

アーバスキュラー菌根菌ゲノム編集法の開発に向けた 形質転換法確立の試み

基礎生物学研究所 共生システム

及川 和聡

アーバスキュラー菌根菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌)は、多くの陸上植物と相利共生の関係にあり、貧栄養の土地においては、広範囲に菌糸を伸長させ、リン酸や窒素、ミネラル、水分などを宿主植物に供給することで、その生育を促進する有用な土壌糸状菌である。また、AM 菌は、宿主植物の根皮層細胞に樹枝状構造を形成し、植物から糖や脂質などの炭素源を獲得する絶対共生性を示す(Shi et al, 2023)。近年、AM 菌の農業資材としての有用性が注目されており、市場では多くの関連する商品が販売されている。しかし、AM 菌を有効に活用するには、AM 菌の基本的な生理機構を分子レベルで理解することが重要である。本研究では、AM 菌の性質を分子レベルで理解する一環として、ゲノム編集法の開発に向けた形質転換法の確立を目的とした。

AM 菌と植物の共生に関連する研究は、世界中で活発に行われており、現在も多くの知見が蓄積されつつある。AM 菌は植物の根から分泌されるストリゴラクトンにより菌糸の分岐が誘導され、植物の根に感染する(Akiyama et al, 2005)。さらに、AM 菌は、植物根内に形成される樹枝状体の膜上に存在するトランスポーターを介して、脂肪酸の中間産物を取り込んでいることが示唆されている(Kameoka and Gutjahr, 2022)。AM 菌の細胞内は、真核生物に共通する細胞小器官であるミトコンドリアや脂肪滴が存在し、原形質流動により活発に菌糸内を動的に移動することが確認されている(Kobae et al, 2014)。特に、ミトコンドリアは、共生誘導因子であるストリゴラクトンに応答して、運動性を変化させることが報告されている(Besserer et al, 2006)。また、AM 菌の顕著な特徴として、胞子内や菌糸内に、数百から数千の核が存在する多核構造をもつことが知られている(Kokkoris et al, 2020)。

近年では、*Rhizophagus irregularis* DAOM19719 株や *R. clarus* HR1 株などの全ゲノム情報が解読され、遺伝子情報がデータベース化され公開されている。これにより研究対象となる遺伝子情報を容易に取得・解析できる環境が整いつつある。ゲノム解析の結果、脂肪酸合成酵素の欠損や多糖分解酵素の減少など興味深い知見も報告されている(Wewer et al, 2014; Kobayashi et al, 2018)。AM 菌は、絶対共生性を示すため、これまで単独の培養は困難であり、宿主植物との共培養が主流であった。しかし近年、一部の AM 菌において、人工培養法が開発され単独での増殖が可能になりつつある。AM 菌の生理や共生機構をさらに深く理解するためには、注目する現象に関連する遺伝子の発現制御や細胞内局在の解析が不可欠である。現在までに、AM 菌の形質転換は様々な方法(Li et al, 2017)が試され、一過的には蛍光タンパク質の発現が確認されている(Helber et al, 2008)が、安定的な方法は確立されていない。*R. clarus* に関しても有効な形質転換法は、確立されていない。

本研究では、まず化学染色により AM 菌細胞内のミトコンドリアおよび脂肪滴を可視化し、それらの動態を解析した。次に、AM 菌の薬剤耐性能試験をもとに、薬剤耐性遺伝子の選択を行い、さらに AM 菌内在性のプロモーターおよびターミネータ領域の遺伝子配列をクローニングして、最適な形質転換用遺伝子ベクターを構築した。最後に、これらのベクターを用いて、AM 菌内での遺伝子発現を複数の方法で検討し、ゲノム編集への応用を視野に入れた技術基盤を整備した。

[実験方法]

材料と培養方法

本実験では、AM 菌(*Rhizophagus irregularis* DAOM197198 株, *R. clarus* HR1 株)を実験材料として用いた。*R. irregularis* と *R. clarus* は、ニンジン毛状根とともに 28℃、暗所条件下のインキュベーター内で共培養もしくは単独に人工培養にて増殖させて、生育させた(Tanaka et al, 2022)。得られた個体から胞子を単離し、4℃で保存したのち、後続の実験に使用した。オルガネラ染色およびパーティクルガン法では、ニンジン毛状根と共生している *R. irregularis* を用いた。薬剤耐性試験、ポリエチレングリコール(PEG)法、およびアグロバクテリウム法による形質転換法実験では、4℃に保存した *R. clarus* の胞子を使用し、形質転換法では 28℃暗所にて発芽させた後、数日間前培養を行った。

形質転換用遺伝子ベクターの構築

AM 菌の形質転換実験には、GATEWAY Binary Vector(pGWB)系ベクターを改変して使用した。蛍光タンパク質(GFP)と薬剤耐性遺伝子(ハイグロマイシン)の CMV35S プロモーター配列を *R. irregularis* の *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* および *Tubulin* のプロモーター配列に置換し、NOS ターミネーター配列は *Tryptophan synthase* のターミネーター配列に置換した(Figure 1, (1)–(3))。各遺伝子配列は、JGI, MycoCosm; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home> と、NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> より取得した。*R. irregularis* の菌糸を収集し、ビーズショッカーで粉碎後、ゲノム DNA を抽出した(NucleoSpin® Tissue, TaKaRa)。抽出 DNA(100 ng)を鋳型として、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて目的遺伝子配列を PCR 法で増幅し、Gateway cloning system(Invitrogen)によりクローニング用ベクターに導入するか、Ligation ver 2.0(TaKaRa)を用いて直接形質転換用ベクターに連結した。得られたベクターは、大腸菌 *DH5α* に導入して高濃度プラスミドを調整し、目的配列はシーケンス解析により確認した。

細胞小器官の染色法

ミトコンドリアは、ニンジン毛状根に付着した *R. irregularis* を、毛状根ごと切断し、0.5 μM MitoTracker™ Green FM (Invitrogen)に 20 分間浸漬して行った。蒸留水で洗浄後、スライドガラス上に載せてカバーガラスをかけ、共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8, Germany)で励起光 488nm / 蛍光波長 525nm の条件で観察した。脂肪滴の染色は、同様に処理した材料を 20 μM NileRed (Wako)で染色し、励起光 514nm / 蛍光波長 610nm で観察した。

薬剤耐性試験

R. irregularis および *R. clarus* の胞子を 0.3%ゲランガムを含む培地に播種し、28℃、暗所で 2~3 週間培養した。培地には 10~200 μM の濃度範囲で、カナマイシン、ハイグロマイシン、及びスペクチノマイシンを添加し、発芽胞子から伸びた菌糸の伸長および新たに形成された胞子数を指標と

して薬剤の影響を評価した(Figure 3)。

AM 菌形質転換法

- パーティクルガン法による遺伝子発現解析

ニンジン毛状根と共培養した *R. irregularis* を寒天プレート上に配置し、遺伝子導入材料とした。1μg の精製 DNA に、2.5 mM CaCl₂ およびスベルミジンを加え、直径 0.6 μm の金粒子と混合した後、ラプチャーディスクに滴下し乾燥させた。BIO-RAD 製 Particle Bombardment System(PDS-1000 | He™) を用い、900、1,100、1,350 psi の 3 段階の圧力で遺伝子導入を行い、1~3 日後に共焦点レーザー顕微鏡で観察をした。

- ポリエチレングリコール (PEG)法による形質転換試験

4℃ 保存の *R. clarus* 胞子を 28℃ に 1~2 日置き、発芽を誘導した。発芽胞子を 0.05% Tween および純水で洗浄後、2% Yatalase (糸状菌細胞壁溶解酵素・コスモバイオ株式会社)に 4 時間浸漬して細胞壁成分を部分的に分解した (Figure 5, A)。その後、0.6M マニトールにて洗浄し、2.5 mM CaCl₂、20μg の精製 DNA を加え、10 分間静置した。等量の PEG4000(Wako)を添加して、30 分間静置し、再度マニトールで洗浄後、0.03% グランガムを含む培地に播種し、28℃・暗所で 1~2 日培養し観察を行った。

