

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688007

研究課題名(和文) 防御応答メカニズムを利用して成立したマメ科植物-根粒菌共生の進化プロセスの検証

研究課題名(英文) From defense to symbiosis; evolution processes of plant symbiotic receptor

研究代表者

中川 知己 (Nakagawa, Tomomi)

明治大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：90396812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円、(間接経費) 5,910,000円

研究成果の概要(和文)：微生物と共生する植物は病原菌を排除しながら共生菌を受け入れなければならない。我々は以前に、マメ科植物において根粒菌との共生プログラムを起動する役割を果たすNFR1が、糸状菌のキチンを認識して防御応答を起動するCERK1から進化したことを明らかにした。

本研究で我々は多くの非マメ科植物が持つCERK1が、防御応答だけではなく菌根菌共生にも関わっていることを明らかにした。菌根菌共生およびキチン防御応答は、最初の陸上植物であるコケ植物でも観察されるので、CERK1の二面的機能は陸上植物の進化の過程で共生と防御が密接に関わっていたことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Plant pathogens have been rapidly evolving their strategy for infection and developing many virulence agents for perturbing host immune system. Thus, plants are constantly exposed to threats from pathogenic microbes in nature. On the contrary, subsets of microbes such as arbuscular mycorrhizal (AM) fungi or rhizobial bacteria symbiotically promote the host plant growth. How plants manage the acceptance of beneficial microbes while rejecting pathogens is a crucial question for understanding the plant-microbe interactions. However, this question has been rarely approached and the answer is still missing. Here, we report that a chitin receptor kinase, OsCERK1, engages in both triggering plant immune responses and acceptance of beneficial AM fungi in rice. These findings illuminate the presence of direct connection between plant defense and symbiotic mechanisms for the first time and are expected to be a breakthrough for this field.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：共生 防御応答 菌根菌 イネ 植物微生物間相互作用 分子進化

1. 研究開始当初の背景

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。根粒では植物が光合成産物の提供などを行う一方で、根粒菌は大気中の窒素ガスをアンモニアに還元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。一方、一般に植物は病原菌の侵入を感知すると防御機構が作動して排除する。根粒菌が排除されずに受容される仕組みについては、長年興味を持たれているものの研究がほとんど進んでいない。

根粒菌が分泌する Nod Factor(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植物応答の大部分を 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おり、非還元末端側に脂肪酸残基が結合した構造を持つ。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、特定の根粒菌とだけ共生を行う。一方でキチン自体はカビなどの菌類の細胞壁成分であり、植物に防御応答を誘導するエリターとして研究されている。NF 受容体である NFR1 およびキチン受容体である CERK1 が相次いで同定されており、お互いに高い相同性を持つ LysM 型受容体キナーゼ(LysM-RK)であることが明らかとなっている。我々はミヤコグサの NFR1 とシロイヌナズナ CERK1 を機能解析することで、NFR1 のキナーゼドメインにはシロイヌナズナ CERK1 には存在しない 3 アミノ酸の YAQ 配列が存在しており、これが根粒菌に対する共生応答に重要な役割を果たすことを明らかにした。根粒菌共生はマメ科植物に限定されているが、キチン防御応答は双子葉および単子葉植物で一般に観察される。したがってマメ科植物においては、祖先の CERK1 遺伝子がキナーゼドメインに 3 アミノ酸の YAQ 配列を獲得することで NFR1 に分子進化したことが推測された (Fig. 1; Nakagawa et al., 2011)。しかし CERK1 が防御応答から共生応答という全く正反対の生理機能をもつ分子種に進化した理由は明らかになっていなかった。

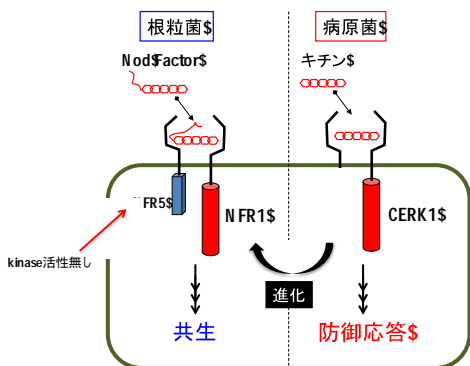


Fig.1 NFR1はキチン受容体から進化した

2. 研究の目的

CERK1 から NFR1 への進化の過程やその

意義を解明することで、根粒菌共生にどのように防御応答が関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

データベース解析により様々な植物の CERK1 遺伝子の配列を解析した。これらの解析に用いた CERK1 をそれぞれの植物からクローニングして、その細胞内キナーゼドメインの根粒菌共生における共生応答誘導能力を検証した。またイネの OsCERK1 遺伝子破壊株を作製して、菌根菌共生に対する影響を調べた。

