送や耐病性のメカニズムはおろか、AM 菌に関する基本的な生態や植物への感染メカニズムもまだほとんどが未解明のままである (Recorbet et al., 2013)。AM 菌の農業への応用を目指す上で、現状では AM 菌と AM 共生に関する基礎的な知見を積み重ねていく研究が必要不可欠である。

2-2. AM 共生の起源

菌根とは、菌類と植物根の共生体のことを指し、アーバスキュラー菌根共生の

他にも、外生菌根、内外生菌根、アルブトイド菌根、モノトロポイド菌根、エリコイド菌根、ラン菌根といった種類が知られている。9割以上の植物が何らかの菌根共生を行うことが知られており (Brundrett, 2009)、自然界では菌根であることの方が一般的である。その中でも AM 共生はアブラナ科、アカザ科などを除く多くの科でみられ、最も普遍的な菌根共生である。また AM 菌は、根構造を持たない苔類やツノゴケ類の一部とも仮根を通じて共生関係を結ぶ (Read et al., 2000; Pressel et al., 2010)。先行研究では、AM 共生確立に要求される遺伝子 *DMI3* の欠損したマメ科植物タルウマゴヤシ *Medicago truncatula* Gaertner において、苔類、ツノゴケ類由来の *DMI3* オルソログがその機能を回復させた (Wang et al., 2010)。このことは、AM 共生遺伝子の機能が、かなり広い範囲の現生植物種の間で保存されており、苔類やツノゴケ類が出現する以前の初期陸上植物が AM 共生遺伝子を獲得した可能性が高いことを示している。さらに、4 億年以上前の祖先陸上植物 *Aglaophyton major* (Kidston and Lang) Edwards の化石においても樹枝状体構造が見られていることから、AM 共生の起源はデボン紀まで遡ることができ、AM 菌は無機栄養や水分の供給を通して祖先植物の陸上生息域の拡大を助けたと考えられている (Simon et al., 1993; Remy et al., 1994; Redecker et al., 2000)。これらの証拠から、AM 共生は最も初期に成立した菌根であるという説が一般に受け入れられている。したがって、将来的な農業への利用を目指すという目的だけでなく、どのようにして最初にこのような植物と菌類の相利共生関係が成立したのかを解明するという学術的な意義においても、AM 菌と AM 共生に関する基礎的な知見を積み重ねていくことは重要である。

2-3. 現在までの AM 共生の研究状況

2-3-1. AM 菌に関する背景知識

AM 菌は分類学上、Glomeromycota 門という単系統群に分類され、菌界においてよく知られている子囊菌門や担子菌門が出現する以前に共通祖先から分岐したと考えられている (Schüßler and Walker, 2010; Grigoriev et al., 2014)。AM 菌は宿主植物根と共生しないと次世代胞子を形成しないことから、絶対共生菌と呼ばれている。AM 菌はほとんどの菌糸に隔壁を欠くため、明確な細胞を定義できず、そのため基本的に菌糸・胞子ともにその細胞質には複数の核が存在し、胞子中には数千の核が含まれている(Lee, 2011)。また現在のところ AM 菌の生活環において有性生殖は確認されていない。これらの Glomeromycota 門にユニークな性質から、AM 菌において伝統的な遺伝学的手法は不適であり、安定的な形質転換体の作製も現在まで成功していない(Bonfante and Genre, 2010)。

2-3-2. 植物側の AM 共生応答に関わる遺伝子群

上述の要因から AM 菌の研究自体が困難であったため、現在まで AM 共生の知見はおもに植物側の解析によって得られてきた。特にマメ科植物のミヤコグサ *Lotus japonicus* (Regel) Larsen と *M. truncatula* における窒素固定細菌との根粒共生の研究が、その原動力になった(Bonfante and Genre, 2010)。これらの植物において根粒共生変異体は数多く単離され、原因遺伝子が特定されているが、その中のいくつかの遺伝子は、根粒共生だけでなく、AM 共生にも不可欠であることが解明された (Catoira et al., 2000; Kistner et al., 2005)。この根粒と AM 共生の両方に必要な遺伝子を介するシグナル伝達経路は、Common Symbiosis Pathway (CSP)と呼ばれ、*L. japonicus* では現在までに 8 遺伝子が同定されている。*LjSYMRK* (*MtDMI2*)は、膜タンパク質のレセプター様キナーゼをコードしており、根粒菌および AM 菌の認識に関わり、何らかの基質をリン酸化することで下流のシグナル伝達経路の活性化を担っていると考えられている(Stracke et al., 2002;

Markmann et al., 2008)。加えて、ヌクレオポリンである LjNUP85、LjNUP133 そして NENA (Saito et al., 2007; Kanamori et al., 2006; Groth et al., 2010)、カチオンチャンネルと考えられている LjCASTOR/LjPOLLUX (MtDMI1) (Chen et al., 2009)、カルシウム - カルモジュリン依存型プロテインキナーゼ LjCCaMK (MtDMI3) (Lévy et al., 2004)、LjCCaMK と相互作用する LjCYCLOPS (MtIPD3) (Yano et al., 2008)も CSP の構成要素であり、これらはすべて核および核膜に局在し機能することから、LjSYMRK の下流シグナルは核に伝えられると考えられている。これらの CSP 遺伝子の存在から、根粒共生は、初期陸上植物にもともと存在した AM 共生応答に必要な遺伝子の一部をリクルートすることで、マメ科植物が獲得した形質であるという進化仮説が広く受け入れられている (Bonfante and Genre, 2010)。

最近では、根粒共生には関わらず、AM 共生に特異的に働く植物側の遺伝子も同定されている。*RAM1* は、*GRAS* ファミリーに属する転写因子で、その変異体では AM 菌の侵入がブロックされ、AM 共生が成立しない (Gobatto et al., 2012)。*RAM1* 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する *RAM2* の発現を調節することもわかっている。AM 菌は植物根に侵入する際に表皮細胞上に菌足と呼ばれる肥大した菌糸構造を形成する。*RAM2* は植物側でこの菌足の形成に関与すると考えられているクチンの生合成を促進する酵素である (Wang et al., 2012)。しかしながら、このクチン自体が AM 菌の発生を促すシグナル分子として働いているのか、もしくは表皮細胞上で菌足の形成を直接助長しているのかについては、まだ明らかにされていない。

2-3-3. AM 共生シグナルとしてのストリゴラクトン

AM 共生における植物側のもうひとつの重要な要素として、植物ホルモンのスト

リゴラクトン(strigolactone, SL)が挙げられる(Gutjahr and Parniske, 2013)。SLはもともと寄生植物の *Striga* 属の種子発芽を促進する化合物として発見された(Cook et al., 1966)。寄生植物の発生を促進してしまう SL の分泌が、植物においてなぜ進化的に保存されているのか、長い間よくわかっていなかった。しかしながら、その後 SL が AM 菌 *Gigaspora* 属の菌糸分岐と伸長を促進する作用を持つことが発見されたこと(Akiyama et al. 2005, Besserer et al., 2006)、SL には AM 菌への共生シグナルとしての機能が存在することがわかり、その理由が説明できる状況となった。また SL は AM 菌の菌糸中の核分裂、ミトコンドリアの活性化、NADH や ATP 量の増加を誘導することも報告されており、これらの現象は菌糸成長に関わっていると推測されている(Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008)。ペチュニアの SL 輸送体 PDR1 の変異体では、植物体の内生 SL 量は変わらないものの、SL が外部に浸出されず、AM 菌の感染レベルも野生型よりも抑制されていた(Kretzschmar et al., 2012)。SL が浸出されないことで、AM 菌の菌糸伸長を十分に誘導できず、結果として感染レベルが野生型よりも低下したと考えられている。この PDR1 は樹枝状体を含む細胞やその近傍の細胞に局在することが示されており(Sharda and Koide, 2008)、SL は皮層細胞内の AM 菌の菌糸の発達にも関与している可能性が示唆されている。また植物における SL 生合成酵素 CCD7 と CCD8 の変異体において感染レベルが抑制されることも報告されており、これらの表現型も *pdr1* 変異体と同様に、野生型よりも AM 菌の菌糸生育が不十分なことが原因だと推察されている(Gomez-Roldan et al., 2008; Koltai et al., 2010; Vogel et al., 2010)。

2-3-4. AM 菌の生活環

宿主植物と共生を確立させ、次世代胞子を形成するまでの AM 菌の生活環の仕

組みは、この十数年間で少しずつ解明されてきている(Recorbet et al., 2013)。AM 菌は非共生状態では孢子中に蓄えられた脂質をエネルギー源として利用して菌糸をランダムに伸ばし、植物根を探索する(Bago et al., 2000)。菌糸が植物根に近づくと、AM 菌は根圏付近に存在する SL を受容し、前述のように菌糸成長が促進されて間接的に宿主根と出会うやすくなる。AM 菌から植物へのシグナル分子についても、最近いくつかの報告がなされた。まず、根粒菌からマメ科植物へのシグナル分子である Nod factor と非常に良く似た分子のリポキトオリゴサッカライド(lipochitooligosaccharide, LCO)が、AM 菌の共生前の発芽孢子の浸出液中からも精製・単離された(Maillet et al., 2011)。これは Nod factor と区別するために Myc-LCO と呼ばれており、Nod factor と同様に植物細胞内で共生応答に必要な Ca^{2+} の周期的な濃度変化である Ca^{2+} スパイキングを誘導することが示されている(Maillet et al., 2011)。さらに、Myc-LCO と同じくキチン化合物であるキチンオリゴマーもまた単離され、同様に Ca^{2+} スパイキングを誘導することが示されている(Genre et al., 2013)。これらの SL とキチン化合物を介した共生前の AM 菌と宿主植物間のシグナルコミュニケーションは、AM 共生の確立において重要な役割を担っていると考えられる(Nadal and Paszkowski, 2013)。

菌糸が植物根に接触すると、AM 菌は根の表皮に菌足を形成し、その後根の中に侵入する。この過程で宿主植物は、菌糸が通過するためのスペースであり、菌糸をガイドする機能を持つと考えられる prepenetration apparatus (PPA) を表皮細胞内に形成する(Genre et al., 2005)。PPA を通って菌糸が宿主根の皮層細胞まで侵入すると、AM 菌は内生菌糸を密に分岐させ、植物と協調的に樹枝状体を形成する。樹枝状体は periarbuscular membrane (PAM) という植物細胞膜に囲まれており、AM 菌と宿主植物の間では樹枝状体の生体膜と PAM を横切って、多くのトランスポーターによって栄養や物質が交換されている。これらのラン

スポンターには、*M. truncatula* とイネ *Oryza sativa* Linnaeus におけるリン酸トランスポンターMtPT4 と OsPT11 (Harrison et al., 2002; Kobae and Hata, 2010)、ABC トランスポンター STR/STR2 (Zhang et al., 2010; Gutjahr et al., 2012)や、ダイズ *Glycine max* におけるアンモニウムトランスポンターGmAMT4.1 (Kobae et al., 2010)、AM 菌 *Rhizophagus irregularis* (Blaszkowski et al.) Walker and Schüßler (旧名 *Glomus intraradices*) における単糖トランスポンターMST2 (Helber et al., 2011) が知られている。

AM 菌 *R. irregularis* は共生状態になると宿主根の外側の菌糸の形態にも変化があり、非共生状態の菌糸はランダムに伸長するのに対して、共生状態では特異的な外生菌糸を形成する。この外生菌糸は直線的で太い runner hyphae と runner hyphae から数回分岐した branched absorbing structures (BAS)から構成される(Bago et al., 1998)。共生が進行すると *R. irregularis* は最終的に BAS の先端に次世代胞子を形成して、生活環が回る。AM 菌は宿主植物との共生状態でないと次世代胞子を形成しない絶対共生菌であり、AM 菌の生活環において非共生状態から共生状態に移行することが、繁殖において不可欠であり、重要な発生段階になっていると考えられる。次世代胞子の形成については、前述のように有性生殖が確認されておらず、詳しいメカニズムはほとんど分かっていない。

2-3-5. AM 菌の遺伝子に関する先行研究

AM 菌と毛状根との *in vitro* 共存培養系が開発されたことによって(Bécard and Fortin, 1988)、AM 菌の分子生物学的研究は徐々に進められてきている。最近では、*R. irregularis* のゲノムの概要が次世代シーケンサーを用いて解読された(Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014)。また、*R. irregularis* の遺伝子の機能解析もまだ事例は少ないものの、行われてきている。

GintSTE は菌類に広く保存されている *STE12* 遺伝子の *R. irregularis* におけるホモログであり (*Gint* は旧名 *G. intraradices* から)、Tollot et al. (2009)によって同定された。*STE12* は、出芽酵母ではマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK)経路を活性化する転写因子である (Dolan et al., 1989; Errede and Ammerer, 1989)。出芽酵母において MAPK 経路は接合、浸潤性成長、糸状性成長の切り替えを制御することで知られている (Roberts and Fink, 1994; Cook et al., 1997)。インゲンマメ属植物に炭且病を引き起こす病原菌 *Colletotrichum lindemuthianum* (Saccardo and Magnus) Briosi and Cavara では、*STE12* は付着器から葉の表面の菌糸侵入に不可欠であることが知られている (Tsuji et al., 2003; Wong Sak Hoi et al., 2007)。*C. lindemuthianum* の *ste12* 欠損株は宿主植物の葉への菌糸侵入が著しく抑制されるが、*R. irregularis* のオルソログと考えられる *GintSTE* を用いてこの *ste12* 欠損株の表現型を相補できることが示され、*GintSTE* が *R. irregularis* の植物根感染にも関与している可能性が示された (Tollot et al., 2009)。

また Helber et al. (2011)は、*R. irregularis* の単糖トランスポーターMST2を同定した。MST2は発芽胞子や外生菌糸よりも植物内の菌糸や樹枝状体で高く発現が誘導され、共生時の単糖の吸収を担っていると考えられている。MST2はグルコース、フルクトース、キシロース、マンノース、ガラクトースなどのさまざまな単糖を輸送できることも実証された (Helber et al., 2011)。

また AM 菌の分泌タンパク質は宿主植物との相互作用を担う可能性があるため、解析対象として近年注目されている。Tisserant et al. (2013)は RNA-sequencing (RNA-seq)法により内生菌糸で高く発現誘導される、分泌タンパク質をコードすると予測される遺伝子群を同定した。Kloppholz et al. (2011)は *R. irregularis* の分泌タンパク質 SP7 が *M. truncatula* の免疫系に関わるエチレン応答

性因子 MtERF19 と相互作用することを実証した。SP7 は MtERF19 と相互作用することで宿主植物の防御応答を抑制させるエフェクターとして機能するようである(Kloppholz et al., 2011)。しかしながら、AM 菌の分泌タンパク質において機能解析されたものは今までのところこの SP7 のみであり、AM 共生確立において機能を担う分泌タンパク質に関する知見は、依然として不十分である。

2-3-6. Host-induced gene silencing (HIGS)による遺伝子機能解析

最近の多くの研究によって、植物は病原菌や病害虫に対する防御機構として、内因性の small RNA による病原生物の遺伝子に対する RNA サイレンシングを利用していることが認められてきた(Jin, 2008; Padmanabhan et al., 2009; Ruiz-Ferrer and Voinnet, 2009; Katiyar-Agarwal and Jin, 2010; Weiberg et al., 2014)。これらと似た現象として、植物に感染した微生物等に人為的に RNA サイレンシングを引き起こす host-induced gene silencing (HIGS)が、遺伝子機能解析を目的として植物病原菌 *Blumeria graminis* (de Candolle) Speer と *Puccinia striiformis* Westendorp などで行われている(Nowara et al., 2010; Yin et al., 2011; Nunes and Dean, 2012)。HIGS は微生物等の遺伝子を標的にした RNA interference (RNAi)誘導コンストラクトを宿主植物に導入し、植物内で産生された small interfering RNA (siRNA)を介して、感染した微生物等の RNAi を引き起こすという手法である。オオムギ病原菌 *B. graminis* では感染過程で発現する 76 の遺伝子について HIGS が行われ、そのうち 16 遺伝子のノックダウンによって、宿主植物へ侵入して栄養を吸収する器官である吸器の形成が抑制された(Nowara et al., 2010)。Yin et al. (2011)はコムギ黄色さび病菌 *P. striiformis* において HIGS を行った。この実験では、*P. striiformis* の吸器で高く発現される、推定分泌タンパク質をコードする 3 つの遺伝子や 1 つのキチナーゼ遺伝子などは効果的にサイレンシングされた一方、菌の全身で

