

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770050

研究課題名(和文) 共生体感染により変動する共生遺伝子制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of symbiotic signaling networks of arbuscular mycorrhiza and root nodule symbiosis.

研究代表者

武田 直也 (TAKEDA, Naoya)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・助教

研究者番号：60571081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生育促進に大きく貢献する菌根共生・根粒共生において、共生菌の感染不全を示す変異体の表現型解析、トランスクリプトーム解析から共生機構を明らかとした。また、菌根共生遺伝子プロモーターのシス領域に結合する共生因子の解析では、RNAiによる発現抑制変異体、トランスポゾンによる破壊株の解析、トランスクリプトーム解析やChIPSeq解析から、この因子の共生における機能とともに、菌根共生以外の機能も持つことが推定された。

研究成果の概要(英文)：Arbuscular mycorrhiza (AM) is a plant-fungal interaction that confers great advantages for the host plant growth. Here we investigated AM phenotypes of AM mutants cerberus and nsp1 and revealed novel regulation mechanisms of AM fungal infection. Transcriptome analysis of these mutants indicated that gibberellin (GA) signaling affects AM fungal infection in the host root. Detailed analysis of GA effect on AM revealed that GA signaling integrated into symbiotic signaling and regulates symbiosis gene expression. We also analyzed RAMI1 that had been isolated as a transcriptional regulator that binds to AM specific cis element. Analysis of RAMI1 indicated that RAMI1 has important roles not only in AM but also in root nodule symbiosis and non-symbiotic physiological functions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物微生物相互作用 共生 アーバスキュラー菌根共生 根粒共生

1. 研究開始当初の背景

一部の植物は光合成産物と引き換えにアーバスキュラー菌根菌(以下、AM菌)との「AM共生」によりリン、根粒菌との「根粒共生」により窒素を効率的に得ることができ、この共生栄養供給は植物の生育・環境適応に大きく貢献している。AM菌は植物の根に侵入し、植物細胞内に形成した樹状の共生器官「樹枝状体」を通して栄養交換を行うAM共生を成立させる。さらに、マメ科植物で見られる根粒共生は、宿主におけるAM共生システムの一部を共有することで成立し、共生器官「根粒」に侵入した根粒菌の窒素固定能を利用して窒素源を得ることができる。

AM・根粒共生で共有されるシステムは、共生体の認識から感染の過程で見られ、共生シグナル分子構造の類似や共生遺伝子の共有、それらによって誘導される共生応答反応など多岐にわたり、申請者もこの共通機構の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、この共生栄養供給効果をもたらす共生微生物の宿主への感染機構についての解析を行い、生物間相互作用により異種生物を体内に受容する分子機構の解明を目的とした。申請者はこれまでの研究で、共生体の感染阻害を示す変異体や共生転写抑制因子を同定していた。これらの表現型解析とともに、これらが示すAM・根粒共生体の感染異常を反映した遺伝子発現プロファイルを取得・解析することで、感染進行の各ステージで鍵となる共生因子の同定と、それらの制御ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では新たな共生因子の同定と、その制御システムを解明することを目的として、申請者が同定した新奇変異体と共生転写抑制因子を起点とした解析を行う。

新奇共生変異体や転写抑制因子RAMIの過剰発現体・抑制体での表現型解析やトランスクリプトーム解析をAM・根粒共生の両面から行い、感染異常を示す表現型を反映した各感染進行ステージでの発現プロファイルとRAMIによるシス-トランス制御系を明らかにする。これらの情報をもとに、共生体感染の各ステージで鍵となる共生因子を同定し、その発現解析やプロモーター解析から得られる知見を総合することで共生遺伝子制御ネットワークの全体像を明らかとしていく。

4. 研究成果

A. 共生変異体 *nsp1*, *cerberus* の解析

共生変異体 *nsp1*, *cerberus* はそれぞれに異なるAM感染阻害表現型を示すことが表現型解析から明らかとなった。この解析から推定・解明されたAM共生と根粒共生における感染制御機構についての報告を行った(発表論文1,3)。この解析では、*nsp1*, *cerberus* 変

異体の感染阻害が植物体表皮での侵入、皮層内伸長(図1)で生じており、それぞれの部位で共生菌感染を制御する機構の存在が明らかとなった。これらの変異体では既知のAM共生変異体では発現誘導が起こらない共生マーカー遺伝子のほぼすべてが誘導され、初期の共生シグナル伝達には異常がないことが分かった。このことから *nsp1*, *cerberus* は、これまでの報告より後期あるいはまったく異なる機構で共生菌感染制御を担う因子であることが明らかとなった。

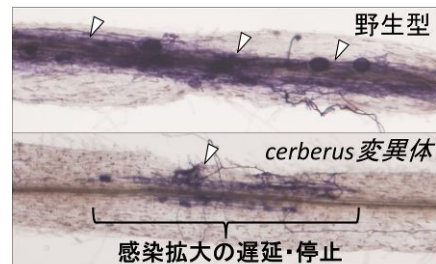


図1. *cerberus* 変異体の感染表現型

野生型と比較して感染拡大の遅延・停止がみられ、宿主皮層における菌糸伸長機構の存在が明らかとなった。

B. ジベレリンシグナルによるAM菌感染制御

nsp1, *cerberus* 変異体の共生時、非共生時におけるトランスクリプトーム解析から、両共生変異体においてジベレリン(GA)合成遺伝子群の発現異常がみられた。このことから、両共生体を示すAM菌感染阻害表現型とGAシグナルとの関連が示唆され、GAシグナルのAM共生における機能解析を行った。その結果、AM共生においてGA合成促進とGA濃度の上昇がみられ、宿主根内でのAM菌菌糸の分岐促進に貢献することが分かった。これまでの研究でGAは共生菌の感染において負の作用を持つことは知られていたが、本研究ではGAが共生において正の作用も持つという新たな側面を明らかとすることができた。さらに、GAシグナルは共生シグナル伝達経路に干渉し、共生遺伝子発現を抑制、あるいは促進・維持することで、表皮においては負の作用、皮層においては正の作用をもつことを示していることも明らかとなった。この研究成果について現在、論文として投稿中である。

