

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19253

研究課題名(和文)ラン科植物とラン菌根菌の共生関係に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study to elucidate molecular mechanisms involved in orchid-mycorrhiza interaction

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラン科植物は菌根菌に依存する特殊な種子発芽を行うが、ランと菌の相互作用に関わる分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。本研究では、共生発芽能が異なる様々な菌を用いて、共生関係の成立や維持に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、特に、菌に内在するマイコウイルスに注目した。共生発芽能に関わる要因として、菌に感染しているpartitivirusの種類およびそれに影響するendornavirusやmegabirnavirusの関与が示唆された。RNAseqを用いて共生発芽に関わる発現変動遺伝子を解析したところ、共生関係の維持に関わる防御応答関連遺伝子や糖輸送関連遺伝子を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物界で最も多様性があるとされるラン科植物がもつ特殊な共生関係はランの生存に必須であり、進化の過程でも失われずに維持されてきた重要なメカニズムである。しかし、その制御に関わる要因については研究が進んでいない。本研究では、共生関係を制御するメカニズムの一因として、菌根菌に感染するウイルスや共生特異的に発現する遺伝子を示唆することができた。さらなる解明により、植物と菌の相互作用に及ぼす内在ウイルスの存在意義を明らかにし、ランと菌根菌の進化学に新たな研究領域を開拓することも期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants in the family Orchidaceae depend on mycorrhizal fungi for seed germination and following seedling development, but little is known about the molecular mechanisms involved in the orchid-fungal interactions. This study aimed to clarify the molecular mechanism involved in the establishment and maintenance of mycorrhizal relationships by using various orchid mycorrhizal fungi with different ability to induce germination. As a factor related to the germination ability, it was suggested that the kind of partitivirus infecting the fungus and the involvement of endornavirus and megabirnavirus. RNAseq analysis using protocorms obtained with or without fungal inoculation was conducted to know the gene expression involved in symbiotic germination, and it was suggested that the defense response-related genes and sugar transport-related genes were involved in regulation of mycorrhizal interaction with fungi.

研究分野：植物病理学、植物生理学

キーワード：ラン 菌根菌 種子発芽 マイコウイルス

1. 研究開始当初の背景

ラン科植物の種子は未熟な胚と種皮のみでできている。一般的な種子に含まれている胚乳や子葉のような組織分化がないため、発芽に必要な養分をほとんど持っていない。ランの種子は、適切な植物ホルモンや糖を添加した培地で培養すれば無菌的に発芽させることができるが、自然状態では、発芽のために適合する菌 (Orchid mycorrhizal fungi, OM 菌) の感染を必要とする。この菌根形成を通じて、ランは成長に必要な養分を菌から得ており、胚の発達、発芽、幼植物体への成長を進めていく。すべてのラン科植物は、発芽時と発芽後の一定期間に菌従属栄養状態となり、この間は菌由来の炭水化物に依存して生存する。ランが OM 菌へ大きく依存している一方、ランから OM 菌へ養分供給のような見返りはなく、陸上植物の多くにみられる AM 菌根系のような相利的な共生関係ではないとされる。このようなラン科植物の特殊な種子発芽プログラム、菌との寄生的共生関係は古くから知られていたが、これまでに、ランと OM 菌の相互作用に関わる分子メカニズムについてはほとんど研究されてこなかった。ランと OM 菌との共生メカニズムを研究するには、種子発芽誘導能をもつ菌を自然から分離することが必要となる。研究代表者はこれまで、希少ランであるレブンアツモリソウに種子発芽誘導能をもつ複数の OM 菌を保持しており、これらを用いて、OM 菌との共生メカニズムを明らかにしようとする本研究計画を考案した。

2. 研究の目的

植物最大の多様性をもつラン科植物がどのように OM 菌との相互作用をコントロールするのか、その分子メカニズムは未解明である。本研究では、共生発芽能が異なる様々な OM 菌を用いて、共生関係の成立や維持に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、菌に内在するマイコウイルスに注目し、ウイルス感染が宿主菌がもつランとの共生能力に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 様々な OM 菌におけるマイコウイルスの同定

レブンアツモリソウやその他のランの根、プロトコームから分離された様々な菌株を液体培養し、得られた菌糸から核酸抽出を行う。菌に感染するマイコウイルスについて解析するには DNase および S1Nuclease 処理により dsRNA を精製する。一部の菌株については、RNAseq を用いて感染ウイルスの網羅的解析を行う。RNAseq で検出されたウイルス様配列について特異的プライマーを作製して RT-PCR による感染確認も行う。マイコウイルスが及ぼす宿主菌の諸形質への影響を調べるために、菌糸融合やプロトプラスト処理によりウイルスや dsRNA を導入した変異菌株や、継代培養や凍結処理によりウイルスや dsRNA を欠失させた変異菌株を作成する。

(2) 共生関係の成立や維持に関わる遺伝子の解析

レブンアツモリソウ完熟種子に様々な OM 菌を接種し、共生発芽能の有無を観察するとともに共生発芽由来のプロトコームを得る。また、無菌発芽によって得られたプロトコームも用意して、レブンアツモリソウに本来感染しているウイルスの解析や、無菌発芽や共生発芽に特異的な遺伝子発現を解析する材料とする。レブンアツモリソウおよびその OM 菌はまだゲノム情報がない。用意したプロトコームから total RNA または dsRNA を精製し、RNAseq によりトランスクリプトーム解析を行った後は、de novo assembly により contig を作製し、各サンプルのリードカウント数を算出し、遺伝子発現量を推定する。また、contig 配列をクエリとして blastX を行い、最も相同性が高いものを contig の遺伝子と推定する。

4. 研究成果

(1) 様々な OM 菌におけるマイコウイルスの同定

これまで、レブンアツモリソウに共生発芽能があることが分かっていた菌株 (WO 菌株) には partitivirus (alphapartitivirus) が 2 種類検出されていたことから、まず他の分離菌株にも同じ partitivirus が感染しているかを調べた。その結果、レブンアツモリソウに共生発芽能を示す菌株の系統でのみ検出される partitivirus と、複数の分離菌株において効率的に検出される partitivirus があつた。各菌株の継代培養や発芽試験の継続を通して、同一菌株から分けたものでも共生発芽能が異なる株を作成できた。分離されて以来、in vitro の発芽試験において高い共生発芽能を示した WO 菌株からは、共生発芽率の低下が観察されるものが得られ、分離当初は共生発芽能が低かった FT 菌株では、継代培養を経て高い共生発芽能を示すようになったものが得られた。これらの菌株について、ウイルス感染とレブンアツモリソウへの共生発芽能との関わりを調べた。共生発芽能が変動した菌株について RT-PCR により partitivirus の有無を調べたところ、共生発芽能が低下した WO 菌株では partitivirus が検出されないものがあつた。一方、共生発芽能が向上した菌株では FT 株では新たに異なる partitivirus が検出された。これらの菌株も含め、RNAseq を行ってさらに網羅的にウイルス感染を解析した。共生発芽能が低いままの FT 菌株では最大 10 種類の partitivirus が検出されたが、共生発芽能が高くなった FT 株では 2 種類のみ partitivirus が検出された。また、partitivirus の他に、推定 ORF を 2 つコードする全長約 19 kb の endornavirus 様配列が検出され、共生発芽能が低い株では endornavirus の感染量が多かった。共生発芽能が低

下した WO 菌株では、以前検出されていた partitivirus が検出されず、また、megabirnavirus の感染量が増えていた。さらに、主に植物を宿主とする amalgavirus の部分配列がこの菌株から検出された。他の菌株では、amalgavirus 様配列が検出されるものはなかった。WO 菌株から検出された amalgavirus 配列はレブンアツモリソウ無菌培養物で検出された amalgavirus の配列と一致しており、ランから菌への RNA 移行が起こったのか今後さらに検証する必要がある。また、RNAseq において、レブンアツモリソウ以外のランから単離された菌株からは partitivirus、endornavirus、megabirnavirus は検出されず、fusarivirus や未分類のマイコウイルスが検出された。

これまで行った RNAseq では、無菌培養由来のレブンアツモリソウに OM 菌で検出された alphapartitivirus と同様の配列が検出されていた。そこで、無菌培養由来のレブンアツモリソウを新しく用意し、RT-PCR でも実際にウイルス配列が検出されるかを試みたが、通常の PCR では検出されなかった。一般に partitivirus の複製量は菌に比べて植物細胞内では非常に少ないとされていることから、抽出核酸内の RNA を増幅する過程を加えたところ、無菌培養由来のランからも微量のウイルス配列を増幅することができた。しかし、また別の無菌培養由来のサンプルを RNAseq で解析した際には、植物を宿主とする deltapartitivirus の部分配列は検出されたが alphapartitivirus は検出されなかった。

dsRNA ゲノムをもつマイコウイルスは RNA サイレncing の標的となりやすいと考えられるが、CP 内で複製するために RNA サイレncing を回避できるという報告もあり、植物ウイルスでみられるような宿主の RNA サイレncing に対抗するサプレッサー活性を保持するのがよく分かっていない。レブンアツモリソウ OM 菌で検出された複数の partitivirus について、アグロインフィルトレーションによって CP の RNA サイレncing 抑制活性を評価した。その結果、全くサプレッサー活性がないものと活性を示すものがあることが分かった。

