

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14550

研究課題名(和文)ラン科植物の「菌寄生性共生」の成立には相利共生の共通共生経路の遺伝子群が必要か？

研究課題名(英文) Does the establishment of mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi require the genes of common symbiotic pathway necessary for mutualistic plant-mycorrhizal symbioses?

研究代表者

上中 弘典(Kaminaka, Hironori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40397849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラン科植物の菌根共生系は、一般的な相利共生の菌根共生系とは逆に、菌類から植物に炭素化合物が供給されるという菌寄生性の特徴をもつ。相利の共生系の確立には共通の遺伝子群が必要であることが報告されているが、ラン科植物を含む菌寄生性の共生に関する分子レベルでの知見は全く無いのが現状である。本研究では、ラン科植物シランの共生発芽系を用いたトランスクリプトーム解析と相利共生のマーカー遺伝子の発現解析、ならびに共通共生経路の鍵遺伝子CCaMKを用いた相補実験などを実施することで、部分的ではあるが「ラン科植物の「菌寄生性共生」の成立には相利共生の共通共生経路の遺伝子群が必要である」ことを証明することができた。

研究成果の概要(英文)：The mycorrhizal symbiosis in orchids has a feature that carbon is provided by mycorrhizal fungi, whose nutrition mode is termed as mycoheterotrophy and opposite to the general mutual symbioses. It has been reported that the genes of common symbiotic pathway are required for mutualistic plant-mycorrhizal symbioses, but the information about the molecular mechanisms of the relationship between orchids and their mycorrhizal fungi is limited. In this study, we conducted the transcriptome analysis and expression analysis of marker genes for mutual symbiosis using symbiotic germination of *Bletilla striata* (Orchidaceae) and the complementation experiment using CCaMK, which is a key gene for common symbiotic pathway. Our results partially demonstrated that the establishment of mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi require the genes of common symbiotic pathway necessary for mutualistic plant-mycorrhizal symbioses.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：ラン 菌根共生 トランスクリプトーム 菌寄生性 共生菌

1. 研究開始当初の背景

陸上植物の多くは地下組織において菌類と共生しており、菌根という共生器官を形成している。アーバスキュラー菌根や外生菌根などの一般的な菌根における共生(菌根共生)系では相利共生の関係が成立しており、リン、窒素などの土壤養分が菌根菌から植物に供給され、植物から菌根菌には光合成産物である炭素化合物が供給される。一方、林床植物やラン科植物などでは、一般的な菌根共生系とは全く異なり、菌に寄生する片利共生が成立する菌根共生(菌寄生性共生)系をもつ植物種が存在する。これらの植物の多くでは発芽に菌類との共生が必須であり、成長過程においても共生を必要とする植物種も存在する。植物と微生物の共生現象についての分子レベルでの研究はマメ科植物やイネを用いて盛んに行われており、単子葉植物、双子葉植物問わず、相利の共生系の確立には「共通共生経路」を構成する遺伝子群が必要であることが明らかになっている。それに対して「菌寄生性共生」の分子メカニズムに関する知見は全く無いのが現状である。そこで研究代表者らは「菌寄生性共生」系の解明を目指し、ラン科植物シランを対象に次世代シーケンサーを用いたゲノム情報の取得と遺伝子発現解析、人工共生発芽系と遺伝子組換え実験系の確立、及び共生状態の評価法の確立などに取り組んできた。

2. 研究の目的

ラン科植物の菌根共生系は、一般的な相利共生の菌根共生系とは逆に、菌類から植物に炭素化合物が供給されるという菌寄生性の特徴をもつ。単子葉植物、双子葉植物問わず、相利の共生系の確立には共通の遺伝子群が必要であることが報告されているが、ラン科植物を含む菌寄生性の共生に関する分子レベルでの知見は全く無いのが現状である。本研究では、「ラン科植物の「菌寄生性共生」の成立には相利共生の共通共生経路の遺伝子群が必要か?」についての回答を得ることを最終目標とし、独自のラン科植物に関するこれまでの研究成果と共に、既存の相利共生の共通共生遺伝子群を活用した新しい観点からの研究を、様々な分野の研究者と共に展開した。

