

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13090

研究課題名(和文)植物・エンドファイト共生関係を成立させる未知ケミカルメディエータの同定と機能解明

研究課題名(英文) Reprogramming of root development by diffusible signals produced during symbiotic interaction of Arabidopsis and a root endophytic fungus *Serendipita indica*.

研究代表者

太田 大策 (Ohta, Daisaku)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10305659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：担子菌門のエンドファイトの一種、*Serendipita indica* は様々な植物種と共生関係を成立させ、耐病性の増強、収量増加などの有用効果をもたらす。*S. indica* はシロイヌナズナに対しても生育促進や病原抵抗性を誘導する。シロイヌナズナは、*S. indica* 感染によって防御物質生合成に加え、オーキシシン(IAA)生合成とともに、顕著な側根発達の促進を示した。続いて、これらの応答が *S. indica* 培養液中の生理活性物質によるものであることを明らかにした。現在、生理活性物質の同定、および側根原基誘導に関わる未同定 IAA 生合成経路の解明のための実験を継続している。

研究成果の概要(英文)：Upon colonization by *Serendipita indica*, an endophytic fungus, root development of the host plant *Arabidopsis* is greatly affected: primary root growth is strongly inhibited, while lateral root (LR) initiation is remarkably stimulated. We found that unidentified diffusible substance(s) produced during the endophytic interaction elevated local of auxin levels at specific sites of the primary root followed by the increased frequency of LR initiation. Reverse genetics and chemical biology studies have demonstrated that the LR development and the local auxin production were independent of the known auxin biosynthetic pathways in *Arabidopsis*. Toward understanding the molecular mechanisms underlying the growth promotion during the endophytic interaction, identification and characterization of the diffusible substances and the unclarified auxin biosynthetic pathway are now underway.

研究分野：応用分子生物学

キーワード：植物共生菌 生育促進 側根原基誘導 オーキシシン生合成

1. 研究開始当初の背景

植物根は吸水や無機元素吸収の機能を担う。同時に、植物根から分泌される多様な有機化合物は土壌中の微生物叢に影響を及ぼし、根圏 (rhizosphere) と呼ばれる土壌環境が成立する。土壌中には植物に対する病原性、あるいは非病原性の微生物だけでなく、植物内生共生菌 (エンドファイト) が存在する。エンドファイトは植物体内で栄養源を得て増殖するが、宿主植物の生育促進やストレス抵抗性増強、無機養分の獲得など有益な効果をもたらす。宿主植物とエンドファイトの共生関係を包括的に説明するメカニズム解明は、環境負担の少ない農業生産を可能にする新規技術開発への展開が期待される。植物は、エンドファイトの共生関係成立過程においても、病原微生物に対する感染初期応答を発動する。その後、共生的な平衡状態への移行に至るまでには、組織内でのエンドファイトの物理的な隔離や防御物質生合成の活性調節が必須である。しかし、中長期的な共生関係成立過程において、防御応答と拮抗する共生の制御メカニズムの全容は明らかではなく、エンドファイト共生による根系発達や生育促進メカニズムの詳細も不明である。本研究では、防御応答と生育促進の関係を理解するため、Trp を前駆体とする二次代謝経路に着目した。

シロイヌナズナは、Trp を前駆体として化学防御物質を合成する。Camalexin (3-thiazol-2'-yl-indole) は、病原性微生物の感染や重金属イオン処理、活性酸素種の発生などにより生合成される。生合成前駆体である Trp は、シトクロム P450 CYP79B2/B3 により IAOx に変換され、さらにシトクロム P450 酵素である CYP71A12/A13 により IAN に変換される。IAN はグルタチオン (GSH) と複合体 GSH(IAN) を形成し、Cys(IAN) に変換される。Cys(IAN) はシトクロム P450 CYP71B15(PAD3) によりジヒドロカマレキ

シン酸 (DHCA) を経て camalexin に変換される。IAOx は indole glucosinolates 生合成経路における中間体でもあり、IAOx からコア骨格インドール-3-メチルグルコシノレート (I3M) を経て合成される。CYP79B2/B3 によって生成する IAOx は、indole cyanohydrin を経て 4-OH-ICN (4-hydroxyindole-3-carbonyl nitrile) に変換される。4-OH-ICN は抗菌性の二次代謝産物で、植物の防御応答に関与する。ANAC042 は、camalexin 生合成経路に関与する CYP71A12, CYP71A13, CYP71B15 の発現を正に制御する転写調節因子として同定された。ANAC04 は、*Alternaria brassicicola* 感染や、細菌鞭毛 (フラジェリン) 由来 22 アミノ酸残基からなるオリゴペプチドの Flg22 処理によって発現が誘導されることから、ANAC042 遺伝子発現を化学防御応答の誘導マーカーとして位置づけられる。

