

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06299

研究課題名(和文) カルシウム振動がコードする共生シグナル情報の解読

研究課題名(英文) Decoding symbiosis signal encoded by calcium oscillation

研究代表者

武田 直也 (Takeda, Naoya)

関西学院大学・生命環境学部・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)：相利的植物-微生物相互作用であるアーバスキュラー菌根(AM)共生や根粒共生において、共生シグナル分子の受容による細胞内Ca²⁺濃度の周期的な変動である「カルシウム振動」の解析を行った。共生菌との最初の相互作用の場となる根毛細胞におけるバイオイメーキングとトランスクリプトーム解析により、カルシウム振動制御下にある共生遺伝子を同定し、その機能からセカンドメッセンジャーとして幅広い役割を持つCa²⁺が、振動現象によってコードする共生シグナル情報を推定した。さらにカルシウム振動の発生機構の解明につながる共生シグナル受容体の発見と解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共生応答としてのカルシウム振動の他にも、植物細胞内では根毛細胞の生長や分岐・膨張などの形態異常時、花粉管伸長や気孔開閉に関連して、異なる波形のCa²⁺のオシレーションが発生している。本研究は、このような共生以外のCa²⁺濃度変動が関与する生理現象の解析に拡張することが可能である。また、現在、トランスクリプトーム解析などから得られた知見から、低環境負荷型の農業技術として期待される「微生物肥料」としての共生能の利用に向けた研究に取り組み、特許などの成果を挙げている。そのため、本研究による成果も共生能の向上と制御を行う技術開発に結び付けることが可能である。

研究成果の概要(英文)：In mutualistic plant-microbe interactions; arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis and rhizobial symbiosis, we analyzed "calcium spiking," which are periodic oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration induced by the acceptance of symbiotic signaling molecules in the host plant. Transcriptome analysis in root hair cells, the site of the first interaction with the symbionts, identified symbiotic genes under the control of calcium oscillation. From their functional analysis, we predicted the roles of calcium spiking encoded by the oscillation phenomenon of Ca²⁺ which may give Ca²⁺, a general second messenger, characteristics of a symbiotic signaling. Furthermore, we discovered and analyzed a symbiotic signal receptor mutant that lead to the elucidation of the mechanism of calcium oscillation generation.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：根粒共生 植物微生物間相互作用 カルシウムシグナリング 菌根共生

1. 研究開始当初の背景

植物はアーバスキュラー菌根菌(以下、AM菌)とのAM共生によりリン源を、根粒菌との根粒共生により窒素源を、それぞれ「樹枝状体」や「根粒」などの共生器官を介して効率的に得ることができる。このような共生による養分供給は、植物の生育・環境適応に大きく貢献するとともに、共生菌の微生物肥料としての利用が期待されている。AM共生や根粒共生は、共生菌から分泌されるシグナル分子の受容と伝達、宿主根内への侵入、共生器官の形成を経て成立するが、この過程において両共生で共有される共通共生経路が存在している。遺伝学・逆遺伝学的な解析から、この共通経路に位置する多くのAM・根粒共生シグナル伝達因子が同定され、研究代表者もこの解析に貢献してきた。これらの中で、共生シグナル分子の受容によって誘導される非タンパク質性のシグナル伝達因子として、周期的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動現象「カルシウム振動」が知られている。同じくカルシウムシグナリング現象で、動物神経細胞に見られる Ca^{2+} の周期的な発火(オシレーション)が~数百ミリ秒オーダーで進行するのに対し、カルシウム振動は数十秒~1分以上かけて Ca^{2+} 濃度が上下し、数分の間隔をあけて再び発生する緩やかな Ca^{2+} 濃度変動を示す。そのため、この共生におけるカルシウム振動の発生機構や機能は、動物細胞とは大きく異なると考えられる。

