

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18561

研究課題名(和文)ジベレリンによる共生シグナルネットワークへの干渉機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of gibberellin interference mechanism to symbiosis signaling networks

研究代表者

武田 直也 (TAKEDA, NAOYA)

関西学院大学・理工学部・准教授

研究者番号：60571081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物と根粒菌、アーバスキュラー菌根菌(以下、菌根菌)との相利的相互作用である根粒共生や菌根共生では、共生菌からの養分供給によって宿主植物に大きな生育促進効果を与えることが知られている。本研究では、これらの共生機構の解明に向け、植物ホルモン「ジベレリン」による共生制御についての解析を行った。菌根、根粒共生遺伝子プロモーター上においてジベレリンシグナルによる発現制御を行う領域を発見し、それらの共生における機能解析を行った。この解析から、ジベレリンによる共生シグナルへの干渉機構と遺伝子発現制御機構を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Root nodule symbiosis (RNS) and arbuscular mycorrhiza (AM) are mutualistic interaction with plants and rhizobia or arbuscular mycorrhizal fungi. It is known that RNS and AM supply nutrients each other and give a large growth promoting effect in both host plant and symbiotic microbes. In this study, we analyzed regulation mechanism of RNS and AM by plant hormone "gibberellin". We have discovered promoter regions that control expression of RNS and AM genes by gibberellin signaling, and have performed function analysis of these regions in symbiosis. From these analyses, we clarified the mechanism of interference to symbiotic signals and gene expression by gibberellin.

研究分野：共生工学

キーワード：共生 植物微生物相互作用 根粒菌 菌根菌 マメ科植物

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は光合成産物と引き換えに根粒菌との根粒共生により窒素、アーバスキュラー菌根菌(以下、菌根菌)との菌根共生によりリンを、それぞれ「根粒」や「樹枝状体」などの共生器官を介して効率的に得ることができる。これらの共生による栄養供給は、植物の生育・環境適応に大きく貢献している。これらの共生では、宿主根への侵入から共生器官を形成する過程で、両共生に共有される共通共生経路が植物内に存在し、相互の共生機構は密接な関連を持って成立している。また、これらの共生の成立過程では、さまざまな植物ホルモンが正負の影響を与えていることが知られている。これまでの研究から、根粒共生・菌根共生でジベレリン(GA)内生量に変動がみられたことから、GAシグナルは根粒・菌根共生双方のシグナル伝達に干渉し、共生遺伝子発現を変化させることで、共生菌感染や共生器官形成に大きな影響を与えていると考えられる。

2. 研究の目的

植物と根粒菌・菌根菌との共生において、共生シグナル伝達経路には植物ホルモン「ジベレリン」により正負的作用を受ける複数の干渉点が存在し、下流の共生遺伝子の発現制御が行われていると推定される。このGAによる共生遺伝子発現の制御機構の解析を起点として、共生シグナル伝達経路への干渉作用を担う分子実体の同定やシス-トランス制御系の解明を行い、共生とGAという異なるシグナルネットワークにおける交差の全体像を明らかとする。このような正負の干渉作用の解明は、これまでの単純な解釈では矛盾が生じていた共生シグナルの複雑な制御システムをひも解く重要な知見となる。

3. 研究の方法

GA濃度の変動により発現に影響を受ける共生遺伝子の網羅的な同定をトランスクリプトーム解析により行う。これまでの研究で明らかとしたGA応答共生遺伝子と合わせ、GA応答性の相違から分類した遺伝子群のそれぞれから、プロモーターバッシングにより共生応答、およびGA応答を担うシス因子を特定する。これらのシス因子の共生における機能の解析を行う。また、既知のGAシグナル因子やNSP1などの共生転写因子に対して、同定したシス因子とのDNA結合活性を調べる。これらの解析から、共生シグナルネットワークに複数存在するGAシグナルからの干渉点となる因子と、その干渉作用の分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 網羅的なGA濃度変動遺伝子の同定
GA濃度変動により影響を受ける共生遺伝子は、数種の遺伝子のみであったが、より網羅的にGAシグナルの変動によって発現量に影響

を受ける遺伝子群を同定するため、マメ科植物ミヤコグサの根より抽出したRNAに対して、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seqによるトランスクリプトーム解析を行った。ここでは活性型GAであるGA₃の添加に加え、ジベレリン合成阻害剤Uniconazole-Pを添加したミヤコグサ根の発現プロファイルの取得を行った。