- アグロバクテリウム法による形質転換試験

構築したベクターを *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 株に形質転換し、薬剤添加 LB プレートで 4 日間培養した。得られた菌を遠心により回収し、AM 菌用培養液に懸濁後、アセトシリンゴンを添加して 4 時間培養した。前培養した *R. clarus* を 0.05% Tween と純水で洗浄し、アグロバクテリウム液と混合して 30 分間共培養した。次に、アセトシリンゴンと 0.03% グランガムを含む培地上に濾紙を敷き、その上で 3 日間共培養し、以降はハイグロマイシンなどを含む選抜培地に濾紙を移して耐性胞子と菌糸を選抜した。

ゲノム編集 CRISPR 用遺伝子ベクターの構築

基本構造は、AM 菌形質転換用ベクターと同様に pGWB 系を改変して使用した。CAS9 は、プロモーター *GAPDH* 下流に配置した。標的配列として、ミトコンドリア分裂に関与する因子の 20 塩基配列をデータベースから複数選定し、gRNA を *Tubulin* プロモーターの下流に配置した。各配列の終端には、*Tryptophan synthase* のターミネーター配列を使用した(Figure 1,(4))。

[実験結果]

ミトコンドリアと脂肪滴の観察

ゲノム編集においてミトコンドリアの分裂因子や脂質代謝系の因子を標的とするため、ミトコン

ドリアおよび脂肪滴の可視化を行った。その結果、ミトコンドリアおよび脂肪滴は多くが楕円形の形状をとり、菌糸内に広く分布していた(Figure 2)。経時的な観察では、いずれのオルガネラも菌糸内を活発に移動している様子が確認された。

薬剤耐性試験

形質転換体の選抜に適した薬剤耐性マーカーを選定するために、*R. irregularis* および *R. clarus* における薬剤耐性を検討した。カナマイシン、ハイグロマイシン、スペクチノマイシンを用いた結果、*R. clarus* では、ハイグロマイシン濃度 30 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3, A and B)、*R. irregularis* では、50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3, C and D)で、菌糸の伸展および分岐形成が著しく阻害された。実際、薬剤添加無しのコントロール群では、発芽胞子が2週間後に菌糸を伸展させていたのに対し、ハイグロマイシン濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ 処理群では、菌糸の伸長がほとんど認められなかった(Figure 3, E)。一方、G418、カナマイシン、カルベシニン、スペクチノマイシン処理では顕著な影響が認められなかった(Figure 3, B and D)。以上の結果より、本研究ではハイグロマイシンを薬剤選抜マーカーとして採用し、形質転換用ベクター内にハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した(Figure 1B-E)。

遺伝子ベクターの構築

R. clarus および *R. irregularis* のゲノム編集技術の確立を目指し、同種に内在するプロモーターおよびターミネーターを導入した複数の遺伝子ベクターを構築した(Figure 1)。また発現確認には蛍光タンパク質 GFP を使用し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を他の pGWB 系ベクターからクローニングして導入した。

形質転換体における遺伝子発現解析

R. irregularis 内在性のプロモーターの活性を評価するために、パーティクルガン法を用いた一過性遺伝子発現解析を実施した。本試験では、*GAPDH* 並びに、*Tubulin* の2種類のプロモーターを対象とした。その結果、両ベクターともに GFP 蛍光が、細胞質内に明瞭に観察され(Figure 4, A and B)、いずれのプロモーターも、遺伝子転写を誘導することが確認された。この結果を受けて、構築した形質転換用遺伝子ベクターを用いて PEG 法による形質転換法を試みた。発芽胞子を洗浄後、2% Yatalase で処理し、細胞壁成分を除去したのち、PEG4000 により遺伝子導入を行った。処理後2日目に観察を行ったところ、頻度は低いものの、GFP 蛍光を示す胞子と菌糸が観察された(Figure 5, B-D)。さらに、アグロバクテリウム法による形質転換法を実施した。1日前培養した発芽胞子に構築ベクターを導入したアグロバクテリウムと共培養を行った結果、GFP 蛍光を発する胞子が少数ながら確認された(Figure 5, E and F)。以上の結果から、本研究で構築した遺伝子ベクターは *R. clarus* において遺伝子発現が可能であり、形質転換には適していることが示唆された。ただし、形質転換効率のさらなる向上に向けて、導入法の最適化が今後の課題と考えられた。

[考察]

今回、本研究ではアーバスキュラー菌根(AM)菌のゲノム編集を可能にするために、*R. clarus* および *R. irregularis* における形質転換法の確立を試みた。現在までに、AM 菌の安定的な形質転換法の確立例は、報告されておらず、本研究はその開発に向けた初期的試みである。まず、他の糸状菌での先行研究を参考に、研究対象である *R. irregularis* の内在性のプロモーターおよびターミネーターを用いて、遺伝子発現の可能性を検討した。その結果、パーティクルガン法および PEG 法による一過性の遺伝子発現解析において GFP の蛍光が確認され、内在性プロモーターが有効に機能することが示唆された。さらに、薬剤耐性試験の結果から、他の真核生物同様に、ハイグロマイシンが有効であることが確認されたため、この薬剤耐性遺伝子をマーカーとしてベクターを構築し、アグロバクテリウム法による安定的な形質転換に取り組んだ。その結果、少数ながら GFP の発現を示す胞子が確認された。しかしながら、形質転換効率は、数%未満と低く、十分とは言えない結果であった。この低効率の要因としては、アグロバクテリウム感染のタイミング（胞子の発芽時期や共培養時間）や胞子・菌糸の細胞壁成分による遺伝子導入の阻害が考えられる。今後は、AM 菌の細胞壁主成分であるキチンやセルロースの事前分解処理など、遺伝子導入の効率化を考慮に入れた方法が重要であると考えられる。また、CRISPR 法や TALEN 法など、核内の遺伝子を標的とするゲノム編集技術と既存の遺伝子導入法を組み合わせることで、より効率的な形質転換法の確立が期待される。現在は、本研究で得られた知見をもとに、ゲノム編集用の遺伝子ベクターの構築を進めており、今後、ミトコンドリアの形態変化を指標として、実際に編集が機能しているかを評価していく予定である。

[要約]

- AM 菌の薬剤耐性能を調べ、内在性プロモーターおよびターミネーターを用いて、形質転換用遺伝子ベクターを構築した。
- AM 菌におけるミトコンドリアおよび脂肪滴の観察を行った。
- パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法による形質転換を試みた。
- 構築したベクターが AM 菌内で発現可能であることを確認した。
- CRISPR 法に用いるためのゲノム編集用遺伝子ベクターを構築した。

[謝辞]

公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団より 2024 年度研究助成のご支援を受け賜いましたことを心より感謝いたします。また、所属研究室(基礎生物学研究所 共生システム研究部門)の川口正代司教授、共同研究者の田中幸子技術職員、橋本佳世研究員には、研究全般と技術的な支援をして頂きましたことを感謝いたします。また、北海道大学大学院農学研究院 江澤辰広准教授には、研究材料の AM 菌を分譲して頂きましたことを感謝いたします。

[文献]

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal

fungi. *Nature* 435: 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>

Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* 4: e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>

Helber N, Requena N (2008) Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 177: 537–548. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02257.x>

Kameoka H, Gutjahr C (2022) Functions of lipids in development and reproduction of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell Physiol* 63: 1356–1365. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac113>

Kobae Y, Gutjahr C, Paszkowski U, Kojima T, Fujiwara T, Hata S (2014) Lipid droplets of arbuscular mycorrhizal fungi emerge in concert with arbuscule collapse. *Plant Cell Physiol* 55: 1945–1953. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu012>

Kobayashi Y, Maeda T, Yamaguchi K, Kameoka H, Tanaka S, Ezawa T, Shigenobu S, Kawaguchi M (2018) The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Genomics* 19: 465. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4853-0>

Kokkoris V, Stefani F, Dalpé Y, Dettman J, Corradi N (2020) Nuclear dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends Plant Sci* 25: 765–778. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.002>

Li D, Tang Y, Lin J, Cai W (2017) Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microb Cell Fact* 16: 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0785-7>

Shi J, Wang X, Wang E (2023) Mycorrhizal symbiosis in plant growth and stress adaptation: From genes to ecosystems. *Annu Rev Plant Biol* 74: 569–607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-061722-090342>

Tanaka S, Hashimoto K, Kobayashi Y, Yano K, Maeda T, Kameoka H, Ezawa T, Saito K, Akiyama K, Kawaguchi M (2022) Asymbiotic mass production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Commun Biol* 5: 43. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02967-5>

Wewer V, Brands M, Dörmann P (2014) Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *Plant J* 79: 398–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.12566>

