

## Phosphatase Specific to Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis

(Arbuscular 菌根菌共生系に特異的なホスファターゼ)

## 学位論文内容の要旨

Arbuscular菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi) は接合菌類 *Glomale* 目に属する糸状菌で、世界中の自然土壌および農耕地土壌に広く分布している。この菌が根に共生し、菌根 (mycorrhiza) を形成した植物は、リン酸肥沃度の極めて低い土壌においても生育することができる。また、本菌の宿主域は広く、アブラナ科やアカザ科などの一部の植物群を除く約80%の陸上植物と共生関係を持つことができると言われている。従って農業生産上、非常に有用な微生物であるばかりでなく、その感染生理やリン酸吸収・濃縮・宿主への移行のメカニズムは科学的見地からも極めて興味深い。しかしながら arbuscular 菌根菌は人工培地上ではほとんど生育しないため、その生理・生態についての解析はほとんど進んでいない。

Arbuscular菌根菌共生系におけるリン酸代謝については、以下のようなスキームが想定されている。土壌中の菌糸ネットワークから吸収されたリン酸は、液胞中にポリリン酸粒子として蓄えられ、原形質流動により、宿主根内に形成された樹枝状体 (arbuscule) まで運ばれる。そこで再びオルトリン酸まで加水分解された後、菌体外に放出され、それを樹枝状体周囲の植物細胞が吸収する。これまでに共生根で特異的に活性の上昇するホスファターゼが、一連のリン酸代謝の一部に関与していることが示唆されてはいるものの、この酵素の性質や本代謝経路での役割については不明である。

そこで本研究では、この様な背景の中で、このホスファターゼの活性と宿主植物の生長との関係を検討すると共に、共生特異的リン酸代謝における役割を推定する目的で、本酵素を精製し、その酵素化学的諸性質について調べた。さらに、菌根菌共生根におけるホスファターゼ活性の局在性について、組織化学的手法を用いて検討を行った。

本研究の結果を要約すると、

1. 共生特異的ホスファターゼの検出法およびその活性と宿主生長との関係を検討する目的で、以下の実験を行った。矮性マリーゴールドに arbuscular 菌根菌 (*Glomus etunicatum*) を接種し、人工気象器中で栽培後、根の粗抽出液を得た。これを電気泳動後、ホスファターゼ活性染色を行うと、共生根で特異的に活性の上昇するバンドが検出され、これを共生特異的ホスファターゼ (infection-specific phosphatase; ISPase) とした。このISPaseの活性は、菌根菌の感染率の上昇に伴って増加した。さらに本酵素の活性と、菌根菌の宿主植物に対する生長促進効果との間には高い相関関係が認められ、リ

ン酸の多施用により生長促進効果が減少すると、本酵素の活性も低下した。部分精製した酵素の活性至適pHは中性付近であり、種々の基質を加水分解し、リン酸イオンなどにより活性が阻害された。

2. 共生特異的ホスファターゼの由来を推定する目的で、以下のような実験を行った。異なる数種菌株をマリーゴールドに接種したものから、それぞれの粗酵素液を調製し、電気泳動後、ホスファターゼ活性染色を行った。ISPaseはそれぞれ異なる菌株が共生した根においても共通に検出され、それら活性バンドは泳動ゲル上ではほぼ同様の移動度 ( $R_m$  値) を示した。発芽中および休眠中の菌根菌胞子から粗酵素液を調製し、同様の分析を行ったところ、ISPaseに相当する活性バンドは検出されなかった。また、非共生根においても弱いながらISPase活性が検出されることなどから、本酵素は宿主植物由来であると推定された。

3. ISPaseのさらに詳しい酵素化学的諸性質を調べる目的で、種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせてISPaseを約170倍に精製した (収率0.4%)。得られた最終画分をSDS-PAGEにより分析したところ、90、70および60kDaのタンパク質を含んでいた。非変性状態での分子量はおよそ105kDaで、concanavalin Aに吸着されることから糖鎖が付加されていると推定された。酵素活性の至適pHは5.0、ピロリン酸結合に対する加水分解活性が高く、 $F^-$ 、 $VO_3^-$ 、 $MoO_4^{2-}$ 、 $PO_4^{3-}$  などにより活性が阻害されることから、本酵素は酸性ホスファターゼ (E.C.3.1.3.2) であることが明らかになった。また、最終画分に含まれる70kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列は他の植物由来酸性ホスファターゼのものと相同性が高く、このことは本ホスファターゼが宿主植物由来である可能性を支持していた。

4. 菌根菌感染による菌根の酸性ホスファターゼ活性局在性の変化を調べ、ISPase活性の発現部位を推定する目的で、以下の実験を行った。菌根菌共生根および非共生根をグルタルアルデヒド固定後、活性染色を行い、凍結切片を作成した。宿主皮層細胞の細胞壁では両者に共通して酸性ホスファターゼ活性が構成的に発現していたのに対し、菌根菌共生根では、特に樹枝状体とそれを取り囲む宿主細胞との間の空隙部分 (apoplast) で活性が上昇していた。また、共生根から分泌 (非破壊的に抽出) されるホスファターゼアイソザイム群の中には、ISPaseと同様の  $R_m$  値を示すものが含まれていた。これらのことからISPaseは、宿主細胞と樹枝状体との間の空隙部分に分泌される酵素である可能性が示唆された。

5. 共生状態にある菌根菌組織におけるホスファターゼ活性の局在性について、数種の菌株を用いて比較検討する目的で、以下の実験を行った。宿主細胞をセルラーゼおよびペクチナーゼで消化し、得られた菌根菌組織をホスファターゼ活性染色した。酸性ホスファターゼは老化した樹枝状体やのう状体を除くほぼ全組織で活性が認められ、局在性に関して菌株間の差異は認められなかった。一方、アルカリホスファターゼは *Glomus* 属菌では特に成熟した樹枝状体で活性が高かったのに対し、*Gigaspora* 属菌ではそれに加えて細胞間菌糸でも高い活性が認められた。

以上のように本研究では、arbuscular菌根菌共生系における共生特異的ホスファターゼ (ISPase) を検出し、その活性が菌根菌の宿主植物に対する生長促進効果と密接な関係にあること、また、ISPaseの精製を行い、本酵素が酸性ホスファターゼ (E.C.

3.1.3.2) であることを明らかにすることなどに加え、本酵素が宿主植物由来のものである可能性を示唆した。また、共生状態にある宿主および菌根菌組織のホスファターゼ活性の局在性について、組織化学的手法を用いて調べることにより、ISPaseの発現部位を推定すると共に、菌根組織全体のホスファターゼ局在性を明らかにするなど、菌根菌共生系におけるリン酸代謝を解明する上での基礎的知見を得た。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 辰 男  
副 査 教 授 千 葉 誠 哉  
副 査 教 授 但 野 利 秋

## 学 位 論 文 題 名

### Phosphatase Specific to Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis

(Arbuscular 菌根菌共生系に特異的なホスファターゼ)

本論文は英文83頁、図25、表11、引用文献68、緒言、4章、英文総括からなり、ほかに参考論文5編が付されている。

Arbuscular菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi) は接合菌類 *Glomale* 目に属する糸状菌で、本菌が根に共生し、菌根 (mycorrhiza) を形成した植物は、リン酸肥沃度の極めて低い土壌においても生育することができる。従って、そのリン酸吸収・濃縮・宿主への移行のメカニズムは極めて興味深いが、本菌が人工培地上でほとんど生育しないことから、そのメカニズムについての解析はほとんど進んでいなかった。

本研究では菌根菌共生根で特異的に活性の上昇するホスファターゼの活性と宿主植物の生長との関係を検討すると共に、共生特異的リン酸代謝における本酵素の役割を推定する目的で、精製した酵素の諸性質を明らかにした。さらに、菌根菌共生根におけるホスファターゼ活性の組織局在性について、詳細な検討を行った。

第1章では共生特異的ホスファターゼの検出法、その活性と宿主生長との関係および本酵素の部分精製の結果について述べられ、下記の内容が含まれている。

①矮性マリーゴールドにarbuscular菌根菌 (*Glomus etunicatum*) を接種し、人工気象器中で栽培後、根の粗抽出液を得た。これを電気泳動後、ホスファターゼ活性染色を行うと、共生根で特異的に活性の上昇するバンドが検出され、これを共生特異的ホスファターゼ (infection-specific phosphatase; ISPase) とした。このISPaseの活性は、菌根菌の感染率の上昇に伴って増加した。さらに本酵素の活性と、菌根菌の宿主植物に対する生長促進効果との間には高い相関関係が認められた。

②部分精製した酵素の活性至適pHは中性付近であり、種々の基質を加水分解し、リン酸イオンなどにより活性が阻害された。

第2章ではISPaseの由来と酵素化学的諸性質について述べられ、下記の内容が含まれている。

①ISPaseは、異なる菌株を接種したマリーゴールド根においても共通に検出されること、発芽中および休眠中の菌根菌胞子からは検出されないこと、非感染根においても弱いながらその活性が検出されることなどから、本酵素は宿主植物由来であると推定され

た。

②ISPaseを種々のカラムクロマトグラフィーにより約170倍に精製し（収率0.4%）、SDS-PAGEによる分析を行ったところ、最終画分は90, 70および60kDaのタンパク質を含んでいた。非変性状態での分子量はおよそ105kDa、酵素活性の至適pHは5.0、ピロリン酸結合を持つ種々の基質に対する加水分解活性が高く、 $F^-$ ,  $VO_3^-$ ,  $MoO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ などにより活性が阻害されることから、本酵素は酸性ホスファターゼ（E.C.3.1.3.2）であることが明らかにされた。

第3章では菌根菌共生根における酸性ホスファターゼ活性発現部位について述べられ、下記の内容が含まれている。

①共生根および非共生根をグルタルアルデヒドで固定した後、ホスファターゼ活性染色を行い、凍結切片を作成し、それぞれの活性部位を比較した。宿主皮層細胞の細胞壁では酸性ホスファターゼ活性が構成的に発現していたが、菌根菌感染を受けると、特に樹枝状体とそれを取り囲む宿主細胞との間の空隙部分（apoplast）で活性が上昇した。

②共生根から分泌（非破壊的に抽出）されるホスファターゼアイソザイム群の中には、電気泳動的にISPaseと同様の移動度（ $R_m$ 値）を示すものが含まれていた。これらのことからISPaseは、宿主細胞と樹枝状体との間の空隙部分に分泌される酵素である可能性が示唆された。

第4章では、数種菌株の菌根菌組織におけるホスファターゼ活性の局在性について、詳細に比較検討した結果が述べられ、下記の内容が含まれている。

①宿主細胞をセルラーゼおよびペクチナーゼで消化し、得られた菌根菌組織を活性染色した。酸性ホスファターゼは老化した樹枝状体やのう状体を除くほぼ全組織で活性が認められ、菌株間の差異は特に認められなかった。

②アルカリホスファターゼの局在性は菌株間で異なっており、*Glomus*属菌では特に成熟した樹枝状体で活性が高かったのに対し、*Gigaspora*属菌ではそれに加えて細胞間菌糸でも高い活性が認められた。

以上のように本研究では、arbuscular菌根におけるホスファターゼについて酵素化学的および組織化学的側面から検討を加え、共生特異的リン酸代謝の解明に関して基礎的な貢献を果たした。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者江澤 辰広 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。