

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05748

研究課題名(和文)陸上植物が保有するEPR3受容体の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of EPR3 receptor in plants

研究代表者

川原田 泰之(Kawaharada, Yasuyuki)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：80786129

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)：マメ科植物のEPR3受容体は、根粒菌の細胞外分泌多糖を受容し、根粒共生を制御することが知られている。しかしながら、植物進化の過程で、いつEPR3受容体が出現し、どのように機能を獲得してきたのかは不明となっていた。そこで本研究では、様々な植物のEPR3受容体の有無を明らかにし、その進化を辿った。その結果、EPR3受容体は、菌根菌との共生に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は、様々な土壌微生物と相互作用することで病原性や共生性を機能させることが知られている。しかしながら、これらの植物が持つ微生物認知システムなどに関する機能の多くが不明となっている。そこで本研究では、LysM型受容体キナーゼの進化を辿ることで植物が有する微生物認知システムの解明に迫った。本研究の結果、LysM型受容体キナーゼの一つであるEPR3受容体は、マメ科植物と根粒菌との共生に必須なことに加えて、土壌微生物との相互作用にも重要な機能をはたすことが示唆された。このように本研究の成果は、植物の自然界での振る舞いを理解する上での重要な成果となる。

研究成果の概要(英文)：The EPR3 receptor is known to regulate the symbiotic nodulation by the recognition of extracellular polysaccharides produced by Rhizobia. However, it has remained unclear when the EPR3 receptor emerged and how they acquired their functions during plant evolution. In this study, I determined the presence of the EPR3 receptor in various plants and traced their evolution. These results suggest that the EPR3 receptor is involved in symbiosis with soil microbes.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根粒共生 マメ科植物 根粒菌 菌根菌 受容体 植物進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と土壤細菌の一種である根粒菌は、互いのシグナル因子の交換による複合的かつ高度に調和された相互作用によって宿主植物の根に新たな器官である根粒を形成する。これまでの研究から、根粒菌が合成・分泌する Nod 因子を宿主植物が LysM 型受容体キナーゼの一種である NFR1 や NFR5 受容体で受容することで、この共生シグナルが開始されることが知られている。また、根粒共生が成立する過程においても様々な相互作用が行われ、根粒菌から分泌される細胞外分泌多糖が共生シグナル因子になることや、宿主植物が他の LysM 型受容体キナーゼである EPR3 受容体を用いて、この細胞外分泌多糖を認識し共生過程を正と負に制御することが明らかとなっている。

このようなマメ科植物が保有する根粒共生相互作用に関わる特異な機能は、進化の過程で獲得した形質であり、その多くは陸上植物全般が有する他の生物との相互作用や根の発生に関わる機能を分化させてきたことが示されている。例えばマメ科植物は、陸上植物の 8 割の植物種が共生することが可能なアーバスキュラー菌根菌との相互作用に関わる遺伝子(タンパク質)を根粒菌との根粒共生に機能させるように進化させ、根粒菌と菌根菌双方の相互作用を制御できるように多機能化してきた。このようなことから、マメ科植物の根粒共生の不全を示す変異体の中には、同様にアーバスキュラー菌根菌との間でも共生不全を示すことが明らかとなっている。

上記でも挙げたように、マメ科植物と根粒菌との根粒共生の研究から明らかになった EPR3 受容体は、マメ科植物以外にも双子葉植物のトマトやイチゴ、単子葉植物のイネやソルガムなどでも保有されていることが確認されている。しかしながら、これらの植物は、根粒菌との相互作用を有さないことから、これらの EPR3 受容体の機能は不明となっている。

