

シンポジウム

接種菌をどのように検出識別するか？
アーバスキュラー菌根菌の場合横山和平¹⁾・立石貴浩^{1,2)}・河野伸之^{1,2)}・斉藤雅典³⁾・丸本卓哉¹⁾¹⁾ 山口大学農学部：〒753-8515 山口県山口市吉田 1677-1²⁾ 生物系特定産業技術研究推進機構：〒331-8537 埼玉県さいたま市日進町 1-40-2³⁾ 畜産草地研究所・草地生態部：〒329-2793 栃木県那須郡西那須野町千本松 768Isolate-specific detection of an arbuscular mycorrhizal fungus,
Gigaspora margarita inoculated in soilKazuhira Yokoyama¹⁾, Takahiro Tateishi^{1,2)}, Nobuyuki Kohno^{1,2)}, Masanori Saito³⁾
and Takuya Marumoto¹⁾¹⁾ Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,
1677-1 Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi, 753-8515 Japan²⁾ Bio-oriented Technology Research Advancement Institution,
1-40-2-Nisshin, Saitama-shi, Saitama, 331-8573 Japan³⁾ Department of Grassland Ecology, National Institute of Livestock
and Grassland Science, 768 Senbonmatsu, Nishinasuno-cho,
Nasu-gun, Tochigi, 329-2793 JapanKey words: *Gigaspora margarita*, DNA marker, Specific identification, Reforestation

1. はじめに

土壌に接種した微生物株のリアルタイムでの追跡は土壌微生物の有効利用法の検討あるいは接種効果の検証という実用的な面だけでなく、土壌微生物の生態を明らかにするという科学的な興味からも重要である。雑多な微生物の中から接種菌株を迅速に検出するためには安定で特異的な特徴を予め見つけておく必要がある。著者らは、1999年から生研機構プロジェクト「共生微生物等を利用した荒廃土壌の新修復技術の開発」において、人為的に導入されたアーバスキュラー菌根菌(以下、AM菌) *Gigaspora margarita* の生態学的解析と緑化過程に及ぼす効果の評価を行っている。

AM菌は接合菌類の Glomales 目に属し、広範囲の植物種と共生系を形成する。AM菌は、土壌中の希薄なリン酸イオンを吸収し水分と共に植物根に供給するので、可給態リン酸の乏しい土壌や乾燥しやすい土壌では植物生育を著しく促進する

ことが知られている^{9,11)}。日本の一般の農耕地土壌はリン酸肥沃度が高く、AM菌の効果はあまり期待できないが、法面や土砂崩れ・泥流・火砕流跡地のように、表土が流亡または未熟な土壌で被覆された場所での生育促進には有効と考えられている。例えば、雲仙普賢岳火砕流跡地で、*G. margarita* 胞子を含む緑化資材が投入され、各種解析から緑化促進の効果が認められた^{7,9)}。しかしながら、周囲の非被災地から土着 AM菌の侵入の機会があり、導入 *G. margarita* がこれら土着 AM菌群と相互作用しながらどのように緑化促進に寄与したか、あるいは AM菌間に相互作用と呼べるものがあつたのかどうかという点は解析されていない。このような動態解析は、AM菌の生態学的研究からも興味を持たれる。即ち、環境条件の変動あるいは土着微生物との相互作用の下で、植物コロニーの発達に伴う導入 *G. margarita* のオートエコロジーを解析するチャンスでもある。

AM菌の同定・識別は主に胞子の色、形、大きさ、付着菌糸及び構造物の形態に基づいて行われており、正確な判別には熟練を要する。まして、

同一種内の異なる系統の識別は、形態学的には不可能とあってよく、このため、DNA マーカーの利用が期待される。しかし、AM 菌は純粋培養できず分子生物学的な研究が進んでいないため、組み換え系が確立されていない。このため、バクテリア等で汎用される抗生物質マーカーなどは利用できない。また、野外での生態調査と組み合わせるためには、組み換えに頼らずゲノム配列自体をマーカーに用いることが望まれる。ここでは、緑化に実際に用いられている *G. margarita* CK 株及び同系統の MAFF520054 を中心に DNA マーカーとして利用可能な配列を検索し、生態学的解析に応用した例を紹介する。

