

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02467

研究課題名(和文) 栄養環境情報と微生物情報の統合に基づく植物免疫応答の制御

研究課題名(英文) Integration of nutrient and microbial cues in the regulation of plant immunity

研究代表者

西條 雄介 (Saijo, Yusuke)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：50587764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物が貧栄養環境で共生菌を許容しながら病原菌を防除する上で細胞ダメージ誘導性のPepペプチド・受容体が果たす重要性、及び低リン条件下でPep応答を増強する仕組みやPepペプチドが根毛形成も誘導する仕組みを明らかにした。さらに、真菌侵入抵抗性に資するカロース合成酵素が低リン条件下において根にカロースを誘導しリン獲得を促進すること、並びにリン枯渇環境応答(PSR)制御因子が栄養十分条件下においても土壌由来の微生物の共生感染制御に重要であることを発見した。以上の結果から、微生物情報と栄養環境情報に基づき、植物が貧栄養環境への適応を進める仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と微生物の関係性は環境条件に応じて大きく変わるものの、背景にある分子機構の解明は遅れている。共生菌に依存する低リン条件下における免疫制御機構の解明を進めた本研究は、栄養環境情報にもとづき植物が免疫・共生制御を行う仕組みの解明に先鞭をつけ、国内外で求められている植物・微生物・環境の三者相互作用研究に重要な貢献を果たした。同時に、野外環境で実効性の高い病害抵抗性作物や共生菌制御技術を開発する上で有意義な情報を提供した。本成果は、植物の環境適応機構を活用して、環境変動に耐える頑強な作物の作出や効率的な共生菌・土壌栄養利用を可能にし、持続可能な食料生産システムの構築に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：This project aims at a better understanding of the mechanisms by which plants integrate microbial and nutritional cues to finetune their immune responses to pathogenic and mutualistic microbes. We show that defense activation through damage-inducible Pep peptides is sensitized under phosphate deficiency, thereby conferring pathogen resistance while accommodating mutualistic microbes for nutrition. Our investigation into the molecular links between immune and phosphate starvation response (PSR) pathways reveals a key role played by PMR4 callose synthase in root callose deposition and phosphate acquisition during PSR. Moreover, genetic studies on PSR pathways via PHR1/PHL1 transcription factors and LPR1/LPR2 ferroxidases further show their critical role in the control of root-associated microbiomes even under nutrient sufficiency. These findings give novel mechanistic insight into the emerging linkage between plant immunity and nutrition deficiency responses.

研究分野：植物分子遺伝学、植物免疫学

キーワード：植物微生物相互作用 植物免疫 共生 環境応答 土壌栄養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は多様な共生微生物の集団を体内に宿して環境適応に役立てながら病原菌の感染・増殖を抑えて自身の健康を保っている。しかしながら、植物が必要に応じて共生菌を許容する一方で病原菌に対して免疫を維持する分子メカニズムはよくわかっていない。申請者は、本研究に先立ち、細胞ダメージの認識が病原菌と非病原菌を識別する鍵として重要であるとの仮説を検証する過程で、細胞ダメージ誘導性の **Pep** ペプチドと受容体 **PEPR** (膜局在性ロイシンリッチリピート受容体キナーゼ (**LRR-RK**)) が病原菌抵抗性に果たす役割やその仕組みの一端を明らかにしていた。また、シロイヌナズナの根に感染し、低リン条件でリン吸収及び植物成長を促進する *Colletotrichum tofieldiae* (**Ct**) と **Ct** に非常に近縁な病原菌 *C. incanum* (**Ci**) をモデルとして、植物が共生菌と病原菌を識別するメカニズムについて解明を進める準備を整えていた。これらをベースとし、シロイヌナズナにおける植物免疫や貧栄養応答に関する最先端の知見を活用・統合することで、シロイヌナズナが根粒共生・菌根共生の宿主ではないために従来の微生物共生研究には乏しかった、免疫応答と貧栄養応答の統合という観点から進歩性の高い成果が得られると期待された。

2. 研究の目的

植物が貧栄養条件特異的に共生関係を成立させる **Ct** 共生菌と近縁な **Ci** 病原菌を活用して、下記の3項目を実施することで、植物が栄養環境情報と微生物情報にもとづいて共生菌を許容しながら病原菌に対しては免疫応答を誘導する分子メカニズムの解明、並びに貧栄養シグナルが免疫応答の調節に働く分子メカニズムの解明を目指した。

- (1) *Colletotrichum* 属真菌の微生物分子パターン (**MAMPs**) 及び受容体の同定
- (2) リン枯渇応答 (**PSR**) 経路と植物免疫シグナル経路との分子リンクの解明
- (3) シロイヌナズナの **PSR** 及び **Ct** 共生に関する種内自然変異の解析

3. 研究の方法

- (1) *Colletotrichum* 属真菌の微生物パターン (**MAMPs**) 及び受容体の解析

Ct 共生菌・**Ci** 病原菌ともに、感染過程で **PEPR** などの免疫受容体の共受容体 **BAK1** を除去して感染を進めることを見出したため、**BAK1** 依存的な **MAMP** 受容体が感染の障壁として働いていることが予想された。そこで、野生型植物と *bak1* 変異体に対して、**Ct** 胞子のタンパク質成分を部分精製して投与し、**ROS** バーストや **MAPK** 活性化など免疫応答を **BAK1** 依存的に誘導するエリシター活性成分 (**MAMPs**) の同定を目指した。同時に、シロイヌナズナのアクセッションを活用して **Ct-MAMP** 応答性に関する種内変異を記述し、**GWAS** により **Ct-MAMP** 応答に重要な植物遺伝子の同定を目指した。

- (2) リン枯渇応答 (**PSR**) と植物免疫との分子リンクの解明

リン欠乏時に、植物は主根の伸長停止や側根・根毛の形成、リン輸送タンパク質の発現増などリン吸収を高める適応応答 (**PSR, Phosphate Starvation Response**) を行う。リン欠乏時に **Pep** 応答が増強されるとの予備データを受け、転写因子 **PHR1**・**PHL1** や分泌性フェロキシダーゼ **LPR1**・**LPR2** を介した **PSR** 経路と **PEPR** 経路との関係性及び分子リンクについて解明を進めた。シロイヌナズナのアクセッションを利用した自然種内変異の記述や **EMS** 変異体のスクリーニング、さらには既知の重要遺伝子間での多重変異体を新たに作出するなど遺伝学的解析を展開するとともに、重要因子については **mRNA**・タンパク質発現解析等も併せて行った。また、免疫強化に働く **PEPR** やカロース合成構成 **PMR4** が **PSR** に果たす役割についても、それらの変異体の表現型解析やトランスクリプトーム解析、メタ共生菌叢解析を併せて行うことで解明を進めた。

(3) シロイヌナズナの野生種間における **PSR** 及び **Ct** 共生に関する種内自然変異の解析

シロイヌナズナのアクセッションを用いて、低リン条件における生育やカロース合成、**Pep** による根の伸長阻害と根毛形成、並びに共生菌 **Ct** 接種による植物の成長促進効果を調べた。

4. 研究成果

(1) *Colletotrichum* 属真菌の微生物パターン (**MAMPs**) の解析

野生型植物と *bak1* 変異体に対して、**Ct** 胞子のタンパク質成分を部分精製して植物に投与し、**BAK1** 依存的に免疫応答を誘導するエリシター (**MAMPs**) が **Ct** に存在することを確かめた。しかしながら、**Ct** 胞子成分が有するエリシター活性が弱く、安定して検出することが困難であった。**Ct-MAMP** 応答に寄与する遺伝子の同定を **GWAS** により目指すには、解析条件の至適化にかかる多大なエフォートや成果の不確実性が懸念される状況となった。一方、下記の項目(2)は進展が著しく、以降、本項目は中断して項目(2)に集中することにした。

(2) リン枯渇応答 (**PSR**) と植物免疫との分子リンクの解明

① 低リン条件において有効な病原菌抵抗性メカニズムの解明

シロイヌナズナの免疫・**PSR** 制御遺伝子の変異体の解析等を通じて、低リン条件では **Pep** 応答 (**PEPR** シグナル系) が増強されること(図1) またそれが **PEPR** 複合体の構成キナーゼ **BAK1** や **BIK1** に依存すること、並びに **PEPR** シグナル系が低リン条件における病原菌抵抗性に寄与することを突き止めた。本成果は、植物免疫で長年謎であった、共生菌の許容

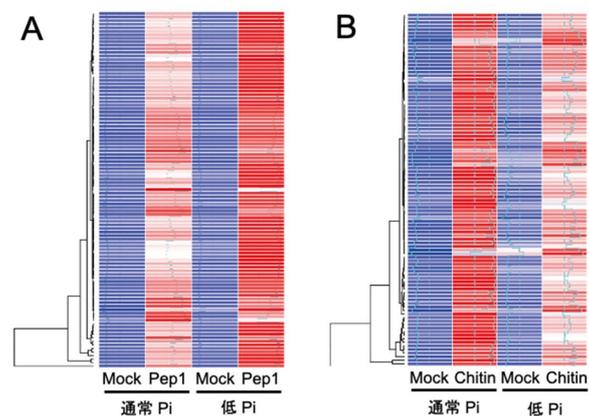


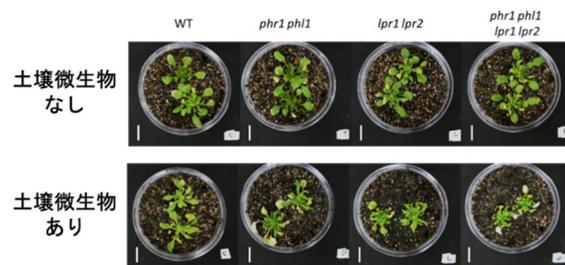
図1 低リン条件におけるPep応答の増強。幼植物を通常リン(Pi)濃度(625 μM)及び低リン濃度(10 μM)で生育させ、Pep1(A)もしくは真菌MAMPキチン(B)の投与後10時間におけるRNAシーケンス解析。Pep1による防御関連遺伝子の誘導(赤)は低リン条件で増大している。

と病原菌の防除を両立させる仕組みに迫る上で有効な糸口として極めて意義が高い。

②PSR 経路の遺伝学的フレームワーク及び新規機能の解明

LPR1/LPR2 経路及び **PHR1/PHL1** 経路の多重欠損変異体 *phr1 phl1 lpr1 lpr2* は、栄養十分条件においても著しい生育不良を示すこと、またそれが滅菌条件では見られず、微生物の存在に依存することを見出した(図2)。この結果は、**PSR** 制御における役割のみが知られていた **PHR1** 経路及び **LPR1** 経路が、栄養獲得における役割に加えて微生物の感染制御に働くことを示唆する。

さらに、低リン条件での免疫制御に重要な **PEPR** との間でも多重欠損変異体を作成して、表現型解析、トランスクリプトーム解析やメタ共生菌叢解析を行い、両 **PSR** 経路に加えて **PEPR** 経路に依存する **PSR** 応答性遺伝子群や共生菌の存在を明らかにした。本発見は、**PSR** 経路(**PHR1** 経路及び **LPR1** 経路)と **PEPR** 経路が緊密に連携しながらリン欠乏・十分条件において植物の生育・免疫・共生制御に働くことを示唆するもので、**PSR** に関するパラダイムシフトを迫る発見となっている。今後、分子メカニズムに関する更なる解明が待たれる。



根の共生微生物叢のメタ16S解析

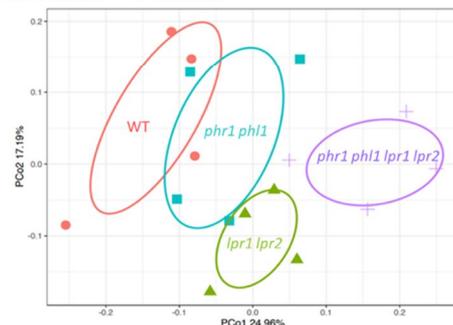


図2 栄養十分土壌におけるPSR経路による共生制御。幼植物を滅菌土壌(土壌微生物を含む懸濁液なし・あり)に移植し、3週間生育させた様子(上)。メタ16S解析による根の共生菌叢のプロファイル(下)。PSR変異体(特に*phr1 phl1 lpr1 lpr2*)では、生育不良に相関して共生菌叢の菌種組成が大きく異なる様子がわかる。

③Pep ペプチドによる根毛形成機構と生理意義の解明

Pep 投与が根毛形成を誘導する現象を見出し、同応答を成立させる因子の同定を進めた。

既知の **PEPR2** シグナルの制御因子や根毛形成因子の変異体で根毛形成が起こらなくなることから、**PEPR2** 複合体またはその近傍で、既知の免疫制御因子が働いて根毛形成を誘導していることを明らかにした。加えて、*pepr1 pepr2* 変異体背景で **PEPR2** 発現を根の異なる細胞タイプに限定することで受容体の機能部位を調べたところ、様々な細胞タイプに導入した場合もほぼ同様に **PEPR2** が免疫応答や根毛形成を誘導することを確認した。また、**Pep** による免疫活性化は往々にして主根の伸長阻害を伴うが、シロイヌナズナの種内