シロイヌナズナの Trp を前駆体とする二次代謝経路では植物ホルモンであるインドール-3-酢酸 (IAA) が生合成される。シロイヌナズナには複数の IAA 生合成経路が存在する。これらは、IPA (indole-3-pyruvate) 経路、IAOx (indole acetaldoxime) 経路、IAM (indole-3-acetamide) 経路、TAM (tryptamine) 経路である。IPA 経路は、植物の主要 IAA 生合成経路である。まず、トリプトファンアミノ基転移酵素 (TAA1) 反応によって Trp から IPA が生成し、IPA はフラビンモノオキシゲナーゼ (YUCCA) 基質となり IAA に酸化される。IAOx 経路は、camalexin と indole glucosinolate の生合成中間体 indole-3-acetonitrile (IAN) を与える。まず、シトクロム P450 CYP79B2/B3 によって Trp から IAOx が生成する。IAOx は別のシトクロム P450 CYP71A12/A13 によって IAN へと変換され、IAN はニトリラーゼ (NIT2) 反応によって IAA が生合成される。Indole-3-acetamide (IAM) は細菌における IAA 生合成中間体であるが、シロイヌナズナやイ

ネ、トウモロコシなどを含む様々な植物種に存在する。植物における IAM 経路は、細菌の IAA 生合成経路と同様、Trp-2-monooxygenase によって Trp から IAM へ変換され、IAM は IAM 加水分解酵素の作用によって IAA へ変換されると推察されている。シロイヌナズナにおいて細菌での IAM 加水分解酵素のオルソログとして AMIDASE 1 (AtAMI1) が同定されている。動物では、トリプタミン (TAM) が Trp 脱炭酸酵素 (TDC) によって生成する。しかし、植物において同様の酵素活性を示す TDC 遺伝子は未だ発見されていない。Phenyl acetic acid (PAA) もオーキシン活性を有する。PAA は IAA と同様にバクテリアや菌類、コケ植物から陸上維管束植物に至る様々な生物種に存在する。シロイヌナズナのあらゆる組織において、PAA は IAA よりもはるかに高いレベルで蓄積するが、生理活性は IAA よりも低い。PAA 生合成経路はフェニルアラニン (Phe) を前駆体として生合成されることが明らかになっているが、その生合成経路は完全に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、植物・エンドファイト共生関係の成立初期に惹起される化学的防御応答 (防御物質生合成) と、それに続く生育促進のメカニズムの関連を解明することを目的とした。実験には担子菌門セバシナ科のエンドファイト *Serendipita indica* を用いた。*S. indica* は大麦や白菜などの多様な植物種と共生関係を成立し、生育促進や収量増加をもたらす。宿主植物としては、アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0) を供試した。*S. indica* は、シロイヌナズナの生育促進や病害抵抗性の増強をもたらすことが知られている。

より具体的には、*S. indica* 感染によって引き起こされる宿主植物シロイヌナズナの Trp 代謝活性の変動、特に内生オーキシン生合成・輸送にフォーカスし側根の発生・発達の関連を解析を実施した。その結果、*S. indica* 培養液中には、植物体内のオーキシンレベルの上昇を介して、側根原基へと誘導する活性を有する低分子化合物が存在することを明らかにした。

3. 研究の方法

野生型 (WT) シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0) に加え、*ANAC042promoter::GUS* 系統、*DR5::GUS* 系統、*DR5rev::GFP* 系統、*cyp79b2 cyp79b3* 二重変異体を供試した。植物種子は滅菌処理後、1/2 Murashige and Skoog (MS) 寒天培地に播種した。遮光した状態で、4°C で 2 日間春化処理を行った、人工気象器内で 22 °C、16 時間明条件 8 時間暗条件下で維持した。担子菌門セバシナ科 *Serendipita indica* は Frank Waller 博士 (ユリウス・マクシミリアン大学ヴェルツブルク) の提供による。*S. indica* 菌体は CM 寒天培地で、暗条件下でインキュベーター内で維持した。菌懸濁液の作製の際には、*Aspergillus* 液体培地で暗条件下 (28 °C) で生育させた。*Aspergillus* 液体培地で 14 日間振盪培養した *S. indica* 菌体は、吸引ろ過により回収した。濾紙上に残った *S. indica* を 10 mL の PNM-P 液体培地で洗浄した。洗浄は 3 回繰り返した。共培養液 (CCM, Co-cultured medium) の作成には、MS 寒天培地上で 7 日間生育させたシロイヌナズナ幼植物 (20 個体)、および *S. indica* 菌体 (2.25 g) を用いた。植物体と菌体は、それぞれ別の透析チューブに封入し、500 mL のメディウム瓶中で、100 mL の PNM-P 液体培地で 4 日間振盪培養した (22 °C、16 時間連続照射下、80 rpm)。共培養 4 日目に、メディウムビンから植物と菌体の入った透析チューブ

