

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19209

研究課題名（和文）サツマイモ栽培種に保存されるT-DNA領域の進化的意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of evolutionary significance of T-DNA region conserved in cultivated species of sweetpotatoes for their evolution

研究代表者

竹本 愛子（田中愛子）（Takemoto (Tanaka), Aiko）

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：90464148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、サツマイモの持つIbACSによる生合成産物がサツマイモの微生物環境に与える影響を明らかにすることを目指す。

IbACS遺伝子を高発現させたタバコを作出し、NMR解析を実施したところ、IbACS生合成産物がアグロシノピンAであることが示された。IbACS発現タバコのメタトランスクリプトーム解析によって、IbACS発現タバコで特異的に検出される新種の細菌から、高発現する新規糖トランスポーターを見出した。さらに、この細菌はアグロシノピンAを資化した。また、サツマイモ品種花らんまんのIbACS遺伝子変異体を作出したところ、野生型個体と比較し、新鮮重の顕著な低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サツマイモは救荒作物として広く利用され、様々な栽培環境（土壌中の微生物相）に高い適応能力を持っている。本研究課題は、サツマイモが進化の過程で獲得した微生物との密接な相互作用の総合的な理解を目指すものである。本研究で見出される有用微生物を活かした応用研究へつながれば、将来的に作物生産現場へ貢献する研究となると期待され、農業生産の持続的な発展に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to clarify the effect of the product synthesized by IbACS on the microbial community of sweet potatoes.

Tobacco with high expression of the IbACS gene was produced and subjected to NMR analysis, and it was shown that the IbACS product was agrociniopine A. In metatranscriptome analysis of IbACS-expressing tobacco, we found a novel sugar transporter with high expression from a new species of bacterium specifically detected in IbACS-expressing tobacco. In addition, this bacterium can degrade agrociniopine A. In addition, IbACS mutants of the sweet potato cultivar Hanaranman were produced and their fresh weights were significantly decreased compared to the wild-type plants.

研究分野：農学

キーワード：共生 微生物

1. 研究開始当初の背景

サツマイモ栽培種ゲノムにアグロバクテリウム由来の T-DNA が保存されていることが報告された(Kyndt *et al.*, PNAS, 2015)。サツマイモ栽培種は中南米を起源とし、50 万年前に野生種から分岐し、栽培化が進んだとされる。したがって、作物として世界に伝播する以前にサツマイモ祖先が病原性アグロバクテリウムの感染を受け、その過程で組込まれた T-DNA が失われることなく栽培種ゲノムに維持されたと推定された。その高い保存性から、サツマイモ野生種の進化、さらに栽培種の育種の過程で、これら遺伝子がサツマイモに何らかの有益な形質を付与していると推定された。しかしながら、この T-DNA に含まれる遺伝子群のサツマイモ栽培種における機能は全くわかっていない。

2. 研究の目的

サツマイモ栽培種において保存される T-DNA 配列には、特定の微生物によって分解・資化される糖類化合物アグロシノピン生合成遺伝子(Agrocinopine synthase; *IbACS*)が含まれている。本研究では、*IbACS* によって合成される物質を明らかにすること、さらに、その生合成産物の根圏微生物相への影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サツマイモACS相同遺伝子(*IbACS*)によるアグロシノピン合成の検証

① タバコ葉におけるアグロシノピン生産

IbACS 遺伝子恒常発現ベクターをタバコ葉に形質転換し、*IbACS* による生合成産物を蓄積した形質転換体葉を凍結後、遠心によって糖類を含むと考えられる上精を回収し、抽出液とした。コントロールとして、アグロバクテリウム MAFF301001 株をトマト苗に接種し、形成された癌腫を 70%エタノールに一晩置き抽出したのち、50 度でインキュベートし、アルコール分を蒸発させ、抽出液とした。

② アグロシノピンの検出

各抽出液をろ紙電気泳動により分画し、硝酸銀染色により、糖類を検出した。ろ紙電気泳動により検出された物質をさらに質量分析、NMR 法によって同定した。

③ アグロシノピンのバイオアッセイ

ろ紙電気泳動により検出された物質を粗抽出後、アグロシン 84 を用いたバイオアッセイを行った。

(2) サツマイモACS相同遺伝子(*IbACS*)発現タバコにおける微生物相への影響

IbACS 高発現タバコにおける根圏微生物への影響を調査するため、コントロールタバコと *IbACS* 高発現タバコを 5 週間栽培し、根組織から、RNA を抽出した。ライブラリを作成し、次世代シーケンサーを用いメタトランスクリ