恒常的に発現している TEF-1 や β -チューブリン、GAPDH、アクチン遺伝子はサイレンシングされなかった(Yin et al., 2011)。このことから、HIGS の効果があるのは、*P. striiformis* の吸器のような、植物体内で発達する菌組織において発現が誘導される遺伝子に限定されるようである。

AM 菌は多核、絶対共生菌といった性質のため従来の分子生物学的研究手法が適用しづらいことから、AM 菌の遺伝子機能解析において HIGS は有効な手法であるといえる。前述の Helber et al. (2011)の報告において、*MST2* の機能解析のために HIGS によるノックダウン試験も行われた。その結果、HIGS によって *R. irregularis* の *MST2* がノックダウンされたことで、*R. irregularis* の感染レベルが抑制され、かつ樹枝状体形成が不全になる表現型が現れたことから、*MST2* が適切な AM 共生に不可欠であることが示された(Helber et al., 2011)。

2-4. 本研究の概要

このように植物側に比べて困難であった AM 菌の分子生物学的な研究は徐々に行われてきてはいるものの、未解決点は山積している。その中でも私は、先に述べた農業への応用や学術的な意義においても非常に重要である「AM 菌が宿主植物と AM 共生を成立させるメカニズムの解明」を本研究の目的とした。

この課題の解決に向けて、本研究では最初に、これまで詳細に解析されていなかった *R. irregularis* に対する植物からの共生シグナルである SL の効果を、菌糸伸長を測定することで評価した。次に共生に関わる AM 菌遺伝子を探索するため、*R. irregularis* について RNA-seq 解析を行い、SL 処理時と、宿主植物との共生時において発現誘導される遺伝子を網羅的に探索した。その結果から、共生に関わっている可能性の高い、SL 処理・共生の両条件で有意に発現誘導される複数の遺伝子を見出した。これらの遺伝子の中で、最も発現誘導率が大き

かった一つの推定分泌タンパク質遺伝子に注目した。その後、この推定分泌タンパク質遺伝子を前述の **HIGS** によってノックダウンさせることで、この遺伝子の機能解析を行った。以上の結果に基づいて、私はこの推定分泌タンパク質が **AM** 共生の確立に寄与することを本研究で示す。

3. 結果

3-1. *R. irregularis* に対する SL の効果の解析

本研究では最初に、*R. irregularis* に対する SL の効果を評価した。AM 菌 *Gigaspora* 属への SL 処理は菌糸分岐と伸長を促進することが報告されている(Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006)。*R. irregularis* においては、菌糸分岐の様式が *Gigaspora* 属とは大きく異なり、分岐構造が複雑になることから正確な評価が不可能であった。一方、SL 処理による菌糸伸長の促進は確認することができたことから、菌糸伸長を指標に *R. irregularis* への SL の活性評価を行った(図 1)。合成ストリゴラクトン GR24 の非処理(0 μM)と 0.01 μM GR24 における菌糸伸長にはわずかな差しかなかったが、0.1 μM GR24 において最大かつ有意な菌糸伸長促進効果が見られた(図 1)。さらに高い濃度(1 μM , 10 μM GR24)ではその効果が徐々に減少し、100 μM では菌糸の発芽と伸長は完全に阻害された(図 1)。したがって、0.1 μM の GR24 処理を至適濃度として、その後の実験では SL 処理にはすべて 0.1 μM の濃度で GR24 を使用した。

3-2. SL 処理と AM 共生の両条件下で発現誘導される *R. irregularis* 遺伝子の同定

共生前と共生状態の *R. irregularis* の遺伝子発現を網羅的に解析するため、非共生状態の発芽胞子(コントロール)と、SL 処理した発芽胞子、共生状態の外生菌糸についてのトランスクリプトーム解析を RNA-seq 法により行った。外生菌糸は宿主にニンジン毛状根を用いた *in vitro* 共存培養(Bécard and Fortin, 1988)から回収した。トランスクリプトーム解析の結果、非共生コントロールと比較して、SL 処理で 34 個、共存培養 4 週の外生菌糸で 2250 個、6 週の外生菌糸で 3201 個、8 週の外生菌糸で 656 個の発現変動遺伝子(differentially expressed genes, DEGs)が

得られた(false discovery rate < 0.001)。共存培養 4、6、8 週の外生菌糸において、宿主植物への窒素化合物の輸送に関わる遺伝子群(*GiNT*, *GiGS2*, *GiCPS*, *GiASS*, and *GiCAR*) (Tian et al., 2010)、*ammonium transporter 1* (*GintAMT1*) (López-Pedrosa et al., 2006)、*monosaccharide transporter2* (*MST2*) (Helber et al., 2011)、*aquaporin 1* (*GintAQPI*) (Aroca et al., 2009)、*phosphate transporter* (*GiPT*) (Harrison and van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001)そして *STE12-like gene* (*GintSTE*) (Tollot et al., 2009)が有意に上方調節されていた(表 1)。この結果は、これらの遺伝子が植物との共生時に誘導されることを示した先行研究と一致する。対照的に、これらの遺伝子は SL 処理では上方調節されていなかった(表 1)。このトランスクリプトーム解析によって、SL 処理した発芽胞子と共存培養 4 週の外生菌糸の両方で発現が上昇する 19 の遺伝子を発見した(表 2)。興味深いことに、19 のうち 11 個の遺伝子は、80 から 154 アミノ酸残基からなる小タンパク質であり、N 末端に分泌性のシグナルペプチドを保持することが SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011)によって予測された 表 2; 表 3)。

表 2 で示した 11 の推定分泌タンパク質遺伝子が SL 処理時と共生状態で誘導されることを確認するため、これらの遺伝子の発現をリアルタイム quantitative reverse transcription (qRT)-PCR で解析した。この qRT-PCR 解析では、非共生の発芽胞子 (コントロール)、SL 処理した発芽胞子、そして共存培養 6 週の外生菌糸から新たに RNA を回収した。SL 処理では 11 のうち 7 つの遺伝子がコントロールに比べて有意に発現が上昇していた(図 2A)。これらの 7 遺伝子の中で、共存培養 6 週の外生菌糸では 5 遺伝子が有意に発現上昇していた (図 2B)。また共生状態の外生菌糸で誘導されるマーカー遺伝子として *GiPT* も qRT-PCR で解析した。先行研究(Maldonado-Mendoza et al., 2001)と同様に、*GiPT* は共存培養 6 週の外生菌糸において発現が有意に誘導されていたことから(図

2B)、正確に共生状態の外生菌糸からサンプリングされたことが示された。以上の結果から、私は少なくともこの 5 遺伝子は SL 処理と共生時の両方で誘導されることを見出した。これらの 5 遺伝子の中で、Protein ID 342269、347085、334310、176092 (Protein ID は Joint Genome Institute で定義されたもの) は内生菌糸でも発現が誘導されることがすでに報告されている(Tisserant et al., 2013) (表 3)。さらに InterProScan (The European Bioinformatics Institute, EBI)を用いてこれらのタンパク質のアミノ酸配列の特徴の検索を行った結果、348911 は LysM ドメインを持ち、347085 と 348911 はシステインリッチであることが予測された(表 3)。

3-3. *SL-induced putative secreted protein 1* の同定

RNA-seq と qRT-PCR 解析の双方において、5 つの推定分泌タンパク質をコードする遺伝子の中で Protein ID 342269 の fold change が SL 処理時と共生時の両条件下で最も大きかったことから(表 2; 図 2)、私は 342269 に注目した。NCBI ウェブサイト上において、データベース Non-redundant protein sequences (nr)を用いてデフォルトの条件で BLAST 検索(E-value < 1.0e-5)を行ったところ、342269 と類似性のあるタンパク質は他の生物において同定されておらず、342269 はシグナルペプチドを除いて特徴的なドメインや構造を持つことが予測されない新規の遺伝子であった。私はこのタンパク質を‘SL-induced putative secreted protein 1’ (SIS1)と名付けた。Tisserant et al. (2013)の *R. irregularis* ゲノムデータから、*SIS1* はイントロンのない 450 bp の翻訳領域からなる遺伝子であることがわかった。また BLAST 検索において、*R. irregularis* 中に SIS1 の類似タンパク質として Protein ID 176092 (36.0 % identity)と RirG205060 (38.1 % identity) (Lin et al., 2014) を発見した(E-value < 1.0e-5)。これらのタンパク質は N 末端のシグナルペプチドと、互いに保存性の高いアミノ酸配列を保持していた(図 3)。さらに 176092 も

SIS1 と同様に、SL 処理と共生時の両条件で発現が上昇していた(表 2; 図 2)。

3-4. 胞子発芽率と SIS1 発現の経時的解析

SL による SIS1 の誘導が、*R. irregularis* の発達段階のどのタイミングで始まるのかを調べることは、その機能を推定するために重要である。そこで SL 有り・無し の培地上の *R. irregularis* について、胞子発芽率と SIS1 の発現の経時変化をそれぞれ解析した。SL 処理区と非処理区(コントロール)の間で胞子の発芽率は、観測期間中ほぼ変化はなかった(図 4A)。発芽率は播種後 3 日目の時点で 30%前後であり、5 日目で 80%以上の胞子から菌糸が発芽していた(図 4A)。5 日目では、ある程度の菌糸の発達がすでに見られた(図 5)。SIS1 の発現は SL 処理、コントロールどちらにおいても 1、3 日目では qRT-PCR で検出することができなかった(図 4B)。SIS1 の発現は SL 処理、コントロールともに 5 日目から検出できるようになり、その発現量はこの時点ですでに SL 処理の方が有意に大きかった(図 4B)。7 日目では、SL 処理においてコントロールよりも著しく SIS1 の発現が誘導されていた(図 4B)。これらの結果から、SIS1 の発現は SL の有無に関わらず発芽後の菌糸伸長中に始まること、そして菌糸が伸長するほど SL による SIS1 の発現誘導量も増大することが示唆された。

3-5. HIGS による SIS1 の機能解析

3-5-1. SIS1-HIGS コンストラクトと SIS1-HIGS 毛状根の作製

AM 共生における SIS1 の機能を解析するにあたり、ノックアウトもしくはノックダウンによる逆遺伝学的解析は有効な手段である。しかしながら、AM 菌を直接形質転換する手法はまだ確立しておらず、標的遺伝子組換えなどの手法を用いることができない。先行研究において、HIGS には、*R. irregularis* の単糖のト

ランスポーターMST2をノックダウンし、MST2がAM共生に必要であることを示した実績があるため(Helber et al., 2011)、本研究においてもAM共生におけるSIS1の機能解析のためにHIGSを適用した。私は、SIS1の330 bpの部分配列(図6)を標的とし、宿主根内で*R. irregularis*にRNAiを引き起こさせるためのHIGSコンストラクトを設計・作製した。

SIS1-HIGSコンストラクト由来の330 bpのdouble-stranded RNA(dsRNA)が、適切にSIS1のRNAiを引き起こすかどうかを検証するため、そのdsRNAの効率評価とターゲット予測をNEXT-RNAiソフトウェア(Horn et al., 2010)によって行った。330 bpのdsRNAが21ヌクレオチドのsiRNAに切断されるとき、310通りのsiRNAが生成され得る。これらのうち、100個のsiRNAが効果的であると予測された(表4)。また330 bpの配列中に非特異的な効果や細胞毒性を及ぼし得るCA[ACGT]型のタンデムトリヌクレオチドリピート(Ma et al., 2006)はひとつも認められなかった(表4)。これらのことからこの330 bpのdsRNAはRNAiを引き起こすのに十分な効率があると考えられた。また*R. irregularis*のcoding sequence(CDS)ライブラリに対して330 bp dsRNAのターゲット予測を行ったところ、オフターゲットの可能性のある遺伝子はなく、ターゲットになりうる遺伝子はSIS1のみであると予測された(表4)。加えて、*M. truncatula*のCDSライブラリにも同様にターゲット予測を行ったところ、ターゲットになりうる遺伝子は一つも予測されなかった(表4)。これらの*in silico*解析の結果から、SIS1-HIGSコンストラクトのオフターゲットになりうる遺伝子は、*R. irregularis*と*M. truncatula*どちらにおいても存在しないことが示唆された。

このSIS1-HIGSコンストラクトを導入した*M. truncatula*の毛状根を独立に3ライン作製した(Line 1 [L1]、Line 2 [L2]、Line 3 [L3])。またコントロールとしてベクター無し(no vector, NV)の毛状根、空ベクター(empty vector, EV)を用

いた毛状根も同様に作製した。HIGS コンストラクトと EV は共発現マーカーとして eGFP を発現させるカセットを含むので、3 ラインの SIS1-HIGS 毛状根と EV 毛状根において GFP 蛍光を確認することができた(図 7)。さらに、AM 菌非感染の各毛状根において 330 bp の *SIS1* 配列を増幅させる RT-PCR を行ったところ、SIS1-HIGS 毛状根の 3 ラインで増幅が見られ、かつ逆転写反応をさせない non-RT コントロールでは増幅が見られなかった(図 8)。このことから SIS1-HIGS 毛状根に導入した *SIS1* の 330bp の部分配列が確かに RNA に転写されていることが示された。

3-5-2. SIS1-HIGS 毛状根における *R. irregularis* の表現型解析

3 ラインの SIS1-HIGS 毛状根と EV、NV 毛状根を用いて *R. irregularis* の約 50 胞子と *in vitro* 共存培養を行い、8 週間後に感染レベルを評価した。感染レベルは以下の F%、M%、A%のパラメータを算出することで定量化した(Trouvelot et al., 1986)。F%は AM 菌が感染している根の割合 (感染率)、M%は感染度合いによって根をクラス分けし、そのクラスごとに重みを付けた感染率 (感染強度)、A%は樹枝状体数によって根をクラス分けし、そのクラスごとに重みを付けて算出した樹枝状体量の指標をそれぞれ示す。その結果、これらの感染レベルのパラメータはすべて、NV と EV コントロールに比べて SIS1-HIGS 毛状根 3 ラインとも有意に減少していた(図 9A-C)。これらと一致して、根の外部に形成される胞子数も、SIS1-HIGS 毛状根での共存培養において有意に減少していた(図 9D)。さらに HIGS によって *SIS1* 発現量が確かに抑制されているかどうかを調査するため、HIGS コンストラクトに導入した 330 bp の外側の *SIS1* 配列を増幅させるプライマー(図 6)を用いた qRT-PCR によって、SIS1-HIGS と EV 毛状根内の内生菌系における *SIS1* 発現量を定量した。その結果、SIS1-HIGS 毛状根内の内生菌

糸の *SIS1* 発現量は、EV コントロールのそれに比べて有意に減少していた(図 9E)。一方、*SIS1* と類似したタンパク質をコードする二つの遺伝子 176092 と RirG205060 について同様に *SIS1*-HIGS L1 と EV 毛状根において qRT-PCR 解析を行ったところ、それらの遺伝子の発現に有意な変動があるとはいえなかった(それぞれ Student's *t* test において $P = 0.82$ 、 0.60) (図 10)。したがって以上の結果から、*SIS1*-HIGS 毛状根に感染した *R. irregularis* において *SIS1* の発現が抑制され、そしてこの抑制が *R. irregularis* の感染レベルの低下をもたらしたことが示された。これらの解析結果は、*R. irregularis* において *SIS1* が宿主根への感染に要求されることを意味している。序論で述べたように、Yin et al. (2011)の実験によると、HIGS の効果があるのは、*P. striiformis* の吸器のような、植物体内で発達する菌組織において発現が誘導される遺伝子に限定されるようである。本研究で HIGS によってサイレンシングが確認された *R. irregularis* の *SIS1* も、内生菌糸で発現が上方調節されることが報告されており(表 3)(Tisserant et al., 2013)、Yin et al. (2011)の結果とも矛盾しないと考えられる。

さらに、植物側の AM 共生応答を解析するため、*R. irregularis* との共存培養後 4 週の *SIS1*-HIGS、EV 毛状根において、*M. truncatula* の AM 共生マーカー遺伝子の発現を qRT-PCR で調査した。その結果、AM 共生マーカー遺伝子の *MtPT4* とサブチリン様セリンプロテアーゼ (サブチラーゼ) 遺伝子 *MtSbtM1* (XM_003611148)の二つの発現は、*SIS1*-HIGS 毛状根において、EV コントロールよりも有意に減少していた(図 11A, B)。このことは *SIS1*-HIGS 毛状根において植物側の AM 共生応答が抑制されていることを示しており、*SIS1*-HIGS 毛状根で感染レベルが落ちるという結果(図 9A-C)と一致した。

AM 菌の感染における *SIS1*-HIGS の効果をさらに解析するため、共存培養 8 週後の根内の *R. irregularis* の菌糸構造を詳細に観察した。EV 毛状根に比べ

て、**SIS1-HIGS** 毛状根では感染している部位であっても菌糸の密度と樹枝状体の数は少なかった(図 9B, C; 図 12)。さらに、**EV** 毛状根では、樹枝状体は十分に発達してよく分岐しているのに対して、**SIS1-HIGS** 毛状根の 3 ラインにおいて、ほとんどの樹枝状体は発達不全であることが観察された(図 11C, D; 図 13)。このことは *periarbuscular membrane* で特異的に発現することが知られている *MtPT4* (Pumplin and Harrison 2009)の発現が減少するという先ほどの結果と一致する(図 11A, C, D; 図 13)。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** は *R. irregularis* において **AM** 共生の確立に寄与していることが示唆された。

4. 考察

4-1. *R. irregularis* の SL 応答

本研究では最初に、これまで詳細な解析例が無かった *R. irregularis* に対する SL 処理の効果を、菌糸伸長を指標とした生理応答から評価した(図 1)。合成 SL の GR24 濃度が 0.1 μM の時に *R. irregularis* の菌糸伸長は最も促進され、これよりも濃度が高くなると菌糸伸長促進効果が徐々に弱くなり、100 μM では逆に菌糸の発芽自体が完全に停止した(図 1)。興味深いことに、SL によって種子発芽が誘導される寄生植物ストライガ *Striga hermonthica* (Delile) Benth. や *Striga asiatica* (Linnaeus) Kuntze においても、0.1 μM の GR24 処理によって最大の発芽率を示し、また 100 μM の GR24 処理では発芽促進作用が著しく弱まることが報告されている(Wigchert et al., 1999)。これらのことから、*R. irregularis* の菌糸伸長促進作用と *Striga* 属の種子発芽促進作用における GR24 の至適濃度が一致する結果となった。天然の SL は不安定で、容易に分解されることが知られている(Akiyama et al., 2005)。そのため自然環境の土壌中では、SL は植物の根圏に限定的に存在しており、SL は AM 菌とストライガにとって宿主植物の存在を感知するのに適した探索マーカーになっていると考えられている(Nadal and Paszkowski, 2013)。*R. irregularis* の菌糸伸長と *Striga* 属の種子発芽における GR24 の至適濃度が一致したことは、根圏において SL を 0.1 μM 程度の濃度を保つように分泌する植物種が存在し、そして絶対共生菌、寄生植物である両者が、このような根圏環境における宿主根探索に適応して独立に進化したことを示唆している。今後、多様な AM 菌種や寄生植物において同様の SL 至適濃度を解析することで、この仮説の検証を行うことは価値があるだろう。

4-2. *R. irregularis* の推定分泌タンパク質

他の菌根菌や病原菌は、限られた数の宿主植物にしか感染しない一方、AM 菌は広範な宿主植物に感染することができる。このような性質を持つ AM 菌の分泌タンパク質は、宿主植物との相互作用において役割を担う因子として注目されているものの(Kloppholz et al., 2011; Tisserant et al., 2013; Lin et al., 2014)、それらの機能に関する知見は未だ乏しい。私は *R. irregularis* の RNA-seq 解析と qRT-PCR 解析を行い、SL 処理した発芽胞子と共生中の外生菌糸で共通して発現が有意に上昇する 5 つの推定分泌タンパク質遺伝子、*SIS1* (protein ID 342269)、protein ID 347085、334310、348911、そして 176092 を同定した(表 2; 図 2)。SIS1 を含むこれらの推定分泌タンパク質は SignalP 4.1 によって分泌能を有する可能性がかなり高いと予測されたものの(表 3)、これらが確かに分泌されることを、レポータータンパク質を利用した実験等によって今後実証する必要があるだろう。これらのタンパク質の中で、348911 が LysM ドメインを保持しており、また 347085 と 348911 がシステインリッチであることが見出された(表 3)。これらの特徴は、植物病原菌において同定された、宿主植物の防御応答を抑制するいくつかのエフェクターの特徴と一致する(Stergiopoulos and de Wit, 2009)。このことから、347085 と 348911 は植物 - 微生物相互作用において機能する可能性が考えられる。また、その 5 つの遺伝子の中で、*SIS1*、347085、334310、176092 は以前に内生菌糸でも発現が上昇することが Tisserant et al. (2013)の RNA-seq 解析において報告されていた(表 3)。したがって、これらの推定分泌タンパク質遺伝子は SL 受容時、共生中の外生菌糸、そして内生菌糸を含んだ、共生前から共生時にわたる時空間的に広い範囲で発現が誘導されることが示された。AM 菌にとって、SL を受容して宿主植物を認識した菌糸、共生中の内生・外生菌糸に共通して必要な遺伝子機能として考えられるのは、「感染」の制御に関わる機能である。なぜ

なら、宿主植物を認識した菌糸はその後「感染」を成立させる必要があり、内生菌糸は宿主根内において「感染」領域を拡大させ、外生菌糸はすでに感染されている宿主根とは別の宿主根において新たに「感染」を成立させるからである。したがってこれらの推定分泌タンパク質は、AM 菌の「感染」において役割を担っている可能性があり、今後のさらなる解析によって、それらの機能を解明していきたい。

4-3. *SIS1* の経時的発現パターン

SL 処理・共生時双方において最も発現誘導率が大きかった *SIS1* について(図 2)、*R. irregularis* の発生過程における発現のタイミングを解析した(図 4)。*SIS1* の発現は播種後 1、3 日目の発芽胞子では検出されず、80%以上の胞子が発芽し、ある程度菌糸が伸長していた 5 日目から検出された (図 4; 図 5)。このことから *SIS1* は発芽期より後の、菌糸伸長期に発現・機能する遺伝子であるとみられる。播種後 5 日目にはすでに SL 処理による *SIS1* の発現誘導が見られ、菌糸がさらに伸長した 7 日目では SL によって劇的に発現量が増大していた (図 4; 図 5)。前述のように天然の SL は非常に分解されやすいため(Akiyama et al., 2005)、宿主植物の根圏において存在していると考えられている(Nadal and Paszkowski, 2013)。自然環境において *R. irregularis* は、菌糸が根圏に到達して SL を受容することで宿主植物の存在を認識し、*SIS1* の発現量を一気に増大させるものと推測される。そのためこの *SIS1* の発現パターンは、*SIS1* が宿主植物への感染過程に関与するタンパク質であるという本研究の主張を支持するものであると考えられる。

これまで SL によって誘導される AM 菌の遺伝子についての知見は乏しかったが、本研究によって *R. irregularis* の SL 誘導性遺伝子の発現を初めて詳細に解析した。今後、*SIS1* は *R. irregularis* における新規の SL 誘導性マーカー遺伝

子として、AM 菌の SL 応答の研究に利用できるだろう。先行研究から、AM 菌は SL に応答して菌糸成長や代謝活性化が促進されることが明らかになったことから(Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008)、AM 菌には SL シグナリングが存在すると予想されるものの、その詳細はまったく解明されていない。近年、植物での SL シグナリングに関わるタンパク質については解析が進んでおり(Waldie et al., 2014)、SL 受容体である D14 と D14-like の KAI2 (Arite et al., 2009; Hamiaux et al., 2012; Waters et al., 2012)、D14、KAI2 の下流シグナリングに関わると考えられ、D14 と相互作用する MAX2 が同定されている (Stirnberg et al., 2002; Stirnberg et al., 2007; Jiang et al., 2013; Zhou et al., 2013)。しかしながら、AM 菌においては、植物で同定されたこれらのタンパク質に該当するような因子は見つかっていない。今後は、SL による AM 菌の菌糸成長誘導などの生理的現象に加えて、*SIS1* の発現誘導を SL 応答の分子生物学的な指標に利用することで、AM 菌における SL シグナリングの解析が進展することが期待される。

4-4. AM 共生中の *SIS1* の機能

4-4-1. *SIS1*-HIGS 実験における *R. irregularis* の感染レベル抑制

本研究では、*M. truncatula* に感染した *R. irregularis* に RNAi を引き起こす HIGS を利用して、AM 共生中の *SIS1* の機能解析を行った(図 9-13)。その結果、3 ラインの *SIS1*-HIGS 毛状根において、感染した *R. irregularis* の *SIS1* のノックダウンが引き起こされ(図 9E)、感染レベルが有意に抑制された (図 9A-D; 図 12)。このことから、*SIS1* は *R. irregularis* において宿主への感染を正に制御していることが示唆された。共生の確立に関わる AM 菌の分泌タンパク質としては、SP7 が知られている(Kloppholz et al., 2011)。SP7 のアミノ酸配列中には、N 末端のシグナルペプチドに続いて核移行シグナルが含まれ、またそれ以降の配列は反復配

列で構成されており、その反復配列を何個含むかによって長さの異なるスプライシングバリエントが存在することが示唆されている(Kloppholz et al., 2011)。SP7は*M. truncatula*の免疫に関わる転写因子MtERF19と相互作用することが証明され、エフェクタータンパク質として機能していると考えられる。一方、SIS1のアミノ酸配列には核移行シグナルも反復配列も含まれておらず、SIS1はSP7とは全く異なるメカニズムにおいて機能しているものと推測され、本研究はAM菌の感染メカニズムにおいて新たな共生因子の存在を発見したと言える。

4-4-2. SIS1-HIGS 実験における樹枝状体の発達不全

SIS1-HIGS 毛状根に感染した*R. irregularis*は、ほとんどの樹枝状体が発達不全な形態を呈していた(図 11D; 図 13)。このような樹枝状体の発達不全は、*R. irregularis*の単糖トランスポーターMST2のHIGSによるノックダウンによっても観察されている(Helber et al., 2011)。また、植物側のリン酸トランスポーターMtPT4の変異体でも同様の樹枝状体の発達不全が見られている(Javot et al., 2007)。このことから、AM共生における栄養交換が適切に行われなくても、AM菌は植物体内で十分な発達が阻害されてしまうものと考えられる。その他にも、AM共生の発達に関わる宿主植物側のいくつかの遺伝子の部分的もしくは全体的な機能欠失が、同様の樹枝状体の発達不全を引き起こすことが示されてきた。それらの原因遺伝子には、初期のAM共生応答における細胞のリモデリングに関与することが提唱されているVapylin (Feddermann et al., 2010; Pumplin et al., 2010)や、膜成分の合成に関わっているとされる膜結合タンパク質MSBPI (Kuhn et al., 2010)、小胞輸送に関わっているとされ、periarbuscular membraneに局在するVAMP72s (Ivanov et al., 2012)、AM共生特異的な転写因子RAM1 (Wang et al., 2012)、トランスポーターであるSTR/STR2 (Zhang et al., 2010)などが挙げられる。

したがって、樹枝状体の発達不全という表現型は、原因遺伝子の機能や機能部位には関係なく不完全な AM 共生が起こっていることを示しており、この *SIS1-HIGS* 表現型から詳細な *SIS1* の機能を推定することは難しい。しかしながら、これらの菌側・植物側の遺伝子と同様に、*SIS1* も適切な AM 共生の確立に関与する機能を持つことが示唆された。今後、*SIS1* が樹枝状体の形成、維持、もしくはその両方に関わっているのかについて解析するために、*SIS1-HIGS* 実験下において樹枝状体形成過程や遺伝子発現の経時変化、そのほかの樹枝状体形成異常を示す変異体との関係を解析することが有効であると考えられる。

4-4-3. *SIS1* を介した SL の AM 共生制御機構

SL は、AM 菌の菌糸分岐と伸長、代謝を促進する (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006; Besserer et al., 2008)。加えて、SL は AM 菌由来の共生シグナルであるキチンオリゴマーを、AM 菌浸出液中において増加させることが報告されている (Genre et al., 2013)。これらの知見に加え、私は本研究の結果に基づいて、SL が AM 菌の *SIS1* の発現誘導を介して AM 菌の感染に寄与しているという、新規の SL の作用機構を提唱する。この作用機構は、SL が植物から AM 菌に対するシグナル物質であるという通説をより強固にするものであり、さらに SL が AM 菌の菌糸の生育促進とキチンオリゴマーの増産以外にも感染制御に関与している可能性を示すものである。序論で述べたように、SL 輸送体 *PDR1*、SL 生合成酵素の *CCD7* と *CCD8* に変異の入った宿主植物体において、AM 感染レベルが落ちることが報告されているが (Gomez-Roldan et al., 2008; Koltai et al., 2010; Vogel et al., 2010; Kretzschmar et al., 2012)、これらの表現型は、これまで宿主内外での SL の不足により、AM 菌の菌糸の発達が通常よりも弱まり、根への侵入と根内部での伸長が遅れることによるものだと考えられてきた。一方、今回の *SIS1*

の発見によって、それらの *pdr1*、*ccd7* と *ccd8* 変異体植物の AM 共生欠損の表現型は、*R. irregularis* において SL による *SIS1* の発現誘導が不十分であることによって引き起こされたとも考えられる。このことから、本研究で提唱する *SIS1* を介した SL による新たな AM 共生制御機構は、先行研究とも矛盾しない。

4-5. *SIS1* の機能の推測

InterProScan によるタンパク質の既知ドメインの類似性検索では、*SIS1* には分泌性シグナルペプチド以外に特徴的なドメインは予測されなかった(表 3)。したがって、AM 菌の感染における *SIS1* の機能は様々なものが想定される。植物病原菌由来因子である microbe-associated molecular patterns (MAMPs)は、植物において病原菌の認知に必要であることが知られている。MAMPs の中には植物細胞内で過敏反応などの防御応答を引き起こす植物病原性バクテリアのタンパク質が報告されている (Albert, 2013)。よく研究されているタンパク質性 MAMPs には flagellin や elongation factor Tu (EF-Tu)が知られており、それぞれの植物側のレセプター-Flagellin sensing 2 (FLS2) (Gomez-Gomez and Boller, 2000)、EF-Tu receptor (EFR) (Zipfel et al., 2006)が同定されている。これらのタンパク質性 MAMPs では、様々なバクテリア間で保存された特定の 20 前後のペプチド領域が、それぞれのレセプターによる認識の中心的な役割を担っている(Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004)。これらのタンパク質性 MAMPs のように、*SIS1* 中の特定のアミノ酸配列が、植物に AM 菌の存在を感知させるシグナルとして機能しているのかもしれない。これまでの先行研究では、AM 菌の植物へ作用するシグナル因子として、リポキトオリゴサッカライド (Maillet et al., 2011)やキチンオリゴマー(Genre et al., 2013)が注目されていた。本研究ではそれらに加えてタンパク質性のシグナル因子が存在する可能性を示した。

また、*R. irregularis* の SP7 (Kloppholz et al., 2011)のように、SIS1 は感染時に植物に対して防御応答を抑制させるエフェクターとして機能していることも考えられる。前述のように、アミノ酸配列の違いから SIS1 の作用機序は SP7 とは異なるかもしれないが、非常に広範な宿主植物域を持つ AM 菌は、複数の作用機序からなるエフェクターシステムを持っていても何ら不思議はない。したがって、今後 SIS1 と相互作用する植物側のタンパク質を探索・同定することは、SIS1 の機能解明に向けた一つの取り組みとして重要である。

SIS1 は *R. irregularis* において SL と共生の両方によって誘導される新規の推定分泌タンパク質であり、宿主植物への感染を正に制御することが示された。SIS1 がどこで、どのように機能しているのかについては今後も解析が必要であるが、この興味深い特徴を持つ SIS1 のさらなる機能の解明は、AM 共生の確立をコントロールするメカニズムの理解につながるだろう。

4-6. 総括

私は AM 菌 *R. irregularis* における新規の推定分泌タンパク質 SIS1 が AM 共生の確立に要求されることを本研究で示した。このことから、私は序論で述べた「AM 菌が宿主植物と AM 共生を成立させるメカニズムの解明」という本研究の目的を部分的に達成することができたと考える。したがって、私は本研究を通じて、新たな持続可能農業モデルのための AM 菌の利用に向けた取り組みや、4 億年以上続く植物と菌の助け合いの仕組みの解明という学術研究に貢献できたと考えている。

5. 材料と方法

5-1. 生物試料と培養条件

野生型 *M. truncatula* Jemalong A17 の実生は、Takeda et al. (2015)の方法を改変して用意された。*M. truncatula* の種子を紙やすりで擦り、70 %エタノールで1分間振盪した後、10%次亜塩素酸ナトリウム、0.1% Tween20 溶液で15分間振盪することで滅菌処理をした。これらの種子を滅菌水で一晩吸水し、1%寒天プレートに並べて24°C、暗黒下2日間で発芽させた。その後24°C、明16時間：暗8時間の条件で2日間インキュベートさせ、実生を生育させた。これらの *M. truncatula* の実生と食用ニンジン(*Daucus carota* Linnaeus)を、Takeda et al. (2013)の方法と Danesh et al. (2006)の方法に従い *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al.) Conn AR1193 株により毛状根に形質転換させた。その毛状根を植物体から切り離し、固体のM培地(Bécard and Fortin, 1988)上で培養した。それらの培養した毛状根は、*R. irregularis* DAOM 197198 (プレミアテック社)の *in vitro* 共存培養に使用した。*in vitro* 共存培養は Bécard and Fortin (1988)の方法を少し改変して行った。約2-3 cmの毛状根断片を0.4% ゲルライトで固めたM培地に植えて2週間後、約50の *R. irregularis* の胞子を根の近傍に播種した。播種する胞子は Furlan et al. (1980)の方法をもとに48%、32%、16%、8% (v/v)のガストログラフィン (バイエル薬品) を用いて密度勾配遠心によって菌糸を取り除き、胞子のみを精製してから使用した。プレートはすべて28°C、暗黒下で4週、6週、8週間インキュベートした。

非共生状態のAM菌サンプルのため、約10,000の *R. irregularis* 胞子をM培地上で28°C、暗黒下で一週間インキュベートすることにより、一者培養を行った。SL処理したAM菌サンプルはM培地に0.1 μM GR24を添加して同様に

用意した。SL 処理下の菌糸伸長解析と、発芽率および *SISI* 発現の経時的解析を行うため、一者培養は GR24 の濃度を 0.01、1、10、100 μM にしたものや、培養期間を 1、3、5 日間にした条件でも同様に行った。

5-2. 菌体の回収と RNA 抽出

in vitro 共存培養もしくは一者培養後の胞子と菌糸を、M 培地中から回収した。*in vitro* 共存培養では、実体顕微鏡 SZX7 (オリンパス) 下においてピンセットで宿主毛状根を注意深く取り除いた。ゲランガムで固めた M 培地は Doner and Becard (1991)の方法をもとにクエン酸バッファー (1.7 mM クエン酸、8.3 mM クエン酸ナトリウム、pH 6.0) で溶解させた。簡潔には、ゲランガム培地の体積に対して 3-4 倍量のクエン酸バッファーを加え 37°C で 5 分間振盪し、ゲルを溶解させた。その後遠心して菌体を沈殿させ、滅菌水で一度リンスし、再遠心後に菌体を回収し、液体窒素で凍らせた。*in vitro* 共存培養の内生菌糸は、*R. irregularis* が感染した *M. truncatula* 毛状根ごと回収し、液体窒素で凍らせた。凍らせた各菌体や宿主根から total RNA を PureLink Plant RNA Reagent (Invitrogen) を用いてマニュアル通りに抽出した。

5-3. RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析

RNA-seq 解析は Takeda et al. (2015) と Handa et al. (2015) が述べたように行った。抽出した total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) と RNase-free DNase Set (Qiagen) で精製した。各サンプルにおいて、RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) と 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies) により出力される RNA 電気泳動プロファイルを利用することで RNA のクオリティを分解度で分類する指標である RNA integrity number (RIN) (Schroeder et al., 2006) を算出した。全サンプルの RIN

は 7.40 以上であり、各サンプルの RNA クオリティは RNA-seq ライブラリの作製に十分な純度であった。RNA-seq ライブラリは total RNA の 170-500 ng を用いて、非共生コントロール、SL 処理、共存培養 4 週、6 週、8 週の条件につき生物学的反復を 3 つずつ、TruSeq RNA sample preparation kit (Illumina)を用いて作製した。各ライブラリは DNA 1000 kit (Agilent Technologies)と 2100 Bioanalyzer system でクオリティをチェックし、KAPA Library Quant Kit (Kapa Biosystems)で濃度を定量した。これらのライブラリを用いて、Illumina HiSeq 2000 (Illumina)によって塩基配列情報を取得した(paired-end, 101 bp)。これらのショートリードのデータは、DDBJ Sequence Read Archive (DRA)に登録した(accession number: DRA002591)。Handa et al. (2015)が行ったように、得られたリードを用いて、Tisserant et al. (2013)が提供した *R. irregularis* ゲノムアセンブリ(Gloin1, Joint Genome Institute)に対してマッピングを行った。マッピングされたリード数は、3 反復の平均を取ったところ、非共生コントロール、SL 処理、共存培養 4、6、8 週でそれぞれ 9.5、9.9、5.3、3.7、5.9 メガリード得られた。マッピングされたリードのカウント数は、Mortazavi et al. (2008)と Nagalakshmi et al. (2008)が述べたように reads per kilobase of exon per million mapped reads (RPKM)値として標準化した。非共生コントロールと比較したときの DEGs を決定するため、遺伝子発現カウント数を、TCC パッケージ iDEGES/edgeR (Robinson et al., 2010; Sun et al., 2013)に基づいて算出した。DEGs の判定は、false discovery rate が 0.001 未満かどうかを統計学的基準として用いて行った。

5-4. リアルタイム qRT-PCR による遺伝子発現解析

回収した total RNA 水溶液中のゲノム DNA を、37°C、一時間 DNase I 処理することにより分解し、その後、酸性フェノール：クロロホルム溶液(1:1)処理によ

って除去した。得られた RNA を鋳型に、ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo) と Thunderbird qPCR Mix (Toyobo) を用いて、LightCycler 96 (Roche) によってリアルタイム qRT-PCR を行った。DNA の混入がないことを確認するため、各サンプルの逆転写反応なしのコントロール実験も同時に行った。各プライマーセットは表 5 のとおりである。発現量は Helber et al. (2011) と Kloppholz et al. (2011) が行ったように、*R.irregularis* または *M. truncatula* のハウスキーピング遺伝子 *translation elongation factor 1 α (TEF)* に対してノーマライズし、fold change は非共生コントロールとの比較から算出した。平均値と標準偏差は生物学的 3 反復から算出した。各増幅産物の溶解曲線解析も行い、ピークが単一であることを確認した。

5-5. HIGS

330 bp の *SIS1* の部分配列を、cDNA から Prime STAR GXL (Takara) と SIS1-HIGS コンストラクトプライマー(表 5)を用いて増幅させ、エントリーベクター pENTR D/TOPO (pENTR D/TOPO cloning kit; Life Technologies) に導入し、エントリークローンとした。pK7GWIWG2(I) (Karimi et al., 2002) は植物における RNAi 用のバイナリーベクターで、35S プロモーター・ターミネーター系によってヘアピン dsRNA を植物に過剰発現させる。Takeda et al. (2009) によって共発現マーカー遺伝子として *eGFP* が挿入された pK7GWIWG2(I) に、エントリークローンを LR clonase (Invitrogen) によって組込み、SIS1-HIGS コンストラクトとした。その後、330 bp *SIS1* 部分配列が pK7GWIWG2(I) の 2 か所のクローニングサイトに挿入されていることを、pK7GWIWG2(I) プライマーセット(表 5)を用いて 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシークエンスすることで確認した。

HIGS コンストラクトと EV を *A. rhizogenes* AR1193 に導入した。これらのアグロバクテリウムを用い、*M. truncatula* において 3 ラインの SIS1-HIGS 毛状

根と 1 ラインの EV 毛状根を上述のように作製した。これらのトランスジェニック毛状根において *SIS1* 部分配列の転写産物を検出するため、AM 菌非感染の EV、*SIS1*-HIGS 毛状根から RNA を抽出・精製し、その後 *SIS1*-HIGS コンストラクトプライマー(表 5)を用いて RT-PCR 解析を行った。逆転写反応なしの non-RT コントロール実験も同時に行った。

これらの毛状根と *R. irregularis* を *in vitro* 共存培養させて 8 週間後、根内部の内生菌糸を Takeda et al. (2015)の方法のようにインク染色することで可視化した。インク染色した内生菌糸を正立顕微鏡 BX50 (オリンパス)で観察して感染レベルを Trouvelot et al. (1986)の方法で定量した。同様に *in vitro* 共存培養の 8 週間後に、根の外部にできたプレート全体の孢子数を実体顕微鏡 SZX7 で計測した。これらの定量結果を *SIS1*-HIGS の表現型解析に用いた。HIGS による表現型は、HIGS のメカニズムを考慮すれば、*R. irregularis* の菌糸が HIGS 毛状根の中に侵入してから現れると予想される。このことから、菌糸が根に付着してすぐに根の外部において形成される、共生時に特異的な菌糸構造の runner hyphae と BAS (Bago et al., 1998)が共存培養 2 週間後で形成されていないプレートは、HIGS による影響ではなく、単に共生が遅れていると見なすことができるので、除外した。*SIS1*-HIGS 実験における *SIS1*、*MtPT4*、*MtSbtM1*、*Protein ID 176092*、*RirG205060*、*RiTEF* の発現量を調査するため、共存培養 4 週間後の *SIS1*-HIGS 毛状根と EV 毛状根を回収し、各プライマー(表 5)を用いて上述のように qRT-PCR 解析を行った。

5-6. NEXT-RNAi による *SIS1*-HIGS 実験の *in silico* 解析

NEXT-RNAi ソフトウェアパッケージ(Horn et al., 2010)をダウンロードして、HIGS に用いた 330 bp の *SIS1* 部分配列の RNAi 効率の評価とターゲット予測を

行った。植物体内で発生したヘアピン dsRNA は、ダイサーによって 21~23 ヌクレオチドに切断されると考えられていることから、siRNA の長さは 21 ヌクレオチドに設定した。RNAi 効率は NEXT-RNAi の中で用意されている手法の 'weighted' で評価し、RNAi 効率スコアの最小値は Shah et al. (2007) が説明したとおり、63 に設定した。CA[ACGT]型トリヌクレオチドリPEATの最小数は 6 に設定した。*R. irregularis* と *M. truncatula* の CDS データセットは、*R. irregularis* ゲノムアセンブリ (GloIn1, Joint Genome Institute) (Tisserant et al., 2013) と、*Medicago Truncatula* Genome Project v4.0 (Mt4.0v1, J. Craig Venter Institute) (Young et al., 2011) からそれぞれ取得した。

5-7. 顕微鏡観察

菌糸伸長と発芽率の定量のため、10 から 32 個の胞子の写真を実体顕微鏡 SZX7 とデジタルカメラシステム DP21 (オリンパス) で撮影し、各胞子集団を 1 つの観測グループとして定義した。菌糸伸長は NIS-Elements AR ソフトウェア (ニコン) を使って測定し、各グループの胞子一個あたりの菌糸伸長を、生物学的に 3 反復ずつ算出した。

樹枝状体の形態を詳細に観察するため、菌類の細胞壁に含まれるキチン質を特異的に染色する Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 594 Conjugate (Invitrogen) を用いて Takeda et al. (2015) のように内生菌糸を染色し、共焦点顕微鏡 A1 (ニコン) を使って Z-stack イメージを取得した。

6. 図表

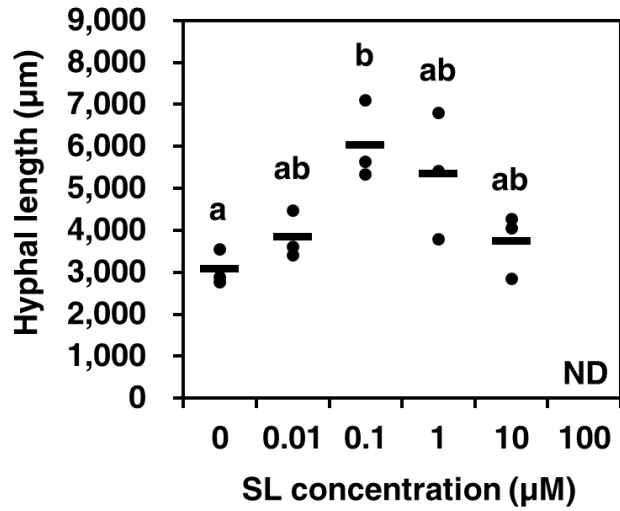


図 1. 各濃度の SL 処理における *R. irregularis* の菌糸長

合成 SL の GR24 (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM) を含む M 培地上で *R. irregularis* 胞子を 1 週間培養し、菌糸長を測定した。各点はデータポイントを示す (生物学的反復 $n = 3$)。各横棒は 3 反復の平均を表す。異なる文字は Tukey HSD test ($p < 0.05$) における有意差を示す。ND, not detected.

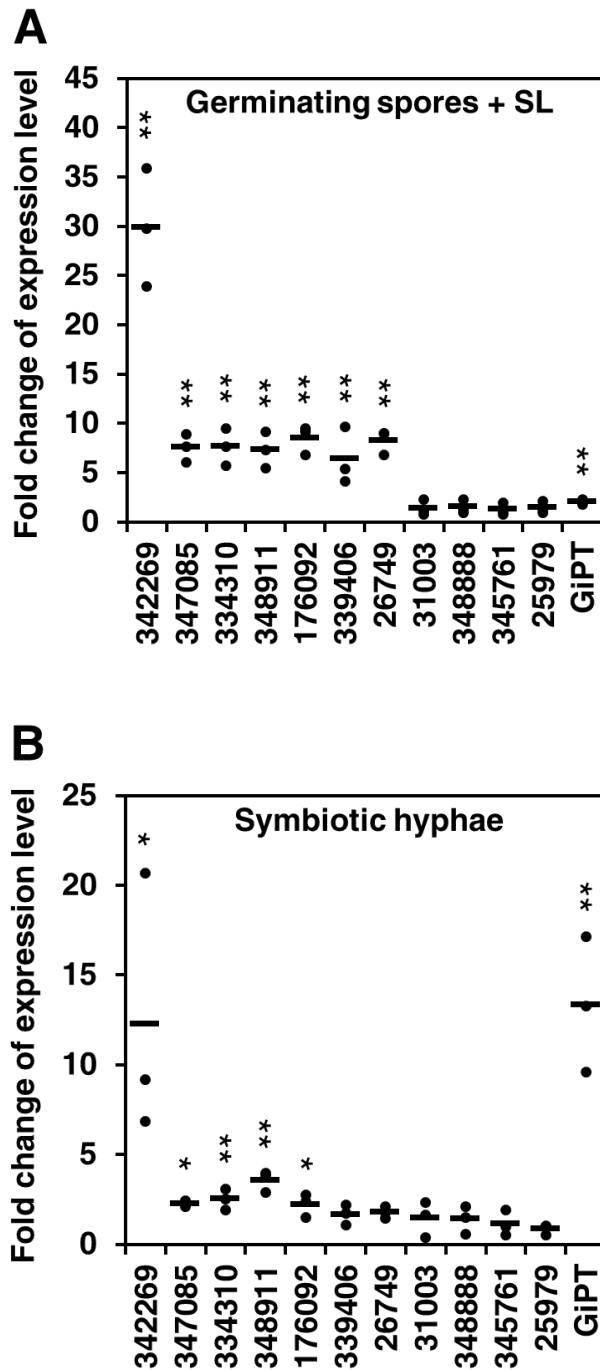


図 2. qRT-PCR 法による 11 の推定分泌タンパク質遺伝子と *GiPT* の発現解析
 SL 処理した発芽胞子(A)と 6 週間共存培養した菌糸(B)における各遺伝子の発現
 量は、*R. irregularis* の *translation elongation factor 1 α (RiTEF)* に対して標準化し、

非共生発芽胞子（コントロール）の発現と比較した fold change によって表されている。横軸の数字は Joint Genome Institute 由来の Protein ID を示す。各点はデータポイントを示す（生物学的反復 $n = 3$ ）。各横棒は 3 反復の平均を表す。アスタリスクは Student's t test におけるコントロールとの有意差を示す(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

```

SIS1           MKFILLLLFLLNILDVA--QGIVIIP--TKIQLSNSNLFWALDGSNVILSP---NGIK 53
ProteinID176092 MKFNL FLL-LLTT-LTAVV-LSQHIIIPGQSIIQLLGRDLYWDVND-GVVLYPGGVNPAR 56
RirG_205060    MKFN-FLL-LLSTALTAVAQLSNETMI-----IQSSGSDLFWALDNIKVVVKPR-EQAAN 52
***  :** ** . ** * . . :*      ** . :*: * ::. *:* * : .

SIS1           WAIYN-----NEIS--PYGNDTVAVQYQGPGKQLAIANKGGPVEILEKWDVGSIIEPQI- 105
ProteinID176092 W-IIQPLPKGNFI---KY-INGGFVQYNGDSKQLNITDS-G-----SPW----LFEPSTE 101
RirG_205060    WTIIIR-YSGGNYILLIPYDIPKKS VQYNGPGKQLTVEKNLN-----TKW----LFEPSE 102
* * .      * * *      ***.* .*** : . . .      *      ::**.

SIS1           IPNVTICSI PVPSE-CATA-DGMK---VI-ANDKHTAGDPNQLWTLESHF 149
ProteinID176092 EPCF-ICSRENQTE-CATAVETNNGWVVKAKQKHSS--PYQLWRVYRVA 147
RirG_205060    LPEL-ICS-SKQTNMCATEDEECK---VI-ALYNGAV--PRQRWIFHKVH 144
* . ***      :: *** : : * : * : : * * * .

```

図 3. SIS1 と、その他の *R. irregularis* が保持する類似タンパク質間のアミノ酸配列比較

SIS1, Protein ID 176092, RirG205060 のアミノ酸配列を EMBL-EBI ウェブサイト上の ClustalW で比較した(Gap Open: 2, Gap Distances: 1)。青い領域は SignalP 4.1 によって予測されたシグナルペプチドを示す。黄色い領域は相互によく似たアミノ酸配列が集中した部位を表す。

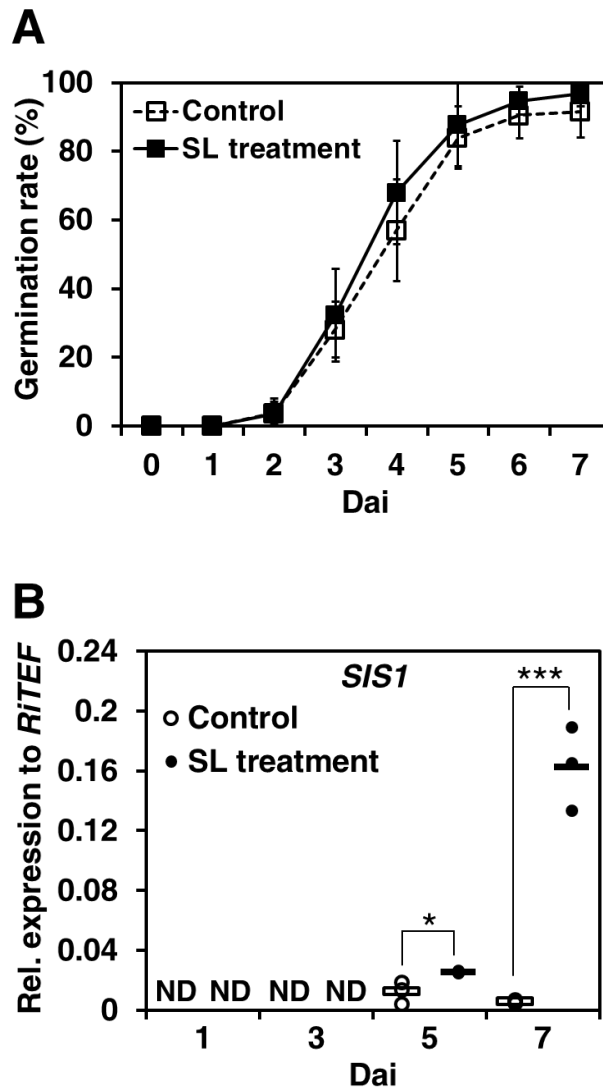


図 4. 胞子発芽率と *SIS1* 発現の経時的解析

A, 1 週間、1 日おきに算出した SL 処理と非処理 (コントロール) 条件下の *R. irregularis* 胞子の発芽率 (生物学的反復 $n = 8$)。エラーバーは標準偏差を表す。

B, qRT-PCR 解析によって定量された胞子播種後 1, 3, 5, 7 日(days after inoculation, dai)の SL 処理と非処理 (コントロール) 条件下の *SIS1* 発現量。これらの発現量は *RiTEF* に対して標準化された。白点と黒点はそれぞれコントロールと SL 処理におけるデータポイントを表す (生物学的反復 $n = 3$)。横棒は 3 反復の平均値を

示す。アスタリスクは Student's *t* test におけるコントロールとの有意差を示す(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)。ND, not detected.

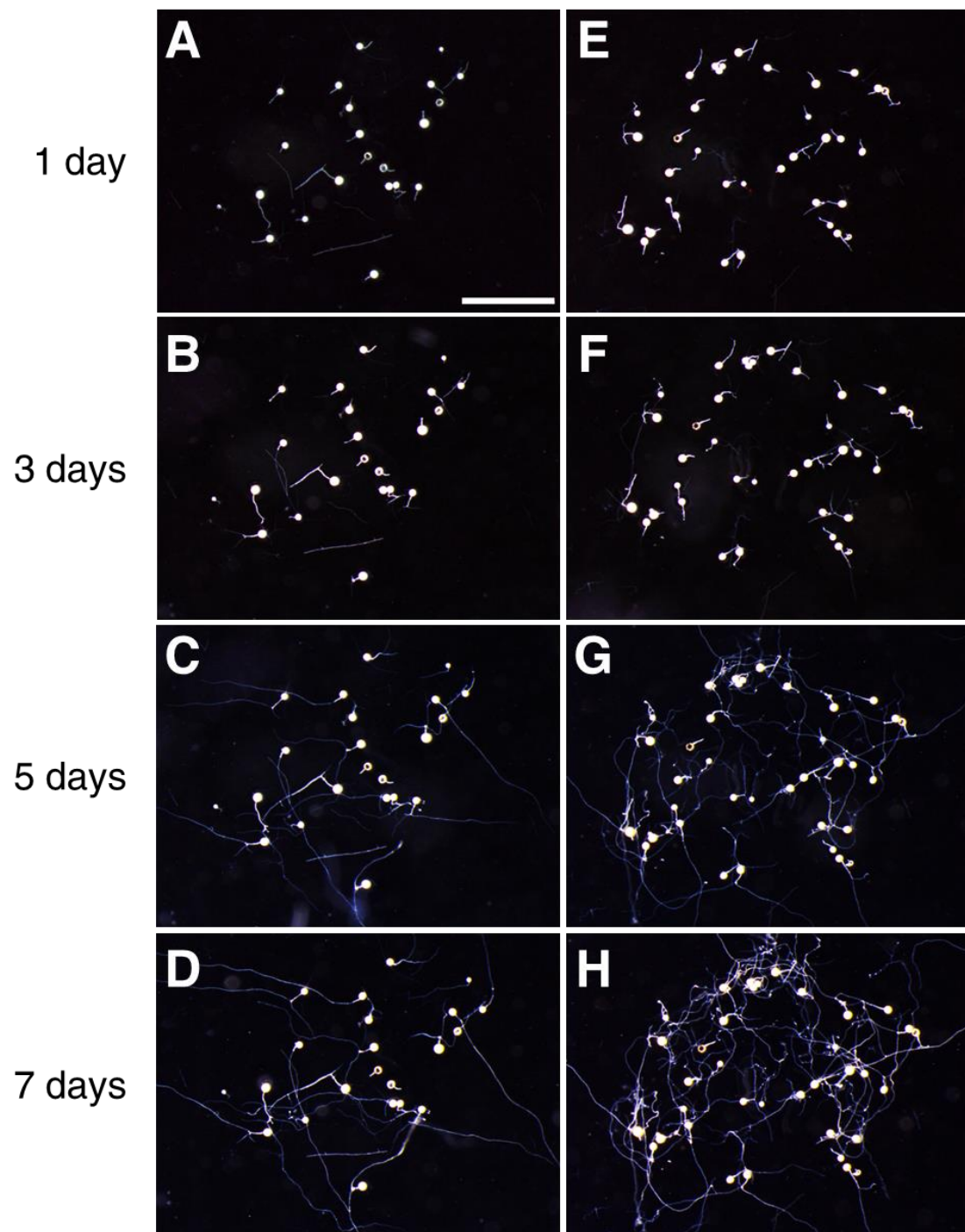


図 5. 胞子発芽と菌糸伸長の様子

R. irregularis 胞子播種後 1, 3, 5, 7 日の発芽率算出に用いた明視野写真。A, B, C, D, 非処理コントロール; E, F, G, H, SL 処理。Bar = 2 mm.

>SIS1

```
ATGAAATTTATCTTACTTTTACTTTTCCTTCTTTTAAACATCCTTACTGATGTTGCTCAAGGAATCGTTATAATACCAACTAAAATTCAA  
TTAAGTAATAGTAATCTTTTTTGGGCATTAGATGGTTCTAATGTTATTTTAAGCCCAATGGTATCAAATGGGCAATTTATAACAATGAA  
ATCTCACCTTATGGTAATGACACGGTCGCCGTCCAATACCAAGGTCCTGGCAAACAACCTCGCTATAGCAAATAAAGGTGGACCTGTTGAA  
ATATTGGAAAAATGGGATGTCGGAAGCATTATAGAACCTCAAATTATTCCAATGTTACCATTTGTTCCATACCAGTCCCTAGTGAATGT  
GCAACAGCAGATGGAATGAAAGTTATTGCTAATGATAAACATACTGCTGGTGACCCTAATCAGTTGTGGACATTAGAGAGTCATTTTTAA
```

図 6. *SIS1* の遺伝子配列

SIS1-HIGS コンストラクトの構築に用いたプライマーセット（緑）と図 9E の qRT-PCR 実験で用いたプライマーセット（マゼンタ）の配列をそれぞれ示す。

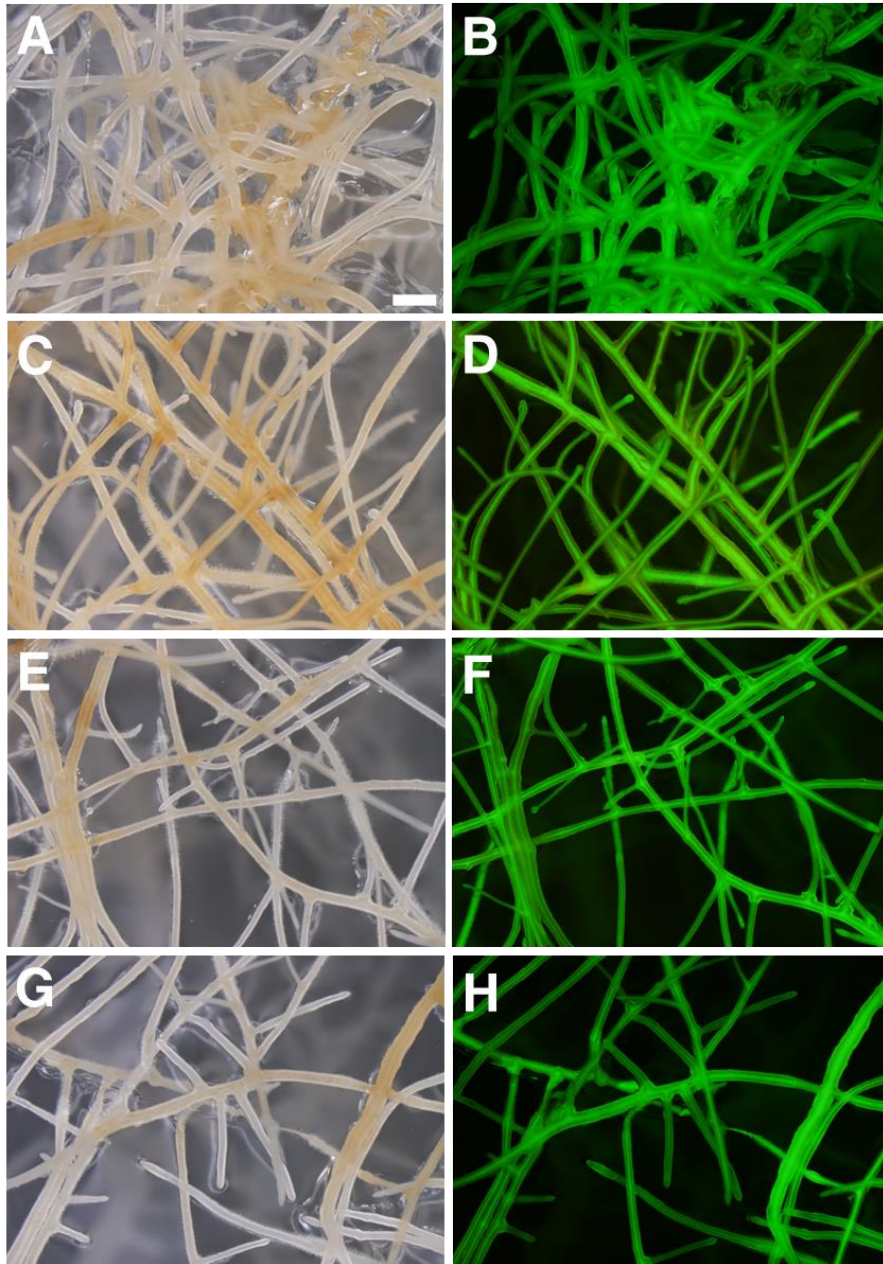


図 7. HIGS コンストラクト由来 eGFP の確認

SIS1-HIGS コンストラクトと empty vector (EV)を用いて形質転換させた毛状根の写真を、明視野と GFP フィルターで撮影した。A, B, EV 毛状根; C, D, SIS1-HIGS L1 毛状根; E, F, SIS1-HIGS L2 毛状根; G, H, SIS1-HIGS L3 毛状根。Bar = 2 mm.

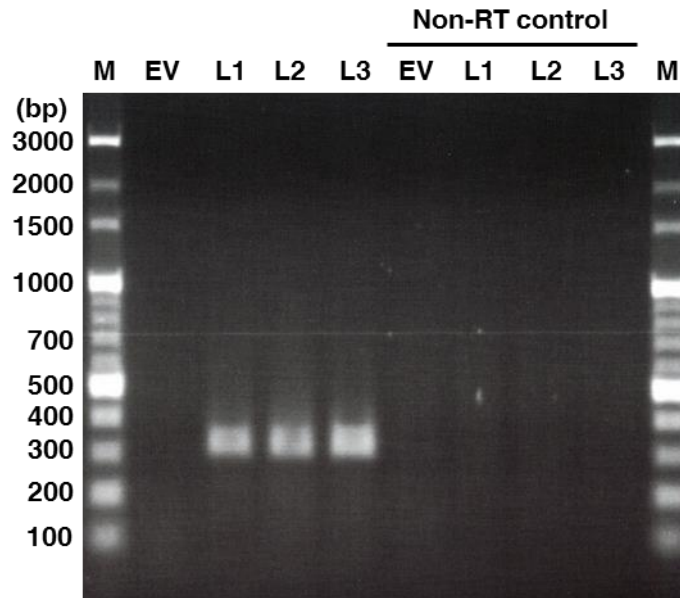


図 8. SIS1-HIGS 毛状根中の 330 bp *SIS1* 断片の転写物の検出

SIS1-HIGS コンストラクトから転写されるヘアピン dsRNA に含まれる 330 bp *SIS1* 断片配列の存在を、非感染の EV と SIS1-HIGS L1, L2, L3 毛状根において、RT-PCR を行うことで調査した。逆転写反応なしのコントロール実験(non-RT control)も同様に行った。M, marker; EV, empty vector; L1-3, SIS1-HIGS lines 1-3.