2. DNA 解析を利用した AM 菌 識別における問題点

同一種で異なる系統の AM 菌の識別には孢子 DNA を鋳型とした PCR を用いた遺伝子レベルでの解析が汎用されている。5.8SrDNA を含む ITS 領域などの rRNA 遺伝子配列とミニサテライト配列を利用した RAPD とが利用されてきたが、次のような問題がある。

①単一孢子内の核の遺伝的多様性：単一孢子 DNA 標品からでも極めて多様な ITS 配列が得られることがいくつかの AM 菌について知られている¹⁰⁾。事実、*G. margarita* MAFF520054 の ITS 領域のクローンの配列は、*Gigaspora* 属の ITS 配列の分子系統樹中に広く分布するとともに、他の系統及び *G. rosea* からの配列ともオーバーラップし、特定のクラスターを形成しなかった(図1)。単一孢子内 DNA の多型現象は ITS 領域に限らず、*Glomus coronatum* の LSU rDNA の D2 領域の PCR 産物を SSCP で解析した例でも報告されている^{1,5)}。一般に孢子間の多様性よりも単一孢子内の遺伝的多様性の方が高いと考えられている^{6,12)}。

②生育に伴う遺伝的多様性：*G. margarita* では直径 400 μm 内外の孢子中に 2000 個以上もの核があり⁹⁾、①からその多くは遺伝型が互いに異なると考えられている。Zézé *et al.* は、*G. margarita* の世代間で、RAPD で得られるバンドパターンが異なることを見いだした¹⁷⁾。このことから、発芽、菌糸伸長、植物根への感染、孢子形成の各ステップ間で遺伝的に多様な核の配分や複製が均等に行われないことが示唆される⁹⁾。

③マーカーとしての単一配列の必要性：RAPD に関しては、孢子を用いる場合には識別に役立つ可能性はあるが、植物根中の菌糸や構造物から DNA を抽出する場合には、共存植物 DNA による妨害が大きいことが予想される。このため、本研究の最終目標である現場での解析には、*G. margarita* の対象系統に特異的な単一配列による識別が望まれる。

3. 特異的 235bp 配列による識別

G. margarita MAFF520054 に特異的な DNA 配列を検索するために、既往の文献で紹介されたものや新規に設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR したが、利用できる配列は得られなかった。続いて、市販の 12 mer ランダムプライマーから、*Scutellospora castanea* で報告されたタンデムリピート¹⁰⁾と 3'-末端が一致するものを選び RAPD を行った。明瞭な増幅産物の塩基配列を決定し、500 bp 以上の配列についてプライマーセットを設計した。これらのプライマーを用いて数系統の *G. margarita* の DNA を PCR したところ、共通したバンドが得られた。従って、これらのプライマーは、系統特異的ではないものの、*G. margarita* ゲノム配列に対応するものと期待された。このように設計したプライマー10種及び ITS1、ITS4¹⁴⁾、M13 ミニサテライトプライマー、(GACA)₄プライマーをランダムに組み合わせ PCR したところ、RAPD 配列から設計した 639R プライマーと M13 ミニサテライトプライマーの組み合わせで MAFF520054 と CK 両株に特異的なバンドを得た。このバンドを回収し塩基配列を決定した (DDBJ accession No. AB052750)。配列の一部から DIG 標識プローブを作成して PCR 産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行った結果、*G. margarita* CK・MAFF520054 株で 235 bp の PCR バンドが標識された。他の系統の PCR 産物はこのプローブでは標識されなかった。畜産草地研究所において栽培された AM 菌共生植物根からマーカー配列の検出を試みた。この結果、*G. margarita* MAFF520054 が感染した植物根からのみポジティブバンドが得られた¹⁵⁾。AM 菌について単一 DNA 配列を指標に菌株レベルで識別を可能にした例はいままでなかった。

