

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660036

研究課題名(和文) 疑似有性生殖による植物共生糸状菌の進化機構の解明とその利用

研究課題名(英文) Possible role of parasexual cycle for the evolution of endophytic fungi.

## 研究代表者

竹本 大吾 (Takemoto, Daigo)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：30456587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の内部で共生的に生育する微生物はエンドファイトと総称されている。イネ科牧草の細胞間隙に共生するEpichloe/Neotyphodium属エンドファイトは、植物を病害虫から守る様々な生理活性物質を生産する。本研究では、植物を守る活性の強い菌株を作出する方法を確立する事を最終目的として、エンドファイトの進化機構の解明を目指した。その結果、異種エンドファイトの菌糸が会合した際に、菌糸融合、核の移行および核の融合が発生し、新たなhybrid菌株が出現した。hybrid株は、親株由来の多様な性質を持っており、疑似有性生殖様の機構がエンドファイトの遺伝的多様性を高める役割を担っていると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epichloae endophytes (Epichloe and asexual derivatives Neotyphodium species) systemically colonize the intercellular spaces of grasses to establish a symbiotic association. Colonization by epichloae endophytes confers various benefits on host plant growth and fitness to environmental conditions through the enhancement of plant resistance to a range of biotic and abiotic stresses, including drought, disease and herbivores. In this study, Epichloe and Neotyphodium isolates are used to investigate the role of parasexual recombination for the emergence of new isolates and evolution of endophytes. We successfully observed cell fusion, cell to cell transfer of nucleus and nuclear fusion of endophyte. We also isolated hybrid isolates which have variety of characteristics inherited from parents isolates.

研究分野：植物病理学

キーワード：共生糸状菌 エンドファイト ライグラス

### 1. 研究開始当初の背景

植物の内部で共生的に生育する微生物はエンドファイトと総称されている。イネ科雑草の細胞間隙に共生する糸状菌である epichloae (*Epichloë*/*Neotyphodium* 属) エンドファイトは、植物を病害虫から守る様々な生理活性物質を生産する。一方、エンドファイトは、植物細胞間隙で生育することにより外界の微生物から隔離され、種子を介して次世代の植物に感染するといった利益を得ている。不完全菌である *Neotyphodium* 属エンドファイトは植物の種子を介して繁殖するため、外界の微生物や近縁種と遭遇する機会は限られている。しかし自然界から単離される *Neotyphodium* 属菌株は、生理活性物質の生産性に著しい多様性が認められる。これまでに、*Epichloë* および *Neotyphodium* 属菌株の *tub2* (*tubulin2*) 遺伝子の分布を比較すると、*Epichloë* 属菌は 1 コピーの *tub2* を持つのに対し、*Neotyphodium* 属菌からは *Epichloë* 属菌由来と推定される複数の *tub2* が見いだされることが報告されている。この結果から、*Neotyphodium* 属菌は、異なる *Epichloë* 属菌の hybrid 化により出現したと推察されているが、詳細は明らかではない。

### 2. 研究の目的

*Epichloae* エンドファイトは、宿主植物内で植物を外敵から守る様々な生理活性物質を生産する。通常、エンドファイトは種子を介して植物と共に繁殖するため、植物との共生体を守る性質を進化の過程で獲得してきた。一方で、植物の組織内では同種他菌株や他の微生物と遭遇する機会が極めて少ないため、独自の進化機構を発達させる必要があったと推定される。多くの *Neotyphodium* 属種は *Epichloë* 属菌の hybrid であると考えられている。申請者らは、エンドファイトが植物内で盛んに細胞融合を形成していることを観察し、不完全菌エンドファイトが宿主植物内での疑似有性生殖によって進化しているという着想を得た。また培地上で *Epichloë* 属菌が疑似有性生殖を行うことを観察している。新たな *Neotyphodium* 属菌は、1) *Neotyphodium* 属菌の感染植物への *Epichloë* 属菌の新たな感染、2) 両菌の細胞融合、3) 核融合とゲノムのシャッフルリング、4) 減数分裂による 1 倍体化、という過程を経て形成されると推定される。本研究では、古くから様々な糸状菌で見いだされるものの、自然界においての重要性が明らかではなかった疑似有性生殖のエンドファイト進化における役割を証明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### A) *Epichloë* および *Neotyphodium* 属菌の疑似有性生殖の細胞学的観察

疑似有性生殖は、隣接する細胞の融合、核の隣接細胞への移行、核融合という過程を経て成立する。そこで、同種間および異種間での疑似有性生殖の過程を詳細に観察するた

め、核局在タンパク質をコードする *NsiA* 遺伝子を用いて、核を可視化した。*NsiA*-GFP あるいは *NsiA*-DsRed を発現した *E. festucae* 株および *Neotyphodium* 属菌株を作出し、両菌株の対峙培養時の核の挙動を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

#### B) *E. festucae* と *Neotyphodium* 属菌の hybrid 株の単離

*Epichloë* あるいは *Neotyphodium* 属菌株群にジェネティシン耐性遺伝子マーカーを用いて GFP を導入した。得られた GFP 発現菌株とハイグロマイシン耐性で DsRed を発現する *E. festucae* F11 株を対峙培養し、疑似有性生殖を誘導する。2 つのコロニーが交わった部位から、2 つの薬剤耐性遺伝子をもつ菌株を分離した(図 1)。得られた菌株を薄層 PDA 固形培地上で培養し、分生子形成を誘導した。単一の分生子由来の菌株を分離し、菌糸が GFP と DsRed のいずれも発現していることを確認した。新規種間雑種株群における生合成遺伝子群の分布の多様性について調査した。

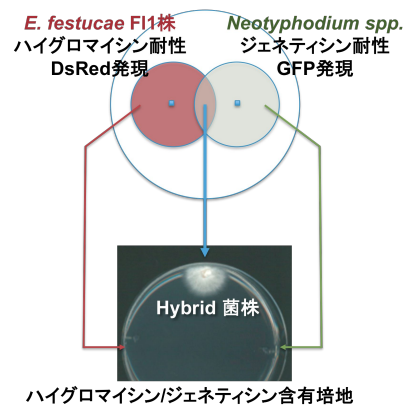


図 1. 培地上での種間雑種の分離法

#### C) イネ科雑草から単離された *Epichloae* エンドファイトの遺伝的多様性および基準株との細胞融合能の解析

種々のイネ科雑草より単離された *Neotyphodium* 属菌 (約 30 菌株) を *Epichloë* 属菌の基準株である F11 株と対峙培養し、融合が確認される菌種を選抜した。また、菌糸融合が認められた菌株について、ITS 領域の塩基配列を決定し、種名を特定した。さらに、これら菌株における種々の生理活性物質の生合成遺伝子 (耐虫性物質合成遺伝子 *PerA*, *LolM*, 毒性物質合成遺伝子 *ltnE*, *idtM*, *lpsB* など) の分布を調査した。

### 4. 研究成果

#### A) *Epichloë festucae* の疑似有性生殖の細胞学的観察

*E. festucae* F11 株では、貧栄養培地である 3% 寒天培地での培養時に隣接する細胞間での細胞融合が観察される。*NsiA*-GFP の融合タンパク質の発現により核を可視化した *E. festucae* F11 株を用いて、隣接している菌糸間での菌糸融合と核の分布を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。細胞融合が起こっ

ている菌系における核の経時的な観察を行なった結果、細胞間融合部位である架橋を渡って隣の菌系細胞へ移行する核の様子を経時的な観察に成功した(図2)。さらに、1細胞に2つの核が共存している細胞を観察したところ、その2核が融合し1つの核として細胞内を移動する様子を経時的に観察することができた(図2)。以上の結果から、細胞融合が起こった菌系において、片方の核が他方の細胞に移動しさらに核融合が起こる、疑似有性生殖様の現象が起こっていることが証明された。

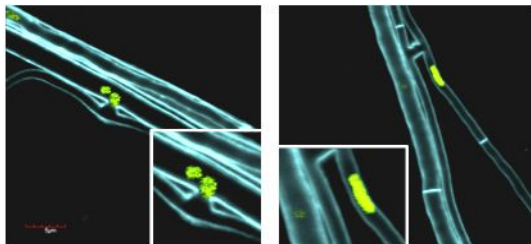


図2. エンドファイトの細胞融合部位における核の細胞間移行(左)と核融合(右)

#### B) *E. festucae* と *Neotyphodium* 属菌の hybrid 株の単離

次に、DsRed を発現するハイグロマイシン耐性の F11 株および GFP を発現するジェネティシン耐性の E437 株の対峙培養を行なった。E437 株は、病原菌と対峙培養した際に、病原系状菌の生育を阻害する活性を持つ事が示されている。これら菌株を 3% 寒天培地で対峙培養し、2 つの株の菌糸が重なる部位を、ハイグロマイシンおよびジェネティシンを含む培地上で培養した。その結果、両抗生物質に対して抵抗性である菌株が得られた。また、この菌株を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、DsRed および GFP の両蛍光タンパク質の発現が認められた。さらに、単分生子分離した 12 の hybrid 菌株を得て、その遺伝子分布を解析した。まず、F11 株由来および E437 株由来の遺伝子の分布を調べたところ、いずれの株においても F11 由来の生理活性物質の生合成遺伝子が検出された。一方、E437 の抗菌性に関する *VibA* 遺伝子の分布を調べたところ、その有無に多様性が認められた。また、抗菌性にも多様性が認められたことから、hybrid 株では、両親株由来の遺伝子が多様な形で遺伝することが示された。

#### C) イネ科雑草から単離された *Epichloae* エンドファイトの遺伝的多様性および基準株との細胞融合能の解析

日本の草地雑草から単離されたエンドファイト菌株 29 菌株および *E. festucae* F11 株、E437 株を用いて、ITS 領域のシーケンス解析を行なった結果、国内の草地雑草から採取された菌株 29 菌株のうち 24 菌株が *Neotyphodium* 属菌の配列と高い相同性を示した。この結果から、国内野生草地において *Neotyphodium* 属菌が極めて高頻度で存在し

ていることが示唆された。

次に、これら *Epichloë/Neotyphodium* 属菌群と *DeRed* を発現する F11 株をそれぞれ 3% agar 培地上で対峙培養し、2 つのコロニーの菌糸が重なる部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、F11 菌株と菌糸融合をおこす菌株の存在を確認した(図3)。F11 菌株と融合した菌株の菌糸は、融合を形成した細胞において F11 菌株由来の DsRed タンパク質の蛍光が確認できた。これまでに F11 菌株との融合が確認された菌株はいずれも *N. occultans* であり、このことから有性世代である *Epichloë* 属菌種同士でおこる融合と同じように、有性世代の消失している *Neotyphodium* 属菌との間でも菌糸を融合させ、Hybrid となる菌糸を形成することが出来得ると示唆された。

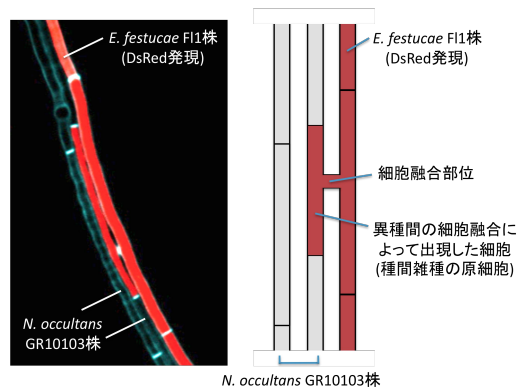


図3. *E. festucae* (DsRed により可視化) と *N. occultans* における細胞融合の観察例

#### 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4件)

1. Niones J.T. and Takemoto D. (2015) *VibA*, a homologue of a transcription factor for fungal heterokaryon incompatibility, is involved in antifungal compound production in the plant-symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Eukaryot. Cell.* 14: 13-24. (査読あり)
2. Niones J.T. and Takemoto D. (2014) An isolate of *Epichloë festucae*, an endophytic fungus of temperate grasses, shows growth inhibitory activity to selective grass pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* in press. (査読あり)
3. Kayano Y., Tanaka A., Akano F., Scott B. and Takemoto D. (2013) Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Genet. Biol.* 56: 87-97. (査読あり)
4. Tanaka A., Cartwright G.M., Saikia S., Kayano Y., Takemoto D., Kato M., Tsuge T. and Scott B. (2013) *ProA*, a transcriptional regulator of fungal fruiting body development, regulates