このトランスクリプトーム解析と共生菌感染時や共生シグナル分子であるNod factorやキチン添加時のトランスクリプトーム解析から、一般的なGA濃度変化にตอบสนองする遺伝子群に加え、共生遺伝子も非共生環境下においてGA濃度にตอบสนองして発現変動を示す遺伝子群が存在していることを明らかとした。これらの遺伝子群には、すでに共生時にGA濃度変動による発現への干渉を受けることを明らかとしていたSTR1やRAM2などの遺伝子も含まれていた(図1)。これらの遺伝子発現量の変動により、菌根菌の宿主内への侵入や、侵入後の菌系の密度に変化が生じることから、GAシグナルによる干渉作用が、菌根共生シグナルに影響を与え、共生菌感染を制御していることを示している。また、これらの遺伝子は、一般的な環境応答などにおけるGA濃度変化にตอบสนองした機能も有していることが推定された。

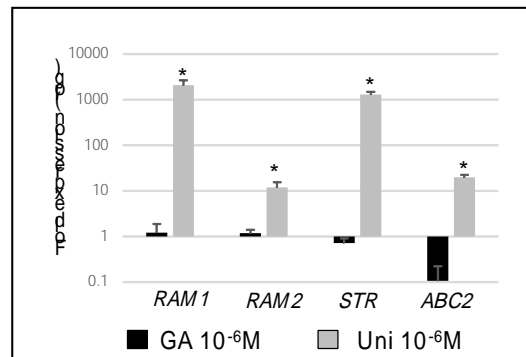


図1. GA濃度変動による共生遺伝子発現
非共生環境下においてもGA合成阻害剤の添加2週後に共生遺伝子として知られる遺伝子群の発現を誘導することができた。GA:GA₃添加、Uni:Uniconazole-P添加、非添加のミヤコグサ根の発現量を1とした。

(2) 菌根共生遺伝子におけるGA応答性シス領域の同定

同定したGA応答性の菌根共生遺伝子RAM1のプロモーターに対し、GA応答に必須の領域の探索などの詳細な解析を行った。まず、プロモーターレポーターとしてRAM1プロモーター-GUSを用いて、プロモーターバッシング解析(プロモーターを短くした複数のコンストラクトを宿主植物へ導入し、GA応答性がみられなくなる領域を特定する)を行った。この解析の結果、低いジベレリン濃度環境下でRAM1発現を誘導するジベレリン応答領域を特定し、Low gibberellin response region (LoGA-RR)と名付けた(図

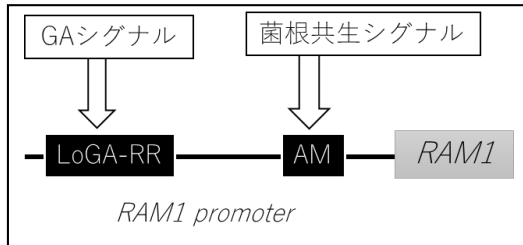


図2. *RAM1* プロモーター上の LoGA-RE すでに同定されている共生応答性のシス領域とは異なる部位に GA 応答を制御する LoGA-RE が存在していた。

LoGA-RR 領域を介した GA による *RAM1* 誘導は、共生応答と独立して機能することから、*RAM1* は一般的なジベレリン応答反応にも機能することが推定された。この LoGA-RR 配列は、*in silico* 解析から推定される既存のシス配列を含まない配列となっていた。これまでの成果をまとめた論文を投稿中であるが、この応答領域以外にもジベレリン応答性の領域が存在していることが示唆される結果が得られており、今後はこの領域の探索も含めた GA 応答機構の解明を行っていく。この解析によって、低い共生菌感染率と低ジベレリン含量を示す共生変異体 *nsp1* における ectopic な共生遺伝子群の発現誘導は、LoGA-RR を介して生じていることが推定された。ただし、*nsp1* が示す共生表現型と遺伝子発現との相関について明らかとするには、GA 濃度の局所的な変動をとらえ、共生菌の存在部位と共生遺伝子発現部位を組織、細胞レベルで解析するなど、さらなる解析が必要となってくる。このような時空間的に解像度を高めた遺伝子発現や共生菌、ホルモンの検出技術の技術開発を含めた研究を今後行っていく。

(3) 根粒共生遺伝子における GA 応答性シス領域の同定と解析

根粒共生において GA は、根粒菌の侵入経路である感染糸や共生器官である根粒の形成を阻害する負の因子として機能する。一方、我々は GA 添加により感染糸形成、根粒形成に必須の遺伝子である *NIN* の発現が誘導されることを発見した。さらに、高濃度の GA 添加はミヤコグサの根に細胞分裂を誘導し、こぶ状の構造を形成させる。この応答をさまざまな共生変異体において解析したところ、*nin* 変異体において細胞分裂を誘導できないことが判明し、また、*NIN* の過剰発現は細胞分裂を誘導することが分かっていたことから、この GA 応答による細胞分裂が *NIN* 依存的に生じることを明らかとした。