[関連図]

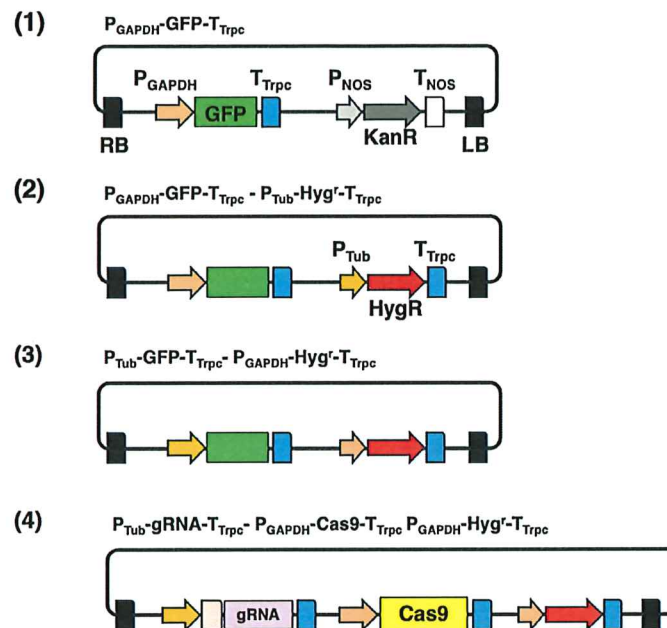


Figure 1. 遺伝子ベクター構造

本研究で使用した遺伝子ベクターの構造を示す。(1) *R. irregularis* の内在性プロモーターである *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*)と、ターミネータ *Tryptophan synthase*(*TrpC*)を、pGWB系の遺伝子ベクターに組み込んだ。(2, 3) (1)のベクターにハイグロマイシン耐性遺伝子(*HygR*)を導入し、それぞれ *GAPDH*(2) および *Tub*(3)のプロモーターを使用した構成。(4) ゲノム編集用に構築した遺伝子ベクターの構造。

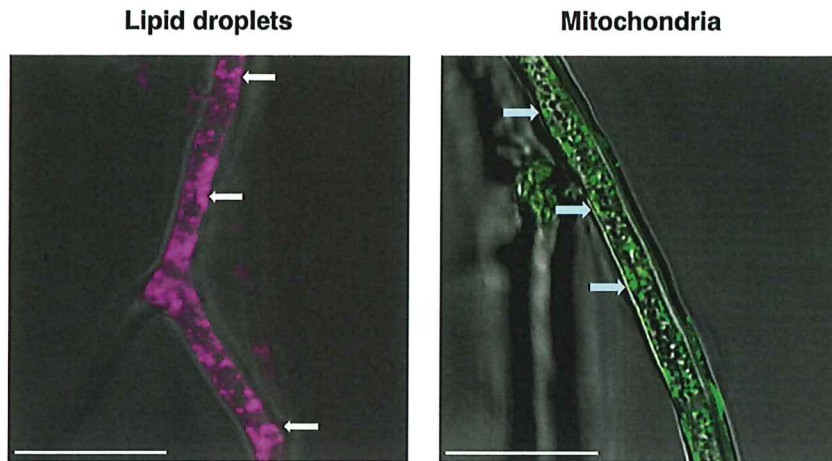


Figure 2. 脂肪滴とミトコンドリア
R. irregularis の脂肪滴 (左図、白矢印) とミトコンドリア (右図、水色矢印) の染色画像。
 スケールバーは 20 μm 。

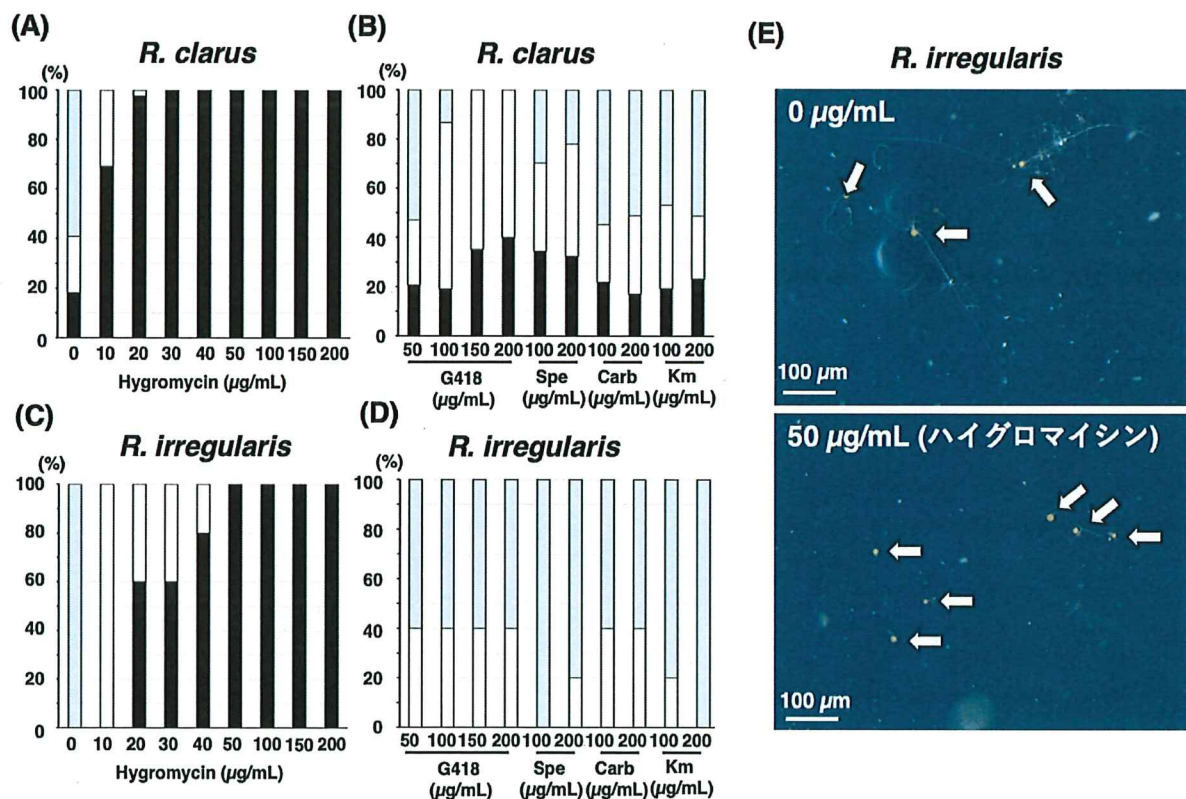


Figure 3. 菌糸伸長と胞子形成を指標とした薬剤耐性試験

各薬剤濃度下での菌糸伸長と胞子形成の定量解析。(A–D) *R. clarus* (A, B)と *R. irregularis* (C, D)において、ハイグロマイシン(A, C)およびその他の薬剤(B, D)の各濃度条件下で菌糸の伸長を評価した。棒グラフは、以下を示す; 黒色、菌糸伸長が 2 mm 未満または発芽しなかった胞子; 白色、菌糸伸長が 2 mm 以上の胞子; 水色、菌糸を伸長させ、新たな胞子を形成した胞子の割合。(E)コントロール(薬剤無添加)およびハイグロマイシン(50 $\mu\text{g/mL}$)添加条件下における、胞子と菌糸の成長の代表的な画像。白い矢印は

胞子を示す。

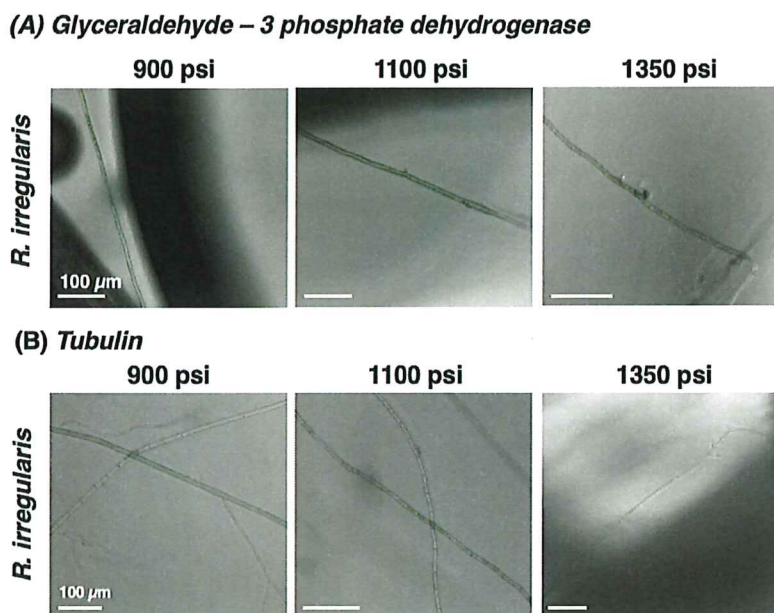


Figure 4. パーティクルガン法による一過的遺伝子発現試験

(A, B) *R. irregularis* を用いて、2 種類のプロモーター *GAPDH*(A)、*Tubulin*(B)により GFP の発現を確認した。900 psi、1100psi、1350 psi の異なる遺伝子ベクター導入圧力を使用した。

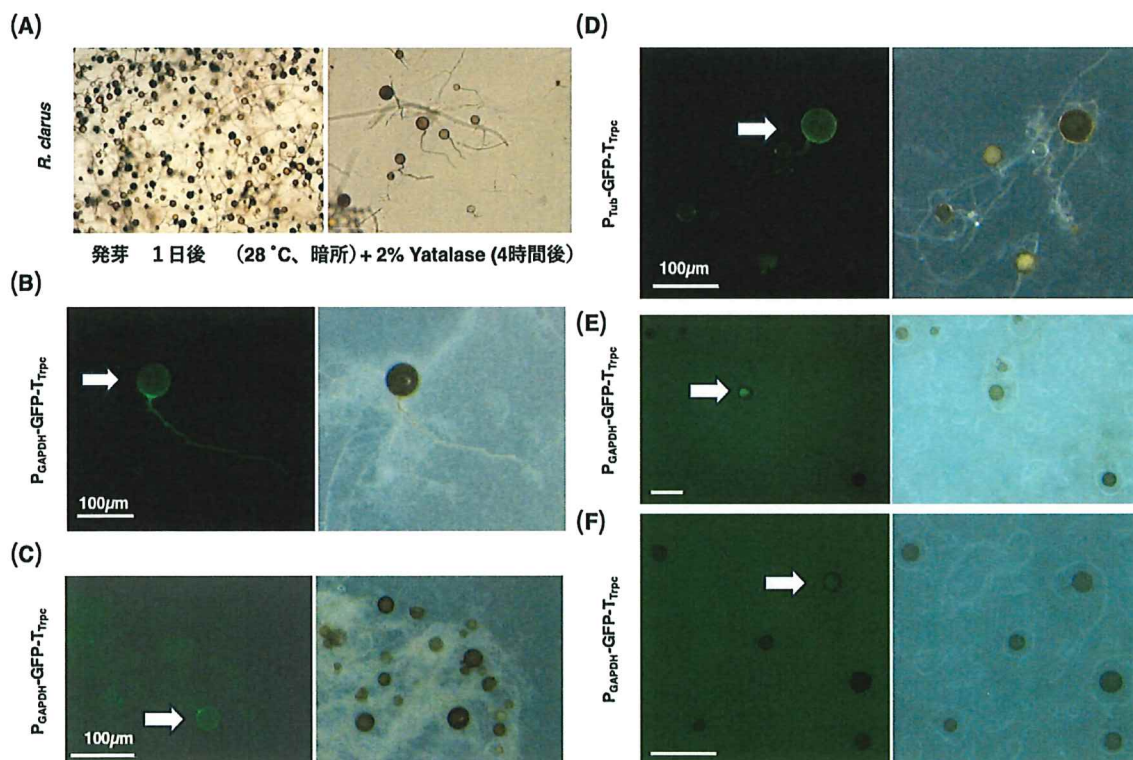


Figure 5. PEG 法による一過的遺伝子発現解析とアグロバクテリウム法による形質転換試験

(A) *R. clarus* の発芽胞子(左図)および Yatalase 処理後の胞子と菌糸(右図)の様子。(B-D) PEG 法によって遺伝子導入された胞子から GFP の蛍光が観察された(白矢印)。(E, F) アグロバクテリウム形質転換法により、胞子から GFP の蛍光が観察された(白矢印)。