

令和元年9月2日現在

機関番号：11201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06503

研究課題名(和文) マメ科植物のEPR3受容体は、病原菌の細胞外分泌多糖も認識するのか？

研究課題名(英文) Does the legume LysM receptor recognize exopolysaccharide from pathogenic bacteria?

研究代表者

川原田 泰之 (KAWAHARADA, Yasuyuki)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：80786129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定は、宿主植物と根粒菌との複雑な相互作用によって成り立っている。この過程でマメ科植物のEPR3受容体は、根粒菌の細胞外分泌多糖や部分長の細胞外分泌多糖を受容・認識して共生過程を正と負の双方に制御している。本研究では、マメ科植物のEPR3受容体が根粒菌の細胞外分泌多糖と同様に、病原菌の細胞外分泌多糖も認識し、免疫過程をも制御するのかを調査した。その結果、EPR3受容体は、根粒菌の細胞外分泌多糖のみを認識し、病原菌の細胞外分泌多糖は認識しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マメ科植物のEPR3受容体は、根粒菌が分泌する細胞外多糖を認識し、根粒共生相互作用を制御していることが知られていたが、本研究からこのEPR3受容体は、病原菌が分泌する細胞外分泌多糖は認識しないことが示唆された。これらのことから、EPR3受容体は、共生相互作用のみに機能することが予想された。今後は根粒共生相互作用時におけるEPR3受容体の詳細な機能解明を行う必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The symbiotic nitrogen fixation is established by complex interactions between legume plants and Rhizobium. The EPR3 receptor of legume plant regulates the symbiotic process by recognizing exopolysaccharide from Rhizobium. In this study, we investigated whether the EPR3 receptor in the legume recognizes exopolysaccharide produced by plant pathogen as well as rhizobial one, and controls the immune process. As a result, we suggested that the EPR3 receptor does not recognize exopolysaccharide of pathogenic bacteria.

研究分野：植物-微生物相互作用

キーワード：植物 共生 根粒 根粒菌 病原性

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

1. 研究開始当初の背景

根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定は、宿主植物と根粒菌との複雑な相互作用によって成り立っている。これまで根粒菌が分泌する細胞外分泌多糖がこの共生相互作用を促進し、部分長の細胞外分泌多糖は共生相互作用を抑制することが示されたことから、これらの細胞外分泌多糖は、共生相互作用の重要なシグナル因子として機能していることが示されていた。一方宿主であるマメ科植物は、これらの細胞外分泌多糖をEPR3 受容体で受容・認識し、共生過程を正と負の双方に制御していることが明らかとなっていた。

自然界の土壌、特に植物の根の周辺に広がる根圏では、共生菌、病原菌、内生菌や寄生菌など多種多様な微生物が生存し、宿主植物は、これらの細菌と様々な相互作用を行なっている。このような環境下でマメ科植物は、共生相互作用を行うために根粒菌を受入れる一方、植物に対して不都合となる病原菌を排除しなければならない。しかしながら、マメ科植物がこれらの微生物を認識して選別するメカニズム、そして、共生過程における防御メカニズムについては一切明らかになっていない。

この疑問を明らかにするため、宿主植物のEPR3 受容体が根粒菌の細胞外分泌多糖と同様に、病原菌の細胞外分泌多糖も認識し、共生過程、及び免疫過程の双方を制御することで、病原菌を排除していると仮説立てることで本研究を計画した。

2. 研究の目的

マメ科植物のEPR3 受容体は、根粒菌の細胞外分泌多糖や部分長の細胞外分泌多糖を受容・認識し共生相互作用を正と負の双方に制御することがこれまでの研究から明らかとなっている。

そこで本研究では、EPR3受容体が同様に病原菌の細胞外分泌多糖も認識し免疫過程をも制御することで、共生性相互作用と病原性相互作用の両相互作用を制御しているのかを調査する。

3. 研究の方法

(1) *Ralstonia* sp. B5-1 株の細胞外分泌多糖欠損変異株の取得を行う。Tn5 トランスポゾンを用いたランダム変異導入法により、細胞外分泌多糖の合成、または分泌能が欠損した変異株のスクリーニングを実施する。スクリーニングに用いる培地には、*Ralstonia* sp. B5-1 株の細胞外分泌多糖の分泌が容易に観察可能な CPG (Casamino acid-Peptone-Glucose)培地や TY (Tryptophan Yeast) 培地を用いる。また、得られた候補変異株について、細胞外分泌多糖と結合することで発色するカルコフローやコンゴレッド試薬上で形態観察を行う。これらの観察から最終的に *Ralstonia* sp. B5-1 株の細胞外分泌多糖欠損変異株を分離する。

(2) 細胞外分泌多糖欠損変異株の病原性能や、ミヤコグサ *epr3* 変異体と *Ralstonia* sp. B5-1 株の病長観察を行う。(1) で分離した細胞外分泌多糖欠損変異株について、宿主植物であるミヤコグサとの相互作用解析を行う。また、ミヤコグサ *epr3* 変異体と *Ralstonia* sp. B5-1 株との間の病長有無の観察も同時に行う。表現型の観察方法は、当研究室によって確立した表現型アッセイ系を用いて行なう。

(3) 細胞外分泌多糖欠損変異株と根粒菌との混合接種試験による複合的相互作用の観察を行う。

ミヤコグサに対して、根粒菌と*Ralstonia* sp. B5-1 株または、細胞外分泌多糖欠損変異株との混合接種試験における根粒形成能力の観察を行う。

4 . 研究成果

(1)テトラサイクリン薬剤耐性が付与されたプラスポゾン(Jonathan and Gerber . : Applied and Environmental Microbiology 2710- (1998)) を三親接合法により*Ralstonia* sp. B5-1株にランダムに挿入した。そして、この得られた変異株集団から細胞外分泌多糖能が欠損した変異株のスクリーニングを実施した。およそ1,000株のプラスポゾンがランダムに導入された変異株について、細胞外分泌多糖能力の有無を個別にスクリーニングし、4株の細胞外分泌多糖欠損変異株(E-1からE-4変異株)を分離した。これらの4株は、CPG培地やTY培地上で野生株と比較して、細胞外分泌多糖が分泌されていないことが確認された。次に、これらの4株について、コンゴレットやカルコフロー試薬上での発色有無を確認した。その結果、2株(E-3変異株、およびE-4変異株)は、細胞外分泌多糖と結合するコンゴレット試薬上で発色が確認されたことから、野生株とは異なる細胞外分泌多糖を分泌している、または変異株の細胞表面に変異が生じていることが予想された。一方で、他の2株(E-1変異株、およびE-2変異株)は、発色が確認されなかった。また、カルコフロー試薬上では、これらの4株の変異株についての違いは観察されなかった。このようなことから、それぞれ異なる形状の細胞外分泌多糖欠損変異株を4株分離することができた。

(2)分離した4株の細胞外分泌多糖欠損変異株と宿主植物であるミヤコグサとの病原性相互作用の観察を実施した。その結果、3株の細胞外分泌多糖欠損変異株(E-1、E-2、E-3変異株)は、野生株と比較して顕著にミヤコグサに対する病原性能が低下していることが示された。一方、1株(E-4変異株)については、野生株と同程度の病原性能を保有していることが示された。このように、細胞外分泌多糖の有無に関わらず、病原性の程度が菌株ごとに異なることが観察された。

次に、ミヤコグサ*epr3*変異体の*Ralstonia* sp. B5-1 株に対する病長表現型を観察するため、*epr3-11*や*epr3-13*変異体と*Ralstonia* sp. B5-1 株との表現型観察を行った。その結果、ミヤコグサ野生体と*epr3*変異体との間で病長の違いは観察されなかった。

これらの結果から、ミヤコグサと*Ralstonia* sp. B5-1 株との相互作用に*Ralstonia* sp. B5-1 株の細胞外分泌多糖の有無が病原性能の直接起因しているという結論には至らなかった。また同時に宿主植物のEPR3受容体は、*Ralstonia* sp. B5-1 株の細胞外分泌多糖を認識しないことや、病原性シグナルを制御しないことが示唆された。

(3)細胞外分泌多糖欠損変異株と根粒菌との複合的相互作用の観察を行うため、細胞外分泌多糖欠損変異株と根粒菌との混合接種試験を実施した。複合的相互作用の観察から、*Ralstonia* sp. B5-1 株や細胞外分泌多糖欠損変異株のE-4 変異株は根粒形成を強く抑制するのに対し、他の細胞外分泌多糖変異株(E-1、E-2、E-3 変異株)は、根粒形成の抑制が見られなかった。(2)の結果と、これらの複合的相互作用の結果を総合すると、細胞外分泌多糖に関わらず、*Ralstonia* sp. B5-1 株の病原性能自体が根粒形成を抑制していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

ハフィジュール ルーマン、川原田泰之、陸上植物の LysM 型受容体キナーゼの進化解析. 第 60 回日本植物生理学会. 2019 年 3 月 13-15 日 (名古屋)

川原田泰之、マメ科植物と根粒菌の宿主特異性を決定する要因の探索. 第 28 回植物微生物研究会. 2018 年 9 月 19-21 日 (鳥取)

川原田泰之、根粒菌の変異株によって誘導される根粒形成抑制表現型に関わる遺伝学的制御. 第 59 回日本植物生理学会年会. 2018 年 3 月 28-30 日 (札幌)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

〔その他〕

特になし