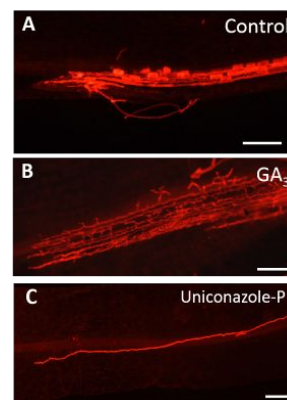


図2. GAによる宿主内菌糸分岐の変化
コントロール(A)と比較して、GA添加(B)では菌糸分岐が促進され、逆にGA合成阻害剤(C)により、菌糸分岐の抑制がみられた。
Bar = 200 μm.

C. AM 共生転写因子 RAMI の解析

AM 共生遺伝子プロモーターのシス領域に結合する因子 RAMI1 の解析では、RNAi による発現抑制変異体、トランスポゾンによる破壊株を取得し、ホモログ RAMI2 とともに、これらの表現型解析を中心に解析を行った。現在のところ、AM 共生においては明確な表現型は得られていない。これはこれらの2つのホモログによる遺伝子重複が原因であることが考えられ、RAMI2 で作成した RNAi 抑制体との交配により、RAMI1/2 双方を抑制・破壊した植物体での表現型解析を進めている。一方、根粒共生においては *rami1* 変異体、*RAMI2* 抑制体において根粒形成に阻害がみられ、両遺伝子の根粒共生への関与が示唆された。そのため、AM 共生とともに根粒形成における機能も見据えた解析を行っている。また、ChipSeq 解析やトランスクリプトーム解析から、RAMI1 は共生遺伝子以外の遺伝子制御機能を持つことも示唆されており、これらの解析から、RAMI が転写制御ネットワークに与える影響について、さらに詳細な解析を行う予定である。

本研究によって NSP1、CERBERUS、RAMI1 が担う共生機構はそれぞれ異なる部位・時期で働くことがわかってきた。そのため感染制御に共生遺伝子の制御ネットワークも感染の進行段階にあわせて多岐にわたると考えられる。一方で、GA による共生シグナルへの干渉は、表皮・皮層で逆の効果を持つが、その表皮・皮層双方の感染機構において影響を与える共生制御を鍵となる因子となると考えられる。今後はこの GA シグナルの共生シグナルへの合流点・干渉機構についての解析を AM 共生・根粒共生両面から進めていく予定である。

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)

1. Nagae M, Takeda N, Kawaguchi M. Common symbiosis genes *CERBERUS* and *NSP1* provide additional insight into the establishment of arbuscular mycorrhizal and root nodule symbioses in *Lotus japonicus*. *Plant Signaling & Behavior in press*. 査読あり
2. Suzaki T, Ito M, Yoro E, Sato S, Harakawa H, Takeda N, Kawaguchi M. Endoreduplication-mediated initiation of symbiotic organ development in *Lotus japonicus*. *Development in press* 査読あり
3. Takeda N, Tsuzuki S, Suzaki T, Kawaguchi M. *CERBERUS* and *NSP1* of *Lotus japonicus* are common symbiosis genes that modulate arbuscular mycorrhiza development. *Plant Cell Physiology*

Vol154:1711-23 (2013) featured on the Research Highlights 査読あり

4. Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T, Kawaguchi M. TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiology* Vol154:433-47 (2013) 査読あり
5. Suzaki T, Kim, C.S., Takeda N, Szczyglowski, K. and Kawaguchi, M. *TRICOT* encodes an AMP1-related carboxypeptidase that regulates root nodule development and shoot apical meristem maintenance in *Lotus japonicus*. *Development* Vol.140:353-361 (2013) 査読あり

[学会発表](計 4 件)

1. 武田直也 他、ジベレリンシグナルが菌根共生・根粒共生に及ぼす影響
第55回日本植物生理学会年会 2014年3月18日 富山
2. Takeda N et al., Gibberellin signaling interferes with symbiosis signaling pathway, which alters symbiotic gene expression and fungal colonization during arbuscular mycorrhiza
18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013年10月14日 Miyazaki
3. 武田直也 他、菌根菌・根粒菌感染に及ぼすジベレリンシグナルの役割
第54回日本植物生理学会年会 2013年3月21日 岡山
4. Takeda N, Common Symbiosis System reveals infection mechanism of Arbuscular Mycorrhizal fungi in leguminous plant *Lotus japonicus*.
1st Molecular Mycorrhiza Meeting ドイツ 2012年9月6日 招待講演

[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

武田 直也 (TAKEDA, Naoya)
基礎生物学研究所・共生システム研究部
門・助教
研究者番号：60571081

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：