この GA による *NIN* の発現や細胞分裂誘導を指標として、*RAM1* におけるアプローチと同様に、*NIN* プロモーター上における GA 応答領域と共生応答領域についての解析をお

こなった。この解析の結果、*NIN* プロモーター上で GA 応答による細胞分裂 (GA-induced cell division; GCD) に必要なシス領域の同定に成功した。この領域はまだ 100bp 以上と広い領域ではあるが、これまでの *NIN* プロモーター上で同定された転写因子結合領域とは全く異なる領域に位置する新規のシス領域であることが明らかとなった。

この領域の根粒形成における機能を明らかにするため、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 による GA 応答領域の除去を試みた。その結果、同定した *NIN* プロモーター上の GA 応答領域を欠損した変異体の同定に成功した。この変異体に GA を添加したところ、GCD 誘導が完全に消失したわけではないが、野生型と比較して有意に低下していた。この GA 応答が低下した変異体における *NIN* 遺伝子の働きが、根粒形成においてどのような変化を及ぼすかを観測することで、根粒共生における *NIN* を介した GA 応答の機能を明らかにできる。この解析の結果、この変異体で根粒形成や感染糸形成の上昇が見られた。このことから、根粒形成における GA による *NIN* 制御は、根粒形成を抑制する機能を持つことが考えられた。実際に根粒形成中では GA 濃度は上昇し、また、*NIN* は根粒形成において過剰な根粒形成を抑制する機能を持つことが知られている。以上のことから、根粒形成における GA の機能として、根粒形成によって内生の GA 合成が活性化され、*NIN* を介した根粒形成の抑制に寄与することが明らかとなった。

これまでの植物-微生物相互作用への植物ホルモンの関与は、生理学的応答の変化の観測に留まることが多く、その分子機構についてはほとんど分かっていなかった。しかし、これらの発見により、ホルモンシグナルと共生シグナルの合流点と干渉機構の一端を明らかとすることができ、今後の全容の解明が期待できる。

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 1件)

1. Carotenuto Gennaro, Chabaud Mireille, Miyata Kana, Capozzi Martina, Takeda Naoya, Kaku Hanae, Shibuya Naoto, Nakagawa Tomomi, Barker David G., Genre Andrea
The rice LysM receptor-like kinase OsCERK1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling
New Phytologist (2017) 214:1440-46 DOI: 10.1111/nph.14539 (査読有)

〔学会発表〕(計 7件)

1. 永江美和 二宮彩月 赤松明 川口正代司 武田直也
共生遺伝子 *NIN* の発現制御を介したジベレリンの根粒共生における機能
第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年

2. 武田直也

異種生物の受容を制御する機構；アーバスキュラー菌根共生を中心に
環境微生物系学会合同大会 2017 2017 年
(招待講演)

3. 武田直也, 永江美和, 川口正代司

根粒共生・菌根共生における共生制御物質の解析と共生能向上効果の検証
植物微生物研究会 2016 年 9 月

4. Naoya Takeda, Miwa Nagae, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Masayoshi Kawaguchi
Gibberellin guidance is required for the spatial regulation of symbiosis gene expression and infection of arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*
International Society for Molecular Plant Microbe Interactions XVII Congress (国際学会) 2016 年

5. 都築 周作, 半田 佳宏, 武田直也, 川口正代司

アーバスキュラー菌根菌 *Rhizophagus irregularis* におけるストリゴラクトン誘導性推定分泌タンパク質の解析
第 57 回日本植物生理学会 2016 年

6. 武田直也, 宮田 佳奈, 西澤 洋子, 賀来華江, 澁谷 直人, 中川 知己, 川口正代司

Induction mechanisms of calcium ion oscillation triggered by chitin and symbiotic signal molecules
第 57 回日本植物生理学会 2016 年

7. 武田直也

Transcriptome analysis of symbiosis mutants revealed infection and colonization mechanisms in arbuscular mycorrhiza.

2nd International Molecular Mycorrhiza Meeting, 2015 年 (国際学会) (招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田直也 (TAKEDA, Naoya)
関西学院大学・理工学部・准教授
研究者番号: 60571081

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

川口 正代司 (KAWAGUCHI, Masayoshi)