

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07114

研究課題名(和文)陸上植物-菌根菌共生の進化の原点を探る：モデル植物フタバネゼニゴケの基盤整備

研究課題名(英文)Tracing the evolutionary process of plant-microbe interaction

研究代表者

中川 知己 (Nakagawa, Tomomi)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：90396812

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)：陸上植物の大部分は、アーバスキュラー菌根菌(AM菌)と共生することでリン酸などの無機養分を効率的に獲得している。AM菌共生のメカニズムは主に被子植物で研究されているが、遺伝子の冗長性が大きいために解析が難航している。そこで我々は、遺伝子の冗長性が少ないと期待されるフタバネゼニゴケを共生の新たなモデルとして整備している。本研究では効率的な遺伝子導入系の確立を目指した。我々はアグロバクテリウムの感染条件を検討して効率的な遺伝子導入系を確立できた。実際にこの方法を用いて共同研究者らは、CRISPRによる遺伝子破壊にも成功している。

研究成果の概要(英文)：Most land plants establish symbiosis with arbuscular mycorrhizal(AM) fungi. Studies for uncovering the molecular mechanisms of AM symbiosis in angiosperm are facing difficulties resulting from gene redundancy. To circumvent this problem, we are recently focusing on a basal plant, *Marchantia paleacea* subsp. *diptera*. In this project, we tried to establish an efficient transformation method. We changed some cultivation condition of both *M. paleacea* and *Agrobacterium tumefaciens* and successfully improved the transformation efficiency. Our results will contribute the better understanding of the molecular mechanism of AM symbiosis.

研究分野：plant-microbe interaction

キーワード：symbiosis arbuscular *Marchantia paleacea* evolution

1. 研究開始当初の背景

植物は微生物と共生することで革新的な能力を獲得することが知られている。マメ科の植物は土壌細菌である根粒菌と共生することで、窒素栄養をほとんど含まない土壌でも旺盛に生育できる。また糸状菌である菌根菌は、大部分の陸上植物と共生して土壌中のリン酸などの養分吸収を促進させる。他にも耐病性を向上させる微生物なども知られているが、多くは宿主植物が限定されている。**植物が微生物を受け入れる基礎的な仕組みを解明できれば、重要作物に有用微生物を共生させる効率的な農業への手がかりになると期待される。**

マメ科植物に限定されている根粒菌共生は、菌根菌共生のメカニズムを土台にして成立したことが示唆されている。菌根菌共生は最初の陸上植物であるコケ植物で成立したとされており、現在でも陸上植物の80%が共生する“古い”共生である。したがって菌根菌共生の仕組みを解明することで、植物が根粒菌や菌根菌を含めた多くの微生物を受け入れるための基礎的なメカニズムの理解につながると考えられる。菌根菌共生のメカニズムは主にマメ科植物やイネを用いて解析されており、複数の共生遺伝子が同定されているが、複雑な共生メカニズムの一部しか説明できない。さらなる共生遺伝子の同定が望まれるが、新規遺伝子の同定は難航しているのが現状である。その一因として、菌根菌共生はコケ植物で成立してから4億年以上進化を重ねており(図1)、多くの共生遺伝子が多重化してメカニズムが複雑化している可能性が挙げられる。

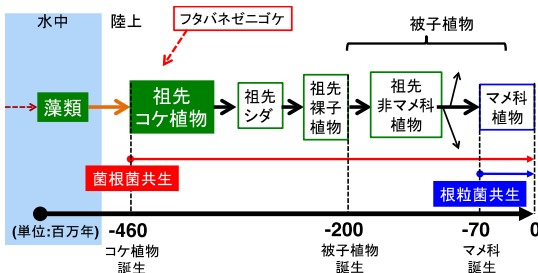


図1 菌根菌共生はコケ植物で成立した後、陸上植物の進化に伴って複雑化したと考えられる。

コケ植物は陸上植物の中で最も原始的な形質を反映する分類群であると考えられている。近年、モデルコケ植物であるヒメツリガネゴケやゼニゴケを用いた解析から、**コケ植物は被子植物と類似しながらも非常に冗長性の少ない単純なメカニズムを保持している**ことが明らかとなっている。これらの研究は主に形態形成や植物ホルモンの応答、概日リズムに関するものであるが、菌根菌共生メカニズムも被子植物と比較して単純であると期待できる。しかしヒメツリガネゴケやゼニゴケはコケ植物の中でも例外的に菌根菌共生を行わない種であ

るために、このような目的の研究には適さない。本研究では、**菌根菌共生を行うフタバネゼニゴケ**をモデルとして整備することで、コケ植物における共生メカニズムを解析する基盤を作る。

2. 研究の目的

植物と菌根菌の共生メカニズムは最初の陸上植物であるコケ植物で成立して、複雑な進化を遂げながら現代に至っていると考えられる。イネやマメ科植物などの被子植物における共生遺伝子の同定は難航しているが、本研究は遺伝子の冗長性(同じ機能の遺伝子の重複度合い)が低いコケ植物フタバネゼニゴケをモデルとして、効率の良い遺伝子導入系や標的遺伝子破壊系を確立することを目的とする。我々はすでにフタバネゼニゴケにおけるRNA-seqやGenome-seqを進めており、効率の良い遺伝子導入系の確立が最後の課題となっている。これを解決することで、新規共生遺伝子の同定が進むだけでなく、陸上植物の進化の歴史で共生がどのように獲得されて発展したのかを推測する重要な知見が得られる。本研究では、フタバネゼニゴケにおける効率的な遺伝子導入系と標的遺伝子破壊系(ジーンターゲットイング)を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

ゼニゴケ属は孢子または無性芽を經由して増殖することができる。モデル植物のゼニゴケでは、孢子を用いて非常に効率の良い遺伝子導入系や標的遺伝子破壊系が確立されている。一方でフタバネゼニゴケは現時点で孢子を形成させる条件が見つかっておらず、無性芽を使って遺伝子導入が可能であるが効率は低い。そこで本研究では無性芽を使った遺伝子導入の効率化と共に、ゼニゴケにおいて生殖成長への切り替えを担うことが明らかになっているBONOBO遺伝子を過剰発現させることで孢子の形成を試みる。

4. 研究成果

フタバネゼニゴケの効率的な遺伝子導入法を確立するために、本研究では2つのアプローチを行った。

(1) 無性芽を用いた形質転換法の確立

フタバネゼニゴケは、傷を付けたり移植したりすると、葉状体の各所に新たな分裂組織が生じて分岐する性質を持つ(図2)。我々はこれに着目して、アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入を試みた。アグロバクテリウムの共存培養時間や濃度、さらには培地のpH等の改良を重ねることで、ハイグロマイシン耐性個体の作出に成功している。我々が開発した手法は比較的簡便であり、培養スペースや期間も短いなど多くの優れた点がある。

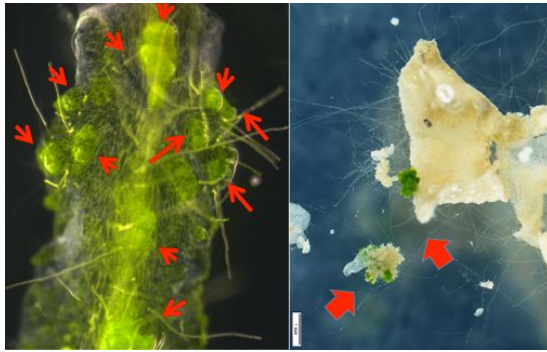


図2：フタバネゼニゴケは容易に分裂組織が誘導される(右)。この分裂活性の高い部位にアグロバクテリウムが感染すれば、遺伝子導入個体が得られると考えられる(左)。

(2) BONOBO 遺伝子の導入による孢子形成の誘導

BONOBO はフタバネゼニゴケに近縁のモデル植物であるゼニゴケで同定された遺伝子である。過剰発現することでゼニゴケの雄株と雌株の両方を強制的に生殖成長に切り替えることが可能である。フタバネゼニゴケの BONOBO 遺伝子オルソログは同定できていないが、我々は上述の形質転換法によりゼニゴケの BONOBO を導入することで、生殖器らしき構造を誘導することができた(図3)。一方でこの生殖器様構造物は完全ではなく、完全な精子や卵は形成されなかった。ゼニゴケにおいても形質転換体によっては同様の結果になるとの情報を得ており、適切なレベルで BONOBO が誘導される個体があれば、孢子を形成することが期待される。

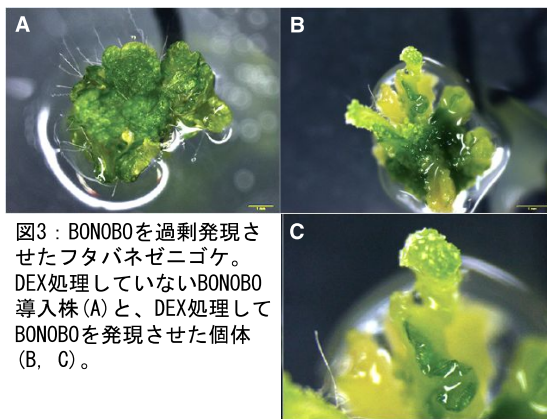


図3：BONOBOを過剰発現させたフタバネゼニゴケ。DEX処理していないBONOBO導入株(A)と、DEX処理してBONOBOを発現させた個体(B, C)。

研究開始当初は CRISPR 法による遺伝子破壊がコケ植物で実用可能であるか不安もあった。しかし BONOBO の導入による孢子形成も時間がかかることが予想されたために、共同研究者らとフタバネゼニゴケにおける CRISPR を現在試みている。現状ではいくつかの遺伝子の破壊に成功しており、研究目的は達成されたと考えている。