2. 研究の目的

共生菌が分泌するシグナル分子やその宿主側の受容体、 Ca^{2+} チャネルタンパク質が同定され、カルシウム振動の起動・発生メカニズムが明らかとなりつつある。その一方で、共生シグナル分子により活性化される経路は複数あり、共生時に誘導される遺伝子群のすべてがカルシウム振動制御下にあるわけではないことも示唆されている。そのためカルシウム振動が持つ情報が、どのような共生応答へ接続するかはわかっておらず、共生に必須の現象であるかについても証明がなされていない。そこで、本研究ではセカンドメッセンジャーとして幅広い機能を持つ Ca^{2+} が、オシレーションによる特徴的な変動パターンを持つことで、植物-微生物相互作用において具体的にどのような共生シグナル情報を有するかを問う。

3. 研究の方法

共生研究のモデル系として、AM・根粒共生の双方を同一植物内に成立させることができるマメ科植物ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)と、共生菌であるAM菌(*Rhizophagus irregularis*)、根粒菌(*Mesorhizobium loti*)を用いた。

本研究ではミヤコグサにおけるトランスクリプトーム解析により、カルシウム振動制御下にあると推定される共生遺伝子を同定した。そしてその遺伝子機能の解析と、バイオイメージングによるカルシウム振動の解析結果を統合し、セカンドメッセンジャーとして幅広い役割を持つ Ca^{2+} が、振動現象によってコードする共生シグナル情報の解読を試みた。

この解析とカルシウム振動が共生成立に果たす役割を明らかとする。このまた、根毛細胞は培養細胞などと異なり、植物個体として存在する状態から1細胞核の単離操作が可能であり、細胞内骨格の再編成や根毛の変形など、その他の共生応答反応も容易に観測できる利点を持つことから、以下の1細胞解析に適した実験材料となる。

(1) 根毛細胞で見られるカルシウム振動パターンの解析

Ca^{2+} 濃度の変化によって蛍光強度を変化させるタンパク質 Yellow Cameleon (YC)を導入したミヤコグサを作成し、カルシウム振動を観測できるイメージングシステムを確立している。この観測システムを用いて、カルシウム振動を指標としたシグナル経路の活性化を共生変異体などを用いて解析してきた。本研究ではカルシウム振動自体の解析として、起動因子であるAM共生・根粒共生シグナル分子での振動パターンの違いや、発達段階の異なる根毛細胞や隣接する細胞間で比較し、固有の周波数や波形を特定した。

(2) 1細胞トランスクリプトーム解析技術の構築

根毛細胞で発生するカルシウム振動パターンに対応した遺伝子発現プロファイルを得るため、根毛細胞より抽出したRNAからRNA-Seqライブラリーを作成し、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。

(3) カルシウム振動制御下にある共生遺伝子群の同定

上記2の結果得られたカルシウム振動パターンを反映した発現プロファイルや、すでに研究代表者がもつAM共生・根粒共生発現プロファイルから、根毛細胞内でカルシウム振動シグナル経路により制御されると推定される遺伝子群を同定した。この際、ここで得られた共生遺伝子は、プロモーターレポーター(GUS)を用いてカルシウム振動の発

生との対応を確認した。

(4) カルシウム振動がコードする共生情報の解読

ミヤコグサでは CRISPR/Cas9 システムを用いることで容易に遺伝子破壊を行うことができ、またトランスポソンのタグラインの利用も可能である。これらのツールを用いて、上記のカルシウム振動制御遺伝子群の機能解析を行った。これまでに研究代表者が行った共生変異体を用いた解析から、カルシウム振動が持つ共生情報は、共生菌感染を促進する遺伝子群の発現を誘導し、宿主植物の共生菌への受容性を高める機能を持つと推定していた。同定した共生遺伝子の機能からこの仮説を検証し、カルシウム振動が共生成立に果たす役割を明らかとする。

4. 研究成果

共生菌との最初の相互作用の場となる表皮細胞での遺伝子発現情報を得るため、表皮細胞組織の単離法の検討と、その細胞からの RNA 抽出を行った。表皮組織の単離は、すでに報告のあるいくつかの方法を検討し、根を液体窒素中で攪拌する方法が最も効率的に多くの根毛細胞を得られることが分かった。この方法を用いて得た根毛細胞からの RNA 抽出については、特殊な方法ではなく RNeasy micro キットを用いることで、トランスクリプトーム解析を行うのに必要な濃度、量、質の RNA を得ることができた。この RNA を次世代シーケンサーによる RNA-seq に供して、トランスクリプトームデータを得ることができた。得られたトランスクリプトーム解析結果をもとに同定した遺伝子について、RT-PCR やプロモーターレポーター解析を行った。そのうちのいくつかの遺伝子については根粒菌感染により根毛細胞で発現誘導が確認されることを示した (図 1)。

