

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18645

研究課題名(和文) エンドファイト型コレトトリカム属菌の栄養条件依存的な植物成長促進機構の解明

研究課題名(英文) Revealing the mechanisms of nutrient status dependent Plant growth promotion effects by endophytic Colletotrichum species

研究代表者

晝間 敬(Hiruma, Kei)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・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)：野外で生育する植物は無数の微生物群と相互作用していることが明らかになりつつあるものの、植物が微生物群と共生している意義に関しては殆ど明らかではない。研究者は、野外の貧栄養土壌で生育するアブラナ科植物であるシロイヌナズナから単離されたColletotrichum tofieldiae(Ct)が、アブラナ科植物の根に感染し、リン欠乏等の栄養枯渇時において植物生長を促す共生菌であることを発見した。Ctの菌糸が植物の第2の根として働き、リン酸を宿主に輸送することで植物生長が促されることが明らかになった。植物は、Ctに対する防御関連応答をリン欠乏時には低下させ共生関係を強化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Various endophytic fungi associate with plants in nature, but it is unclear whether these provide host fitness benefits. Although most characterized species of the fungal genus Colletotrichum are pathogens causing anthracnose diseases on various plant species, I found that C. tofieldiae (Ct) colonizes roots of brassica plants including Arabidopsis without causing disease symptoms. Ct transfers phosphorus to shoots, promotes plant growth only under phosphorus-limiting conditions. The host's phosphate starvation response (PSR) system regulates Ct root colonization and is required for plant growth promotion (PGP). PGP also requires a host tryptophan-derived metabolites, components of plant immune responses. These results indicate a functional link between immunity and the PSR system during beneficial interactions with Ct.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：内生糸状菌 植物生長促進 Colletotrichum シロイヌナズナ リン 根 炭疽病菌

## 1. 研究開始当初の背景

野外で生育する植物の根は多種多様な微生物と相互作用している。これらの微生物は植物生長促進など、植物の環境適応に必要な不可欠な機能を有していると考えられている。しかしながら、これら微生物の機能を適切に評価する実験系が限られていたことから、植物根圏と相互作用する微生物の機能は殆ど明らかになっていない。

研究者は、野外の貧栄養土壌で生育するモデル植物シロイヌナズナから *Colletotrichum tofieldiae*(*Ct*)と呼ばれる糸状菌を単離した。*Ct* は、様々な植物種に炭疽病を引き起こす炭疽病菌と近縁であった。しかしながら、*Ct* は、シロイヌナズナを含むアブラナ科植物の根に感染し、リン欠乏条件下で植物生長を促した(図1)。一方で、日本のダイコン圃場から単離され *Ct* と近縁種である *Colletotrichum incanum*(*Ci*)はリン欠乏条件下で植物生長を著しく阻害した。両者はゲノム情報の大部分を共有していることから、両者を比較することで植物生長促進機構や病原性発現機構のメカニズムに迫ることができると着想した。

## 2. 研究の目的

本研究は、病原糸状菌と近縁である *Ct* がリン欠乏条件下で示す植物生長促進効果のメカニズムを近縁種である *Ci* と比較解析しながら明らかにして行くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

第1に、*Ct* がリン欠乏条件下で植物生長促進効果を示すことから、*Ct* が自身の菌糸を介してリン酸を宿主へと輸送している可能性が考えられた。そこで、放射性同位体である  $^{33}\text{P}$  を用いて、菌糸から植物へのリンの輸送が行われているかを検証する実験系を構築した。

第2に、*Ct* による植物生長促進効果の機構を探るため、シロイヌナズナのリン酸枯渇時の適応反応に関わる因子を網羅的に調査した。リン酸トランスポーター遺伝子、リン酸トランスポーターの細胞膜への輸送に関与する *PHF1* 以上の遺伝子をまとめて制御すると考えられている転写因子である *PHR1* と *PHL1* を調査した(Tzyy-Jen and Shu-I 2012)。

第3に、*Ct* と *Ci* 感染時の根におけるシロイヌナズナの詳細な遺伝子発現変動について、RNAseq を用いたトランスクリプトーム解析により明らかにし、比較解析を行った。

第4に、比較トランスクリプトーム解析から浮かび上がった経路の植物変異体入手し、*Ct* による植物生長促進効果に変化が生じるかを調査した。特に、アブラナ科植物に特異的と考えられているトリプトファン由来の二次代謝物の合成酵素やその制御転

写因子(Clay et al., 2009; Bednarek et al., 2009)に着目して研究を行った。



Mock Ct

図1. *C. tofieldiae* (*Ct*) によるリン欠乏時における植物生長促進

## 4. 研究成果

### (1) リン欠乏条件下において *Ct* が宿主植物にリンを供給することが判明した

$^{33}\text{P}$  を用いたリン酸輸送の可視化実験より、*Ct* 菌糸がシロイヌナズナ根に感染することでリン酸が植物地上部に輸送されることが判明した。一方で、近縁種である *Ci* 感染時では *Ct* と比較して有意なリン酸輸送は認められなかった。さらには、リン栄養が十分存在する条件下では、*Ct* は根に感染しているにもかかわらずリン酸が輸送されなかった。以上のことから、*Ct* によるリン酸輸送は、環境のリン酸濃度(おそらくは宿主内のリン酸濃度)に厳密に制御された現象であることが示唆された。これまでにリン酸吸収を助ける糸状菌としてアーバスキュラー菌根菌が研究されており、地上植物の約7割以上と共生関係を結んでいることが知られている。一方で、モデル植物のシロイヌナズナを始めとするアブラナ科植物を宿主とはしないことが知られており、それはアブラナ科植物がアーバスキュラー菌根菌共生に必要な因子を失ったためであると考えられている(Bonfante and Genre, 2010)。今回の研究により、*Ct* のような内生糸状菌が宿主の栄養吸収を助けることでアブラナ科植物が貧栄養土壌に適応していることが示唆された。