自然変異の解析や根毛形成細胞特異的な **PEPR2** 導入実験により、主根の伸長阻害と免疫活性化を分離できることを示した。後者は、**Pep** による根毛形成が、根の成長と免疫の保持に寄与することを示唆する。これらの成果を論文に報告した (Okada et al., 2020 New Phytologist)。根の免疫制御機構の解明、並びに植物成長調和型の植物免疫強化技術の開発に向けて有意義な知見を提供した。

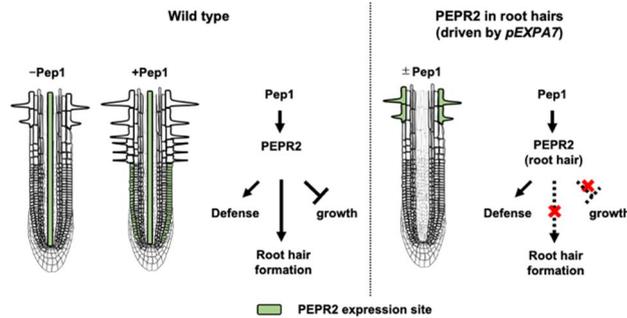


図3 PEPR2を介したPepペプチドによる根毛形成制御モデル。Pepによる免疫応答と根毛形成の誘導、及び根の伸長抑制は分離が可能である(左、野生型)。PEPR2の発現を根毛形成細胞に限定させると根の伸長抑制なしに免疫応答を誘導できる(右)。(Okada et al, 2021 New Phytologistから転載)

④PSRにおける根のカロース誘導機構と生理意義の解明

PSR に伴い、根毛でカロース沈着が誘導されることを見出したため、**EMS** 変異体スクリーニングにより重要遺伝子の同定を進めた。得られた変異体の原因遺伝子を同定し、免疫応答(特に病原真菌の侵入抵抗性)で重要なカロース合成酵素遺伝子 **PMR4** であることを突き止めた。さらに、カロース蓄積が地上部へのリン吸収を促進するとともに共生菌 **Ct** の感染を制限することを示唆する知見を得た。なお、根毛形成不全変異体 **rhd6** でも同様に地上部へのリン蓄積が低下することから、根毛におけるカロース沈着が重要であると考えられ、現在、本モデルについてさらなる検証を進めている(図4)。また、上記の **phr1 phl1 lpr1 lpr2** 変異体でも低リン条件におけるカロース沈着は正常に起こることから、**PMR4** を介したカロース誘導はそれら **PSR** 制御因子を必要としないことが示唆された。本成果は、植物の免疫経路と **PSR** 経路が密接な関係にあることをさらに強める発見となった。

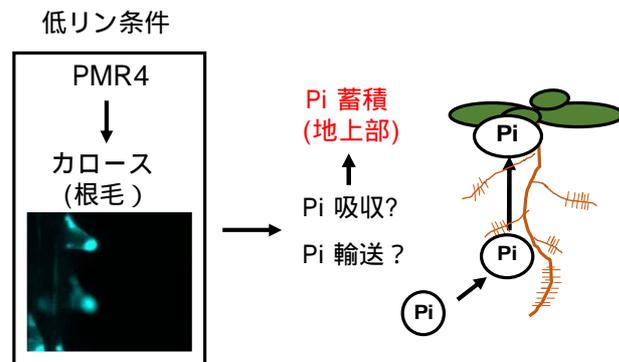


図4 低リン条件におけるカロース合成酵素PMR4を介したカロース蓄積。pmr4や根毛形成不全rhd6変異体では地上部におけるリン蓄積量が低下することから、根毛におけるカロース蓄積がリンの吸収や輸送を促す可能性が示唆される。現在、根・根毛にPMR4発現を限定した場合の影響を調べてその可能性を検証している。

(3) シロイヌナズナの野生種間におけるPSR及びCt共生に関する種内自然変異の解析

いずれも種内自然変異の存在を明らかにした。**Pep** による根の伸長阻害と根毛形成が分離可能であることに加えて、低リン条件において共生菌 **Ct** の植物成長促進効果と植物自身(共生菌なし)の成長保持機能との間に負の相関があることが示された。しかしながら、いずれのケースも特定の強い **GWAS** ピークが検出されず、種内変異の原因遺伝子の同定には至らなかった。項目3も中断して、その分のエフォートを上記の項目(2)に集約させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li X, Sanagi M, Lu Y, Nomura Y, Stolze SC, Yasuda S, Saijo Y, Schulze WX, Feil R, Stitt M, Lunn JE, Nakagami H, Sato T, Yamaguchi J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Protein Phosphorylation Dynamics Under Carbon/Nitrogen-Nutrient Stress and Identification of a Cell Death-Related Receptor-Like Kinase in Arabidopsis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00377	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 該当する
1. 著者名 Yoshiyama KO, Aoshima N, Takahashi N, Sakamoto T, Hiruma K, Saijo Y, Hidema J, Umeda M, Kimura S.	4. 巻 103
2. 論文標題 SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 acts as a regulator coordinating crosstalk between DNA damage response and immune response in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Mol Biol	6. 最初と最後の頁 321-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-020-00994-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saijo Y, Loo EP.	4. 巻 225
2. 論文標題 Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 87-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15989.	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 Shinya Tomonori, Yasuda Shigetaka, Hyodo Kiwamu, Tani Rena, Hojo Yuko, Fujiwara Yuka, Hiruma Kei, Ishizaki Takuma, Fujita Yasunari, Saijo Yusuke, Galis Ivan	4. 巻 94
2. 論文標題 Integration of danger peptide signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 626 ~ 637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.13883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogita Nobuo, Okushima Yoko, Tokizawa Mutsutomo, Yamamoto Yoshiharu Y., Tanaka Maho, Seki Motoaki, Makita Yuko, Matsui Minami, Okamoto-Yoshiyama Kaoru, Sakamoto Tomoaki, Kurata Tetsuya, Hiruma Kei, Saijo Yusuke, Takahashi Naoki, Umeda Masaaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 439 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saijo Yusuke, Loo Eliza Po-ian, Yasuda Shigetaka	4. 巻 93
2. 論文標題 Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 592 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13808	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 Okada Kentaro, Kubota Yuki, Hirase Taishi, Otani Koichi, Goh Tatsuaki, Hiruma Kei, Saijo Yusuke	4. 巻 229
2. 論文標題 Uncoupling root hair formation and defence activation from growth inhibition in response to damage associated Pep peptides in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2844 ~ 2858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yusuke Saijo
2. 発表標題 Pattern recognition receptors mediate direct apoplastic resistance against bacterial water acquisition in plants
3. 学会等名 The 30th International Conference on Arabidopsis Research, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Saijo
2. 発表標題 Pattern recognition receptors confer direct apoplastic resistance against bacterial water acquisition in plants.
3. 学会等名 International Symposium on Plant Receptor Kinases and Cell Signaling 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tae-Hong Lee, Takuma Inoue, Midori Tanaka, Taishi Hirase, Shigetaka Yasuda, Kei Hiruma and Yusuke Saijo
2. 発表標題 Phosphate status-dependent control of associations with beneficial and pathogenic fungi in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee T, Loo EP, Tanaka M, Tajima Y, Hirase T, Yamada K, Yasuda S, Hiruma K and Saijo Y.
2. 発表標題 Pattern recognition receptors in fluctuating environments
3. 学会等名 International Plant Molecular Biology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西條雄介
2. 発表標題 微生物の認識と制御を介した植物の環境適応
3. 学会等名 第53回感染生理談話会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西條雄介
2. 発表標題 リン栄養環境情報に基づく植物免疫の制御
3. 学会等名 第4回植物栄養研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西條雄介
2. 発表標題 微生物情報と環境情報の統合に基づく植物免疫の制御と環境適応
3. 学会等名 第28回植物微生物研究会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西條雄介
2. 発表標題 植物のパターン認識受容体を介した微生物の認識・制御と環境適応
3. 学会等名 日本育種学会平成30年度秋季大会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Saijo
2. 発表標題 Integration of microbial and environmental cues in plant immunity
3. 学会等名 ICPS (EIG-CENCERT) symposium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Saijo
2. 発表標題 Pattern-triggered immunity under water stress conditions
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kentaro Okada, Koei Yachi, Nhi Nguyen tan Anh, Tae-Hong Lee, Satomi Kanno, Kei Hiruma, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Callose synthase-mediated adaptation to phosphate starvation in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Chigusa, Ayato Hirano, Kentaro Okada, Yuniar Devi Utami, Kei Hiruma, Miki Fujita and Yusuke Saijo
2. 発表標題 Microbiome regulation by phosphorus starvation response regulators in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	University of Montpellier	INRA	CNRS	他3機関
ドイツ	MPIPZ			
フランス	CEA/CNRS			