(2) 共生関係の成立や維持に関わる遺伝子の解析

無菌発芽で得られたプロトコームと共生発芽で得られたプロトコームを材料に RNAseq を行い、それぞれの発芽過程で特異的に変動する遺伝子の探索を行った。共生発芽プロトコームでは、感染している OM 菌の違いにより、生育が停止してしまったプロトコームとそのまま成長を続けて健全に成長するプロトコームに分けてサンプリングし、共生関係の維持に関わる遺伝子について探索した。無菌発芽でも共生発芽でも発現量が高い遺伝子には、カタラーゼや peroxidase など酸化還元制御に関わる遺伝子があった。無菌発芽同様に、共生発芽プロトコームでもサイトカニン結合タンパク質遺伝子が高く発現しており、発芽過程にサイトカニンに関わるものが示唆された。

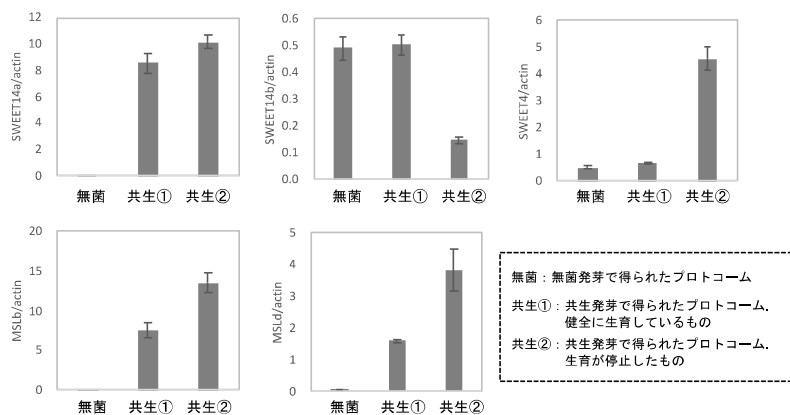


図. 無菌発芽および共生発芽プロトコームにおける遺伝子発現量の比較 (qRT-PCR)

RNA-seq において共生発芽特異的な発現変動がみられた遺伝子について、qRT-PCR でも発現量の確認を行った。SWEET14b は無菌発芽と共生発芽のどちらのプロトコームでも発現している一方、SWEET14a は共生発芽プロトコーム特異的に発現していた。また、病原菌への防御応答に関わる SWEET4 は共生②で発現量が高かった。MSL (mannose-specific lectin) は植物免疫に関わるとされ、共生発芽系において発現量が増加していた。

共生発芽プロトコームでは、防御応答に関わる PR4 遺伝子の発現が無菌プロトコームに比べて高かったが、PR1 遺伝子の発現量は無菌発芽プロトコームの方が高かった。防御応答関連遺伝子では他にも共生発芽プロトコーム特異的に発現しているものがみられたが、生育が停止したプロトコームと健全に生育しているプロトコームではこれらの防御応答関連遺伝子の発現量に違いがあった。また、共生発芽プロトコーム特異的に発現する糖輸送関連遺伝子を検出した。RNAseq で発現変動が確認された遺伝子について、qRT-PCR による発現量解析を行ったところ、同様の結果を得ることができた (図)。糖輸送関連遺伝子と OM 菌感染との関わりを確認するために、レブンアツモリソウ実生の継代培養において、菌が残っている個体と残っていない個体を用意して、これらの糖輸送関連遺伝子の発現量を調べた。その結果、菌が感染している個体でのみ発現していることが確認され、この遺伝子が菌根形成の制御に関わるものが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志村華子・増田税・幸田泰則
2. 発表標題 ラン-菌根菌共生系に影響を及ぼすウイルス探索の試み
3. 学会等名 平成30年度（第53回）植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲島七海・平田智恵子・藤野介延・志村華子
2. 発表標題 RNAseqによるランの共生発芽に関わる分子メカニズム解明に向けた遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shimura H, Masuta C, Koda Y	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press, New York	5. 総ページ数 217
3. 書名 Metagenomic Analyses of the Viruses Detected in Mycorrhizal Fungi and Their Host Orchid. In: Pantaleo V, Chiumenti. (eds) Viral Metagenomics. Methods in Molecular Biology, vol 1746.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----