3. 研究の方法

(1)ラン科植物シラン(*Bletilla striata*)の種子と共生菌(*Tulasnella* sp. strain HR1-1)を用いた共生発芽系(Yamamoto et al., BMC Plant Biol., 2017)により得られた幼植物体(プロトコーム)を発芽(共生)後1,2,3週間のタイミングで採取した。これらから抽出した全RNAを用い、次世代シーケンサーを用いたRNA-seqを行った。得られたリードデータから共生菌(HR1-1)のゲノム情報を用いてシラン由来の配列のみを抽出し、Trinityを用いて *de novo* アセンブルを行い、シランの

全 mRNA の情報を得た。本情報をリファレンスとして用いてシラン由来のリードデータを Bowtie2 によりマップし、eXpress による各遺伝子の発現量の定量化を行った。また、EdgeR により各サンプル間における発現量の比較を行い、発現変動遺伝子(DEGs)を抽出し、BLAST2GO により DEGs の GO enrichment 解析を行った。

(2)シランの mRNA の配列データから、共生の鍵遺伝子として知られる *CCaMK* のオルソログの配列を同定し、RT-PCR 法を用いてシランの *CCaMK* オルソログ *BsCCaMK* の全長 cDNA を単離した。*BsCCaMK* の推定アミノ酸配列と他の *CCaMK* の配列との比較を行った。また、シランの種子、および共生発芽系にて経時的に得られたプロトコームから RNA を抽出し、RT-qPCR により *BsCCaMK* の発現解析を行った。

(3)*BsCCaMK* の cDNA は、ミヤコグサで発現させるためのベクター pUB-GW-GFP(Maekawa et al., Mol. Plant Microbe Interact., 2008) に導入し、*Rhizobium rhizogenes* による毛根根形質転換系を用いた相補実験に用いた。根粒共生と菌根共生のどちらもできないミヤコグサの *CCaMK* 欠損変異体 *ccamk-3* においてミヤコグサの *CCaMK*(*LjCCaMK*) もしくは *BsCCaMK* を過剰発現させた毛根に、DsRed を発現する根粒菌(*Mesorhizobium loti* MAFF 303099) もしくは菌根菌(*Rhizopogon irregularis* DAOM 197198)を接種し、根粒が形成された個体もしくは菌根が観察された個体の数を測定することで、*BsCCaMK* の機能を評価した。

(4)同様にシランの mRNA の配列データからイネの菌根共生のマーカー遺伝子群のオルソログの配列(*BsAMxx*)を得た。(2)と同様に、シランの種子、および共生発芽系にて経時的に得られたプロトコームにおける *BsAMxx* 遺伝子群の発現解析を行った。また、共生発芽用の培地にスクロースを添加することにより共生状態が崩れることから、本実験系で得られたサンプルも用いて、発現解析を行った。

(5)共生発芽により得られたプロトコーム内の菌糸を蛍光染色することで、共生菌が基部側のみに存在することが明らかになった。そこで、プロトコームを半分に分割した上下のサンプルを用い、(3)と同様に *BsAMxx* 遺伝子群の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1)RNA-seq によるシランの共生発芽時の経時的なサンプル間での発現変動遺伝子(DEGs)の解析から、発芽(共生)後1週間(W1)、2週間(W2)、および3週間(W3)へとステージが進み、共生段階が進むにつれ、発現する遺伝子が大きく変化することが明らかになった(Fig.1)。

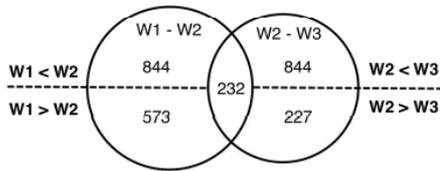


Fig. 1 Venn diagram showing the number of differentially expressed genes (DEGs) between transitions W1-W2 and W2-W3 during symbiotic germination of *Bletilla striata*.

また、DEGs の GO enrichment 解析を行った結果、85 の GO term が大きな比率を占めており、W2、W3 と共生段階が進むにつれて、共生の場である細胞壁に関係する異なる遺伝子群の発現量が顕著に上昇することが明らかになった (Fig.2)。それ以外にも、細胞内の酸化還元に関わる遺伝子群の発現量も大きく変化することから、共生の制御や成立には酸化還元反応に関わる可能性が示唆された。

