

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780063

研究課題名(和文)植物生育促進菌類とミヤコグサの共生機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of a symbiotic mechanism between Plant growth promoting fungi and Lotus japonicus

研究代表者

増中 章 (Masunaka, Akira)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・飼料作物研究領域・主任研究員

研究者番号：80466010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物生育促進菌類のトリコデルマ菌は、ミヤコグサの抵抗性遺伝子を抑制し、ゆるい共生関係を樹立するが、ミヤコグサの菌根菌や根粒菌が利用する共生シグナル伝達経路に変異が起きた系統では、抵抗性遺伝子の発現を抑制することができなくなり、根内部に侵入できず、共生関係の樹立に失敗することが示されつつある。このことから、トリコデルマ菌とミヤコグサのゆるい共生関係には共生経路が必要であることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Trichoderma koningii one of plant growth-promoting fungi suppresses the expression of resistant genes involved in production of phytoalexin in Lotus japonicus and establishes an associative symbiosis. it seems to failed to irrupt into the inside of roots and establish the symbiosis since it could not suppress the expression of the resistant genes when T. koningii was inoculated on Lotus japonicus mutated on the symbiosis pathway. It suggests that T. koningii might require the symbiosis pathway for associative symbiosis with Lotus japonicus.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物生育促進菌類 ミヤコグサ

1. 研究開始当初の背景

これまでに植物の生育を著しく促進する植物生育促進菌類(Plant growth-promoting fungi: PGPF)が見いだされており(Hyakumachi, 1994)、中でも唯一 *T. koningii* は、マメ科植物の主要な抵抗性機構であるイソフラボノイド型ファイトアレキシン生合成を遺伝子発現レベルで制御し、根とゆるい共生関係(associative symbiosis)を構築することを明らかにしてきた(Masunaka, et al., 2011)。マメ科植物の共生メカニズム解明は、根粒細菌の植物抵抗性の回避機構(Okazaki, et al., 2004, Masunaka, et al., 2011)や共生シグナル因子(Nod)の特定(Peters, N.K., et al., 1986)、共生シグナル伝達経路の発見(Oldroyd, G.E.D., et al., 2001)など目覚ましく発展している。また菌類(特に菌根菌)は、根粒細菌と共通の共生シグナル伝達経路(Common Signaling Pathway: CSP)を利用することが明らかになっている(Stracke, S., et al., 2002)。しかしながら共生シグナル因子(Myc)など菌類側の要因は未だ未知のままであるため、植物の菌類特異的な共生関連因子はあまり解明されていない。一方、エンドウ褐紋病菌は植物に感染する際に、植物の抵抗性反応を抑制する因子(エフェクター)を生産するが(Shiraishi, et al., 1992)、*T. koningii* もミヤコグサと共生するためにエフェクター因子を生産している可能性がある(Masunaka, et al., 2011)。本研究では、マメ科植物根と共生できる数少ない菌類である *T. koningii* を用いて菌類 - 植物の共生メカニズムの解明を行う。

2. 研究の目的

各種肥料原料の価格高騰・枯渇問題の中、減肥技術につながる「微生物による植物生育促進現象の解明」が求められている。これまでに植物生育促進菌類(PGPF)である *Trichoderma koningii* はミヤコグサの抵抗性機構を制御し、根とゆるい共生関係を構築することでミヤコグサの生育を促進させることを明らかにした。本研究ではミヤコグサおよび *T. koningii* の共生変異体を用いて Myc 等の共生関連因子を探索し、ミヤコグサの遺伝子応答反応を網羅的に解析することで微生物による植物生育促進現象にダイレクトに関与する共生メカニズムを分子生物学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) CSP と抵抗性機構の相互関係を検証する。初めに、ミヤコグサ共通シグナル伝達経路(CSP)変異系統を用いて、*T. koningii* は CSP を利用しているか、また CSP 変異系統に対し *T. koningii* は抵抗性関連遺伝子の発現を抑制できるのか調査する。

(2) 菌の遺伝子変異菌株を作製する。マーカー遺伝子を組み込んだ糸状菌形質転換ベクターを用いて *T. koningii* の共生遺伝子変異菌株の作製を試みる。共生変異菌株のゲノム DNA から形質転換ベクターを回収することによって、共生関連遺伝子を単離する。

(3) 野生型 *T. koningii* と共生変異菌株をそれぞれ接種したミヤコグサのアレイ解析を行うことによって、ゆるい共生関係構築時のミヤコグサの初期応答反応を解明する。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサとゆるい共生関係を構築する糸状菌 *Trichoderma koningii* (Tk) が共通共生シグナル伝達経路(common signaling pathway: CSP)を利用しているのか検証するために、ミヤコグサの野生型および共生変異系統(pollux-, ccamK-)の根部に Tk を接種し、病害抵抗性関連遺伝子である 4 つのイソフラボノイド型ファイトアレキシン(ベスチロール)生合成遺伝子、*PKR1*、*IFS*、*HI4'OMT*、*PTR1* の発現誘導パターンをノーザンプロット法により解析した結果、*IFS*、*HI4'OMT*、*PTR1* で発現誘導が起きていることを確認した。さらにミヤコグサの CSP の前後に位置する菌根形成シグナル経路に遺伝的変異を有する ME778 および ME2329 を用いて、糸状菌(菌根菌)共生経路が生育促進菌類(PGPF)であるトリコデルマ菌のゆるい共生関係構築に必要であるか検討した。トリコデルマ菌をミヤコグサの幼苗根に感染させるとミヤコグサの CSP 変異系統に感染させた場合と同様に、*PKR1* 遺伝子の発現には誘導抑制がかかり、他の 3 つの

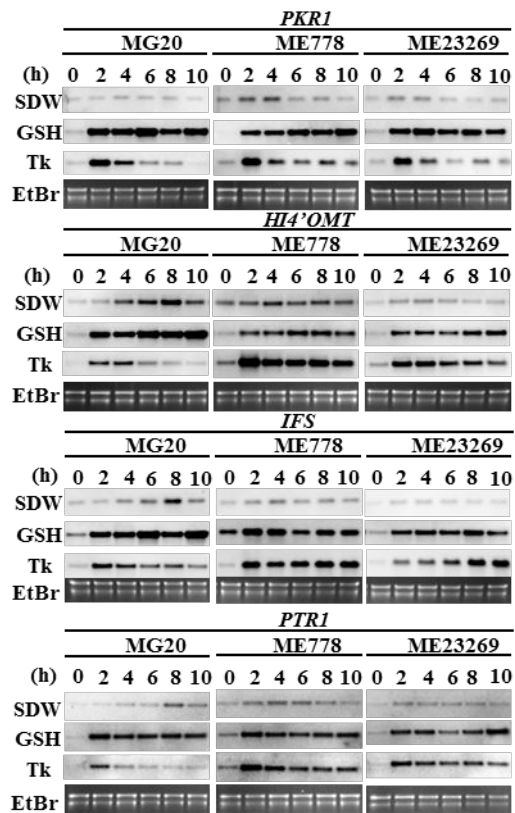


図 1. 遺伝子発現解析。SDW, 滅菌蒸留水; GSH, エリシター; Tk, *T. koningii*

遺伝子 (*IFS*、*HI4'OMT* および *PTR1*) で発現誘導が見られた。これら発現誘導が復活した 3 つの遺伝子の発現誘導パターン

はミヤコグサとは不親和を示す他の PGPF である *Penicillium* 菌や *Fusarium* 菌接種時と類似していることから、ME778 および ME2329 系統ではトリコデルマ菌との共生関係構築が拒絶され、抵抗性応答が起きたことが示唆された(図1)。

(2) さらにトリコデルマ菌の共生能欠損菌株作成のための遺伝子組換え法の開発を行った。本菌への遺伝子導入には、ポリエチレングリコール 6000 を用いた場合、最も効率が良くなったが、遺伝子細胞導入試薬リポフェクチンを使用すると効率は悪化した。これらの方法により遺伝子導入が可能となったが、遺伝子導入菌株のゲノムサザン解析から、導入遺伝子の挿入位置は、比較的決まった場所であること、ランダムな遺伝子導入は難しいことが予想された。(3) *T. koningii* iGT2-3 処理した各ミヤコグサの根の横断切片の顕微鏡観察を行

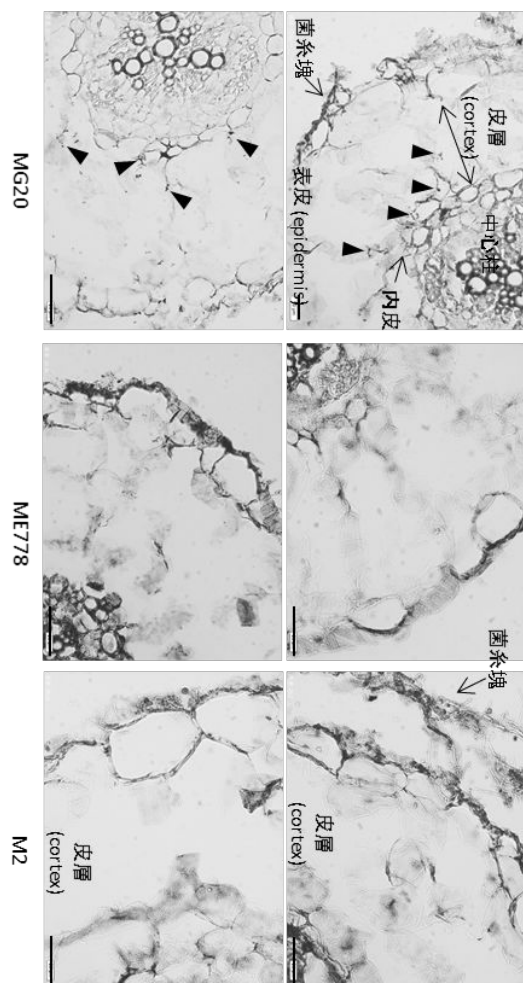


図2 . *T.koningii* のミヤコグサ根内への感染黒三角は、*T.koningii* の感染菌糸を示す。

い、根内部への感染を検証した。その結果、野生系統 MG20 では、根の表皮細胞(間隙)内だけでなく内皮細胞(間隙)内にまで菌糸が確認された。共生経路変異系統 ME778 と M2 (CSP 変異) 系統では、根の表面上では、菌糸の定着が一部確認できたが、根の内部まで侵入した菌糸は検出できな

った。これらのことから、*T. koningii* はゆるい共生関係を樹立する際に、菌根菌が利用している共生経路を活用している可能性が示された。しかしながら、横断切片の精度が非常に低く、菌糸の見極めが非常に困難であったため再度の検証が必要であることは否めない。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

増中 章, Plant growth-promoting fungi, *Trichoderma koningii* colonizes on/in the roots of *Lotus japonicus* by suppressing the production of isoflavonoid phytoalexin vestitol 第7回国際共生学会大会、2012年7月22日、クラクフ市(ポーランド)
増中 章, 植物生育促進菌類 *Trichoderma koningii* に対するミヤコグサ共生変異体のファイトアレキシン生合成遺伝子の発現応答、2012年度日本草学会、2012年8月27日、酪農学園大学(北海道江別市)
増中 章, 植物の誘導抵抗性機構に対する病原体の感染戦略、平成27年度日本植物病理学会100周年記念、2015年3月28日、明治大学(東京都千代田区)

[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：
 出願年月日：
 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

増中 章 (MASUNAKA, Aki ra)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所・飼料作物研究領
域・主任研究員
研究者番号：80466010