フタバネゼニゴケは海外でも共生進化のモデルとして注目されており、今後はさらに需要が増えると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) 「The rice LysM receptor-like kinase OsCERK1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling」 Carotenuto G, Chabaud M, Miyata K, Capozzi M, Takeda N, Kaku H, Shibuya N, Nakagawa T, Barker D, Genre A, *New Phytologist* 誌 vol.214(4): pp.1440-1446 (2017)
- (2) 「Evaluation of the role of the LysM receptor-like kinase, OsNFR5/OsRLK2 for AM symbiosis in rice」 Miyata K, Hayafune M, Kobae Y, Kaku H, Nishizawa N, Masuda Y, Shibuya N, Nakagawa T (責任著者), *Plant and Cell Physiology* 誌 vol.57(11): pp.2283-2290 (2016)
- (3) 「Volatile Components Emitted from the Liverwort *Marchantia paleacea* subsp. *diptera*」 Sakurai K, Tomiyama K, Kawakami Y, Ochiai N, Yabe S, Nakagawa T (共同責任著者), Asakawa Y, *Natural Product Communications* 誌 vol.11: pp.263-264 (2016)
- (4) 「Rice arbuscular mycorrhiza as a tool to study the molecular mechanisms of fungal symbiosis and a potential target to increase productivity」 Nakagawa T and Imaizumi-Anraku H *Rice* 誌 vol.8: 32 (2015)
- (5) 「Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking」 Shinya T, Nakagawa T (equally contributed with the first author), Kaku H, Shibuya N *Curr. Opin. Plant Biol.* 誌 vol.26: pp.64-71 (2015)

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 「ミヤコグサが土壤微生物叢を操る仕組み」中川知己, 佐伯和彦, 豊岡公德, 佐藤 繭子, 平川英樹, 大澤美芙, 若崎真由美, 福原舞, 川東拓司, 吉田彩恵, 菅沼教生, 三井久幸, 佐藤修正, 川口 正代司 第59回 日本植物生理学会 札幌コンベンションセンター 2018年3月29日
- (2) 「植物と微生物のジレンマゲーム～4億年以上の試行錯誤で植物がたどり着いた究極

の解答!?!」中川知己 数学・物理学・情報科学シンポジウム(2017) 奈良女子大学 2017年12月9日

(3) 「ミヤコグサはいかにして働かない cheating 根粒菌を排除するのか？」中川知己 , 佐伯和彦, 豊岡公德, 佐藤繭子, 平川英樹, 大澤美芙, 若崎真由美, 福原舞, 川東拓司, 吉田彩恵, 菅沼教生, 佐藤修正, 三井久幸, 岡崎伸, 川口正代司 植物微生物研究階第27回研究交流会 京都大学 2017年9月20日

(4) 「ミヤコグサはいかにして働かない cheating 根粒菌を排除するのか？」中川知己 , 佐伯和彦, 豊岡公德, 佐藤繭子, 若崎真由美, 大澤美芙, 福原舞, 川東拓司, 吉田彩恵, 菅沼教生, 佐藤修正, 岡崎伸, 川口正代司 日本植物学会第81回大会 東京理科大学 2017年9月9日

(5) 「How do host legume plants reject cheating rhizobia?」Mai Fukuhara , Wakana Nishiyama , Kana Miyata ,Nanami Sone ,Sara Kibi ,Kiminori Toyooka , Mayuko Sato , Mayumi Wakazaki , Shigeki Yabe , Kazuhiko Saeki , Shin Okazaki , Masayoshi Kawaguchi, Tomomi Nakagawa 第58回日本植物生理学会 鹿児島大学 2017年3月17日

(6) 「マメ科植物-根粒菌共生における共生終了後の共生根粒菌の爆発的増殖」中川知己, 西山和華奈, 宮田佳奈, 曾根奈那美, 吉備沙羅, 岡崎伸, 矢部重樹, 川口正代司 日本植物学会第80回大会 沖縄コンベンションセンター 2016年9月16日

(7) 「窒素固定しない cheating を行う pink4 変異体について」福原舞, 西山和華奈, 宮田佳奈, 曾根奈那美, 吉備沙羅, 矢部重樹, 佐伯和彦, 岡崎伸, 中川知己, 川口正代司 第26

回植物微生物研究会 東北大学 2016年9月9日

(8) 「How do host plants establish secure symbioses with microbial partners?」Tomomi Nakagawa 日本植物生理学会 岩手大学 2016年3月16日

(9) 「マメ科植物-根粒菌共生において共生終了後に根粒菌はどうなるのか？」中川知己, 西山和華奈, 宮田佳奈, 曾根奈那美, 吉備沙羅, 渋谷直人, 矢部重樹 日本植物学会 新潟コンベンションセンター 2015年9月8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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川知己 (NAKAGAWA TOMOMI)
名古屋大学・理学系研究科・特任助教
研究者番号: 90396812