leaf hyphal network development in the *Epichloë festucae*-*Lolium perenne* symbiosis. *Mol Microbiol.* 90: 551-568. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 磯部仁美・増中 章・菅原幸哉・月星隆雄・田中愛子・竹本大吾 (2015) *Epichloae* エンドファイトの遺伝的多様性獲得における疑似有性生殖の役割. 平成 27 年度日本植物病理学会全国大会, 明治大学, 東京
2. 榎野友香・亀岡慎一・岡村文音・尾崎よしの・小林光智衣・高木宏樹・寺内良平・田中愛子・Barry Scott・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* の共生確立変異株における菌系融合関連遺伝子の発現解析. 平成 27 年度日本植物病理学会全国大会, 明治大学, 東京
3. 竹本大吾 (2015) 宿主特異性を決定する多様な機構. 日本植物病理学会創立 100 周年記念シンポジウム, 明治大学, 東京
4. Takemoto D. (2015) Two closely related Rho GTPases, Cdc42 and RacA, have opposite roles for the ROS production and symbiotic infection of endophytic fungus *Epichloë festucae*. 28th Fungal Genetics Conference. Asilomar, USA.
5. 岡村文音・田中愛子・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* における菌系融合欠損株の探索と共生確立能の解析. 第 14 回系状菌分子生物学コンファレンス, 東北大学, 仙台
6. 榎野友香・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 Cdc42 および RacA の相互作用因子特異性の機能解析. 第 14 回系状菌分子生物学コンファレンス, 東北大学, 仙台
7. 岡村文音・田中愛子・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* における菌系融合欠損株群の共生確立能について. 平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会. 富山大学, 富山
8. 榎野友香・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* の p22phox 様タンパク質をコードする *pro41* 破壊株の機能解析. 平成 26 年度日本植物病理学会関西西部会. 富山大学, 富山
9. 榎野友香・田中愛子・竹本大吾 (2015) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* の Cdc42 および RacA の機能における相互作用因子結合能の重要性に関する解析. 平成 26 年度日本植物病理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌
10. Niones J.T. and Takemoto D. (2013) Overexpression of *vib-1* gene in *Epichloë festucae* enhances its antifungal activity against grass pathogens. 平成 25 年度日本植物病理学会関西西部会, 岡山大学, 岡山市
11. 竹本大吾 (2013) イネ科牧草に共生する系状菌エンドファイトの共生確立に関わ

る遺伝子群の機能解析. 2013 年度土壤肥料学会, 名古屋大学, 名古屋

12. 竹本大吾 (2013) イネ科牧草に共生する *epichloae* 属エンドファイトの共生時に機能する遺伝子群の解析. 平成 25 年度植物感染生理談話会, 北陸粟津温泉法師, 石川
13. 榎野友香・竹本大吾 (2013) 牧草共生系状菌 *Epichloë festucae* の低分子量 G タンパク質 RacA および Cdc42 の相互作用因子特異性の共生確立における役割. 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 岐阜大学, 岐阜

〔図書〕(計 1 件)

1. 竹本大吾・榎野友香・勝又美穂・尾崎よしの・赤野史岳・Barry Scott・田中愛子 (2013) イネ科牧草に共生する *epichloae* エンドファイトの共生時に機能する遺伝子群の機能解析. 植物-微生物相互作用とピオトロフ感染. 古賀博則・森正之・田中栄爾・高原浩之編, 日本植物病理学会, 東京, 48, 87-98.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~byori/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本大吾 (Takemoto Daigo)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授  
研究者番号: 30456587

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

寺内良平 (Terauchi Ryohei)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究部・研究部長  
研究者番号: 50236981