ブを取り出した後、PNM-P 培養液 (外液) を回収し、孔径 0.2 μm フィルターで濾過滅菌した。この培地を“共培養液”と定義した。対照実験として、植物体のみを同条件で培養後、濾過滅菌した培地を“Control 培養液”と定義した。

根系発達誘導能の活性評価には、MS 寒天培地上で 4 日間生育させたシロイヌナズナ幼植物を用いた。12 ウェルのプレート上、各ウェルに 4 個体のシロイヌナズナ幼植物を移し、3 mL ずつ CCM または Control 培養液を分注した。プレートは、22 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間明条件・8 時間暗条件で、80 rpm で 4 日間振盪培養した。植物体は、処理後 4 日目に 70 % エタノール中で固定・脱色し、50 % グリセロールに浸し、根系形態・側根数を実体顕微鏡下で観察した。酵素反応阻害剤 (PPBo: 4-phenoxyphenylbionic acid) は、DMSO に溶解後、各ウェルに添加した。

4. 研究成果

宿主植物シロイヌナズナと共生菌 *S. indica* の相互作用によって、Trp を前駆体とする camalexin 生合成の誘導が認められた。Camalexin 生合成の誘導は、*ANAC042promoter::GUS* 発現を指標とした。この時、シロイヌナズナと *S. indica* の物理的な接触は必須でなかったことから、何らかの低分子化合物がシロイヌナズナの応答反応を惹起したと考えられた。そこで、シロイヌナズナと *S. indica* を透析チューブで隔離し、同一の培養液中で培養したところ、カマレキシン生合成誘導 (*ANAC042promoter::GUS* 発現)に加えて、側根の著しい発達が確認された。この時に得られた共培養液 (CCM) には、1 nM 程度のカマレキシンが蓄積していた (Control では検出限界以下)。CCM を新たな植物体の培養に用いた際にも、カマレキシン生合成 (*ANAC042promoter::GUS* 発現)と側根発達が認められた。これらの結果から、シロイヌナズナと *S. indica* の相互作用の初期には、

シロイヌナズナの Trp を前駆体とする二次代謝経路による化学防御物質生合成が誘導されること、さらにその誘導には未同定の低分子化合物が関与すると考えられた。

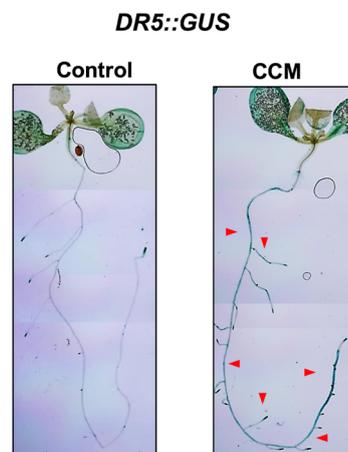


Fig. 1. Induction of *DR5::GUS* expression by CCM. Arabidopsis seedlings were cultured in either CCM or control medium for 48h. CCM treatment exhibited strong activities to induce remarkable *DR5::GUS* expression as visualized by the histochemical staining. The *GUS* expression sites accompanied the prominent stimulation of lateral root development in the CCM treated seedlings.

この二次代謝経路は、植物ホルモン IAA 生合成と重複する。そこで、CCM による側根原基の誘導には、内生 IAA レベルの上昇が関与すると考え、オーキシン応答性の *DR5::GUS* 発現植物を用いて、CCM による内生オーキシンレベルへの影響を検討したところ、根系全体での *GUS* 発現誘導とともに側根発達が観察された (Fig. 1)。また、シロイヌナズナにおいて camalexin と indole glucosinolate の生合成前駆体であるとともに、IAA 生合成にも関与が推定される生合成中間体 IAOx を生成するシトクロム P450 CYP79B2 の発現が強く誘導されていた。これらの結果から、CCM 中には Trp を前駆体とする二次代謝を活性化する未同定低分子物質が存在し、化学防御物質と IAA 生合成を誘導すると考えられた。CCM の IAA 濃度を計測したところ、約 15 nM であり、この

濃度では CCM で誘導された側根発達には至らなかった。

これらの結果は、シロイヌナズナと *S. indica* の共生関係成立の初期には, Trp 由来の二次代謝物質の生合成誘導が起こり, 同時に内生 IAA 生合成の誘導を介して根系発達に至ると考えられた。そこで, CCM によって誘導される IAA 生合成の活性化の機序の解明を目的とした実験を開始した。シロイヌナズナには複数の IAA 生合成経路が存在する。

そこでまず, *S. indica* 感染に応答し, 内生 IAA レベル上昇と側根誘導に関与する IAA 生合成経路を特定するために, 次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現量解析を実施したが, IAA 生合成経路の活性化を裏付ける明確な結果を得ることはできなかった。続いて, CCM 中に検出された約 2 倍濃度となる 50 nM IAA で *DR5rev::GFP* 系統を処理した。50 nM IAA 添加で側根数は増加したが, CCM による側根数増加レベルには至らず, 主根の著しい伸長阻害が観察された。また, CCM 処理では主根全体で強い *DR5rev::GFP* 発現誘導が見られ, その蛍光強度は 50 nM IAA 添加区よりも遥かに強かった。一方, CCM 処理区と 50 nM IAA 添加区の両方において, 地上部での *DR5rev::GFP* 発現誘導は見られなかった。これらの結果から, CCM は根系の IAA レベルを上昇させること, この IAA レベル上昇は CCM 中の IAA の吸収と蓄積によるものではなく, IAA の *de novo* 合成が根で活性化されたためであると考えられた。そこで次に, IPA 経路に関わる *TAA1* と *YUC1* のそれぞれのプロモーター制御下で *GUS* レポーターを発現する系統を作出し, CCM による IPA 経路の発現誘導の有無を解析したが, CCM 添加によってこれらの遺伝子発現は誘導されないことがわかった。

次に, IAA レベル上昇に関わる IAA 生合成経路の特定を目的として, 逆遺伝学手法

とケミカルバイオロジー手法による IAA 生合成経路の特異的遮断実験を実施した。IAOx を中間体とする経路の関与を検証する為に, *CYP79B2* と *CYP79B3* の T-DNA 挿入による二重変異体 (*cyp79b2 cyp79b3*) を供試した。*cyp79b2 cyp79b3* においても, CCM 処理による側根原基の誘導は WT に顕著な差は認められなかったことから, IAOx を経由する経路は *S. indica* 感染による側根原基誘導には関与しないことがわかった。

さらに, ケミカルバイオロジー手法によって IPA 経路の関与を調べるため, フラビンモノオキシゲナーゼ (YUCCA) 阻害剤である PPBo の添加が側根発達に及ぼす影響を調べた。Control 区では, 0.1 μ M PPBo 存在下で側根誘導が著しく阻害され, 最高濃度の 10 μ M PPBo ではほぼ完全に消失した。一方, CCM 処理区では, 0.1 μ M PPBo 存在下でも統計的に優位な側根数の減少は見られず, 10 μ M PPBo でも約半数の側根数が確認された。これらの結果から, CCM 添加による側根誘導には, IPA 経路の寄与以外の要素 (未知の IAA 生合成経路, あるいは IAA 極性輸送による側根形成部位での IAA 供給の調節機構) が存在すると考えられた。

本研究では, *S. indica* 共培養液中には, 内生オーキシシンレベルの上昇を介して, 側根原基の発生・発達を改変・誘導する低分子化合物が存在することを明らかにした。根系発達を誘導する新規低分子化合物の発見は, 植物発生物学への新たな理解を与えるのみならず, 植物と共生微生物の相互作用と生育促進を低分子化合物によって模倣し, 非生物的に植物生産力を高める応用研究への新基軸への発展が期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕（計 5 件）

①担子菌エンドファイト *Piriformospora indica* 共生によるシロイヌナズナの側根原基誘導. 吉川 凌香, 勝山 菜央, 中本 雅俊, 小川 拓水, 岡澤 敦司, 太田 大策. 日本農芸化学会 2017 年度大会

②担子菌エンドファイトによって誘導される宿主植物の根系発達に関する研究. 稲次 葵, 吉川 凌香, 勝山 菜央, 齋藤 綾子, 中本 雅俊, 小川 拓水, 岡澤 敦司, 太田 大策. 日本農芸化学会 2017 年度大会

③担子菌エンドファイト *Serendipita indica* 由来の低分子化合物によるシロイヌナズナ側根原基誘導の解析. 稲次葵, 吉川凌香, 勝山菜央, 齋藤綾子, 中本雅俊, 小川拓水, 岡澤敦司, 太田 大策. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会

④担子菌 *Serendipita indica* 共生で誘導されるシロイヌナズナの代謝変動の解析. 勝山菜央, 吉川凌香, 稲次葵, 齋藤綾子, 中本雅俊, 小川拓水, 岡澤敦司, 太田 大策. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会

⑤担子菌エンドファイト *Serendipita indica* 由来のケミカルメディエータによるシロイヌナズナ側根原基誘導の解析. 稲次 葵, 吉川 凌香, 勝山 菜央, 齋藤 綾子, 中本 雅俊, 小川 拓水, 岡澤 敦司, 太田 大策. 2017 年第 35 回 日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会

〔図書〕（計 0 件）

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者 太田大策 (Daisaku Ohta)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10305659

(2) 研究分担者 ()
研究者番号：

(3) 連携研究者 秋山康紀 (Kohki Akiyama)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：20285307

(4) 研究協力者 ()