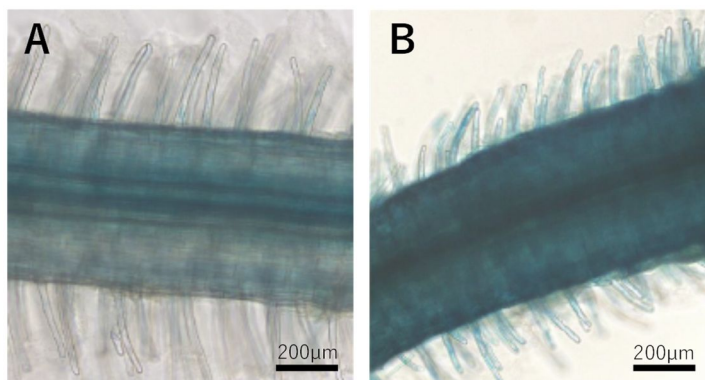


図 1. 共生遺伝子のプロモーター-GUS 解析

非接種根 (A) と比較して根粒菌接種 (B) では速やかに根毛細胞での GUS 染色が確認できた。この発現領域や応答時間はカルシウム振動のパターンと類似している。

そのため、これらの遺伝子の破壊株を作成することとした。根粒菌感染や共生シグナル分子である Nod factor に応答して根毛で発現する遺伝子を 4 つ候補として挙げ、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集によって対応する遺伝子に変異を導入した。その結果、それぞれの変異体の作出に成功した。それらの 4 破壊株の表現型解析から根粒共生が促進される 2 変異体を特定した。これらの遺伝子は共生を抑制する機構を持ち、初期の共生応答が共生を負に制御する調節因子として機能する可能性を支持した。これらの遺伝子に対してより詳細な機能解析を継続するとともに、変異体でのカルシウム振動発生を調べ、カルシウム振動誘導機構との関連を調べる予定である。

また、カルシウム振動自体の解析として、カルシウム振動の発生率や振動パターンについて計測した。ミヤコグサにおけるカルシウム振動の経時的な変化を調べたところ、根粒菌の感染から数分後に発生が確認でき、その後、3 時間程度で振動のピークを迎えた後に減衰していくが、数日間はカルシウム振動が継続していることが分かった (図 2)。

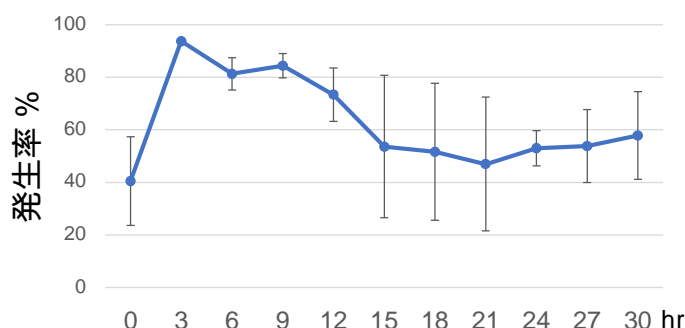


図 2. カルシウム振動発生率の時間変化

根粒菌接種後にカルシウム振動を示した細胞の割合を示した。3hr で最も活性化された状態となり、その後に減衰していく。

表皮において発現を示す共生応答遺伝子のプロモーターGUS 解析では、共生菌接種後、数日で根毛などの表皮細胞での発現が誘導されることから、カルシウム振動の発生期間中に発現が誘導されることを示すことができた。今後の研究として、カルシウム振動によるこれらの遺伝子の直接的な制御関係の証明を行っていく予定である。

また、このカルシウム振動の発生には表皮細胞における共生シグナルである Nod ファクターの受容が重要な起点となっている。この受容体タンパク質である Nod factor Receptor 1 (NFR1)の変異体では Nod factor に応答したカルシウム振動は発生せず、以降の共生応答や根粒形成が進行しない。しかし、*nfr1* 変異体の中から、根粒形成は起こらないが Nod factor に応答したカルシウム振動が生じる変異体を同定した。この *nfr1* 変異体については現在解析中のため、詳細は省略するが、このタイプの変異体は 1 アリルしかなかったことから、同じタイプの変異を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により NFR1 に変異を導入し、その発生機構の解析を行うこととした。その結果、別アリルでも根粒形成能の消失とともにカルシウム振動現象の残留が確認できた。今後、この変異体の詳細な解析を行うことで、共生シグナルの受容とカルシウム振動の誘導機構の解明に大きく貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akamatsu Akira, Nagae Miwa, Nishimura Yuka, Romero Montero Daniela, Ninomiya Satsuki, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Sakakibara Hitoshi, Kawaguchi Masayoshi, Takeda Naoya	4. 巻 105
2. 論文標題 Endogenous gibberellins affect root nodule symbiosis via transcriptional regulation of NODULE INCEPTION in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15128	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 Tominaga Takaya, Miura Chihiro, Takeda Naoya, Kanno Yuri, Takemura Yoshihiro, Seo Mitsunori, Yamato Masahide, Kaminaka Hironori	4. 巻 61
2. 論文標題 Gibberellin Promotes Fungal Entry and Colonization during Paris-Type Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in <i>Eustoma grandiflorum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcz222	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 Suzaki Takuya, Takeda Naoya, Nishida Hanna, Hoshino Motomi, Ito Momoyo, Misawa Fumika, Handa Yoshihiro, Miura Kenji, Kawaguchi Masayoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 LACK OF SYMBIONT ACCOMMODATION controls intracellular symbiont accommodation in root nodule and arbuscular mycorrhizal symbiosis in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1007865	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Akihiro Yamazaki, Yozo Okazaki, Yasuhiro Higashi, Kazuki Saito, Akira Akamatsu, Naoya Takeda, Akira Miyahara, Miwa Nagae, Yosuke Umehara, Makoto Hayashi
2. 発表標題 Sterol acyltransferase is involved in the regulation of root nodule symbiosis
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akamatsu A, Nagae M, Nishimura Y, Kawaguchi M, Takeda N
2. 発表標題 Characterization of cis-Regulatory Regions in NIN Promoter Required for Infection Thread Formation and Gibberellin Responses
3. 学会等名 International conference of Nitrogen fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Akamatsu, Miwa Nagae, Yuka Nishimura, Naoya Takeda
2. 発表標題 Characterization of a cis-regulatory region in NIN promoter required for infection thread formation in Lotus japonicus
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaya Tominaga, Chihiro Miura, Naoya Takeda, Yuri kanno, Yoshihiro Takemura, Mitsunori Seo, Masahide Yamato, Hironori Kaminaka
2. 発表標題 Gibberellin promotes fungal entry and colonization during Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in Eustoma grandiflorum
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎真優 赤松明 米倉円佳 近藤聡 武田直也
2. 発表標題 根毛1組織のトランスクリプトーム解析による表皮特異的共生遺伝子の探索
3. 学会等名 植物微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Akamatsu, Miwa Nagae, Yuka Nishimura, Masayoshi Kawaguchi, Naoya Takeda
2. 発表標題 Gibberellin regulates root nodule symbiosis through autoregulation of nodulation system
3. 学会等名 13th European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoya Takeda
2. 発表標題 Gibberellin regulates root nodule symbiosis through autoregulation
3. 学会等名 Satellite Meeting on Signal Transduction Pathways in Nitrogen-Fixing Symbioses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤松明 武田直也
2. 発表標題 フォスファチジルイノシトール輸送タンパク質が調整する根粒菌感染機構の解明
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daniela Romero-Montero, Mayu Kawasaki, Akira Akamatsu, Naoya Takeda
2. 発表標題 Relationship between the plant cell wall and the infection process of symbiotic microbes, focusing on COBRA genes in <i>Lotus japonicus</i> .
3. 学会等名 International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
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
---------	---------