2. 研究の目的

マメ科植物の EPR3 受容体が根粒菌からのシグナル因子を受容・認識し、根粒共生相互作用を制御することが明らかとなっている。しかしながら、植物進化の過程で、いつ EPR3 受容体が発現し、マメ科植物ではどのように機能進化を遂げたのかは不明となっている。また、マメ科植物以外の陸上植物でも EPR3 受容体が保存されていることから、根粒共生以外の機能も有していることが予想されるが、その実体は不明となっている。そこで本研究では、公開された植物のゲノム情報から LysM 型受容体キナーゼを抽出し、系統解析などを用いて植物界に広がる EPR3 受容体の進化を、LysM 型受容体キナーゼ全体の進化と共に明らかにする。さらに、多くの陸上植物が共生可能なアーバスキュラー菌根菌と EPR3 受容体との相互関係を明らかにし、EPR3 受容体を持つ新規な相互作用メカニズムの解明を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサのゲノム情報を用いた LysM 型受容体キナーゼの抽出と分類

2010 年に Lohmann らによって、ミヤコグサから 17 の LysM 型受容体キナーゼが同定されている (Lohmann et al.: MPML., 2010)。また、2020 年には、Kamal らによってミヤコグサ Gifu 系統のゲノム配列が更新された (Kamal et al.: DNA research, 2020)。そこで、最新のゲノム情報 (*Lotus japonicus* Gifu genome version 1.2) を用いてミヤコグサの LysM 型受容体キナーゼを検索した。次に、得られた LysM 型受容体キナーゼを用いて近隣結合法、ClustalW の bootstrap value 値、そして Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation の結果を統合してクレード分類を行った。

(2) 16 種の種子植物から抽出した LysM 型受容体キナーゼの解析

LysM 型受容体キナーゼの多様化を解析するため、Poales 目、Alismatales 目、Fabales 目、Malpighiales 目、Malvales 目、Brassicales 目、Caryophyllales 目や Solanales 目から 15 種の植物を選抜し、それぞれの公開ゲノム情報から LysM 型受容体キナーゼを抽出した。同定した LysM 型受容体キナーゼとミヤコグサのゲノムから明らかとなった LysM 型受容体キナーゼを合わせて、近隣結合法、ClustalW の bootstrap value 値、そして Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation の結果を統合してクレード分類を行った。

(3) *lys8* 変異体の分離

Lys8 遺伝子は、10 のエキソンから構成されている。そこで、ミヤコグサ *lore1* 変異体集団から、*Lys8* 遺伝子の CDS 領域に *lore1* レトロトランスポゾンが挿入されていることが予想される変異体ラインを選抜し、それらのラインについて *lore1* レトロトランスポゾンの挿入確認を PCR で行いホモ変異体の選抜を行った。

(4) *epr3* 変異体の菌根菌観察

表面殺菌したミヤコグサ種子を無菌環境で発芽させ、7 日目の幼植物体を滅菌黒ボク土(リン酸非施肥土壌)と滅菌パーミキュライトを 1:2 で混合した土壌に移植した。また、移植時に *Rhizophagus irregularis* DAOM198198 (Premier Tech) の胞子を 200 粒/植物に調整し接種した。その後、これらの植物を 23℃ で 16 時間明期/8 時間暗期の条件で栽培し、適宜滅菌水を添加した。一定期間栽培後、植物根を回収して DAB 染色法によって菌根菌を染色した。菌根共生の観察

には、実体顕微鏡下で菌糸の伸長率、嚢状体の形成数や、小胞体の形成数を計測した。

(5) *Epr3* と *Lys8* 遺伝子の発現解析

pUB-GFP バイナリーベクターにミヤコグサ Gifu 系統の *Epr3*、または *Lys8* プロモーター領域（それぞれ、2.2 または、1.8 kb）と *Gus* 遺伝子を In-fusion 法 (TAKARA) を用いてクローニングした。これらのクローニング領域を *Agrobacterium rhizogenes* AR1193 を介して毛状根形質転換法によりミヤコグサの胚軸から形質転換根を誘導した。この形質転換根に根粒菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF303099 株) または、アーバスキュラー菌根菌 (*R. irregularis* DAOM198198) を接種後、一定の日数を生育させた。その後、形質転換根を回収し X-gluc を用いて GUS 染色を行い、実体顕微鏡、または、光学顕微鏡を用いて発現部位の観察を行った。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサのゲノム情報を用いた LysM 型受容体キナーゼの抽出と分類

