

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06400

研究課題名(和文) 菌従属栄養進化過程での光合成機能喪失の機序に迫る—サカネラン属を用いた解析

研究課題名(英文) Mechanism of loss of photosynthetic function during mycoheterotrophic evolution - analysis using *Neottia* (Orchidaceae)-

研究代表者

山下 由美 (Yamashita, Yumi)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・支援研究員

研究者番号：30792543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光合成による独立栄養植物から、共生する菌類から炭素化合物を獲得する菌従属栄養植物が進化した。近年、この進化プロセスが注目されているものの、既往の研究では菌類の機能のみに焦点が当てられ、光合成機能喪失の進化は解明されていない。本研究はラン科サカネラン属を用いて、植物体の独立-菌従属栄養レベルの進化を解明するとともに、光合成機能が菌従属栄養性の進化に伴ってどのように喪失したか、光合成酸素発生速度解析などの植物生理学的な手法と光合成関連遺伝子の解析から初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成機能の研究は現在世界的に進行する地球温暖化による悪影響をいかに回避するかの観点からも注目を浴びているが、その機能喪失メカニズムの研究も健全な機能保全の解析と同様に重要である。菌従属栄養植物はその進化過程で光合成機能を喪失するが、喪失の過程は不明であった。本研究は菌従属栄養植物カイサカネランを植物生理学的に解析し、光合成機能喪失の過程を初めて明らかにした点で意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Mycoheterotrophic plants, that acquire carbon compounds from symbiotic fungi, evolved from photosynthetic autotrophic plants. Although this evolutionary process has received attention in recent years, previous studies have focused only on fungal functions, and the evolution of the loss of photosynthetic function has not been elucidated. In this study, we used the genus *Neottia* (Orchidaceae) to elucidate the evolutionary level of mycoheterotrophy. Then, we clarified for the first time the mechanisms how the photosynthetic function was lost during the evolution of mycoheterotrophy, using plant physiological methods such as photosynthetic oxygen production rate analysis and photosynthesis-related gene analysis.

研究分野：植物分類学

キーワード：菌従属栄養植物 光合成 安定同位体比 色素体構造 光合成関連遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成による独立栄養を原則とする植物において、共生する菌類から炭素化合物を獲得する栄養摂取様式を獲得した種を菌従属栄養植物と称する。近年、植物の独立栄養から菌従属栄養に至る進化プロセスが注目されているものの、既往の研究では炭素化合物を供給する菌類の機能のみに焦点が当てられ、一方の栄養源となる光合成に関する機能の進化は解明されていない。ラン科サカネラン属は、近縁種間で独立栄養種、菌従属栄養種、さらに両者の中間的な性質を有する種が分化しており、菌従属栄養性の進化プロセスを解明する絶好のモデルであると考えられる。その中でも特に、普通葉は退化するものの植物体が緑色のカイサカネランは独立栄養から菌従属栄養への中間段階に位置すると考えられ、この植物を用いれば菌従属栄養性進化に伴う光合成機能の喪失過程の解析に最適であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究はサカネラン属、特に緑色菌従属栄養植物カイサカネランを用いて、植物体の独立・菌従属栄養レベルの進化を解明するとともに、光合成酸素発生速度解析などの植物生理学的な手法と光合成関連遺伝子の解析から、光合成機能が菌従属栄養性の進化に伴ってどのように喪失したかを詳細に検討しそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炭素と窒素の安定同位体比測定による独立栄養 菌従属栄養レベルの推定

日本産サカネラン属 10 種と同所に生育する独立栄養植物と菌類を自生地から採取し、それぞれの炭素と窒素の安定同位体比を測定した。

(2) カイサカネランの光合成機能解析

サカネラン属植物 10 種の光合成機能として最大量子収率と電子伝達速度を自生地で測定し、さらにカイサカネランを含む数種の植物を実験室内に持ち込み、光化学系 I の機能として 730 nm 光照射時のクロロフィル蛍光、光化学系 II の機能として、密閉チャンバー内での光合成酸素発生速度と最大量子収率を測定した。

(3) サカネラン属の色素体構造の解析

カイサカネランの植物体から DMF を用いてクロロフィルを抽出し、クロロフィル a および b の含量を測定した。さらにグルタルアルデヒドで固定組織をオスミウム酸染色し、切片を作成して透過型電子顕微鏡を用いて色素体の構造を解析した。

(4) サカネラン属の光合成関連遺伝子の塩基配列の決定

カイサカネランを含む数種のゲノム DNA を抽出し、色素体関連遺伝子 *rbcL*, *PsaA*, *PsaB*, *PsbA* の塩基配列を決定してアミノ酸構造を推定した。

種名	形態形質	栄養摂取様式
ヒメフタバラン	緑葉	独立
アオフタバラン	緑葉	独立
タカネフタバラン	緑葉	独立
ヒメヨウラン	無葉	菌従属
カイサカネラン(緑)	無葉(緑)	菌従属
カイサカネラン(白)	無葉(白)	菌従属
サカネラン	無葉	菌従属
エゾサカネラン	無葉	菌従属
タンザワサカネラン	無葉	菌従属

4. 研究成果

(1) サカネラン属植物の栄養依存性レベルの推定

自生地から得た植物体内の炭素と窒素の安定同位体比測定し

た結果、サカネラン属植物の内、普通葉を有し、植物体が緑色のフタバランの仲間は独立栄養生活を営み、普通葉を持たない植物は植物体が緑であるか、無いかにかかわらず、菌従属栄養性であることが明らかになった。

(2) カイサカネランの光合成機能の解析

サカネラン属植物 10 種の光化学系 II の機能を自生地で測定した結果、普通葉を持つ種の最大量子収率は、通常の植物と同等の高い値を示したが、普通葉の無い種はカイサカネランを含めて極めて低く、光化学系 II の機能がないことが明らかとなった。

カイサカネランに注目し、実験室内で光化学系 I の機能として遠赤色 730 nm 光照射時のクロロフィル蛍光を測定した結果、独立栄養種のアオフタバランとアオフタバランでは蛍光強度の上昇とクエンチングが見られたが、菌従属栄養植物ギンリョウソウモドキとカイサカネランでは見られなかった。

光化学系 II の機能として光合成酸素発生速度を測定したが、カイサカネランには上昇が見られず、以上のことからカイサカネランは光化学

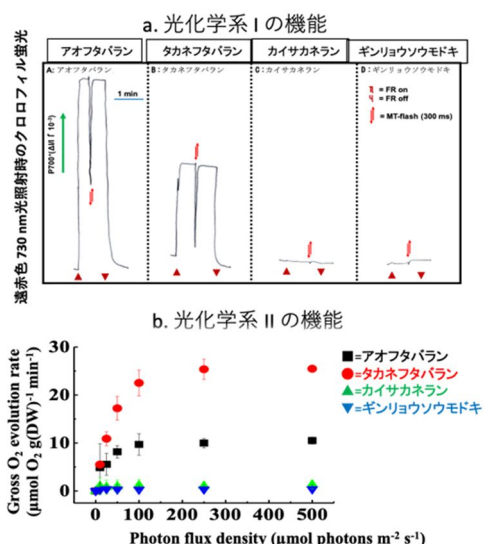


図1. カイサカネランの光合成機能

系 I および II の両方の機能がないことが明らかになった。

### (3) カイサカネランの色素体構造の解析

カイサカネランの植物体から DMF を用いて注出されたクロロフィル a, b の量はいずれも緑葉を持つアオフトバラン、タカネフトバランと比較すると 1/5~1/10 と少なかったが、カイサカネランは緑葉を持つ植物同様クロロフィル a, b を持つことが明らかになった。

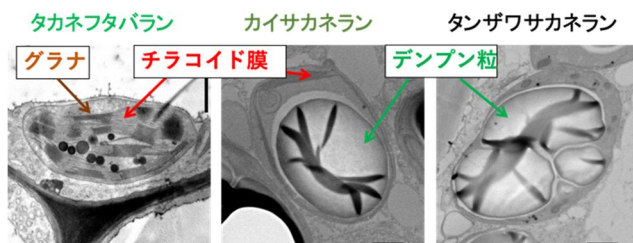


図2. 色素体の透過型電子顕微鏡画像

透過型電子顕微鏡観察の結果、カイサカネランは色素体構造を有したが、その数が少なく、また、チラコイド膜が扁平でグラナ様構造が少なく未熟であった。従ってこの結果からも光合成は正常に機能しないと推定された。

### (4) サカネラン属の光合成関連遺伝子の塩基配列の決定

緑葉を持つアオフトバランとタカネフトバランではルビスコ *rbcl*, 光化学系 I

の *PsaB*, *PsaA*, 光化学系 II の *PsbA* の 4 遺伝子にコードされるタンパク質はいずれも正常に発現されると推定されたが、菌従属栄養種では全ての遺伝子が一部または全部を欠失しており、発現されないと推定された。カイサカネランではルビスコと光化学系 I の 3 つの遺伝子産物は欠失していたが、光化学系 II の *PsbA* のみ正常に発現されると推定された。

### (結論)

本研究は独立栄養から菌従属栄養への栄養依存性シフトの中間に位置すると考えらえるカイサカネランが完全に菌従属栄養であり、植物生理学的な手法を用いることによって初めて光化学系 I および光化学系 II の両方の機能が完全に失われていることを明らかにした。しかし、それにもかかわらず、カイサカネランはクロロフィル a, b を有し、不完全な形態ではあるが色素体を有することも明らかになった。さらに、光合成関連遺伝子の解析によって、光合成機能喪失の過程でルビスコと光化学系 I の消失が先行し、光化学系 II が残存することも明らかにした。菌従属栄養植物での光合成の機能喪失経路につながる発見であり、今後の光合成の機能制御研究にも興味深い知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下由美、高木大輔、池田健一、末次健司、黒沢高秀、遊川知久
2. 発表標題 緑色菌従属栄養植物カイサカネランの色素体構造
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumi Yamashita, Felix Lallemand, Akihiko Kinoshita, Yuki Ogura-Tsujita, Takahide Kurosawa, Marc-Andre Selosse, Tomohisa Yukawa
2. 発表標題 Low copy nuclear gene (Xdh) sequences reveal at least five independent evolutions of mycoheterotrophy in tribe Neottieae.
3. 学会等名 6th International Orchid Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下由美、高木大輔、Felix Lallemand、末次健司、Marc-Andre Selosse、黒沢高秀、遊川知久
2. 発表標題 緑色菌従属栄養植物カイサカネランの光合成機能の検証
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下晃彦、山下由美、辻田有紀、黒沢高秀、Felix Lallemand、Marc-Andre Selosse、遊川知久
2. 発表標題 ラン科サカネラン属の菌従属栄養性と光合成機能の進化
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018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
研究分担者	遊川 知久 (Yukawa Tomohisa)  (50280524)	独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・グループ長  (82617)	
研究分担者	末次 健司 (Suetsugu Kenji)  (70748839)	神戸大学・理学研究科・准教授  (14501)	
研究分担者	山下 俊之 (Yamashita Toshiyuki)  (90192400)	奥羽大学・薬学部・教授  (31602)	
研究分担者	高木 大輔 (Takagi Daisuke)  (80825654)	東北大学・農学研究科・JSPS特別研究員(PD)  (11301)	

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
---------	---------