### (2) *Ct* による植物生長促進効果に必要な宿主因子を同定した

*Ct* による植物生長促進効果にシロイヌナズナのリン欠乏時の適応反応に必要な *PHR1*, *PHL1*, 及び *PHF1* が必要であることを発見した。*PHR1* と *PHL1* は、*Ct* 感染時に特異的に発現誘導されるリン酸トランスポーター等の遺伝子の発現を制御しており、*phr1 phl1* 変異体においてはリン欠乏時の宿主へのリン酸輸送量が低下した。

### (3) 植物は *Ct* に対しては植物免疫応答をリ

## リン欠乏時に低下させる一方で病原菌 *Ct* に対してはリン欠乏でも維持することが判明した

*Ct* 及び *Ci* がシロイヌナズナの根に感染した際のトランスクリプトーム解析により、*Ct* 感染時にはリン欠乏時に植物免疫応答に関連した遺伝子群の発現が低下した一方で、*Ct* 感染時には活性化したままであることが明らかになった。植物免疫応答は植物生長と拮抗することが知られているため、*Ct* は植物免疫応答を活性化させないことで植物生長を阻害しない感染形式を取ることが考えられた。

## (4) *Ct* が植物生長促進を発揮するために植物のトリプトファン由来の二次代謝物が必要であることが判明した

最後に、特に発現が変動していたトリプトファン由来の二次代謝物の合成もしくはその制御に必要な遺伝子群を調査した結果、トリプトファン由来の二次代謝物は *Ct* による植物生長促進効果や *Ct* の潜在的な病原性を抑えるのに必要であることが判明した(図2)。

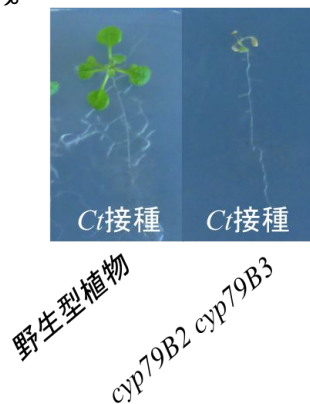


図2. *Ct* はトリプトファン由来の二次代謝物が合成できない *cyp79B2 cyp79B3* を枯死させる

以上の成果の一部は、Hiruma et al., Cell 2016) に報告した。

*Ct* を用いた実験系は、遺伝子破壊を含め遺伝子組換え技術を適応することが可能で、モデル植物シロイヌナズナの蓄積した知見にもアクセスできる利点がある。本実験系を用いることで今後も未だ大部分が不明である共生系状菌による植物生長促進機構や、病原性獲得機構などが明らかになることが期待される。

## 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2件)

1. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramirez D, Bucher M, O'Connell RJ and Schulze-Lefert P. (2016). Root Endophyte

*Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*, 165, 464-474. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>. (査読あり).

2. Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Weimann, A., Thon, M.R., Damm, U., Dallery, J.F., Hainaut, M., Henrissat, B., Lespinet, O., Sacristán, S., Ver Loren van Themaat, E., Kemen, E., McHardy, A.C., Schulze-Lefert, P., and O'Connell, R.J. (2016). Survival Trade-offs in Plant Roots during Colonization by Closely Related Beneficial and Pathogenic Fungi. *Nat Commun.* DOI:10.1038/ncomms11362. (査読あり).

[学会発表](計5件)

1. Hiruma K, Tanaka M, Lee TH, Kitagawa N, Schulze-lefert P, and Saijo Y. Phosphate status-dependent control of interactions with pathogenic and endophytic fungi in *Arabidopsis thaliana*. Fungal Genetics conference 2017.03.13-18 アシロマー(アメリカ).

2. 晝間敬、西條雄介、Schulze-Lefert Paul *Colletotrichum* 属の内生糸状菌とアブラナ科植物の栄養条件依存的な共生関係 植物病理学会感染生理談話会(招待講演)2016年8月10-12日、兵庫県神戸市・シーパル須磨.

3. 晝間敬、種田有加里、Gerlach Nina, Bucher Marcel, 久保田裕生、Schulze-Lefert P, 西條雄介 内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* による植物へのリン酸輸送にはシロイヌナズナの PHR1 及び PHL1 が必要である。日本植物病理学会全国大会 2016年3月21-23日 岡山県岡山市・岡山コンベンションセンター.

4. Hiruma K, Gerlach N, Sacristan S, Nakano RT, Oida Y, Hacquard S, Kracher B, Bucher M, Saijo, Y, O'Connell R, and Schulze-Lefert P. Phosphate dependent plant growth promotion by the root endophyte *Colletotrichum tofieldiae*. 日本植物生理学会(招待講演)2016年3月18日-20日 岩手県盛岡市・岩手大学.

5. 晝間敬、種田有加里、久保田裕生、Schulze-Lefert P, 西條雄介 内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* に対する栄養条件依存的な植物免疫の初期応答の解析 日本植物病理学会関西西部会 2015年9月29日—30日 徳島県徳島市・あわぎんホール.

[図書](計1件)

1. 晝間 敬・Schulze-Lefert P. 糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* はリン酸の欠乏した条件において宿主植物の根にリン酸を供給し成長を促進する ライフサイエンス新着論文レビュ - DOI: [10.7875/first.author.2016.029](https://doi.org/10.7875/first.author.2016.029)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://first.lifesciencedb.jp/tags/%E6%A4%8D%E7%89%A9%E7%A7%91%E5%AD%A6>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

晝間 敬 (HIRUMA, Kei)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：[20714504](#)

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )