

機関番号： 82112
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21780043
 研究課題名（和文） マメ科植物－根粒菌共生における防御応答制御機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis of the role of defense mechanisms in the legume-rhizobia symbiosis.
 研究代表者
 中川 知己（NAKAGAWA TOMOMI）
 （独）農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット 任期付研究員
 研究者番号： 90396812

研究成果の概要（和文）：

マメ科植物の根には根粒菌と呼ばれる土壌細菌が感染して根粒が形成される。根粒内では根粒菌が大気から窒素栄養を作出して植物に供給する。これによりマメ科植物は窒素栄養を含まない土壌においても旺盛に生育する。土壌中には多くの病原菌が存在しており、有益な根粒菌をマメ科植物が選別して共生する仕組みには未解明な部分が多く存在する。申請者は根粒菌識別に不可欠な NFR1 遺伝子が、防御応答を担うキチン受容体から進化したことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Nitrogen-fixing symbiosis between legumes and rhizobia is initiated by the recognition of rhizobial Nod factors (NFs) by host plants. NFs are diversely modified derivatives of chitin oligosaccharide, a fungal elicitor that induces defense responses in plants. Recent evidence has shown that both NFs and chitin elicitors are recognized by structurally-related LysM-receptor kinases. Here, we demonstrated that NF receptors are evolved from the chitin receptors with limited alterations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物微生物間相互作用

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：共生、病理学、植物微生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

根粒菌が分泌する Nod ファクター(以下 NF)は共生の開始シグナルであり、根粒菌共生時に観察される現象の大部分を NF 処理のみで誘導することができる。NF はキチンを基本骨格として非還元末端側に脂肪酸残基が結合しており、宿主植物はこの脂肪酸残基を含めた様々な修飾の違いを認識して特定の

根粒菌のみと共生を行う。2003 年に NF の受容体である NFR1 が、LysM 型キナーゼであることが報告されている。

一方でキチンはカビなどの菌類の細胞壁成分であり、キチンオリゴマーは植物に防御応答を誘導するエリシターとして研究されている。最近になってキチン受容体である CERK1 が単離され、NFR1 と非常によく似た構

造をしていることが明らかとなった。

申請者は根粒菌の分泌する共生開始シグナルである Nod ファクターが、宿主植物に一過的な防御応答を誘導することを明らかにしていた。さらに共生初期シグナル伝達系を構成する因子が、この防御応答に対して抑制的に働くことを見いだしていた。これらの独自の発見から、植物は共生菌を認識して一過的に防御応答を作動させるが、共生シグナル伝達の進行により共生菌であることが確認できた時点で防御応答を抑制して受け入れることが予想された。

2. 研究の目的

根粒菌共生に必須の受容体である NFR1 が、なぜ防御応答を誘導するのかを明らかにする。また誘導された防御応答は根粒菌共生にとって負に働くと予想されるが、実際は一定時間経過後に速やかに抑制される。このメカニズムについても明らかにする。

3. 研究の方法

Nod ファクター受容体である NFR1 は、キチン受容体である CERK1 と、特に細胞内キナーゼドメインが非常によく似ているが、それぞれ防御と共生という逆の生理応答を誘導する。また過去のバイオインフォマティクスによる解析から、NFR1 と CERK1 は同祖遺伝子である可能性がしめされている。

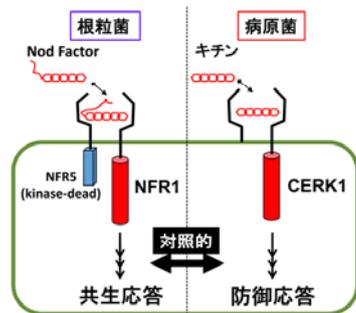


Fig.1 NFR1 と CERK1 は対照的な生理応答を誘導する

また Nod ファクターを受容した NFR1 は、一過的に防御応答を誘導するが、その後は NFR1 下流の共生遺伝子群により防御応答が抑制されることが判っている。これまでの解析から、防御応答の抑制には菌根菌共生にも必要であることが報告されている CSP 遺伝子群 (代表的例: CCaMK 遺伝子) が関与するが、CSP 下流の根粒菌共生のみに関与する遺伝子群 (代表例: NSP2 遺伝子) は関与しないことが判っている。