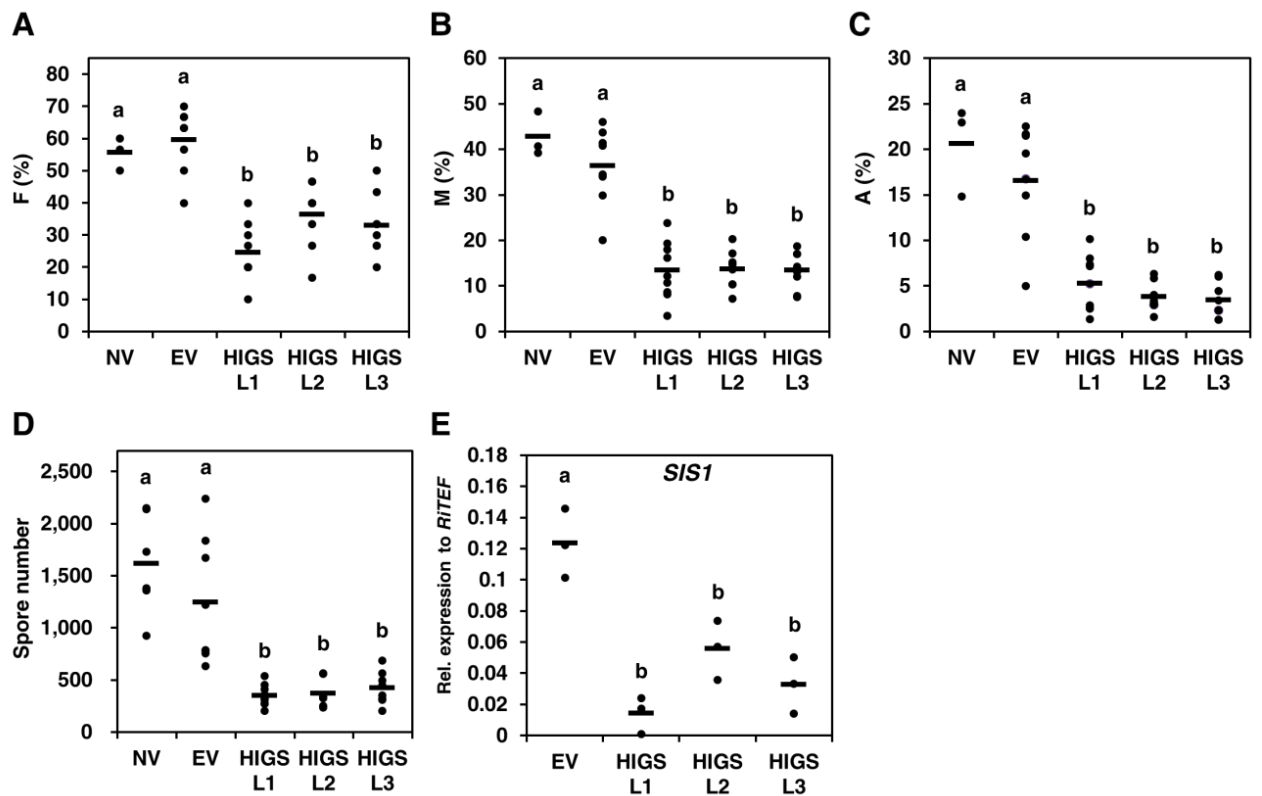


図 9. SIS1-HIGS 毛状根を用いた *in vitro* 共存培養における、感染レベル、胞子形成数と、*SIS1* 発現量

A, B, C, 感染レベルは共存培養の胞子播種後 8 週で解析した。F%は感染率、M%は感染強度、A%は樹枝状体量の指標をそれぞれ示す。生物学的反復はそれぞれ、 $n = 3$ (NV), 8 (EV), 9 (HIGS L1), 8 (HIGS L2), 8 (HIGS L3)である。**D**, 胞子播種後 8 週の培養プレート中に新たに形成された胞子数。生物学的反復はそれぞれ、 $n = 6$ (NV), 8 (EV), 10 (HIGS L1), 8 (HIGS L2), 8 (HIGS L3)である。**E**, 胞子播種後 4 週の内生菌糸における *SIS1* 発現量を測定した。これらは *RiTEF* に対して標準化し、生物学的反復を $n = 3$ とした。各点はデータポイントを、各横棒は 3 反復の平均を表す。異なる文字は Tukey HSD test ($p < 0.05$)における有意差を示す。NV, no vector; EV, empty vector; HIGS L1–3, SIS1-HIGS lines 1–3.

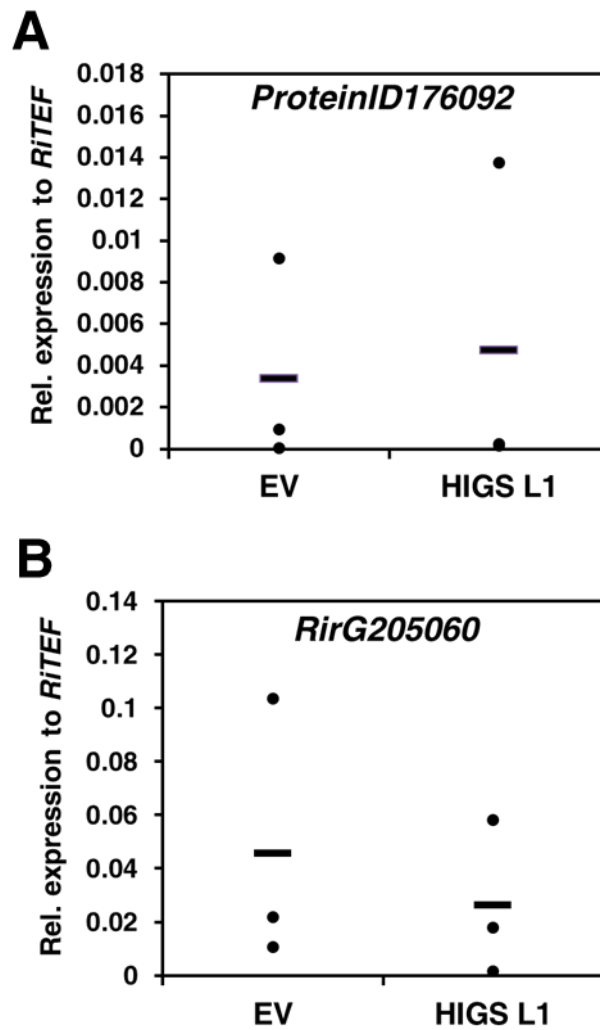


図 10. qRT-PCR による *SIS1* 類似タンパク質遺伝子の発現解析

Protein ID 176092 (A)と *RirG205060* (B)の発現量は、*in vitro* 共存培養 4 週後の内生菌糸において測定した。これらは *RiTEF* に対して標準化した。各点はデータポイントを (生物学的反復 $n = 3$)、各横棒は 3 反復の平均を表す。EV, empty vector; HIGS L1, SIS1-HIGS L1 hairy root.

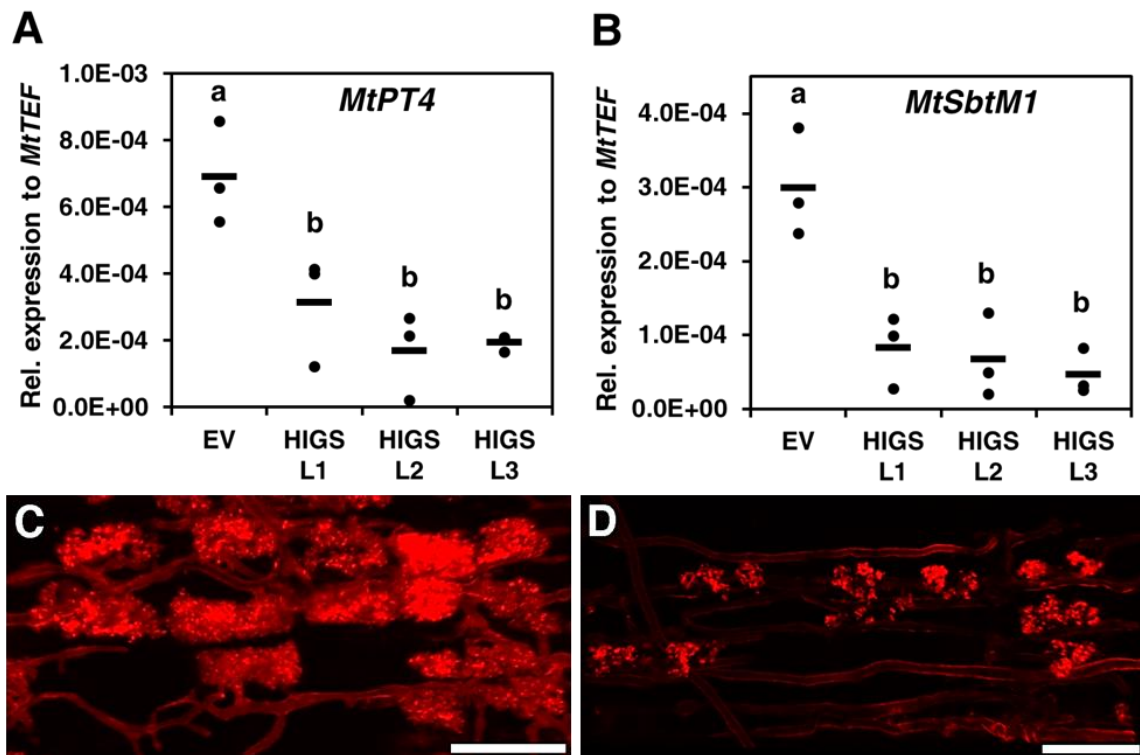


図 11. 宿主植物の AM 共生マーカー遺伝子の発現と、SIS1-HIGS 根内の樹枝状体の形態

M. truncatula の AM 共生マーカー遺伝子である *phosphate transporter4* (*MtPT4*) (A) とサブチラーゼ遺伝子 *MtSbtM1* (B) の発現量を、共存培養 4 週後の EV、SIS1-HIGS 毛状根において測定した。これらは *M. truncatula* の *translation elongation factor 1 α* (*MtTEF*) に対して標準化した。各点はデータポイントを (生物学的反復 $n = 3$)、各横棒は 3 反復の平均を表す。異なる文字は Tukey HSD test ($p < 0.05$) における有意差を示す。C, D, 共存培養 8 週後の EV 毛状根 (C) と SIS1-HIGS L1 毛状根 (D) 中の、wheat germ agglutinin (WGA)-Alexa Fluor 594 dye でラベルした樹枝状体。Bars = 50 μ m.

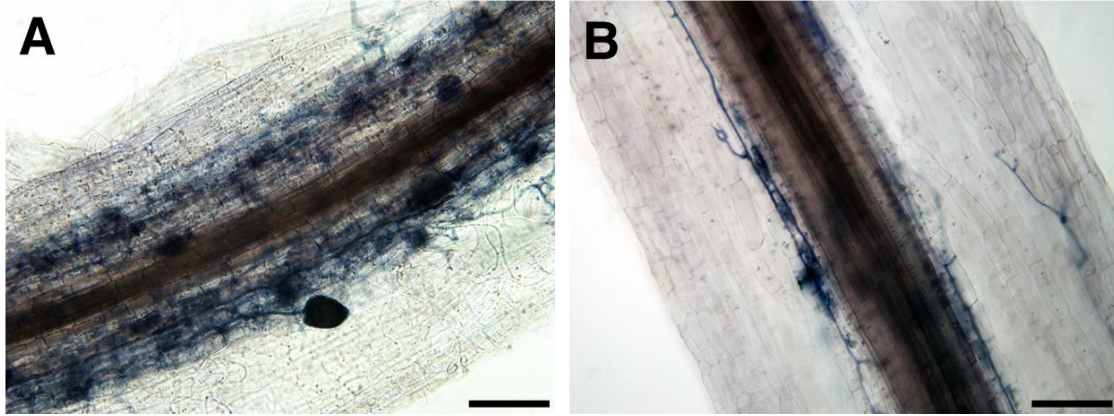


図 12. EV 毛状根と SIS1-HIGS 毛状根内の感染の様子

EV 毛状根(A)、SIS1-HIGS 毛状根(B)を用いた *in vitro* 共存培養 8 週後の *R. irregularis* の内生菌糸をインク染色した後、観察した。Bars = 100 μ m.

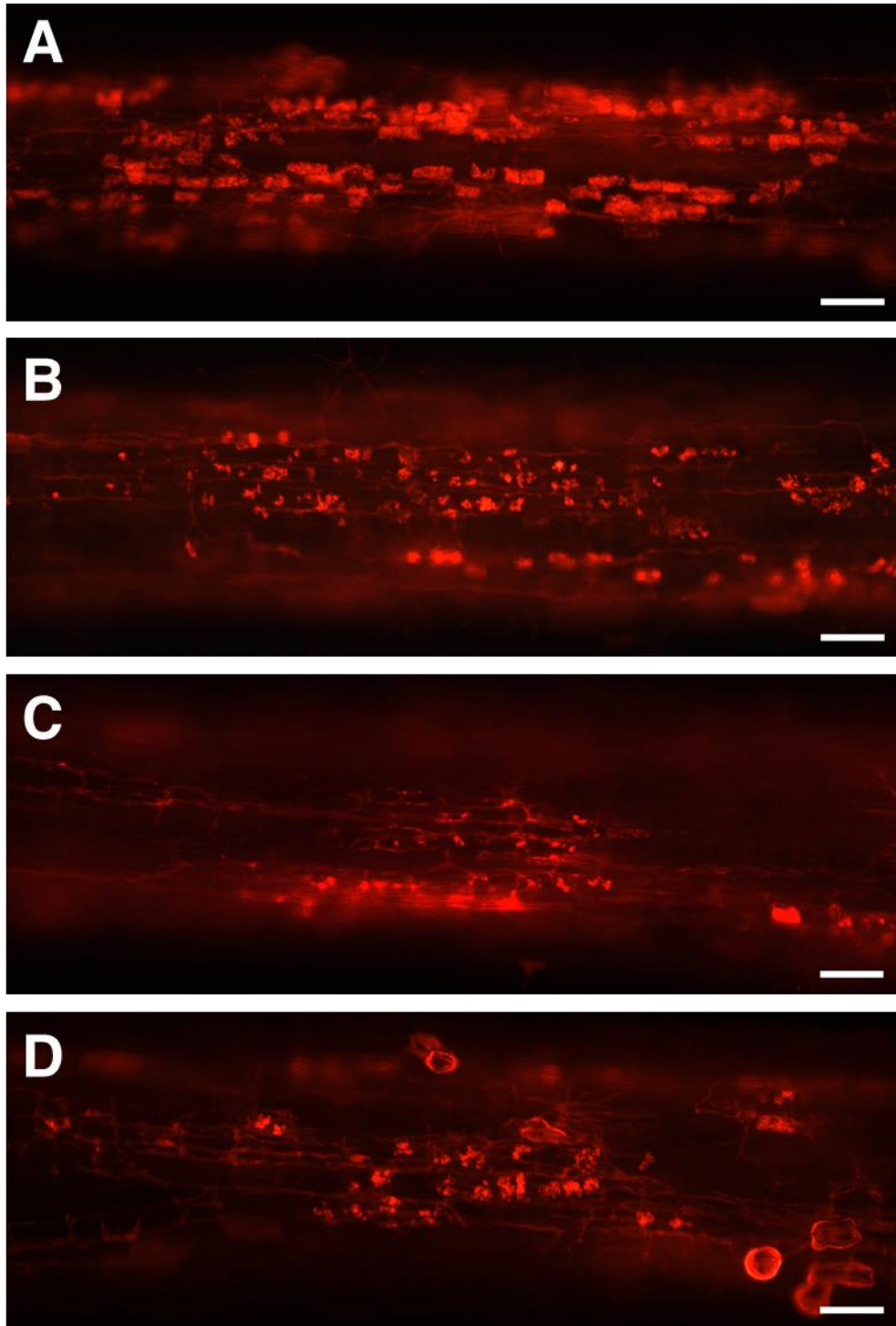


図 13. EV 毛状根と SIS1-HIGS 毛状根内の樹枝状体の俯瞰写真

A, EV 毛状根; B, SIS1-HIGS L1 毛状根; C, SIS1-HIGS L2 毛状根; D, SIS1-HIGS L3 毛状根。Bars = 100 μ m.

表 1. *R. irregularis* の共生時の外生菌糸において上方調節される既知遺伝子群の本 RNA-seq 解析結果

Protein ID	アノテーション	Log ₂ FC (FDR)			
		SL処理	共存培養4週	共存培養6週	共存培養8週
46659	Nitrate transporter (<i>GiNT</i>)	0.08 (1.0E+00)	2.49 (6.7E-11)	4.54 (2.3E-23)	4.06 (1.7E-43)
13677	Glutamine synthetase 2 (<i>GiGS2</i>)	-0.61 (1.0E+00)	1.02 (3.6E-03)	2.21 (3.1E-11)	2.69 (9.5E-23)
342769	Carbamoyl-phosphate synthase (<i>GiCPS</i>)	-0.36 (1.0E+00)	1.84 (1.3E-08)	2.96 (4.4E-23)	2.13 (1.8E-12)
333749	Argininosuccinate synthase (<i>GiASS</i>)	-0.63 (9.1E-01)	2.07 (7.7E-10)	3.44 (2.4E-24)	2.97 (6.6E-18)
217140	Arginase (<i>GiCAR</i>)	0.40 (1.0E+00)	1.28 (5.1E-05)	1.56 (4.3E-07)	-0.21 (1.0E+00)
337025	Ammonium transporter 1 (<i>GintAMT1</i>)	-1.02 (7.1E-01)	3.17 (4.0E-15)	4.40 (3.9E-24)	4.40 (2.7E-34)
341609	Sugar transporter (<i>MST2</i>)	0.52 (1.0E+00)	5.37 (4.0E-19)	5.60 (3.0E-23)	4.68 (1.3E-26)
98222	Aquaporin 1 (<i>GintAQPI</i>)	2.12 (1.0E-03)	3.39 (6.8E-06)	2.52 (5.4E-04)	-2.32 (2.2E-03)
345528	Phosphate transporter (<i>GiPT</i>)	0.18 (1.0E+00)	2.84 (4.9E-13)	3.03 (1.2E-15)	1.01 (3.1E-02)
67971	Ste12-like transcription factor (<i>GintSTE</i>)	0.25 (1.0E+00)	1.70 (2.0E-08)	1.87 (5.3E-11)	0.88 (4.4E-03)

Protein ID は Joint Genome Institute 由来のものである。太字の数値は非共生コントロールと比較して有意な発現変動がみられたことを示す(FDR < 0.001)。FC, fold change; FDR, false discovery rate.

表 2. 本 RNA-seq 解析において SL 処理・共存培養 4 週の両条件で上方調節された *R. irregularis* の遺伝子群

Protein ID	アノテーション	分泌性の 予測結果	Log ₂ FC (FDR)			
			SL 処理	共存培養 4 週	共存培養 6 週	共存培養 8 週
342269	No hit	+	2.55 (3.5E-05)	7.40 (7.3E-50)	7.15 (2.5E-22)	2.63 (4.6E-05)
347085	No hit	+	2.29 (1.1E-12)	5.02 (2.9E-38)	4.30 (4.6E-13)	0.03 (1.0E+00)
334310	Hypothetical protein	+	2.04 (8.4E-10)	4.16 (4.2E-34)	3.29 (1.5E-08)	-0.52 (7.0E-01)
348911	LysM superfamily	+	2.22 (6.7E-12)	4.16 (2.1E-30)	3.40 (3.4E-12)	0.44 (8.1E-01)
176092	No hit	+	2.42 (5.9E-07)	5.40 (9.7E-30)	4.79 (1.5E-13)	0.69 (6.8E-01)
199622	Histone H3		2.02 (7.0E-04)	5.73 (1.2E-29)	5.24 (9.8E-39)	2.07 (1.8E-05)
339406	No hit	+	2.05 (1.9E-08)	3.87 (1.4E-29)	3.44 (6.9E-10)	-0.56 (6.1E-01)
31003	No hit	+	2.29 (7.7E-04)	3.99 (3.3E-28)	3.46 (4.7E-17)	-0.91 (2.2E-01)
347485	No hit		2.10 (4.5E-06)	5.02 (4.2E-27)	3.42 (6.8E-05)	-1.98 (4.1E-04)
348888	Hypothetical protein	+	2.36 (7.7E-07)	3.42 (4.4E-27)	2.46 (1.3E-09)	-1.48 (1.7E-02)
62093	S1/P1 nuclease		1.73 (3.4E-05)	3.36 (3.6E-21)	2.68 (6.9E-06)	-0.92 (1.2E-01)
26749	No hit	+	2.13 (7.7E-04)	4.99 (4.0E-20)	4.87 (4.2E-14)	0.12 (1.0E+00)
345761	No hit	+	2.14 (2.8E-06)	3.00 (1.6E-19)	1.98 (8.4E-06)	-1.39 (2.2E-02)
336409	HMG-box superfamily		4.44 (1.0E-06)	6.50 (1.6E-17)	6.05 (3.2E-23)	4.25 (3.9E-13)
25979	No hit	+	1.83 (2.8E-06)	2.76 (8.4E-17)	1.81 (2.4E-05)	-2.04 (3.3E-06)
341801	No hit		2.21 (7.8E-09)	2.38 (4.1E-10)	0.68 (2.4E-01)	-2.07 (1.8E-06)
91549	Fatty acyltransferase-like subfamily		2.45 (3.5E-05)	3.48 (1.5E-06)	3.16 (1.7E-04)	-1.10 (3.0E-01)
32380	PIF1-like helicase		7.24 (3.3E-10)	8.60 (1.3E-05)	7.98 (2.5E-06)	5.13 (5.8E-03)

345846 No hit

1.77 (2.0E-05)

1.38 (5.5E-04)

0.54 (4.3E-01)

-2.26 (2.6E-09)

Protein ID は Joint Genome Institute 由来のものである。‘+’は、SignalP4.1 によって分泌タンパク質をコードすることが予測されたことを意味する。太字の数値は非共生コントロールと比較して有意な発現変動がみられたことを示す(FDR < 0.001)。FC, fold change; FDR, false discovery rate.

表 3. 11 の推定分泌タンパク質の詳細

Protein ID	タンパク質 の長さ(aa)	SignalP 4.1		シグナル ペプチド 領域(aa)	内生菌糸での 上方調節 ^a	システイン 数	ドメイン予測
		D-score					
342269 (SIS1)	149	0.907		1 - 21	+	2	N/A
347085	94	0.927		1 - 19	+	6	N/A
334310	135	0.919		1 - 19	+	3	Cytolysin/lectin
348911	81	0.913		1 - 22		5	LysM, transmembrane
176092	147	0.906		1 - 19	+	3	N/A
339406	137	0.876		1 - 24		1	Transmembrane
31003	100	0.785		1 - 20	+	0	N/A
348888	133	0.818		1 - 20		0	N/A
26749	154	0.929		1 - 19	+	3	N/A
345761	150	0.890		1 - 24	+	4	Transmembrane
25979	80	0.926		1 - 20	+	0	N/A

Protein IDは Joint Genome Institute 由来のものである。^aこれらのデータは Tisserant et al. (2013)によって示されたものである。aa, amino acids; N/A, Not applicable.

表 4. SIS1-HIGS 実験で用いた dsRNA の効率とターゲット予測の *in silico* 解析

dsRNA 長(nt)	siRNA 長(nt)	21-nt siRNAs 数	効率的な siRNAs 数	Efficiency スコアの 平均	CA[ACGT] リピート 数	<i>R. irregularis</i>		<i>M. truncatula</i>	
						オンター ゲット 遺伝子	オフター ゲット 遺伝子	オンター ゲット 遺伝子	オフター ゲット 遺伝子
330	21	310	100	55.73	0	<i>SISI</i>	N/A	N/A	N/A

詳細は'材料と方法'のセクションを参照。nt, nucleotides; N/A, Not applicable.

表 5. 本研究で用いたプライマー

名前	用途	配列
ProteinID342269_F	図 2 と 4B の実験	TGTTCCATACCAGTCCCTAGTGA
ProteinID342269_R	図 2 と 4B の実験	GTCCACAACCTGATTAGGGTCAC
ProteinID347085_F	図 2 の実験	TGCCCCATTCAAATTACTGGCA
ProteinID347085_R	図 2 の実験	TTACCCTTGACGCCAAAATCGT
ProteinID334310_F	図 2 の実験	ACTTTCTTTGCCGCCGTTACTA
ProteinID334310_R	図 2 の実験	TGCTTACTGGTGGGTATGTTTCC
ProteinID348911_F	図 2 の実験	CCGAACGTAATCTTTCCCGGTT
ProteinID348911_R	図 2 の実験	ATGGTGTATTTCTCTCACGGCT
ProteinID176092_F	図 2 と 10 の実験	ACCACCCTTACTGCTGTTGTTT
ProteinID176092_R	図 2 と 10 の実験	CCCTGGGTATAAAACAACGCCA
ProteinID339406_F	図 2 の実験	AACTGTATCGGAACTCTGGCGA
ProteinID339406_R	図 2 の実験	GCCTTCTACTCCGCTTGACATT
ProteinID26749_F	図 2 の実験	AACTGTTCCTTTTTCGCGTTCCT
ProteinID26749_R	図 2 の実験	TAGGACCAAGGGATTGAACGGA
ProteinID31003_F	図 2 の実験	CCTTGGTCTGTTGGCTCTGAAC
ProteinID31003_R	図 2 の実験	TCTGCGCTAAAGATTGGTGTGG
ProteinID348888_F	図 2 の実験	TTGCCCTTTTCTTCGCCATCTT
ProteinID348888_R	図 2 の実験	GGATTATCGTGTGCTTCCGGTT
ProteinID345761_F	図 2 の実験	GGTGCTTCTCCTTTCCAATGTGA
ProteinID345761_R	図 2 の実験	ACGCCACAATTATTCCTTTGGA
ProteinID25979_F	図 2 の実験	ATGTCTCTAGCCCGGAAGTG
ProteinID25979_R	図 2 の実験	ACTATGGAATCGGATGGAATGTTT
GiPT_F	図 2 の実験	GGTGCTGCCTTTAATCCACTCA
GiPT_R	図 2 の実験	CCCCTGGAACGATGAATGTTGT
RiTEF_F	図 2、9E と 10 の実験	TGTTGCTTTTCGTCCCAATATC
RiTEF_R	図 2、9E と 10 の実験	GGTTTATCGGTAGGTCGAG
SIS1HIGSconstruct_F	SIS1-HIGS コンストラクトの作製	CACCGGCATTAGATGGTTCTAA
SIS1HIGSconstruct_R	SIS1-HIGS コンストラクトの作製	TGACTCTCTAATGTCCACAAC
pK7GWIWG2(I)_F1	SIS1-HIGS コンストラクトの配列解析	ACATGAGCGAAACCCTATAAGAAC
pK7GWIWG2(I)_R1	SIS1-HIGS コンストラクトの配列解析	TTAGCATTTAACGTGTTTGACAGTC
pK7GWIWG2(I)_F2	SIS1-HIGS コンストラクトの配列解析	AAGCGTGACCAGATAAACATAACTC
pK7GWIWG2(I)_R2	SIS1-HIGS コンストラクトの配列解析	GACGCACAATCCCACTATCCTTC
SIS1HIGSoutside_F	図 9E の実験	CATCCTTACTGATGTTGCTCAAGG

SIS1HIGSoutside_R	☒ 9E の実験	CCATCTAATGCCCAAAAAAGATTAC
MtPT4_F	☒ 11A の実験	GGTTCTTCCGCGAAATCTGTTA
MtPT4_R	☒ 11A の実験	AGGGTAGTCTCCACCAATACCA
MtSbtM1_F	☒ 11B の実験	ATGTTGGCTGCAGAGGAGAATC
MtSbtM1_R	☒ 11B の実験	AAATCCAGAGGCTACTTTGCGG
MtTEF_F	☒ 11A と 11B の実験	TACTCTTGGAGTGAAGCAGATG
MtTEF_R	☒ 11A と 11B の実験	GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG
RirG205060_F	☒ 10 の実験	TTCTTTTGCTCCTTTCAACCGC
RirG205060_R	☒ 10 の実験	TGTCCAGTTAGCAGCTTGTCT

7. 参考文献

- Akiyama K., Matsuzaki K., and Hayashi H.** 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824–827.
- Akkopru A., and Demir S.** 2005. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *J. Phytopathol.* 153:544–550.
- Albert M.** 2013. Peptides as triggers of plant defence. *J. Exp. Bot.* 64:5269–5279.
- Aono T., Maldonado-Mendoza I. E., Dewbre G. R., Harrison M. J., and Saito M.** 2004. Expression of alkaline phosphatase genes in arbuscular mycorrhizas. *New phytol.* 162:525-534.
- Arite T., Umehara M., Ishikawa S., Hanada A., Maekawa M., Yamaguchi S., and Kyojuka J.** 2009. *d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol.* 50:1416–1424.
- Aroca R., Porcel R., and Ruiz-Lozano J. M.** 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytol.* 173:808-816.
- 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. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1169–1178.
- Augé R. M.** 2001. Water relations, drought and vesiculararbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42.

- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., and Piché Y.** 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139:375–388.
- Bago B., Pfeffer P. E., and Shachar-Hill Y.** 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* 124:949–958.
- Bécard G., and Fortin J. A.** 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108:211–218.
- Berta G., Sampo S., Gamalero E., Massa N., and Lemanceau P.** 2005. Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mossae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. *Eur. J. Plant Pathol.* 111:279–288.
- Besserer A., Puech-Pages 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 Biol.* 4:1239–1247.
- 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 Physiol.* 148:402–413.
- Bonfante P. and Genre A.** 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1:48.
- Brundrett M. C.** 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 Soil*

320:37–77.

- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R. V., Journet E. P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C., and Dénarié J.** 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12:1647–1666.
- Chen C., Fan C., Gao M., and Zhu H.** 2009. Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol.* 149:306-317.
- Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., and Egley G. H.** 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154:1189–1190
- Cook J. G., Bardwell L., and Thorner J.** 1997. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 390:85–88.
- Cordier C., Pozo M. J., Barea J. M., Gianinazzi S., and Gianinazzi-Pearson V.** 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1017–1028.
- Danesh Y. R., Mohammadi Goltapeh E., Alizadeh A., and Modarres Sanavy M.** 2006. Optimizing carrot hairy root production for monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi in Iran. *J. Biol. Sci. (Faisalabad, Pak.)* 6:87–91.
- Dolan W., Kirkman C., and Field S.** 1989. The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Biochemistry* 86:5703–5707.
- Doner L. W., and Bécard G.** 1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations.

Biotechnol. Tech. 5:25–28.

Duan X. G., Neuman D. S., Reiber J. M., Green C. D., Saxton A. M., and Augé R.

M. 1996 Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *J. Exp. Bot.* 47:1541–1550.

Duhamel M., and Vandenkoornhuysen P. 2013. Sustainable agriculture: possible

trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci.* 18:597-600.

Errede B., and Ammerer G. 1989. STE12, a protein involved in cell-type-specific

transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes & Development* 3:1349–1361.

Ezawa T., Cavagnaro T. R., Smith S. E., Smith F. A., and Ohtomo R. 2004. Rapid

accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol.* 161:387–392.

Feddermann N., Muni R. R., Zeier T., Stuurman J., Ercolin F., Schorderet M., and

Reinhardt D. 2010. The *PAMI* gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *Plant J.* 64:470–481.

Felix G., Duran J. D., Volko S., and Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception

system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265–276.

Foley J. A., Defries R., Asner G. P., Barford C., Bonan G., Carpenter S. R., Chapin

F. S., Coe M. T., Daily G. C., Gibbs H. K., Helkowski J. H., Holloway T.,

Howard E. A., Kucharik C. J., Monfreda C., Patz J. A., Prentice I. C.,

Ramankutty N., and Snyder P. K. 2005. Global consequences of land use.

Science 309:570-574.

Furlan V., Bartschi H., and Fortin J. A. 1980. Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75:336-338.

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 Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198:190–202.

Gobatto E., Marsh J. F., Vernié T., Wang E., Maillet F., Kim J., Miller J. B., Sun J., Bano A., Ratet P., Mysore K. S., Dénarié J., Schultze M., and Oldroyd G. E. 2012. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol.* 22:2236–2241.

Gomez-Gomez L., and Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5:1003–1011.

Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., and Rochange S. F. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189–194.

Grigoriev I. V., Nikitin R., Haridas S., Kuo A., Ohm R., Otilar R., Riley R., Salamov A., Zhao X., Korzeniewski F., Smirnova T., Nordberg H., Dubchak I.,

- and Shabalov I.** 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42:D699-704.
- 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 J.* 69:906–920.
- Gutjahr C., and Parniske M.** 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29:593-617.
- Hamiaux C., Drummond R. S., Janssen B. J., Ledger S. E., Cooney J. M., Newcomb R. D., and Snowden K. C.** 2012. DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* 22:2032–2036.
- 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 Cell Physiol.* 56:1490–1511.
- Harrison M. J., and van Buuren M. L.** 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626–629.
- Harrison M. J., Dewbre G. R., and Liu J.** 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14:2413–2429.
- 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.

Horn T., Sandmann T., and Boutros M. 2010. Design and evaluation of genome-wide libraries for RNA interference screens. *Genome Biol.* 11:R61.

Ivanov S., Fedorova E. E., Limpens E., De Mita S., Genre A., Bonfante P., and Bisseling T. 2012. *Rhizobium*–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:8316–8321.

Javot H., Penmetza R. V., Terzaghi N., Cook D. R., and Harrison M. J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:1720–1725.

Jiang L., Liu X., Xiong G. S., Liu H., Chen F., Wang L., Meng X., Liu G., Yu H., Yuan Y., Yi W., Zhao L., Ma H., He Y., Wu Z., Melcher K., Qian Q., Xu H. E., Wang Y., and Li J. 2013. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature* 504:401–405.

Jin H. 2008. Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS Lett.* 582:2679–2684.

Kanamori N., Madsen L. H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E. M., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:359–364.

Karimi M., Inzé D., and Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7:193–195.

Katiyar-Agarwal S., and Jin H. 2010. Role of small RNAs in host–microbe

interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:225–246.

- Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb K. 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. *Curr. Biol.* 21:1204–1209.
- Kobae Y., and Hata S.** 2010. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol.* 51:341–353.
- Kobae Y., Tamura Y., Takai S., Banba M., and Hata S.** 2010. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant Cell Physiol.* 51:1411–1415.
- Koltai H., LekKala S. P., Bhattacharya C., Mayzlish-Gati E., Resnick N., Wininger S., Dor E., Yoneyama K., Hershenhorn J., Joel D. M., and Kapulnik Y.** 2010. A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *J. Exp. Bot.* 61:1739–1749.
- Kretschmar T., Kohlen W., Sasse J., Borghi L., Schlegel M., Bachelier J. B., Reinhardt D., Bours R., Bouwmeester H. J., and Martinoia E.** 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483:341–344.
- Kuhn H., Kuster H., and Requena N.** 2010. Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 185:716–733.

- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., and Felix G.** 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16:3496–3507.
- Lee J.** 2011. The distribution of cytoplasm and nuclei within the extra-radical mycelia in *Glomus intraradices*, a species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycobiology* 39:79-84.
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E. P., Ané J. M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié 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 H. Y., Yang G. D., Shu H. R., Yang Y. T., Ye B. X., Nishida I., and Zheng C. C.** 2006. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant Cell Physiol.* 47:154–163.
- Li T., Hu Y. J., Hao Z. P., Li H., Wang Y. S., and Chen B. D.** 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 197:617-630.
- 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 Genet.* 10:e1004078.
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C. D., and**

- Harrison M. J.** 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50:529-544.
- Liu Q., Parsons A. J., Xue H., Jones C. S., and Rasmussen S.** 2013. Functional characterisation and transcript analysis of an alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*. *Fungal Genet. Biol.* 54:52-59.
- López-Pedrosa A., González-Guerrero M., Valderas A., Azcón-Aguilar C., and Ferrol N.** 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet. Biol.* 43:102–110.
- Ma Y., Creanga A., Lum L., and Beachy P. A.** 2006. Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature* 443:359-363.
- Maillet F., Poinso V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martínez E. A., Driguez H., Bécard G., and Dénarié J.** 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58–63.
- Maldonado-Mendoza I. E., Dewbre G. R., and Harrison M. J.** 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1140–1148.
- Markmann K., Giczey G., and Parniske M.** 2008. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *Plos Biol.* 6:497–506.

- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L., and Wold B.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5:621–628.
- Nadal M., and Paszkowski U.** 2013. Polyphony in the rhizosphere: presymbiotic communication in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:473–479.
- Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., and Snyder M.** 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320:1344–1349.
- 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.
- Nunes C. C., and Dean R. A.** 2012. Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Mol. Plant Pathol.* 13:519-529.
- Padmanabhan C., Zhang X., and Jin H.** 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:465–472.
- Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., and Nielsen H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8:785–786.
- Pingali P. L.** 2012. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:12302–12308.
- Pozo M. J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J. M. and Azcon-Aguilar C.** 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular

- mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. J. Exp. Bot. 53:525–534.
- Pressel S., Bidartondo M. J., Ligrone R., and Duckett J. G.** 2010. Fungal symbioses in bryophytes: new insights in the twenty first century. Phytotaxa 9:238-253.
- Pumplin N., and Harrison M. J.** 2009. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant Physiol. 151: 809–819.
- 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 J. 61:482–494.
- Read D. J., Duckett J. G., Francis R., Ligrone R., and Russell A.** 2000. Symbiotic fungal associations in ‘lower’ land plants. Philosophical Transactions of the Royal Society London B355:795-813.
- Recorbet G., Abdallah C., Renaut J., Wipf D., and Dumas-Gaudot E.** 2013. Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: underground artists break the silence. New Phytol. 199:26–40.
- Redecker D., Kodner R., and Graham L. E.** 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289:1920–1921.
- Remy W., Taylor T. N., Hass H., and Kerp H.** 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:11841–11843.
- Roberts R. L., and Fink G. R.** 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes Dev. 8:2974–2985.
- 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.
- Ruiz-Ferrer V., and Voinnet O.** 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:485–510.
- 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.
- Shah J. K., Garner H. R., White M. A., Shames D. S., and Minna J. D.** 2007. sIR: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinf.* 8:178.
- Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., and Ragg T.** 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7:3.
- Schübler A. and Walker C.** 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. 1–58 Gloucester, UK
- Sharda J. N. and Koide R. T.** 2008. Can hypodermal passage cell distribution limit root penetration by mycorrhizal fungi? *New Phytol.* 180:696–701.
- Simon L., Bousquet J., Lévesque C., and Lalone M.** 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363:67–69.
- Smith S. E., Smith F. A., and Jakobsen I.** 2003. Mycorrhizal fungi can dominate

- phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133:16-20.
- Stergiopoulos I., and de Wit P. J.** 2009. Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:233–263
- Stirnberg P., van De Sande K., and Leyser H. M.** 2002. *MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* 129:1131–1141.
- Stirnberg P., Furner I. J. and Leyser H. M. O.** 2007. *MAX2* participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* 50:80–94.
- 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 fungal and bacterial symbiosis. *Nature* 417:959–962.
- Sun J., Nishiyama T., Shimizu K., and Kadota K.** 2013. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinf.* 14:219.
- Sylvia D. M., Fuhrmann J. J., Hartel P. G., and Zuberer D. A.** 2004. Principles and applications of soil microbiology (2nd Edition). Upper Saddle River, NJ: Pearson.
- Takeda N., Sato S., Asamizu E., Tabata S., and Parniske M.** 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 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 Cell Physiol.* 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 Physiol.* 167:545–557.

Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P. J., Bücking H., and Shachar-Hill Y.

2010. Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiol.* 153:1175–1187.

Tilman D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R., Schindler

D., Schlesinger W. H., Simberloff D., and Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281-284.

Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., Kohler A., Symeonidi A., Balestrini R., Charron

P., Duensing N., Frei dit Frey N., Gianinazzi-Pearson V., Gilbert L. B., Handa Y., Herr J. R., Hijri M., Koul R., Kawaguchi M., Krajinski F., Lammers P. J., Masclaux F. G., Murat C., Morin E., Ndikumana S., Pagni M., Petitpierre D., Requena N., Rosikiewicz P., Riley R., Saito K., San Clemente H., Shapiro H., van Tuinen D., Bécard G., Bonfante P., Paszkowski U., Shachar-Hill Y. Y., Tuskan G. A., Young J. P., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:20117–20122.

Tollot M., Wong Sak Hoi J., van Tuinen D., Arnould C., Chatagnier O., Dumas B.,

Gianinazzi-Pearson V., and Seddas P. M. 2009. An *STE12* gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytol.* 181:693–707.

- Trouvelot A., Kough J. L., and Gianinazzi-Pearson V.** 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA Press, Paris, 217-221.
- Tsuji G., Fujii S., Tsuge S., Shiraishi T., and Kubo Y.** 2003. The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:315–325.
- van der Heijden M. G. A., Martin F. M., Selosse M. A., and Sanders I. R.** 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 205:1406–1423.
- Van Kauwenbergh S. J.** 2010. *World Phosphate Rock Reserves and Resources*. IFDC Technical Bulletin 75.
- Vogel J. T., Walter M. H., Giavalisco P., Lytovchenko A., Kohlen W., Charnikhova T., Simkin A. J., Goulet C., Strack D., Bouwmeester H. J., Fernie A. R., and Klee H. J.** 2010. *SICCD7* controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza- induced apocarotenoid formation in tomato. *Plant J.* 61:300–311.
- Waldie T., McCulloch H., and Leyser O.** 2014. Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J.* 79:607-622.
- Wang B., Jeun 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 Phytol.* 186:514-525.
- Wang E., Schornack S., Marsh J. F., Gobbato E., Schwessinger B., Eastmond P., Schultze M., Kamoun S., and Oldroyd G. E.** 2012. A common signaling process that promote mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol.*

22:2242–2246.

- Waters M. T., Nelson D. C., Scaffidi A., Flematti G. R., Sun Y. K., Dixon K. W., and Smith S. M.** 2012. Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development*. 139:1285–1295.
- Weiberg A., Wang M., Bellinger M., and Jin H.** 2014. Small RNAs: a new paradigm in plant–microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol* 52:495–516.
- Wigchert S. C., Kuiper E., Boelhouwer G. J., Nefkens G. H., Verkleij J. A., and Zwanenburg B.** 1999. Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *J Agric. Food Chem.* 47:1705-1710.
- Wong Sak Hoi J., Herbert C., Bacha N., O’Connell R., Lafitte C., Borderies G., Rossignol M., Rougé P., and Dumas B.** 2007. Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol. Microbiol.* 64:68–82.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:20540-20545.
- Yin C., Jurgenson J. E., and Hulbert S. H.** 2011. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:554–561.
- Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M.**

K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., Zhou, S., Mudge, J., Bharti, A. K., Murray, J. D., Naoumkina, M. A., Rosen, B., Silverstein, K. A. T., Tang, H., Rombauts, S., Zhao, P. X., Zhou, P., Barbe, V., Bardou, P., Bechner, M., Bellec, A., Berger, A., Bergès, H., Bidwell, S., Bisseling, T., Choisine, N., Couloux, A., Denny, R., Deshpande, S., Dai, X., Doyle, J. J., Dudez, A. M., Farmer, A. D., Fouteau, S., Franken, C., Gibelin, C., Gish, J., Goldstein, S., González, A. J., Green, P. J., Hallab, A., Hartog, M., Hua, A., Humphray, S. J., Jeong, D. H., Jing, Y., Jöcker, A., Kenton, S. M., Kim, D. J., Klee, K., Lai, H., Lang, C., Lin, S., Macmil, S. L., Magdelenat, G., Matthews, L., McCorrison, J., Monaghan, E. L., Mun, J. H., Najjar, F. Z., Nicholson, C., Noirot, C., O’Bleness, M., Paule, C. R., Poulain, J., Prion, F., Qin, B., Qu, C., Retzel, E. F., Riddle, C., Sallet, E., Samain, S., Samson, N., Sanders, I., Saurat, O., Scarpelli, C., Schiex, T., Segurens, B., Severin, A. J., Sherrier, D. J., Shi, R., Sims, S., Singer, S. R., Sinharoy, S., Sterck, L., Viollet, A., Wang, B. B., Wang, K., Wang, M., Wang, X., Warfsmann, J., Weissenbach, J., White, D. D., White, J. D., Wiley, G. B., Wincker, P., Xing, Y., Yang, L., Yao, Z., Ying, F., Zhai, J., Zhou, L., Zuber, A., Dénarié, J., Dixon, R. A., May, G. D., Schwartz, D. C., Rogers, J., Qué-tier, F., Town, C. D., and Roe, B. A. 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480:520-524.

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.

Zhou F., Lin Q. B., Zhu L. H. Ren Y., Zhou K., Shabek N., Wu F., Mao H., Dong W., Gan L., Ma W., Gao H., Chen J., Yang C., Wang D., Tan J., Zhang X., Guo X., Wang J., Jiang L., Liu X., Chen W., Chu J., Yan C., Ueno K., Ito S., Asami T., Cheng Z., Wang J., Lei C., Zhai H., Wu C., Wang H., Zheng N., and Wan J.
2013. D14-SCF(D3)-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* 504:406–410.

Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J. D., Boller T., and Felix G.
2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125:749–760.

8. 謝辞

最初に、指導教官である基礎生物学研究所・共生システム研究部門川口正代司教授に、厚く御礼申し上げたいと思います。川口先生は、私がそれまで全く扱っていなかったアーバスキュラー菌根菌の研究を、博士後期課程から行うことを快く認めてくださいました。また、私に研究活動を自由に行わせていただきながら、時に議論を重ねることで科学的・論理的な思考法を身に付けられるように導いていただきました。心より感謝の意を表したいと思います。

同様に、ご自身の研究の合間に、私の研究活動に対する指導にたくさんのお時間を割いていただいた同部門の武田直也助教にも心から御礼申し上げます。武田先生には当初不慣れであったアーバスキュラー菌根菌の取り扱いなど、本研究で用いたほとんどの実験技術を教えていただきましたし、非常に多くの有益なアドバイスもいただきました。また実験だけでなく、研究者としての発表の仕方や、論文の書き方などについてもご指導いただきました。深く感謝申し上げます。

また同部門の半田佳宏研究員には、本研究で用いた次世代シーケンサーのデータ解析のほとんどを丁寧に教えていただきました。近年発展が目覚ましい分野であるバイオインフォマティクスに触れることができたのは、私にとって非常に大きな財産になりました。心より感謝いたします。

同部門所属の皆様方にも、ミーティングでアドバイスをいただいたり、実験のサポートをしていただいたり、大変お世話になりました。感謝の意を表します。

本学の授業でお世話になった同研究所の長谷部光泰教授、松林嘉克教授（現：名古屋大学）、重信秀治特任准教授、鎌田芳彰助教にも、本研究に関する重要なお指摘を多数いただきました。厚く御礼申し上げます。

また同研究所の生物機能情報分析室と光学解析室の方々にも、実験機器の利用等で大変お世話になりました。深く感謝いたします。

以上のすべての方々の支援がなければ、本博士論文を書き上げることはできませんでした。皆様方に心より感謝申し上げます。