4. 研究成果

マメ科植物はジャケツイバラ亜科、ネムノキ亜科、マメ亜科に細分されるが、最も古く分岐したジャケツイバラ亜科の 80%は根粒菌共生を行わない。一方でネムノキ亜科やマメ亜科では 80%以上の植物が根粒菌共生を行う。したがってこれらの植物の CERK1 の間で YAQ 配列の有無による差が存在すると予想された。しかし研究開始当初に報告されたイネのキチン受容体 OsCERK1 において YAQ に類似した YAR 配列が発見され、さらに非マメ科の様々な植物の CERK1 において、YAQ および YAR 配列が存在することが明らかとなった。一方でシロイヌナズナと同じアブラナ科の白菜の CERK1 は YAQ 配列を持っていない。したがって共生応答に重要な YAQ 配列はマメ科植物だけではなく、アブラナ科以外の多くの植物にも保存されていることが明らかとなった (Fig. 2)。

Lotus NFR1	DFGLTKLIEVGNST--LQT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDISP
Medicago LYK3	DFGLTKLIEVGNST--LHT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
Pea Sym37	DFGLTKLIEVGNST--LHT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
Poplar	DFGLTKLIEVGNST--LHT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
R.communis	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
Tomato	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
Grape	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RLVGTFGYMPPEYAQYGDVSP
OsCERK1	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RVVGTFGYMPPEYARYYGDVSP
Sorghum	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RVVGTFGYMPPEYARYYGDVSP
Maize	DFGLTKLIEVGNST--LPT---RVVGTFGYMPPEYARYYGDVSP
AtCERK1	DFGLTKLIEVGNST--LPT---TRGAMGTFGYMAPEIV--YGEVSAK
B. Napus	DFGLTKLIEVGNST--LPT---TRGAMGTFGYMAPEIV--YGEVSAK

Fig.2 共生応答の起動に重要な YAQ/YAR 配列が、非マメ科植物の CERK1 ホモログにも保存されている。

非マメ科植物の CERK1 にも YAQ/YAR 配列が保存されていたことは、これらの非マメ科植物 CERK1 が根粒菌以外の微生物との共生に関与している可能性を示唆している。そこで我々は陸上植物の大部分(約 80%以上)と共生するが例外的にアブラナ科の植物とは共生しない菌根菌との共生に着目して、CERK1 がこの共生に関与しているとの仮説を立てた。

これを検証するために我々は、農業生物資源研究所の西澤洋子博士らが作出したイネ OsCERK1 破壊株を用いて、菌根菌共生に対する影響を調べた。その結果、oscerk1 変異体では菌根菌の感染が破綻していることが明らかとなった (Fig. 3)。

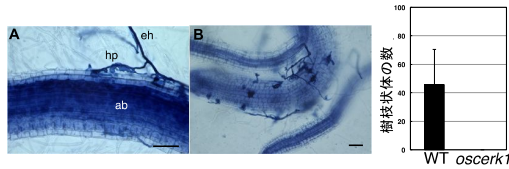


Fig.3 菌根菌は野性型イネ(A)の根に共生するが、*cerk1*変異体(B)では根の組織内に感染できない。eh: 外生菌糸、hp: 付着器、ab: 細胞内の共生構造。(C) 樹状体を形成している感染ユニットの数。

一方でイネにおいて *OsCERK1* と受容体複合体を形成してキチンを認識して防御応答を誘導する *OsCEBiP* の遺伝子破壊株 *oscebiP* では正常な菌根菌共生が観察された。したがってキチン防御応答ではなく *OsCERK1* が菌根菌共生に必須であることが明らかとなった (Fig. 4)。

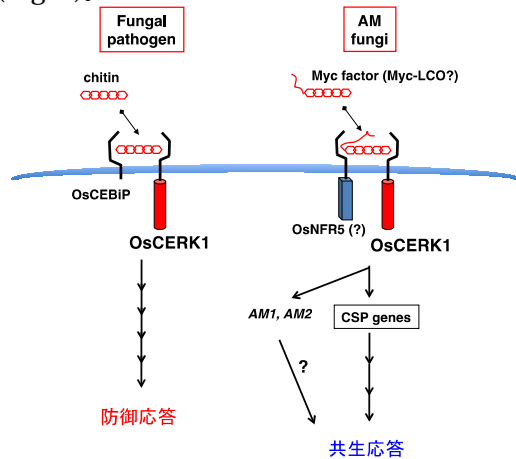


Fig.4 *OsCERK1*は防御応答と共生応答の両方で機能している。

イネ以外の非マメ科植物の *CERK1* の共生応答誘導能力を調べるために、トマト (YAQ)、トウゴマ、ソルガム、白菜などの *CERK1* をクローニングして、これらの細胞内キナーゼドメインをミヤコグサの *NFR1* 細胞外ドメインに接続したキメラ遺伝子を、ミヤコグサの *nfr1* 変異体に導入した。ミヤコグサ *nfr1* 変異体は NF に対する応答が完全に破綻してお