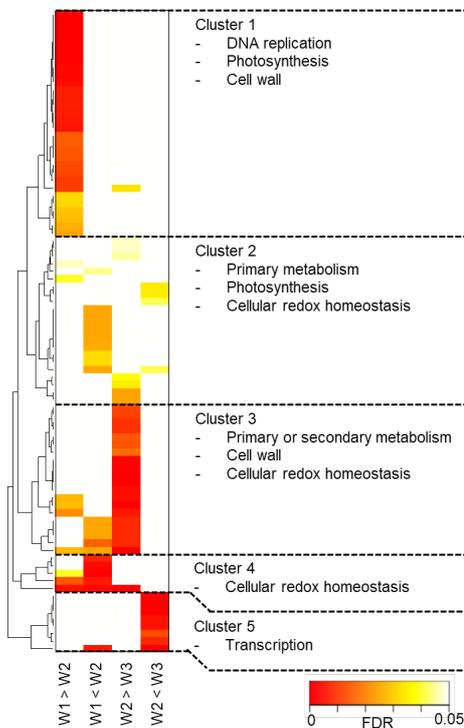


Fig. 2 GO enrichment analysis of DEGs during symbiotic germination in the *de novo* reference assembly of *Bletilla striata*.

(2) RNA-seq により得られた配列データを基に、シランの CCaMK オルソログの全長 cDNA を単離し、クローニングを行い、ORF の配列を同定した。イネとミヤコグサの CCaMK のアミノ酸配列との比較を行った結果、CCaMK にて高度に保存されているドメインや自己リン酸化サイトなどが保存されていた (Fig.3)。また、発現解析を行った結果、*BsCCaMK* は共生発芽により発現量が増加することも明らかになった (Fig.4)。

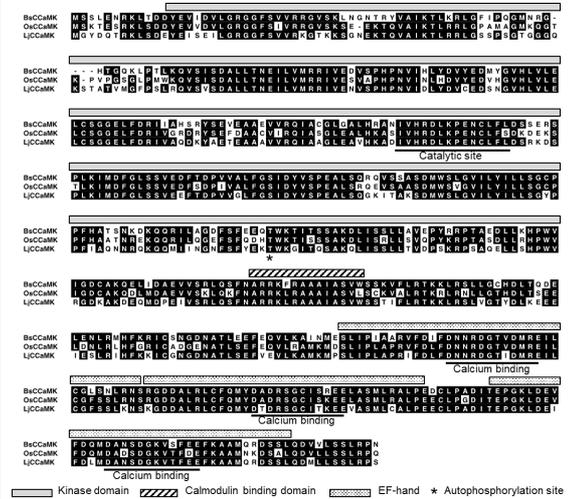


Fig. 3 Amino acid alignment of the CCaMK protein sequence from three plant species, *B. striata*, *Oryza sativa*, and *Lotus japonicus*.

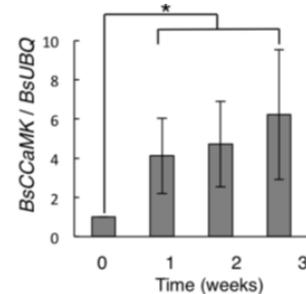


Fig. 4 Expression of *BsCCaMK* during symbiotic germination with *Tulasnella* sp. strain HR1-1.

(3) *BsCCaMK* の cDNA を用いてミヤコグサの *CCaMK* 変異体 (*ccamk-3*) の相補実験を行った結果、根粒共生と菌根共生のどちらの場合でも、ミヤコグサの CCaMK を用いた場合と同様に、*BsCCaMK* はミヤコグサの CCaMK 変異を相補することができた (Fig.5)。本結果から、シランの CCaMK は相利共生を行う植物 (ミヤコグサ) の CCaMK と同様の機能をもつことが明らかになった。

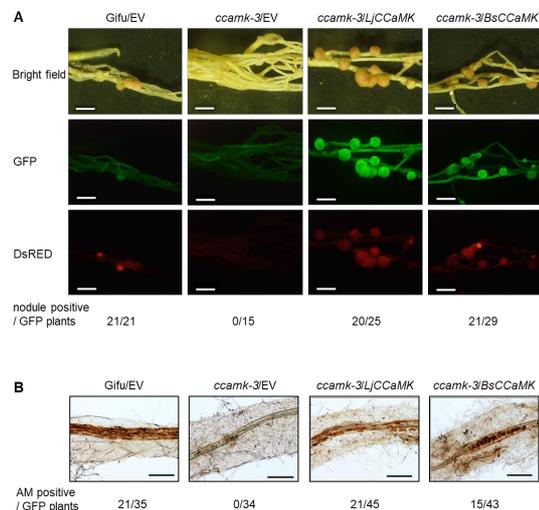


Fig. 5 Complementation of the *Lotus japonicus* *ccamk-3* mutant with *Bletilla striata* CCaMK. Transgenic hairy roots carrying an empty vector (EV), *LjCCaMK*, or *BsCCaMK* were inoculated with *Rhizophagus intraradices* (A), or with *Mesorhizobium loti* expressing DsRed (B).