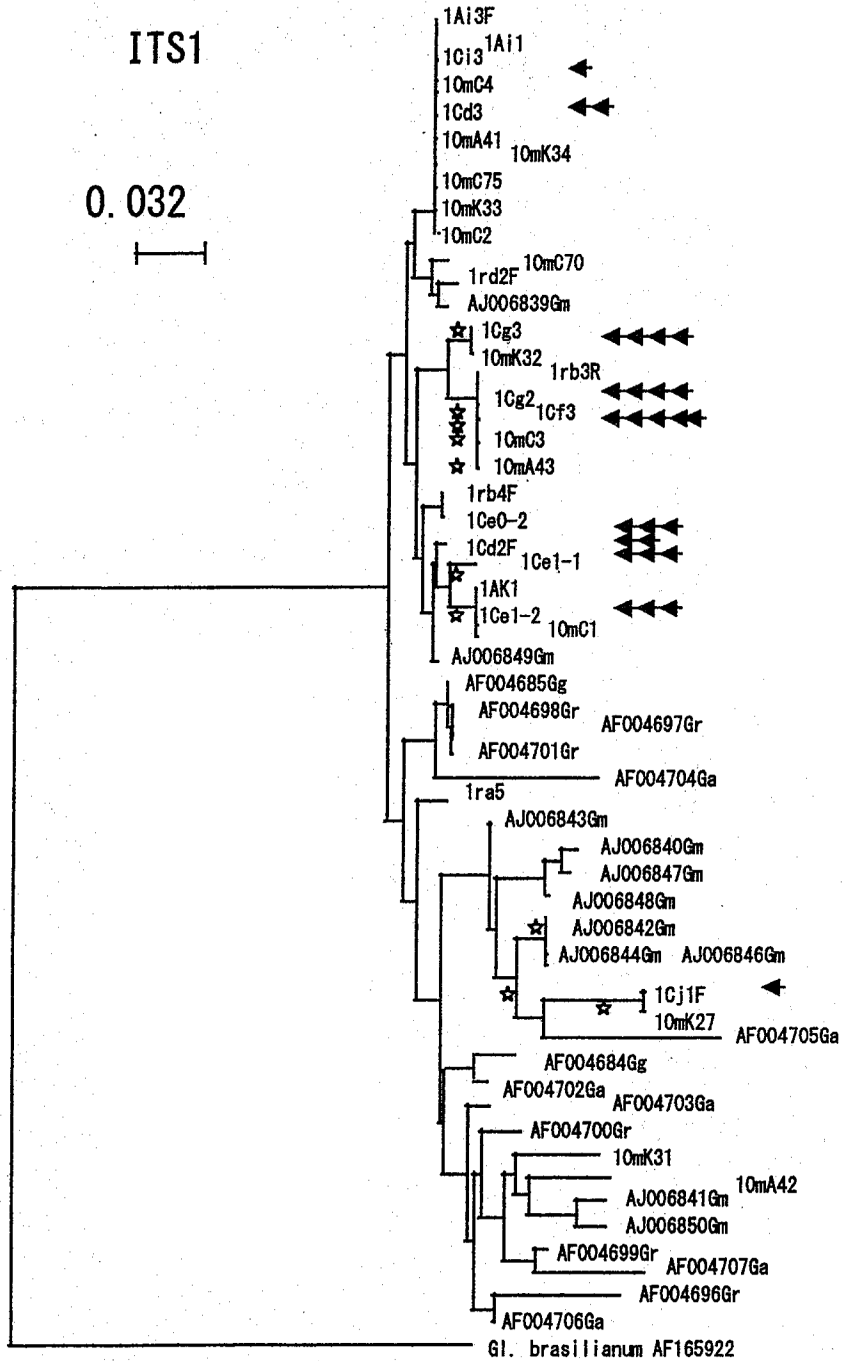


図1 近隣接合法による *Gigasopora* 属 ITS1 配列の分子系統樹。☆印は、1000 回のブートストラップで 800 以上の値が得られたものを示した。末尾にアルファベットが書かれたものはデータベース上の配列で、末尾のアルファベットは、Gm: *G. margarita*, Ga: *G. albida*, Gg: *G. gigantea*, Gr: *G. rosea* を示す。1 または 10 で始まる配列は本研究で決定したもので、1 は単一胞子、10 は 10 個の胞子から調製した DNA を鋳型にして得られたものを意味する。大文字の C は *G. margarita* MAFF520054, A は Ni-A を、r は *G. rosea* を示す。添付した小文字は胞子の番号を表し、MAFF520054 についてはわかりやすいようにアローヘッドの数で仕分けして示してある。

4. マーカーの安定性

前述のように、系統特異的なマーカーとしては、遺伝型が異なっても孢子中の大部分の核に存在する配列であり、経代的にも保存されるものでなければならない。データベース検索の結果、ここで得られた配列には真核生物のサテライト配列の一部と 20~30 bp の範囲で相同性を持つ部分が 3 箇所発見され、この配列もサテライトの一部と推察された¹⁵⁾。反復配列、特に逆向き反復配列などのサテライト配列は、ゲノム組み換えの「ホットスポット」として働くことが知られており^{2,3,13)}、相同性を持つ部分がターゲットとなって組み換えが起こる危険性も考えられる(図2)。この研究で得られた配列について、このような危険性がなく、マーカーとして安定であることを理論的に証明することは容易ではない。しかし、元々同一の系統の *G. margarita* MAFF520054 と CK とが 8 年間にわたって異なる場所で隔離されて経代培養さ

れ、厳密な世代数の一致がない孢子間でもこの配列が保存されていること、更には感染植物根や現場の孢子(後述)からも検出されることから、発芽、菌糸伸長、次世代孢子形成などの遺伝子レベルのイベントの回数が異なってもこの配列の保存性に影響はなくマーカーとして利用し得ると判断した。

5. 現場への適用例

雲仙普賢岳山麓は 1992 年以來、大規模な火砕流に覆われ、それまでの植生は破壊された。1997 年以降、*G. margarita* CK 株を含む緑化資材が投与された^{7,8)}。本研究では、マーカー-DNA 配列を利用した CK 株の検出を雲仙普賢岳の緑化現場に適用し、緑化の進行に伴う接種 *G. margarita* の生態学的知見を得つつある。火砕流跡地の植栽に用いたウィーピングラブグラスの根圏からは、施工の有無に関わらず、土着と考えられる AM 菌の小型