最新ゲノム情報を用いて LysM 型受容体キナーゼを探索したところ、従来明らかとなっている 17 の LysM 型受容体キナーゼに加えて、新たに 3 つの受容体を同定することに成功し、それぞれの LysM 型受容体キナーゼを LYS8、LYS17 と LYS18 と命名した(図 1)。LYS8 受容体は、EPR3 受容体と高い相同性を示すのに対し、LYS17 と LYS18 は、ミヤコグサの他の LysM 型受容体キナーゼとは高い相同性を示さない新規性が高いことが予想された。次に、新たに同定した 3 つの受容体を含む 20 の LysM 型受容体キナーゼをクレード分けしたところ、11 のクレードに分類することができた。

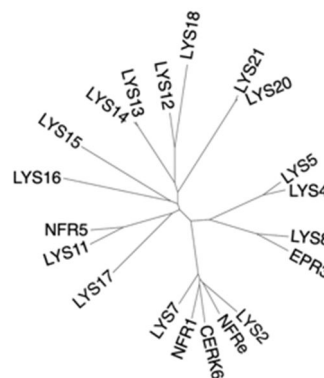


図 1. ミヤコグサの LysM 受容体キナーゼ

(2) 16 種の種子植物から抽出した LysM 型受容体キナーゼの解析

ミヤコグサと 15 の植物種から抽出された合計 193 の LysM 型受容体キナーゼを用いてクレード分けしたところ、ミヤコグサで分類された 11 のクレードを含む 14 のクレードに分類することができた(図 2)。これらのクレード分類からは、全ての種子植物が保有するクレードや、双子葉植物や単子葉植物のみが保有する特異的なクレードなどが明らかとなった。さらに、菌根菌との共生を失った植物種では、同様に複数のクレードで LysM 型受容体キナーゼの欠失が確認され、菌根菌共生と各クレード、及び LysM 型受容体キナーゼとの相関が明らかとなった。

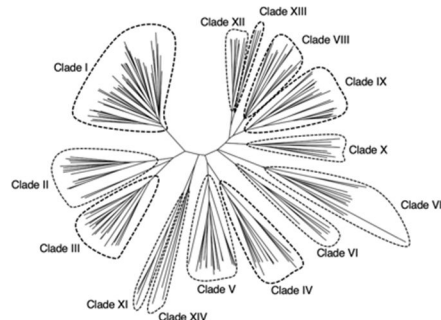


図 2. 種子植物の LysM 受容体キナーゼと各クレード

(3) *lys8* 変異体の分離

Lotusbase (<https://lotus.au.dk/>) で公開されている *lore1* レトロトランスポゾン挿入位置情報を基に、*Lys8* 遺伝子に *lore1* レトロトランスポゾンが挿入されている L00280、L02514 や、L02587 ラインを取得した。これらのラインから各 5 から 10 個体ずつ発芽させて、*Lys8* 遺伝子内に *lore1* レトロトランスポゾンの挿入を確認したところ、L00280 と L02514 ラインでは、全ての個体でヘテロに *lore1* レトロトランスポゾンが挿入されていることが確認された。また、L02587 ラインは全てが野生型を示したことから、このラインは *lys8* 変異体の選抜から外した。次に、L00280 と L02514 から種子の収穫を試みたところ、L02514 ラインでは、落花が確認されて種子を収穫することができなかった。一方、L00280 からは種子を取得することができ、次世代の植物体からホモ変異体の取得に成功し、この変異体を *lys8-1* 変異体とした。

(4) *epr3* 変異体の菌根菌観察

epr3-11 や *epr3-13* 変異体とアーバスキュラー菌根菌 (*R. irregularis* DAOM198198) との共生能を菌接種後 6、8、10 週目に観察したところ、ミヤコグサ野生株と比較して、菌糸の伸長、嚢状体の形成、そして、小胞体の形成に、優位な違いは観察されなかった。

(5) *Epr3* と *Lys8* 遺伝子の発現解析

Epr3、または *Lys8* 遺伝子プロモーターと *Gus* 遺伝子を導入した形質転換毛状根に根粒菌を接種し、14 日目に X-gluc を用いて GUS 染色を行い発色部位の観察を行ったところ、*Epr3* 遺伝子の発現は、表皮細胞や根粒内部で強く観察されたのに対し、*Lys8* 遺伝子の発現は、根粒菌非接種と相似しており、根粒形成過程における *Lys8* 遺伝子の発現誘導は観察されなかった(図 3A)。次に、各形質転換毛状根にアーバスキュラー菌根菌を接種後 10 週目に *Epr3* と *Lys8* 遺伝子の発現を観察したところ、*Epr3* 遺伝子では、菌根菌の非接種根と同じく発現誘導が観察されなかつ

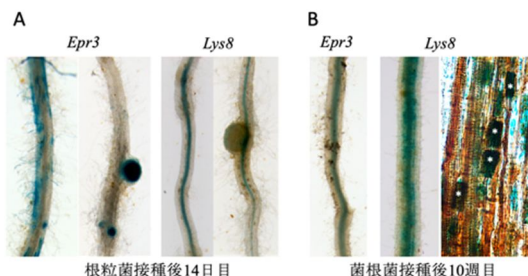


図 3. *Epr3* と *Lys8* 遺伝子の発現パターン

たのに対し、*Lys8* 遺伝子では、菌根菌を接種した根の皮層細胞で発現誘導が観察された。さらにこの発現誘導されている組織を同定するために、菌根菌の染色を行ったところ、成熟した嚢状体が形成された細胞で発現が誘導されていることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 川原田 泰之	4. 巻 58
2. 論文標題 宿主特異性をもたらす根粒共生の多様性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 461-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.461	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 Kawaharada Yasuyuki, Sandal Niels, Gupta Vikas, Jin Haojie, Kawaharada Maya, Taniuchi Makoto, Ruman Hafijur, Nadzieja Marcin, Andersen Kasper R., Schneeberger Korbinian, Stougaard Jens, Andersen Stig U.	4. 巻 230
2. 論文標題 Natural variation identifies a Pxy gene controlling vascular organisation and formation of nodules and lateral roots in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2459 ~ 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17356	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hafijur Ruman, Masanori Saito, Yasuyuki Kawaharada
2. 発表標題 Classification of Lysin motif receptor like kinase (LYM-RLKs) in seed plants
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原田泰之
2. 発表標題 植物が保有するLYM型受容体キナーゼの進化
3. 学会等名 植物微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川原田泰之
2. 発表標題 根粒形成におけるマメ科植物と根粒菌が持つ互いの宿主範囲
3. 学会等名 植物の栄養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhei Chiba and Yasuyuki Kawaharada
2. 発表標題 Characterization of novel host specificity in the nodule symbiosis between Lotus spp. and Rhizobium sp.
3. 学会等名 IPFS Young Researcher Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原田 泰之、谷内 慎、米倉 令恵、千葉 悠平
2. 発表標題 マメ科植物の根粒共生過程で機能する宿主特異性メカニズムの解析
3. 学会等名 第85回日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuhei Chiba, Sachiko Masuda, Arisa Shibata, Ken Shirasu, Yasuyuki Kawaharada
2. 発表標題 Preparation for identification of a gene regulated host specificity in the nodule symbiosis in Lotus spp.
3. 学会等名 第1回 超分野植物科学研究会
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
---------	---------