

令和元年5月30日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0122

研究課題名(和文) 共生栄養供給能の利用に向けた共生促進剤の探索と解析

研究課題名(英文) Analysis of symbiosis promoters to utilize symbiotic nutrient supply

研究代表者

武田 直也 (Takeda, Naoya)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：60571081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物と菌根菌・根粒菌との菌根共生・根粒共生は、リンや窒素などの養分を宿主に供給し、大きな生育促進効果をもたらすことから、微生物肥料としての利用が注目されている。本研究では、共生体のトランスクリプトーム解析やメタボローム解析により、共生菌の感染能と生育促進効果をもつ物質の探索を行い、それらの候補物質の添加による共生能の向上効果を検証した。その結果、いくつかの候補物質の解析を行い、共生の促進効果を持つことを明らかにし、これらの物質を共生を促進させる「共生促進剤」として利用するための研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と微生物の相互作用は、宿主に大きな生育促進効果を与えることから、微生物肥料としての利用など、農業への応用が期待されている。しかし、これら共生の成立過程は宿主植物、共生菌の共生因子により制御されているが、外部の温度・湿度・栄養状態などの環境因子によっても大きく影響を受けるため、宿主への生育促進効果も不安定なものになってしまう。そのため、大規模な利用のためには、共生能の向上や安定制御に関する技術開発が不可欠なものとなっている。本研究では共生を促進、調整する物質を同定し、それを共生促進剤として利用することで、さまざまな環境変化に影響を受ける共生能の安定制御を実現することができる。

研究成果の概要(英文)：Root nodule symbiosis (RNS) and arbuscular mycorrhiza (AM) are mutualistic interaction that supply nutrients such as phosphorus and nitrogen to the host plant. The symbiosis promote host growth and the symbiotic ability is expected to be used as a bio-fertilizer. The symbiosis establishment process is controlled by the symbiotic factors both from the host plant and symbiotic microbes. In addition, it is also greatly affected by environmental factors such as temperature, humidity and nutrient status. Thus, the growth promotion effect is often unstable in natural conditions. Therefore, in this study, we searched for molecules that promote microbial infection or effect of symbiotic ability by transcriptome and metabolome analysis. We isolated several candidate molecules and confirmed their promotion effects on the symbiotic interactions.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物微生物間相互作用 共生 根粒共生 菌根共生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本では食料自給率の改善が急務とされ、また世界的な植物バイオマスの利用価値への注目から、農業生産性の向上が望まれている。植物の生育には主にチッソ・リン・カリウムが必要とされるが、現代農法では過剰な化成肥料の添加によりそれらの栄養素を供給し、その生産性を維持している。しかし、化成肥料は製造時の大量のエネルギー消費（年間天然ガス使用量の数%が窒素肥料製造に消費）や資源の枯渇（各国のリン鉱石輸出制限、日本は100%輸入に依存）などの環境・資源問題を生じさせる。そのため、持続的な農業の発展のためには、化成肥料・農薬の使用量の低減が可能となる環境低負荷型の農業スタイルの確立が不可欠となる。一方、ダイズなどのマメ科植物は「根粒菌」との根粒共生によりチッソ源、「菌根菌」との菌根共生によりリン源を得ることができるようになる。これらの共生では、共生菌が宿主根内に侵入し、「根粒」や「樹枝状体」などの共生器官を形成することで栄養物質の交換を容易にしている。さらに菌根共生においては、多種のミネラル供給や乾燥耐性・耐病性を付与することが知られており、古くからその有用性が認識されている。そのため、共生菌との相互作用は低肥料・低農薬型の農業を目指すうえで特筆すべき生物機能であり、これらの機能を有効に利用する「微生物肥料」を使用することで、従来の施肥技術の改善が期待できる。

近年、微生物農薬の開発など生物機能の農業への利用の可能性が実証されており、共生機能についてもその有益性を利用すべく、共生菌を配合した土壌資材の販売なども行われている。しかし、現状ではその利用は小規模にとどまり、大規模農業での利用は実施されていない。その原因の1つとして、このような生物機能が生物・微生物間相互作用によってもたらされるものであり、生物を用いるがゆえの不安定さが実用面での問題となることがあげられる。実際に根粒菌・菌根菌の宿主植物への感染や生育促進効果は、環境要因などによって大きく左右され、実験室レベルにおいても感染や生育促進効果がみられないことがある。そのため、植物の生育に大きな利益をもたらす共生栄養供給の農業利用を可能とするためには、共生効果のさらなる向上とともに、安定的・持続的に生物間相互作用を制御する技術開発が必要となる。このような問題に対して、共生制御を担う共生遺伝子の同定など、共生機構の解明に向けた研究が行われ、その基礎的な知見の蓄積が行われてきた。しかし、共生遺伝子の改変などによる共生能の向上では、刻々と変化する外部環境に対する調整を行うことができず、また実質的に組換え植物を栽培することができない日本での使用は不可能である。そのため、これまで得られた基礎的な共生研究の成果を直接、農業などの応用に結び付けることはできていなかった。

2. 研究の目的

本研究では物質添加による根粒共生・菌根共生の調整が可能な共生因子を同定・解析し、菌根・根粒共生能の向上効果を検証することで、共生能を調整・促進する「共生促進剤」の開発を目指す。これらの解析から得られる研究成果は、物質添加による共生能の向上や、環境条件などによって低下する共生能に対しての補償効果を期待でき、共生の安定制御と持続的・大規模利用を実現する技術となりうる。

3. 研究の方法

本研究では共生のモデルとして、ダイズ(*Glycin max*)、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)と根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti*)との根粒共生、これらのマメ科植物に加えて作物としてネギ属(*Allium schoenoprasum* 等)とアーバスキュラー菌根菌(*Rhizophagus irregularis*)との菌根共生を用いた。

根粒菌・菌根菌と共生させたミヤコグサを用いて、共生の場となる根部、生育促進効果がみられる地上部でのトランスクリプトーム解析を行い、共生時に変動する遺伝子を特定する。この解析では代謝・合成系遺伝子群の発現変動に注目し、特定の代謝経路に在る遺伝子群を解析候補遺伝子とする。これらの遺伝子について定量的RT-PCRによる発現解析を行いつつ、律速となる酵素遺伝子と実際に共生に必要とされる分子種などを特定する。これらのデータをもとに、遺伝子には分子生物学・遺伝学・逆遺伝学的手法や共生変異体、形質転換体を用いた解析を行い、さらに外部から添加・調整が可能な共生因子の解析を行う。物質としては、

1. 菌根菌・根粒菌の感染能の向上に結び付く物質
2. 根粒菌の共生の場となる根粒形成促進に働く物質
3. 栄養供給能（窒素固定能、リン酸供給能）を向上させる物質

などに注目した探索を行った。解析対象物質については、現時点の技術でその物質が1. 大量に入手可能であるか、2. 効果に対してコスト面で見合うものであるかなど、実用化に向けた優位性についても考慮して優先順位をつける。

同定した遺伝子を対象とした解析では、根粒共生・菌根共生時の詳細な発現時期や局在解析を、定量的RT-PCRやプロモーターGUS fusionを用いて行う。この解析により、遺伝子の誘導時期や局在を明らかにすることで、その物質がそれぞれの共生において必要とされる時期・部位などが特定でき、その作用点と共生における機能が推定できる。また、共生促進物質を探索するうえで、共生に関与する物質の網羅的な探索も有効な手段として働くことが考えられる。そのため、共生菌や植物におけるメタボローム解析を植物科学最先端研究拠点ネットワーク（理化学研究所）の支援により行う。このメタボローム解析データとトランスクリプトーム解析とを統合して得られた情報から、菌根共生、根粒共生に影響を与えうる物質候補を同定する。

解析候補とした物質に対しては、実際に候補物質の添加による共生菌の感染率、共生栄養供給や生育促進への作用を検証する。ここでは共生促進物質候補の有効濃度や、葉面散布・土壌への添加などによる添加方法での効果の違いを検証し、実際の利用において使用できる添加法などの検討も行う。また、宿主植物だけでなく、共生菌の増幅や感染形態、共生遺伝子発現などへの影響も解析する。これらの解析により、共生能への正の作用を詳細に検証するとともに、負の影響をもつ可能性なども捉え、それぞれの物質の有効性を評価する。さらに作物への知見の適用例として、根粒共生についてはダイズ、菌根共生にはその効果が大きいとされるネギ類における作用についても解析し、より大規模な作物への適用をめざした基礎的なデータを蓄積するとともに、本研究により同定した共生促進因子が、広い植物種において普遍的に存在する共生システムで機能する物質であることも証明する。

ここで、我々の先行研究では、共生時の宿主根でのトランスクリプトーム解析により、チアミン、ジベレリンを共生制御因子として同定し、これらの物質に対する作用機構の解析と共生菌感染における促進効果についての検証を行い、その有効性を示すことができていた。そのため、これらの物質を指標として、共生能の向上と利用への可能性を検証するための評価法の確立を行うことができる。物質添加時の菌根菌、根粒菌の感染率の測定法や、共生栄養供給能の評価、生育促進効果を統一した基準で、栽培室レベルで評価する方法を確立する。ここではミヤコグサとともに、ダイズ、ネギ類などの作物種での評価法の確立を目指す。

これらの研究によって、共生効果の向上と安定制御を実現する「共生促進剤」の開発につながる知見を得て、共生栄養供給を化成肥料の代替・補助的用途として使用し、施肥量の低減による環境・資源・エネルギー問題を解決する低環境負荷型農業の実現に貢献する。

4. 研究成果

(1) 根粒・菌根共生におけるトランスクリプトーム解析

根粒菌・菌根菌と共生させたマメ科植物ミヤコグサでのトランスクリプトームデータ、共生シグナル分子を添加したデータ、および共生変異体のデータ取得を行った。共生シグナル分子としては、根粒共生時に根粒菌から分泌される Nod factor、菌根共生時に菌根菌から分泌されるキチンオリゴマーを添加した植物体での発現プロファイルを取得した。共生変異体としては、根粒の過剰着生、菌根菌の過剰感染が確認されている変異体 *har1* および *tml* のトランスクリプトーム解析を行った。これらの共生変異体では非感染状態での植物状態が共生菌の感染や共生器官の形成を促進していると考えられたことから、非感染状態での根および地上部の発現プロファイルの取得を行った。トランスクリプトーム解析の手法としては、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を用いた。上記のサンプルより抽出した RNA から次世代シーケンス用ライブラリを作製し、Illumina HiSeq2000/2500 を用いて数 M ~ 数十 M reads のショートリード情報を取得した。この RNA-seq データをインフォマティクスによる解析を行い、これらの遺伝子発現プロファイルから共生促進物質の候補となる物質とその合成遺伝子・経路の情報を得た。

(2) 候補遺伝子の機能解析

過剰根粒共生変異体 *har1*, *tml* での解析では、非感染状態で発現が上昇する遺伝子に注目して解析を行った。*har1*, *tml* では、非常に初期の共生菌感染プロファイルが得られ、非感染状態においても一部の共生遺伝子の発現上昇がみられた。そのため、これらの変異体は、共生菌の受容性が高い状態、感染前から共生菌を受け入れやすい状態を作り出していると考えられる。この変異体において非感染状態において受容性を高める共生因子を候補遺伝子をピックアップした。このとき、本課題は遺伝子改変ではなく物質添加による共生能を向上させることを目的とした研究であることから、候補遺伝子は生合成・代謝系の遺伝子や、物質によって遺伝子機能を代替できるものを候補とした（以下、特許出願を検討しているため、具体的な遺伝子名は省略する）。これらの候補遺伝子のうちから qRT-PCR により発現量の変動が確認でき、その後の解析手法が確立できる遺伝子を 5 つほど選び、毛状根形質転換（根のみを転換する一過的遺伝子導入法）により、過剰発現させた植物根を作成した。この形質転換根に根粒菌を接種したところ、ある遺伝子の過剰発現が、野生型植物と比較して有意な根粒数の上昇を示した。この遺伝子がコードするタンパク質は、タンパク質の添加ではなく一般的な試薬を用いて代替可能であることから、その効果の検証を行うことで、共生促進剤として利用することが想定される。しかし、一過的な形質転換では正確な表現型の評価は難しいことから、根のみではなく植物体全体で遺伝子を過剰発現させた形質転換体を作成した。この過剰発現体の根粒共生表現型の解析では、これまでに一過的な発現解析と同様に、根粒菌感染上昇の結果が得られており、この遺伝子は感染を促進する機能を持つことが明らかとなった。さらに現在は CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子破壊株を得ることができた。その破壊株の解析により、過剰発現体の逆の表現型がみられることを期待して、表現型を解析している。今後はさらに詳細な機能解析を行うため、発現部位の検討や細胞内局在の解析などを引き続き行っていく。さらに、*har1* や *tml* 変異体では菌根菌の感染も向上することが知られていることから、過剰発現体において菌根共生能の向上効果についても検証を行う予定である。

(3) メタボローム解析による共生蓄積物質の同定と解析

ミヤコグサ、菌根菌双方のメタボローム解析などによる代謝産物の網羅的解析なども取り入れ、さまざまな方法により共生促進物質の探索を行った。菌根菌はいくつかの代謝産物を宿主植物に依存しており、チアミンや脂肪酸などの代謝経路の一部が欠損していることが知られている。

そのため胞子に蓄積した物質が菌根菌の増殖や植物への感染に関与することが示唆された。このメタボローム解析からの情報とトランスクリプトーム解析データを統合し、得られた情報から、菌根共生に影響を与える物質候補の同定を行った。候補物質としていくつかの物質に注目したが、まず菌根菌胞子で蓄積し、菌根菌の共生時に関連する遺伝子の発現上昇が見られた物質に注目した解析を行った（以下、特許出願を検討しているため、具体的な物質名は省略する）。その物質と派生体の菌糸への添加実験では、菌糸伸長や分岐へ影響を与えることが判明した。この菌糸伸長の評価法として、画像解析ソフト ImageJ を用いた簡易的な菌糸の数値化を行った。この方法を用いて、候補物質の菌糸伸長への影響を数値化、定量化することが可能となり、また統計的な処理により客観的な作用の判定を行うことができるようになった。また、植物体への共生菌への感染向上効果についても、物質添加により検証し、グルタチオン添加により感染を促進する効果がみられることが判明した。これはその物質添加により菌糸の伸長が促進されることで宿主植物への菌糸の接触の頻度が上昇し、それによって宿主内への菌糸の侵入率が向上したと考えられる。この物質については、植物体への菌根菌感染を向上させる感染促進剤としての利用が期待できる。

そのほかの候補物質においても菌糸の伸長を促進する効果があることが確認できており、その解析を進めている。

(4) 作物種を用いた栽培室・圃場における共生促進剤の効果検証

この解析によって得られた共生促進効果を持つ物質については、モデル植物だけでなく、作物への影響の解析を栽培室で評価した。その評価法として、根粒菌に関しては共生器官である根粒の計測条件の検討を行った。また、その根粒における窒素固定能の測定技術として、ガスクロマトグラフィーを用いたアセチレン還元活性測定の測定法を導入し、物質添加による影響を評価する実験系を立ち上げた。菌根共生においては、接種胞子数に応じた感染率の変化を測定することで宿主植物における感染能の変動と生育促進効果を評価する手法を確立した。とくに応用対象として想定しているネギを用いた測定では、安定した感染と生育促進効果を計測できるようになっている。

さらにこのように共生に作用する物質が実際に圃場の作物における共生能の向上や生育促進、収量の増加に結び付くかの検証を行った。すでに論文として発表し、本課題で報告を行った根粒共生におけるチアミン(ビタミン B1)の作用について、圃場において栽培しているダイズ(エンレイ、タンバグロ)に添加することで、実験室内と同様の効果が得られるかの検証を行った。その結果、チアミン添加個体では、非添加個体と比較して葉身の大型化や葉数の増加が見られ、着夾数の増加も観測することができた。台風の被害などにより個体数が大幅に減少し、最終的な収量の測定では有意差は見えなかったが、ダイズ種子数と個々の種子の重量に増加傾向を見ることができた。このことから、チアミンはダイズの圃場栽培にも実験室と同様の効果がみられることが判明した。

作物種、圃場を用いた解析については最終年度に開始したばかりであり、今後もさらに検証を行っていく必要があるが、他の共生促進効果が期待できる物質についても、同様の方法により圃場における効果の検証を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Maeda T, Kobayashi Y, Kameoka H, Okuma N, Takeda N, Yamaguchi K, Bino T, Shigenobu S, Kawaguchi M

Evidence of non-tandemly repeated rDNAs and their intragenomic heterogeneity in *Rhizophagus irregularis*

Communications Biology (2018) vol 1, Article number 87:1-13

(2) Tsuzuki S, Handa Y, Takeda N, Kawaguchi M.

Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is required for the establishment of symbiosis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*

Molecular Plant-Microbe Interactions (2016) 29:277-86

(3) Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, Takeda N*

The relationship between thiamine and two symbioses: Root nodule symbiosis and arbuscular mycorrhiza

Plant Signaling & Behavior (2016) e1265723

(4) Nagae M, Parniske M, Kawaguchi M, Takeda N*

The Thiamine Biosynthesis Gene *THI1* Promotes Nodule Growth and Seed Maturation

Plant Physiology (2016) 172:2033-43 *Corresponding author

〔学会発表〕(計 7件)

(1) 前田太郎, 小林裕樹, 亀岡啓, 大熊直生, 武田直也, 山口勝司, 尾納隆大, 重信秀治, 川口正代司

AM 菌の rDNA はタンデムリピート構造を欠損しゲノム内多型を示す

第 82 回日本植物学会 2019 年

(2) 前田太郎, 小林裕樹, 亀岡啓, 大熊直生, 武田直也, 山口勝司, 尾納隆大, 重信秀治, 川口正代司

高精度ゲノム解読で判明した AM 菌のユニークな rDNA とリボソーム使い分けの可能性

日本進化学会第 20 回大会 2018 年

(3) Mamu Gonnami, Yukiko Isowa, Sarasa Takashima, Naoya Takeda, Mayumi Egusa, Shinsuke Ifuku, Hironori Kaminaka

Chitin nanofiber promotes rhizobial symbiosis in the model legume *Lotus japonicus*

The 14th International Chitin and Chitosan Conference 2018 年 8 月 27 日

(4) 武田直也

異種生物の受容を制御する機構; アーバスキュラー菌根共生を中心に

環境微生物系学会合同大会 2017 2017 年 8 月 28 日~31 日(招待講演)

(5) 武田直也 永江美和 川口正代司

根粒共生・菌根共生における共生制御物質の解析と共生能向上効果の検証

植物微生物研究会 2016 年 9 月 7 日~9 日

(6) 武田直也

植物 微生物共生制御機構の解明と共生栄養供給能の利用

植物の栄養研究会 2016 年 9 月 2 日~3 日(招待講演)

(7) 武田直也 永江美和 川口正代司

共生促進剤としてのジベレリン合成阻害剤の利用

菌根研究会 2015 年 10 月 31 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~takeda/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 永江 美和

ローマ字氏名: Nagae Miwa

研究協力者氏名: 川口 正代司

ローマ字氏名: Kawaguchi Masayoshi

研究協力者氏名: 赤松 明

ローマ字氏名: Akamatsu Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。