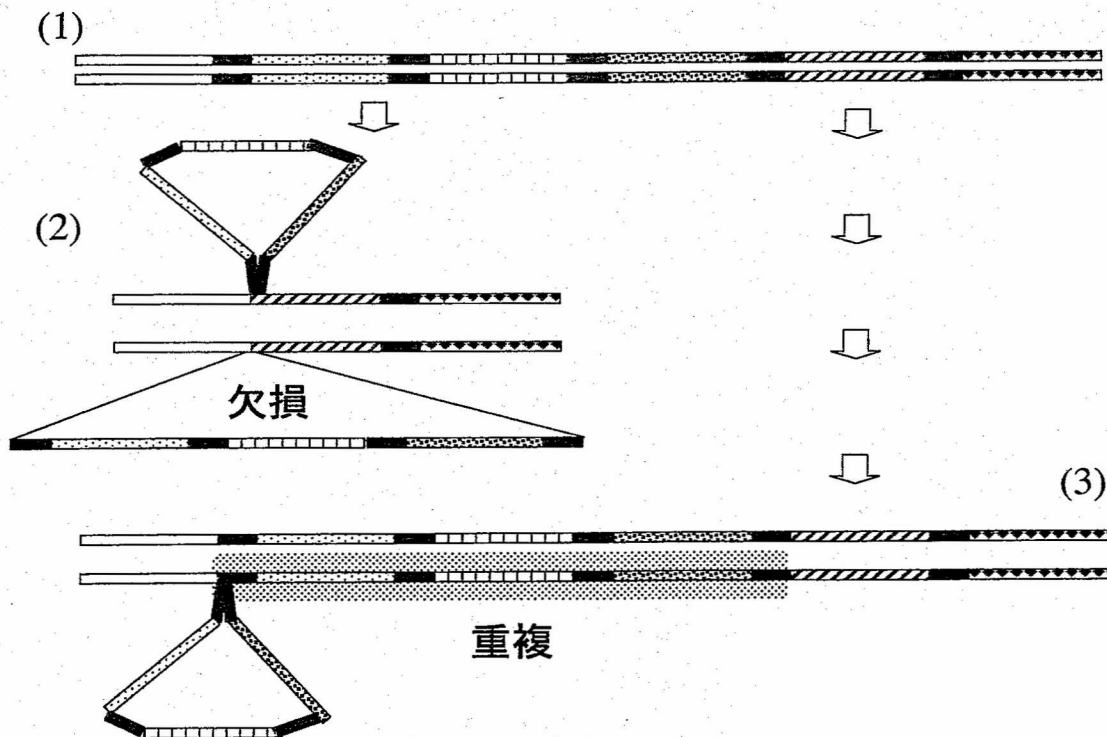


図2 反復配列(逆向き)を原因とするゲノム再編成の模式図

いずれも二本鎖 DNA を示す。反復配列を黒塗りのカラムで示した。異なる模様のカラムはそれぞれ反復配列で挟まれた異なる DNA 領域を示す。(1) 二本鎖 DNA, (2) 鋳型鎖が逆向き反復配列の部分でループを形成したために一部の領域が欠損した娘鎖ができた例, (3) 複製中の娘鎖にループが形成されたために、一部の DNA 領域(網掛けで示した)が重複した例。

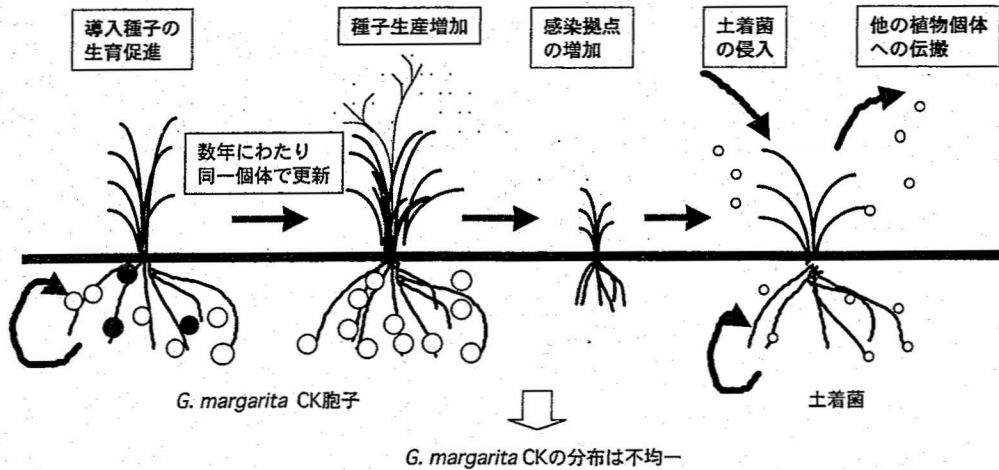


図3 普賢岳火砕流跡地の緑化施工区で推定された接種 *G. margarita* の緑化に対する効果

胞子が多数見つかった。施工区の一部のウィーピングラブグラス根圏からは、マーカーを持つ胞子が得られ、施工時に接種した *G. margarita* が4年経過後も残存・定着していることが明らかになった(未発表)。現在も調査・解析は継続中であるが、このような結果から、人為的に導入した *G. margarita* が定着したこと、導入した *G. margarita* は広範囲には拡散しないこと、周囲の非被災環境から小型胞子を形成する種が多数侵入することが明らかになった。現段階では、接種 *G. margarita* が導入植物種子の生育を促進し、継続的に種子散布量を増加させるなど植物生育の起点となり、侵入した土着 AM 菌胞子の感染機会を増加させたと想定している(図3)。また、*G. margarita* と小型胞子を形成する AM 菌とで、拡散や生残の戦略が異なることも示唆されて興味深い。

6. ま と め

土壌微生物を人為的に利用するためには、接種された条件下で目的とする効果を発揮するかどうか検証する必要がある。このためには、マーカーを利用して対象となる微生物の土壌中での動態を追跡しなければならない。今回得られた配列の特異性については今後も検討が必要であるが、マーカーが明らかになった *G. margarita* 系統を用いれば既施工地を利用した動態解析だけでなく、野外での大規模なモデル実験等も行えると期待される。

謝 辞

本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」プロジェクトの「共生微生物等を利用した荒廃土壌の修復技術の開発」の支援を受けて行ったものである。