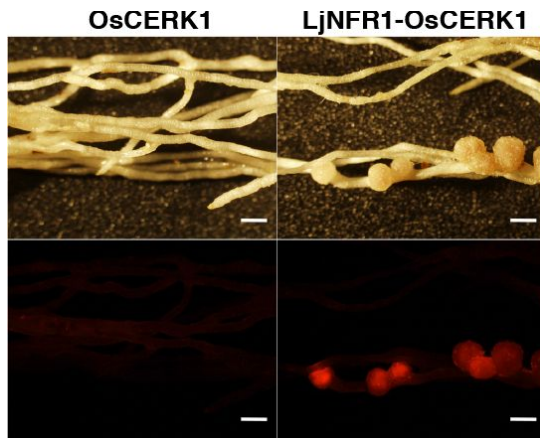


Fig.5 YAQ/YAR配列を持つ非マメ科 *CERK1* のキナーゼドメインは根粒共生を起動できる。り、根粒菌が全く感染できない表現型を示す。

しかし YAQ や YAR を持つ *CERK1* のキメラ遺伝子を導入した形質転換体は、根粒菌が感染して正常な根粒形成を示した。また *OsCERK1* の細胞内ドメインを用いたキメラ遺伝子も *nfr1* 変異体を完全に相補した (Fig. 5)。これらの結果は、イネ以外の YAQ/YAR 配列を持つ非マメ科 *CERK1* 遺伝子も共生応答を起動する能力があり、菌根菌共生に関与している可能性が高い。

以上の結果からマメ科植物の *NFR1* は、菌根菌共生で機能していた先祖 *CERK1* 遺伝子が、その細胞外ドメインを根粒菌の NF を認識できるように変化させて進化したものだと考えられる。その一方で菌根菌共生を行わないアブラナ科では、*CERK1* が YAQ/YAR 配列を欠損して防御応答専用の *CERK1* へと進化したと予測される (Fig. 6)。

CERK1 は糸状菌の細胞壁成分キチンを認識して防御応答を起動する受容体として同定された。その後の解析から *CERK1* は、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを受容して防御応答を起動するなど、植物の防御応

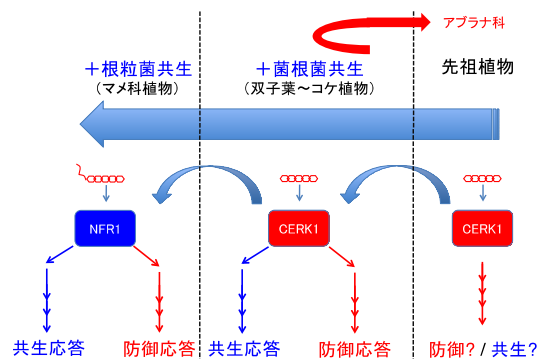


Fig.6 菌根菌共生で機能していた *CERK1* が根粒菌共生において転用されて *NFR1* へと進化した。

答の中心的な役割を担っていることが指摘されている。実際に病原菌側の解析からも、*CERK1* の分解や *CERK1* 下流シグナルの攪乱を起こす病原性因子が発見されており、防御メカニズムにおける *CERK1* の重要性を裏付けている。その一方で我々の発見は、*CERK1* が病原菌の排除とは全く逆の、共生菌の受け入れにも関わっていることを明確に示している。

CERK1 は多くの植物で 1 コピーまたは非常に少数の相同性遺伝子しか持たないことが示されており、菌根菌共生やキチン防御応答も多くの植物で観察されている。したがって *CERK1* の防御と共生における二面性は陸上植物進化のかなり早い段階から維持されている可能性が考えられる。しかしその一方で、共生と防御応答という生理学的に真逆の機能を *CERK1* が同時に獲得したとは考え難い。

菌根菌共生は最初の陸上植物とされるコケ植物で成立したとされており、同一の菌株がコケやシダ、裸子、被子植物に感染して共生する。菌根菌共生や防御応答の分子メカニズムの解析は現時点で被子植物の一部に限定されているが、原始の植物のメカニズムが

明らかになれば、CERK1 の二面的な機能がどのように進化してきたのかを明らかにできる。コケ植物は原始の陸上植物の性質を反映していると期待されるが、現在モデルとして整備されているヒメツリガネゴケやゼニゴケは、例外的に菌根菌共生を行わない。そこで我々は菌根菌が感染するフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea* var. *diptera*) を新たなモデル植物として整備を開始した。現時点で次世代シーケンスにより、CERK1 や既知の菌根菌共生遺伝子の大部分のホモログがフタバネゼニゴケにも存在することを確認している。

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 5 件)

“Two distinct EIN2 genes cooperatively regulate ethylene signaling in *Lotus japonicus*.” Miyata K., Kawaguchi M. and Nakagawa T. **Plant Cell Physiology** 誌 (査読有り)・54 巻・1469 - 1477 ページ・2013 年

“Discriminative phytoalexin accumulation in *Lotus japonicus* against symbiotic and non-symbiotic microorganisms and related chemical signals.” Masai M., Arakawa M., Iwaya K., Aoki T., Nakagawa T., Ayabe S. and *Uchiyama H. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 誌 (査読有り)・77 巻・1773 - 1775 ページ・2013 年

“Expression and functional analysis of a *CLV3*-like gene in the model legume *Lotus japonicus*” Okamoto S, Nakagawa T., Kawaguchi M., **Plant Cell Physiology** 誌 (査読有り)・52 巻・1211-1221 ページ・2011 年

“The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation.” Krusell L, Sato N, Fukuhara I, Koch BE, Grossmann C, Okamoto S,

Oka-Kira E, Otsubo Y, Aubert G, Nakagawa T., Sato S, Tabata S, Duc G, Parniske M, Wang TL, Kawaguchi M, * Stougaard J., **Plant Journal** 誌 (査読有り)・65 巻・861-871 ページ・2011 年

“防御から共生へ 根粒菌の共生シグナルを認識する Nod ファクター受容体 NFR1 は、キチン受容体から進化した!” 中川知己 **化学と生物** 誌 (査読無し)・49 巻・660-662・2011 年

[学会発表](計 15 件)

“Trick or Treat? 植物の微生物に対する防御と共生のメカニズム” 中川知己 明治大学科学技術研究所公開講演会 (2013)

“植物-微生物間相互作用における抵抗性から共生への進化のメカニズム” 中川知己 第 86 回日本細菌学会総会シンポジウム

“LjEIN2-1・LjEIN2-2 を介したエチレンシグナリングによる根粒形成の制御” 宮田佳奈, 川口正代司, 中川知己 第 23 回植物微生物研究会

“原始的な共生と防御のモデル植物、フタバネゼニゴケの整備状況” 中川知己, 古崎利紀, 榊原恵子, 石崎公庸, 緒方法親, 宮本綾乃, 石井一夫, 嶋村正樹, 賀来華江, 河内孝之, 渋谷直人 第 23 回植物微生物研究会

“陸上植物における菌根菌共生メカニズムの進化を探る～昨日の友は今日も友?” 中川知己 2013 年日本土壌肥料学会

“LysM 型受容体キナーゼの機能解析から見えてきた植物防御-共生応答の進化” 中川知己, 宮田佳奈, 古崎利紀, 香西雄介, 小澤憲二郎, 石井一夫, 梅原洋佐, 宮本綾乃, 小八重善弘, 秋山康紀, 賀来華江, 西澤洋子, 渋谷直人 第 55 回日本植物生理学会

“フタバネゼニゴケにおけるキチン防御応答遺伝子の発現解析” 宮本綾乃, 古崎利紀, 榊原恵子, 石崎公庸, 緒方法親, 石井一夫, 嶋村正樹, 賀来華江, 河内孝之, 渋谷直人, 中川知己 第 55 回日本植物生理学会

“ミヤコグサの EIN2 遺伝子を介したエチレンシグナリングと根粒形成の制御” 宮田佳奈, 川口正代司, 中川知己 第 55 回日本植物生理学会

“植物-微生物間相互作用における抵抗性から共生への進化のメカニズム” 中川知己 第 86 回日本細菌学会シンポ

ジウム

“ Arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Marchantia paleacea* var. *diptera*: Tracing the evolutionary origin of symbiotic plant-microbe interaction. ”

Tomomi Nakagawa *Marchantia* workshop 2012 シンポジウム

“ フタバネゼニゴケが紐解く植物-微生物間相互作用の進化の歴史~防御と共生の起源を探る~ ” 中川知己 日本植物生理学会 2012 年度シンポジウム

“ 防御から共生へ: 病原菌と共生菌に対する植物応答メカニズムの進化プロセスの検証 ” 中川知己 東北大学公開セミナー

“ 植物-微生物共生の進化の原点を探るためのモデル植物、フタバネゼニゴケ ” 中川知己 広島大学公開セミナー

“ 協調する? 敵対する? 病理学的な視点から見てきた植物-微生物共生メカニズムの進化 ” 中川知己 植物微生物研究会 2011 年度若手の会シンポジウム

“ 防御から共生へ: LysM 型受容体キナーゼの分子進化が可能にしたマメ科植物-根粒菌共生 ” 中川知己 筑波大学公開セミナー

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 知己 (NAKAGAWA TOMOMI)

明治大学研究・知財戦略機構・研究推進員

研究者番号: 90396812