

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14466

研究課題名(和文)植物のリン枯渇適応反応による共生菌・病原菌の感染制御機構

研究課題名(英文)Control of root colonization of mutualistic and pathogenic fungi via plant phosphate starvation responses

研究代表者

晝間 敬(Hiruma, Kei)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：20714504

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):植物は栄養が枯渇した環境では微生物と共生関係を促進することにより栄養獲得能を高める。今回、植物のリン枯渇適応反応を制御する転写因子PHR1およびそのパラログPHL1が共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) の感染中に、抗菌物質も含むトリプトファン由来の二次代謝物の合成酵素や制御因子の遺伝子発現を正に制御することを発見した。さらには、PHR1/PHL1の制御下にいるトリプトファン由来の二次代謝物の合成酵素遺伝子であるCYP71A12およびCYP71A13がインドールグルコシノレート合成酵素遺伝子PEN2とともに、Ctの感染を制御することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は自身の栄養状況に応じて巧みに共生微生物の感染を制御していることが考えられ、その仕組みを知ることが共生微生物の有益な機能を活用していく上でも重要である。今回、植物がリン酸枯渇を制御する転写因子を介して共生微生物の感染を制御していることが判明したことに加えて、実際にPHR1/PHL1が制御する微生物感染を抑制する実態も発見した。これらの知見は、共生微生物を暴走させることなく制御し安全に適応していくために有益だと考えられる。

研究成果の概要(英文): Depending on nutrient availability, plants promote or repress beneficial interactions with microbes. However, little is known about mechanisms by which host plants regulate microbes in a manner dependent of nutrient availability. This study shows that MYB-type transcription factors PHR1 and its parlor PHL1, two major regulators of phosphate starvation responses (PSR), positively regulate the expression of *A. thaliana* genes related to biosynthesis of tryptophan-derived secondary metabolites during interactions with the root beneficial fungus *Colletotrichum tofieldiae* (Ct). Furthermore, this study identifies that one of the branch of tryptophan-derived secondary pathway regulated by PHR1/PHL1 is required for repression of Ct growth as well as Ct-mediated plant growth promotion under low phosphate conditions. Thus, this study points to a functional link between phosphate starvation responses and anti-fungal secondary metabolites during interactions with beneficial fungi.

研究分野: 植物微生物相互作用

キーワード: 共生菌 病原菌 リン枯渇適応反応 トリプトファン代謝 細胞タイプ *Colletotrichum*

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、微生物との共生関係を樹立することで、貧栄養環境など野外では認められるストレス環境への適応を果たしている。野外で生育するモデル植物シロイヌナズナから単離された内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (以下 *Ct*) は、シロイヌナズナを初めとするアブラナ科植物の根に感染し、リンが枯渇した環境下では自身の菌糸を介してリンを植物に供給し植物生長を促す共生菌であることが明らかになっている (Hiruma *et al.*, 2016)。

植物は微生物との共生を促進することに加えて、リンが枯渇した際に根の形態変化やリン酸トランスポーターの発現上昇を誘導するといった様々な適応反応を示すことが報告されている。興味深いことに、このリン枯渇応答の多くを制御することが報告されていた転写因子 PHR1 およびそのパラログである PHL1 が共生菌 *Ct* の宿主根における感染を正に制御していることが明らかになった (Hiruma *et al.*, 2016, 若手研究 (B) の成果)。このことは、本来植物単独でのリン枯渇への適応応答に関わると考えられてきた植物因子が共生微生物の感染制御にも関わっていることを示唆するものの、その感染制御基盤についてはこれまで明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、植物のリン枯渇応答が共生微生物との相互作用を制御する機構を理解する第一歩として、リン枯渇応答を制御する転写因子 PHR1/PHL1 が共生菌 *Ct* の感染を制御する基盤を明らかにすることを目的とした。また、本共生菌は病原菌とも近縁であることから、PHR1/PHL1 が病原菌の感染制御にも関与しているか検証した。

3. 研究の方法

PHR1/PHL1 が転写因子であることから、*Ct* 感染時における野生型 Col-0 および *phr1 phl1* 変異体間での複数時点でのトランスクリプトーム解析を RNAseq により行い、*phr1 phl1* 変異体で発現が有意に変動する植物遺伝子群のリスト化を行った。同様の試験を、*Ct* の近縁でシロイヌナズナに対して病原性を示す *C. incanum* を用いて行うことで、PHR1/PHL1 が病原菌の感染時に果たす役割も同時に検証した。次に、PHR1/PHL1 の制御下に存在する植物遺伝子の *Ct* 感染における役割について、逆遺伝学的手法を用いて調査した。さらには、PHR1/PHL1 が根の細胞タイプに依存した形で異なる機能 (植物単独でのリン枯渇応答・共生菌感染制御) を発揮している可能性を検証するため、細胞タイプ特異的に PHR1-GFP を発現する形質転換植物を *phr1 phl1* 変異体背景下で作出して、植物単独でのリン枯渇応答や共生菌感染制御が細胞タイプ特異的に PHR1-GFP を発現させることで回復するかどうかを調査した。

4. 研究成果

Ct 感染時における野生型 Col-0 および *phr1 phl1* 変異体間での比較トランスクリプトーム解析を行ったところ、*Ct* 感染時に誘導される植物遺伝子群の 7 割以上は PHR1/PHL1 によって制御されることが判明した。特に、*Ct* が共生効果を発揮する際に特異的に誘導されるリン酸トランスポーターの遺伝子群も PHR1/PHL1 によって制御されることが明らかになった。また、興味深いことに、微生物の構成生物に反応して誘導される植物免疫応答関連のものやアブラナ科植物が生成する抗菌活性も持つトリプトファン由来の二次代謝物の合成酵素や制御因子をコードする遺伝子群も PHR1/PHL1 の制御下に存在していることが判明した。以上から、PHR1/PHL1 は *Ct* との共生樹立に関する遺伝子群だけではなく、防御関連の応答を *Ct* 感染時に正に制御していることが考えられた。PHR1/PHL1 による防御関連遺伝子の制御は、*Ct* の近縁種である病原菌 *C. incanum* の感染時においても認められたため、PHR1/PHL1 は根の共生・病原微生物が感染した際の防御応答を正に制御し、おそらく、この防御応答の制御が欠落したことで *phr1 phl1* 変異体下で共生菌 *Ct* の感染量が増加したことが考えられた。これは、PHR1/PHL1 が根圏細菌叢との相互作用の際に活性化するサリチル酸依存性の免疫応答を負に制御していることとは対照的であり (Castrillo *et al.*, 2017)、今後、PHR1/PHL1 が微生物の種類に応じて免疫応答への働きかけを変える仕組みを理解していくことも興味深い研究テーマだと考えられる。

次に、PHR1/PHL1 によって特に顕著に制御されている防御関連遺伝子に着目した。CYP71A12 および重複した機能を持つと考えられる CYP71A13 は、トリプトファン由来の抗菌物質である Camalexin や他の抗菌二次代謝物の生成に関与する酵素をコードする遺伝子である。興味深いことに、CYP71A12 のタンパク蓄積量はリン栄養環境に応じて大きく変化して、特に *Ct* 感染時のリン欠乏環境下で顕著に蓄積する。*Ct* 感染時において、*phr1 phl1* 変異体下で両遺伝子の発現量が特に顕著に低下していたため、本遺伝子群が *Ct* 感染時における菌体制御や *Ct* による植物生長促進効果の制御に関与していることが示唆された。また、これまでに、トリプトファン由来のインドールグルコシノレート合成に関与する PEN2 が *Ct* による植物生長促進効果に必要であることを報告してい

る(Hiruma et al., 2016)。そこで、PEN2 および CYP71A12/CYP71A13 を同時に欠損した *pen2 cyp71a12 cyp71a13* 変異体を用いて、変異体下で *Ct* 感染や *Ct* による植物生長促進効果に変化が認められるかどうか調査した。その結果、野生型植物や *pen2* 変異体と比較して *pen2 cyp71a12 cyp71a13* 変異体においては、*Ct* による根および地上部の植物生長促進効果が認められなくなるだけでなく、植物生成長が阻害された(図1)。一方で、*pen2 cyp82C2 pad3* 変異体は、*pen2 cyp71a12 cyp71a13* 変異体ほど植物生長が阻害されなかったことから、CYP82C2 および PAD3 によって生成される 4OHICN と Camalexin 以外の未同定の二次代謝物経路も関与していることが考えられた。さらに、*Ct* が感染すると枯死するトリプトファン由来の二次代謝物の合成能が欠損した *cyp79B2 cyp79B3* 変異体と比べると *pen2 cyp71a12 cyp71a13* における表現型はマイルドであったため(図1, *pen2 cyp71a12 cyp71a13* と *cyp79b2 cyp79b3* の比較)、CYP79B2/CYP79B3 の下流で PEN2, CYP71A12/CYP71A13 によって作られる二次代謝物以外も *Ct* 共生に関与していることが考えられた。*Ct* 感染についても同様に確認したところ、感染後期(接種24日以降)に関しては、野生型植物や *pen2* 変異体と比較して *pen2 cyp71a12 cyp71a13* 変異体において、*Ct* 菌体量が有意に増加したことから、これら酵素から作られる二次代謝物は *Ct* 感染の制御に必要であることが示唆された。一方で、感染中期(接種20日前後)においては、野生型植物と *pen2 cyp71a12 cyp71a13* 変異体間での *Ct* 菌体量の差が認められないにも関わらず、*Ct* 共生時に誘導される遺伝子群の発現が有意に減少していた。以上から、CYP71A12/CYP71A13 は、*Ct* 菌体量を正に制御することに加えて、共生関連遺伝子群を正に制御する機能を有していることが考えられた。

以上から、PHR1 は植物単独のリン枯渇応答を制御するだけでなく、微生物感染などを制御するなど、複数の異なる機能を有していることが考えられた。機能性を確認した PHR1-GFP の局在性を調査したところ、全ての根の細胞タイプで発現していることを見いだした。そこで、PHR1 は細胞タイプに依存することなく同様の機能を発揮できるのか、もしくは、細胞タイプ特異的に異なる機能を発現しているのかを調査するため、*phr1 phl1* 変異体下で、根毛細胞列、非根毛細胞列、皮層細胞列、内皮細胞列特異的なプロモーター制御下で PHR1-GFP を発現する形質転換体を作出した。細胞タイプ特異的に PHR1-GFP が発現しているかどうか顕微鏡で確認後に、それぞれの形質転換体におけるリン欠乏応答(アントシアニン蓄積など)や *Ct* 応答を調査した。その結果、リン欠乏時におけるアントシアニン蓄積は内皮細胞で PHR1-GFP を特異的に発現する植物体では認められた一方で、他の細胞タイプで PHR1-GFP を発現する植物体では認められなかった。一方で、*Ct* による植物生長促進効果は、根毛細胞列特異的に PHR1-GFP を発現する植物体を除き、認められた。以上のことから、PHR1 は細胞タイプ依存的に一部異なる機能を有している一方で、様々な細胞タイプに局在する PHR1 が *Ct* 共生に関与していることが伺えた。

以上の成果をまとめると、リン枯渇応答を制御する転写因子 PHR1/PHL1 が抗菌活性を有する二次代謝物経路を正に制御することで、共生微生物の感染を制御していることが明らかになってきた。PHR1/PHL1 はアブラナ科植物だけではなく、単子葉植物も含む多様な植物で保存されていることから、PHR1/PHL1 が有する微生物制御機構はアブラナ科植物が分岐した以前から植物に保持されていた可能性が想定される。一方で、今回、PHR1/PHL1 が制御することが判明したトリプトファン由来の二次代謝物の多くはアブラナ科植物特異的であることから、他の植物においても、PHR1/PHL1 が微生物制御に関わっているのか、かつ、関わっているとすれば、こういった下流経路を制御することによってその微生物制御を成し遂げているのか理解する必要性もあろう。

さらに、*phr1 phl1* 変異体においても、全体的な遺伝子発現レベルは大きく低下するものの、*Ct* 感染時に特異的に誘導される共生遺伝子群の発現誘導自体は依然維持されていることから、共生菌感染時に共生遺伝子を活性化させるために関与する制御因子は他にも存在していることが示唆される。今後は、共生菌感染時特異的な遺伝子発現応答を制御する因子の同定・解析も必要であろう。

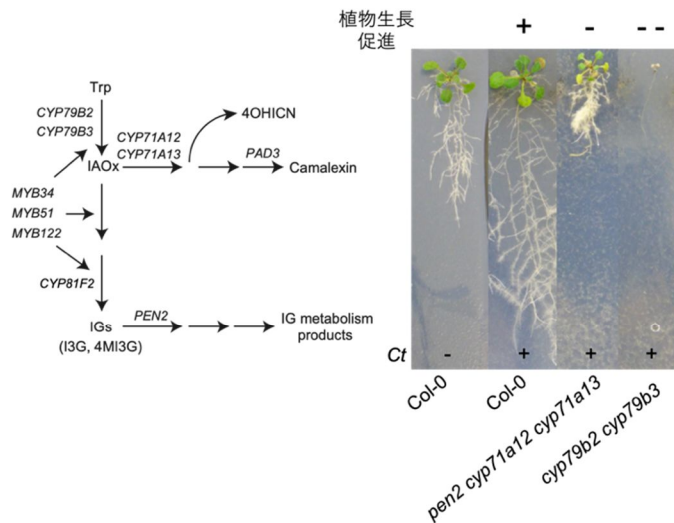


図1. *pen2 cyp71a12 cyp71a13*変異体において、*Ct*による植物生長促進効果は見られない。左 トリプトファン由来の二次代謝物合成経路。右 野生型植物(Col-0)、*pen2 cyp71a12 cyp71a13*変異体、*cyp79b2 cyp79b3*変異体に*Ct*を接種した。

<引用文献>

Hiruma K et al.: **Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent.** *Cell* 2016, **165**:464-474.

Castrillo G. et al. **Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity.** *Nature* 2017 543, 513+, doi:10.1038/nature21417.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiruma Kei	4. 巻 7
2. 論文標題 Roles of Plant-Derived Secondary Metabolites during Interactions with Pathogenic and Beneficial Microbes under Conditions of Environmental Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 362 ~ 362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7090362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kuldanai Pathompitakukul, Kei Hiruma, Hiroyuki Tanaka, Nanami Kawamura, Atsushi Toyoda, Takehiko Itoh, Yusuke Saijo	4. 巻 -
2. 論文標題 Host-dependent fungus-fungus competition suppresses fungal pathogenesis in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1101/2020.05.27.117978	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 晝間敬 西條雄介
2. 発表標題 シロイヌナズナのリン枯渇適応反応を制御する転写因子PHR1による共生糸状菌の制御機構
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 晝間敬
2. 発表標題 内生糸状菌との相互作用を介したアブラナ科植物のリン栄養獲得戦略
3. 学会等名 日本植物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Hiruma
2. 発表標題 The beneficial associations between a root-associated fungal endophyte and Brassicaceae vegetables in field
3. 学会等名 The 30th International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tae-Hong Lee, Midori Tanaka, Taishi Hirase, Shigetaka Yasuda, Kei Hiruma, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Sensitization of PEPR damage signaling confers pathogen resistance under phosphate deficiency in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>植物の共生糸状菌による植物生長促進およびその活用 https://www.kri.or.jp/news-event/img/20190129_report_03.pdf</p>
--

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