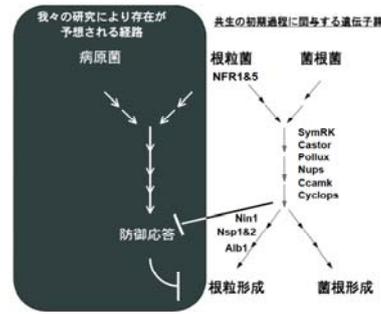


Fig.2 共生遺伝子群による防御応答の抑制

(1) NFR1 および CERK1 のキメラ遺伝子を使ってミヤコグサ *nfr1* 変異体の相補実験を行うことで、それぞれの細胞内キナーゼドメインの共生応答の誘導に必須の領域を調べた。

(2) *ccank* 変異体では共生応答や防御応答の誘導に関与する経路は機能しているが、抑制に関与する経路は機能していない。また *nsp2* 変異体では、共生応答に関与する経路は機能していないが、防御応答の誘導や抑制に関与する経路は機能している。マイクロアレイを用いて、野生型ミヤコグサ、*ccank* 変異体、*nsp2* 変異体の Nod ファクター応答遺伝子群を網羅的に解析することで、防御応答の誘導および抑制に関与する NFR1 の下流因子の同定を試みた (下図)。



4. 研究成果

(1) 上述のように NFR1 と CERK1 の細胞内ドメインは高い相同性を持つ。しかし NFR1 の細胞外ドメインに AtCERK1 の細胞内ドメインを接続したキメラ遺伝子 NFR1-AtCERK1 は、*nfr1* 変異体の根粒菌共生の表現型を相補しなかった (Fig. 3)。そこで NFR1 と AtCERK1 のスワッピング実験により NFR1 の共生応答に必須の領域を同定したところ、一般的にキナーゼの活性に重要な役割を果たすことが知られているアクチベーションループ近傍の 3 アミノ酸の配列 (YAQ) が共生に必要なことが明らかとなった。実際、この領域を導入した NFR1-AtCERK1-YAQ は、*nfr1* 変異体の根粒共生不全の表現型を相補した (Fig. 4)。過去にマメ科植物および非マメ科植物の包括的なゲノム解析から、NFR1 と CERK1 は LysM-RK の中でも特に配列が類似しており、マイクロシンテニーなどから同祖遺伝子であることが示唆されている (Zhu et al., 2006)。したがって NFR1 はキチン受容体から進化した

と考えられる。

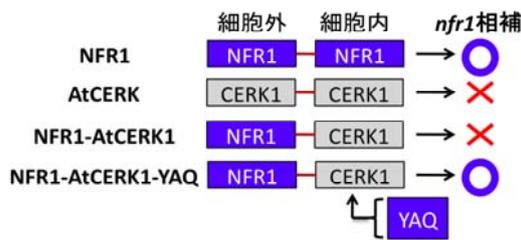


Fig. 3 ミヤコグサ *nfr1* 変異体の共生表現型の相補実験

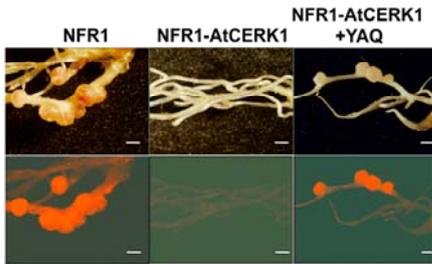


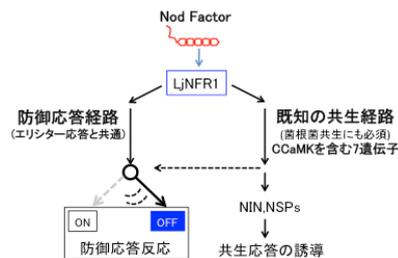
Fig. 4 *nfr1* 変異体の DsRed ラベル根粒菌を用いた相補実験

NFR1 は病原菌を含む多種多様な微生物の中から根粒菌を識別するために必須であり、共生応答の誘導に決定的な役割を果たしている。上述のように申請者は、キチン受容体が細胞内キナーゼドメインに YAQ の 3 アミノ酸の配列を獲得することで、NFR1 へと進化した可能性が高いことを明らかにした。したがって YAQ 配列の獲得は植物が根粒菌に対して、排除から受容して共生することに戦略を大きく転換した決定的なイベントであると考えられる。