(4) 共生発芽系の培地にスクロースを添加する(+Suc)ことで、発芽したプロトコームにおいて共生細胞数が劇的に減少し、共生細胞で見られる菌糸コイル(ペロトン)が観察されなくなることが明らかになった(Fig.6)。通常の共生発芽系(-Suc)にて得られたプロトコームとともに、共生できていないサンプルとして本実験系(+Suc)により得られたプロトコームも使い、イネの菌根共生のマーカー遺伝子群のシランのオルソログの遺伝子群(*BsAMxx*)の発現解析を行った。その結果、調査したほとんどの遺伝子で、共生特異的に発現量が顕著に増加することが明らかになった(Fig.7)。本結果から、菌寄生性共生を行うラン科植物においても、相利共生と共通のメカニズムを用いて共生が制御されていると考えられる。

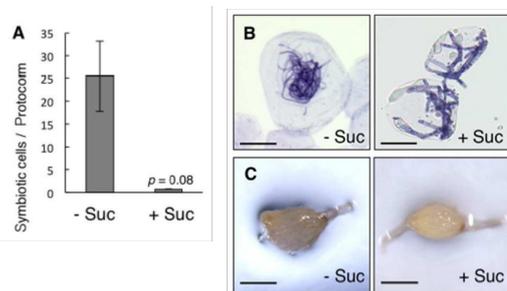


Fig. 6 Effect of sucrose on symbiotic germination of *Bletilla striata* with *Tulasnella* sp. strain HR1-1. (A) The number of symbiotic cells per symbiotic protocorm growing on oatmeal agar medium with or without sucrose. (B) *B. striata* cells with *Tulasnella* hyphae. (C) *B. striata* protocorms growing with *Tulasnella*.

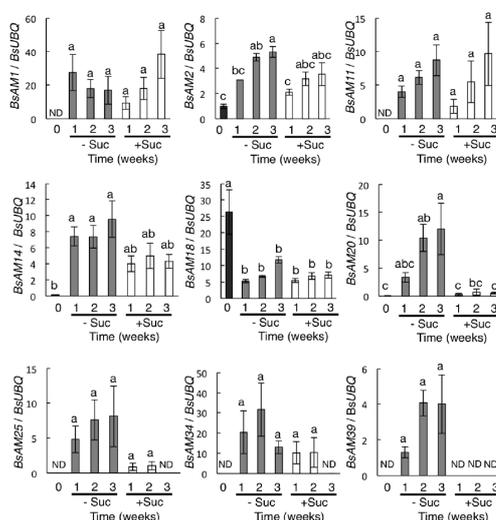


Fig. 7 Expression of *Bletilla striata* marker genes during symbiotic germination with *Tulasnella* sp. strain HR1-1.

また、共生発芽により得られたプロトコーム内の菌糸を蛍光染色した結果、共生菌が基部側のみに存在することが明らかになった(Fig.8A)。そこで、プロトコームを半分に分割した上下のサンプルを用い、*BsAMxx* 遺伝子群の発現量の比較を行った。その結果、共生菌が存在する基部での *BsAMxx* 遺伝子群の発現量は、ほとんどの場合共生菌が存在しない頂部と比べて顕著に高いことが明らかになった(Fig.8B)。つまり、これら遺伝子群は、共生している細胞特異的に発現が誘導されていると考えられる。

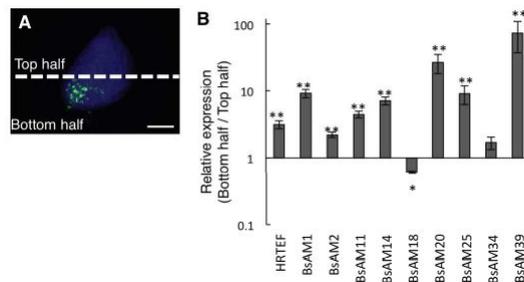


Fig. 8 Spatial distribution of the expression of *Bletilla striata* marker genes in symbiotic protocorms. (A) Colonization of a *B. striata* protocorm by *Tulasnella* sp. strain HR1-1. (B) Expression of *B. striata* marker genes during symbiotic germination with *Tulasnella*.