要 旨

アーバスキュラー菌根菌(以下、AM菌)は、植物への水やリン酸イオンの供給を通じた生育促進が期待され荒廃土壌の緑化現場に人為的に導入されている。しかし、従来の形態学的手法では、接種 AM 菌の土壌中あるいは植物根中での動態を野外において系統レベルで調査することは困難だった。このため、DNA マーカーの利用が検討されてきたが、ヘテロポリカリオンである AM 菌胞子 DNA からは大サブユニット rDNA の可変領域や ITS 領域では多様なクローンが得られ、系統の識別と同定は不可能だった。また、野外での動態解析には植物根中の菌糸 DNA の解析も必要であり、植物根 DNA の影響を受けやすい RAPD や PCR-RFLP は不適切と考えられ、単一 DNA 配列をマーカーとして用いる方法を開発する必要があった。

今回、*Gigaspora margarita* MAFF520054 株から系統特異的な 235 bp の配列を検出する条件を確立し、同一系統で既に商品化されている *G.*

margarita CK 株にも同配列が存在することを確認した。また、MAFF520054 株が感染した植物根からもマーカーを検出することに成功した。この方法により、CK 株導入後 4 年を経過した雲仙普賢岳火砕流跡地のウィーピングラブグラス根圏の *G. margarita* 孢子が導入した CK 株であることが確認され、接種菌が現場土壌で定着していることが明らかとなった。また、その様式から、土着 AM 菌との生態学的戦略の違いを推察した。

今回得られた配列は、サテライト配列の一部と推定されたが、上記のような試験の結果、マーカーとして実用的なレベルであると推察された。

引用文献

- 1) Clapp, J. P., Rodriguez, A. and Dodd, J. C. (2001) Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol.*, **149**, 539-554
- 2) Field, D. and Wills, C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1647-1652.
- 3) Gordenin, D. A., Lovachev, K. S., Degtyareva, N. P., Malkova, A. L., Perkins, E. and Resnick, M. A. (1993) Inverted DNA repeats: a source of eukaryotic genomic instability. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5315-5322
- 4) Hering, O. and Nirenberg, H. (1995) Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. *Mycopathologia*, **129**, 159-164
- 5) Kjølner, R. and Rosendahl, S. (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant and Soil*, **226**, 189-196
- 6) Lanfranco, L., Delpero, M. and Bonfante, P. (1999) Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol. Ecol.*, **8**, 37-45
- 7) 丸本卓哉・河野伸之・江崎次夫・岡部宏秋 (1999) 火山灰荒地の菌根菌利用による植生復元, 土と微生物, **55**, 81~90
- 8) Marumoto, T., Okabe, H., Ezaki, T., Nishiyama, M. and Yamamoto, K. (1996) Application of symbiotic microorganisms to soil conservation and reforestation. *BioJapan '96 Symposium Proceedings*, p. 242-250
- 9) Miller, R. M. and Jastrow, J. D. (1992) The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: *Mycorrhizal Functioning: An integrative plant-fungal process*, Ed. M. F. Allen, p. 438-467, Chapman and Hall, New York
- 10) 斎藤雅典 (2000) VA 菌根菌の利用と資材化, 鈴木孝仁ら編, 微生物の資材化: 研究の最前線, p. 5~70, ソフトサイエンス社, 東京
- 11) Smith, S. E. and Read, D. J. (1997) Mineral nutrition, heavy metal accumulation and water relations of VA mycorrhizal plants. In: *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd ed., Ed. S. E. Smith, and D. J. Read, p. 126-160, Academic Press, San Diego
- 12) Schüssler, A. (1999) Glomales SSU rRNA gene diversity. *New Phytol.*, **144**, 205-207
- 13) Van Belkum, A., Scherer, S., Van Alphen, L. and Verbrugh, H. (1998) Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 275-293
- 14) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications*, Ed. M. A. Innis, et al., p. 315-322, Academic Press, San Diego
- 15) Yokoyama, K., Tateishi, T., Marumoto, T. and Saito, M. (2002) A molecular marker diagnostic of a specific isolate of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *FEMS Microbiol. Let.*, **212**, 171-175
- 16) Zézé, A., Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V. and Dulieu, H. (1996) Characterization of a highly repeated DNA sequence (SC1) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its detection in plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2443-2448
- 17) Zézé, A., Sulstiyowati, E., Ophel-Keller, K., Barker, S. and Smity, S. (1997) Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 676-678