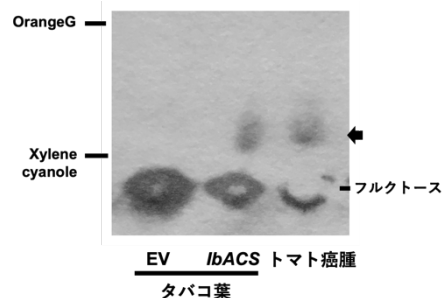


図 1. 高圧ろ紙電気泳動によるアグロシノピンの検出。

EV: コントロールタバコ葉. *IbACS*: *IbACS* 発現タバコ葉. 矢印がアグロシノピンと考えられるスポット。

プトーム解析を行った。得られた配列を比較し、*IbACS* 高発現タバコにおいて顕著に増加する微生物由来の配列を特定した。

4. 研究成果

(1) サツマイモACS相同遺伝子(*IbACS*)によるアグロシノピン合成の検証

IbACS 高発現タバコ葉抽出液およびトマト癌腫抽出液を用いて、ろ紙電気泳動を行い、糖を分画・検出した。その結果、*IbACS* 高発現タバコ葉抽出液にトマト癌腫抽出液と一致する位置にスポットが検出された(図1)。さらにこの物質を粗抽出し、Orbirtap LC-MS を用いた質量分析の結果、この物質の質量はアグロシノピンAと一致した(図2)。さらに、粗抽出サンプルをアグロシン 84 を用いたバイオアッセイに供試したところ、アグロシノピンの存在下にアグロシン 84 を同時に取り込むことによりできるアグロバクテリウム菌株の生育阻害が確認され、タバコ葉サンプルに含まれる物質がアグロシノピンである可能性が強く支持された。また、タバコ葉サンプルをさらにカラムを用いて精製し、NMR 分析を実施したところ、*IbACS* の高発現によりタバコ葉で生産された物質はアグロシノピンAであることが明らかとなった。

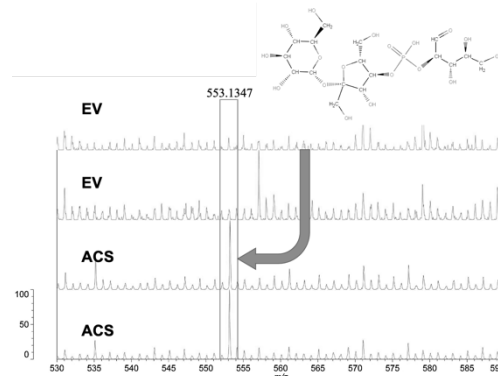


図2. 質量分析によるアグロシノピンの検出.

EV: コントロールタバコ葉.
ACS:*IbACS* 発現タバコ葉. 矢印がアグロシノピンと考えられるピーク.

(2) サツマイモACS相同遺伝子(*IbACS*)発現タバコにおける微生物相への影響

IbACS 高発現タバコにおける根圏微生物への影響を調査するため、根におけるメタトランスクリプトーム解析を行った。その結果、*IbACS* 高発現タバコで特異的に検出されるグラム陽性細菌 *Leifsonia* sp. を検出した(図3)。さらに、このグラム陽性細菌において高発現する糖トランスポーターを新たに発見した。この細菌のゲノム解析を実施し、既知の *Leifsonia* 属菌のゲノムと比較したところ、最も高いものでANI値は 87.1 であったことから、この菌株は、新種の *Leifsonia* 属菌であると考えられた。

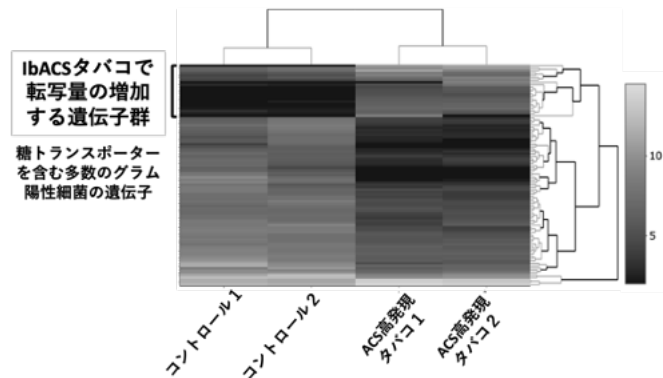


図3. *IbACS* 高発現タバコにおけるメタトランスクリプトーム解析.

さらに、*IbACS* (遺伝子のサツマイモにおける機能を明らかにするため、*IbACS* 遺伝子を破壊した変異体を CRISPR/CAS9 システムを用い作出した。3ヶ月栽培したサツマイモ品種の野生型と *IbACS* 変異体の表現形質を調査したところ、地上部、地下部ともに *IbACS* 変異体の生長が顕著に抑制されていた。このことから、*IbACS* より生産される物質がサツマイモの健全な生育に不可欠であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinjo Rina, Tanaka Aiko, Sugiura Daisuke, Suzuki Takamasa, Uesaka Kazuma, Takebayashi Yumiko, Kojima Mikiko, Sakakibara Hitoshi, Takemoto Daigo, Kondo Motohiko	4. 巻 450
2. 論文標題 Comprehensive analysis of the mechanisms underlying enhanced growth and root N acquisition in rice by the endophytic diazotroph, <i>Burkholderia vietnamiensis</i> RS1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Soil	6. 最初と最後の頁 537 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11104-020-04506-3	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 Tanaka Aiko, Kamiya Shota, Ozaki Yoshino, Kameoka Shinichi, Kayano Yuka, Saikia Sanjay, Akano Fumitake, Uemura Aiko, Takagi Hiroki, Terauchi Ryohei, Maruyama Jun ichi, Hammadeh Hamzeh Haj, Fleissner Andr?, Scott Barry, Takemoto Daigo	4. 巻 114
2. 論文標題 A nuclear protein NsiA from <i>Epichloe festucae</i> interacts with a MAP kinase MpkB and regulates the expression of genes required for symbiotic infection and hyphal cell fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 626 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14568	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 Rina Shinjo, Kazuma Uesaka, Kunio Ihara, Shunsuke Sakazaki, Katsuya Yano, Motohiko Kondo, Aiko Tanaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Burkholderia vietnamiensis</i> Strain RS1, a Nitrogen-Fixing Endophyte Isolated from Sweet Potato	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00820-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00820-18	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 Aiko Tanaka, Takamasa Suzuki, Kazuma Uesaka, Shingo Hata	4. 巻 7
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Ralstonia</i> sp. Strain SET104, Isolated from Root Nodules of <i>Aeschynomene indica</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01441-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01441-18	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 Mizuno Yuri, Ohtsu Mina, Shibata Yusuke, Tanaka Aiko, Camagna Maurizio, Ojika Makoto, Mori Hitoshi, Sato Ikuo, Chiba Sotaro, Kawakita Kazuhito, Takemoto Daigo	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotiana benthamiana RanBP1-1 Is Involved in the Induction of Disease Resistance via Regulation of Nuclear-Cytoplasmic Transport of Small GTPase Ran	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00222	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中愛子, 竹本 大吾, 鈴木 孝征, 上坂 一馬, 山口 信雄, 大谷 基泰, 中谷内 修, 荒川賢治, 田中伸和
2. 発表標題 サツマイモに見出されたAgrobacterium由来 Acs 遺伝子の機能解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aiko Tanaka, Daigo Takemoto, Takamasa Suzuki, Kazuma Uesaka, Nobuo Yamaguchi, Motoyasu Otani, Osamu Nakayachi, Nobukazu Tanaka
2. 発表標題 Accumulation of agrocinopine-like substrate in Ipomoea batatas
3. 学会等名 18th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中愛子, 竹本 大吾, 鈴木 孝征, 上坂 一馬, 山口 信雄, 大谷 基泰, 中谷内 修, 田中 伸和
2. 発表標題 サツマイモ T-DNA 由来 Acs 遺伝子のタバコにおける発現と菌叢解析
3. 学会等名 植物微生物研究会第29回研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aiko Tanaka, Daigo Takemoto, Takamasa Suzuki, Kazuma Uesaka, Nobuo Yamaguchi, Motoyasu Otani, Osamu Nakayachi, Nobukazu Tanaka
2. 発表標題 Expression of Ipomoea batatas Acs gene and its effect to root microbiome in Nicotiana tabacum
3. 学会等名 1st International Convolvulaceae Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新庄 莉奈, 田中 愛子, 近藤 始彦
2. 発表標題 Burkholderia vietnamiensis による生育促進効果の植物種間差異
3. 学会等名 植物微生物研究会第29回研究交流会
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	田中 伸和 (Tanaka Nobukazu) (50263744)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授 (15401)	
研究分担者	大谷 基泰 (Otani motoyasu) (20223860)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授 (23303)	
研究分担者	中谷内 修 (Nakayachi Osamu) (40227963)	石川県立大学・生物資源環境学部・助教 (23303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	荒川 賢治 (Arakawa Kenji)		
研究協力者	鈴木 孝征 (Suzuki Takamasa)		

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			
オーストラリア	University of Adelaide			