これらの結果から、本研究の目的である「ラン科植物の”菌寄生性共生”の成立には相利共生の共通共生経路の遺伝子群が必要か？」についての回答を得ることに対して、部分的にはあるが「必要である」との回答を得ることができたと思う。本研究での成果は、Molecular Plant Microbe Interactions 誌に掲載された。ただし、当初予定していたシランの遺伝子組換え実験系が安定的に構築できなかったため、共通共生経路の遺伝子群の必要性が直接的には証明できなかった。今後は、遺伝子組換え実験系の確立に取り組み、菌寄生性共生の成立に関する更なる知見を得べく研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miura, C., Yamaguchi, K., Miyahara, R., Yamamoto, T., Fuji, M., Yagame, T., Imaizumi-Anraku, H., Yamato, M., Shigenobu, S. and Kaminaka, H.: The mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi possesses major components shared with mutualistic plant-mycorrhizal symbioses. Mol. Plant Microbe Interact., in press (2018) 査読有

Suetsugu, K., Yamato, M., Miura, C.,

Yamaguchi, K., Takahashi, K., Ida, Y., Shigenobu, S. and Kaminaka, H.: Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes, and gene expression in mycorrhizal roots. *Mol. Ecol.*, 26, 1652-1669 (2017) 査読有

Yamamoto, T., Miura, C., Fuji, M., Nagata, S., Otani, Y., Yagame, T., Yamato, M. and Kaminaka, H.: Quantitative evaluation of protocorm growth and fungal colonization in *Bletilla striata* (Orchidaceae) reveals less-productive symbiosis with a non-native symbiotic fungus. *BMC Plant Biol.*, 17, 50 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

三浦千裕、山本樹稀、本城真也、山口勝司、菅野裕里、谷亀高広、大和政秀、瀬尾光範、重信秀治、上中弘典：ジベレリンを介したラン科植物シランの菌根共生の制御機構、札幌コンベンションセンター、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月

Chihiro Miura, Katsushi Yamaguchi, Ryohei Miyahara, Tatsuki Yamamoto, Masako Fuji, Takahiro Yagame, Haruko Imaizumi-Anraku, Masahide Yamato, Shuji Shigenobu, Hironori Kaminaka : Conservation of plant common symbiosis pathway in mycorrhizal symbiosis between *Bletilla striata* (Orchidaceae) and mycorrhizal fungus、台北 (台湾)、Taiwan-Japan Plant Biology 2017、2017 年 11 月

本城真也、三浦千裕、藤雅子、込山真太郎、山本樹稀、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：ラン科植物と *Rhizoctonia* 属菌間の共生親和性の解析、京都大学、植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月

古井佑樹、三浦千裕、山本樹稀、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：ラン科植物は菌根共生の制御系を利用して無菌的に発芽する、京都大学、植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月

三浦千裕、山本樹稀、山口勝司、菅野裕里、谷亀高広、大和政秀、瀬尾光範、重信秀治、上中弘典：ジベレリンはラン科植物シランの菌根共生を制御する鍵因子である、京都大学、植物微生物研究会第 27 回研究交流会、2017 年 9 月

Chihiro Miura, Tatsuki Yamamoto, Katsushi Yamaguchi, Yuri Kanno, Takahiro Yagame, Masahide Yamato, Mitsunori Seo, Shuji Shigenobu, Hironori Kaminaka : Gibberellin-mediated defense responses on the mycorrhizal symbiosis in *Bletilla striata* (Orchidaceae)、鹿児島大学、第 58

回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月

古井佑樹、山本樹稀、三浦千裕、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：ジベレリン生合成阻害剤によるラン科植物の発芽と共生の促進効果、愛媛大学、日本農薬学会第 42 回大会、2017 年 3 月

山本樹稀、三浦千裕、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：オーキシンおよびジベレリンはラン科植物シランの菌根共生の制御に關与する、千葉大学、菌根研究会 2016 年度大会、2016 年 12 月

藤雅子、三浦千裕、込山真太郎、山本樹稀、本城真也、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：ラン科植物と *Tulasnella* 属菌間の共生親和性の解析、千葉大学、菌根研究会 2016 年度大会、2016 年 12 月

Yuki Furui, Chihiro Miura, Tatsuki Yamamoto, Katsushi Yamaguchi, Takahiro Yagame, Masahide Yamato, Shuji Shigenobu, Hironori Kaminaka : Transcriptome analysis of aymbiotically germinated *Bletilla striata* (Orchidaceae) and effects of phytohormones on germination、テジョン (韓国)、日韓合同国際シンポジウム (AFELISA) 2016 年度大会、2016 年 10 月

Tatsuki Yamamoto, Chihiro Miura, Takahiro Yagame, Masahide Yamato, Hironori Kaminaka : Involvement of auxin and gibberellic acid in the regulation of mycorrhizal symbiosis in *Bletilla striata* (Orchidaceae)、テジョン (韓国)、日韓合同国際シンポジウム (AFELISA) 2016 年度大会、2016 年 10 月

三浦千裕、山口勝司、宮原良平、山本樹稀、谷亀高広、今泉 (安楽) 温子、重信秀治、大和政秀、上中弘典：ラン科植物シランにおける共通共生遺伝子群の解析、東北大学、植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016 年 9 月

山本樹稀、三浦千裕、谷亀高広、大和政秀、上中弘典：オーキシンおよびジベレリンはラン科植物シランの菌根共生の制御に關与する、東北大学、植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016 年 9 月

古井佑樹、三浦千裕、山本樹稀、山口勝司、谷亀高広、大和政秀、重信秀治、上中弘典：ラン科植物シランの無菌発芽系におけるトランスクリプトーム解析と植物ホルモンの影響評価、沖縄コンベンションセンター、日本植物学会第 80 回大会、2016 年 9 月

Chihiro Miura, Tatsuki Yamamoto, Masahide Yamato, Katsushi Yamaguchi, Shotaro Nagata, Yuria Otani, Hisayo Asao, Miwako Matsumoto, Takahiro Yagame, Shuji Shigenobu, Hironori Kaminaka : Involvement of auxin and gibberellic acid in the regulation of mycorrhizal symbiosis in *Bletilla striata* (Orchidaceae)、ポートランド (米国)、XVII International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions、

2016年7月

Chihiro Miura, Tatsuki Yamamoto, Masahide Yamato, Katsushi Yamaguchi, Shotaro Nagata, Yuria Otani, Hisayo Asao, Miwako Matsumoto, Takahiro Yagame, Shuji Shigenobu, Hironori Kaminaka: Involvement of auxin and gibberellic acid in the regulation of mycorrhizal symbiosis in *Bletilla striata* (Orchidaceae)、岩手大学、第57回日本植物生理学会年会、2016年3月

三浦千裕、末次健司、大和政秀、山口勝司、高橋和也、井田喜子、重信秀治、上中弘典: ハマカキランのアルビノ個体を用いたトランスクリプトーム解析による菌従属栄養性に関する遺伝子群の探索、とかちプラザ、菌根研究会2015年度大会、2015年10月

山本樹稀、古井佑樹、三浦千裕、谷亀高広、大和政秀、上中弘典: ラン科植物シランの菌根共生における植物ホルモンの影響、とかちプラザ、菌根研究会2015年度大会、2015年10月

山本樹稀、三浦千裕、長田翔太郎、大谷ユリア、谷亀高広、大和政秀、上中弘典: ラン科植物シランの発芽後の初期成長における菌根共生の役割、つくば国際会議、植物微生物研究会第25回研究交流会、2015年9月

三浦千裕、末次健司、大和政秀、山口勝司、高橋和也、井田喜子、重信秀治、上中弘典: ハマカキランのアルビノ個体を用いたトランスクリプトーム解析による菌従属栄養性に関する遺伝子群の探索、つくば国際会議、植物微生物研究会第25回研究交流会、2015年9月

②山口勝司、浅尾久世、松本美和子、秋田朝日、尾納隆大、上中弘典、大和政秀、重信秀治: Synthetic long-read 法を用いた完全長トランスクリプトーム解析、つくば国際会議場、NGS現場の会第四回研究会、2015年7月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ラン科植物の発芽と共生を促進する技術

発明者: 上中弘典、三浦千裕、山本樹稀、古井佑樹

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願2015-196787

出願年月日: 平成27年10月2日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/faculty/kaminaka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上中 弘典 (KAMINAKA, Hironori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 40397849

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

大和 政秀 (YAMATO, Masahide)

千葉大学・教育学部・准教授

研究者番号: 00571788

(4) 研究協力者

今泉 (安楽) 温子

(IMAIZUMI -ANRAKU, Haruko)

三浦 千裕 (MIURA, Chihiro)

山本 樹稀 (YAMAMOTO, Tatsuki)

古井 佑樹 (FURUI, Yuki)