(2) NF処理により誘導される防御応答の誘導、およびその抑制のメカニズムを調べるために、野生型ミヤコグサと *ccamk* 変異体のNF応答を、マイクロアレイを用いて調べた。その結果、*ccamk* 変異体で野生型植物より3倍以上強く誘導される遺伝子には、WARKYやERFなどの防御応答に関与する転写因子が多く含まれていた。また *ccamk* 変異体で強く誘導される遺伝子(つまり野生型植物ではCCaMK が抑制している遺伝子)の96%がキチンやフラジェリンにより誘導される防御応答遺伝子であった。一方でCCaMK に依存して誘導される遺伝子の67%が共生特異的であった。したがってCCaMK を介した共生シグナルは、これまで知られていた共生反応の開始だけでなく防御応答の抑制にも寄与していることが明らかとなった。

本研究により根粒菌共生に必須の NF 受容体である NFR1 は、微生物を感知して排除す

るキチン受容体から進化した可能性が高いことが示された。またNFを受容したNFR1は防御応答遺伝子の発現を誘導するが、同時に起動する共生シグナルがCSPを介してこれを抑制することが明らかとなった。根粒菌共生の開始時に一過的に防御応答が誘導されることは宿主植物が共生菌を能動的に受容することと一見矛盾しており、NFR1がキチン受容体から進化したと考えられることから、先祖遺伝子であるキチン受容体の名残である防御応答の誘導をCSPが消去していると考えられることもできる。しかし根粒菌は分類学的に植物病原菌であるアグロバクテリウムと非常に近縁(同じRhizobium属)であり、共生プラスミド-病原性プラスミドがお互いに伝播されることも報告されていることから、申請者は一過的な防御応答経路の活性化が共生に必須である可能性があると考えており、今後検証を行う予定である。また本研究により、根粒菌と菌根菌の両方の共生に必須のCSP遺伝子群が防御応答の抑制に関与している可能性が示された。菌根菌共生はアブラナ科やアカザ科を除くほとんどの単子葉-双子葉植物で観察されており、CSPは多くの高等植物で機能していると考えられる。根粒菌や菌根菌以外の共生微生物についてはあまり研究が進んでいないために、CSPが他の植物-微生物間の共生に関与しているかどうかは現時点で不明である。しかしCSPによる共生時の防御応答の抑制機構を解明することで、植物が有用微生物と共生するための普遍的なメカニズムが明らかになる可能性が高いと申請者は考える。



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2件)

- 1) Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, Yazaki K, Aoki T, Shibuya N, Kouchi H

From defense to symbiosis: Limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium

symbiosis. Plant J. 65, 169-180 (2011)

- 2) Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M

How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. Plant and Cell Physiology 51, 1381-1397 (2010)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 中川知己

「宿主植物から見た生物間相互作用」“共生における植物のセキュリティシステム”
日本植物学会 2010 年度年会シンポジウム
2010 年 9 月 10 日、中部大学で発表

- 2) 中川知己

「防御と共生：植物—微生物相互作用に見る普遍性と特殊性」“抵抗性から共生へ：Nod Factor 受容体の分子進化”
日本植物生理学会 2009 年度年会シンポジウム
2010 年 3 月 21 日、熊本大学で発表

- 3) 中川知己

“ミヤコクサにおける Nod Factor シグナリングとキチンシグナリングの比較解析”
第 19 回植物微生物研究会
2009 年 9 月 10 日、松本市あがたの森文化会館で発表

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

中川 知己

(独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・任期付研究員)

研究者番号：90396812

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし