

**科学技術振興調整費「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」
平成 19～21 年度実施「植物・微生物間共生におけるゲノム相互作用」成果の概要**

研究代表者 農業生物資源研究所植物科学研究領域特任上級研究員 河内宏

1) 研究目的

植物は生態系の中で、周囲の微生物や昆虫、あるいは他の植物との間で病虫害、寄生、共生、生育阻害など、様々な特異的関係を持って生存している。この中でも、とりわけ植物と微生物の相互作用は、共生窒素固定の有効利用や作物の病害防除など、持続的な食料生産と地球環境の保全の面からみて重要な課題に直結している。

本研究は、近年我が国を中心に研究の進展が著しいマメ科植物と根粒菌・菌根菌共生系の解析を主軸とし、根粒菌共生と関係の深い植物病原菌の感染シグナルの受容・シグナル伝達機構の解析、さらに未開拓の研究分野として、植物と内生菌(エンドファイト)共生の解析を含め、課題間の緊密な連携・組織的研究体制によって、植物と微生物の相互作用をゲノムレベル・分子レベルで総合的に解明することを目的とした。これによって、共生微生物の有効利用や病害防除のための基礎知見を整備し、連携施策群「食料・生物生産研究」が目標とする、環境と調和の取れた安全な食料生産のための基盤技術の確立に資することを目指した。

2) 研究成果の概要

本研究は、3サブテーマから構成した。以下、各サブテーマごとに得られた成果の概要を示す。

微生物感染シグナルの受容と初期シグナル伝達系

根粒菌共生の初期シグナル伝達系と“オートレギュレーション”(根粒菌の共生シグナル物質Nodファクターに応答して、地上部を介したシグナル伝達によって根粒着生を負に制御するメカニズム)の関係を解析し、Nodファクターに応答して根で発現するCLE遺伝子の産物であるCLEペプチドが、オートレギュレーションの内的シグナルであることを明らかにした。CLEペプチドは、地上部に運ばれ、HAR1(受容体キナーゼ)のリガンドとして働くと推定される(図1)。このペプチドはまた、硝酸態窒素による根粒着生の抑制にも関与している。菌根菌の分泌する共生シグナル物質を探索し、熱水可溶性画分から1つの化合物を単離・構造決定した。

病原菌の代表的な分子パターンであるキチンは植物に抵抗性反応を引き起こすエリシターである。シロイヌナズナ突然変異体を用いて、キチン受容体CERK1を同定し、この成果をもとにイネのキチンエリシター受容体の基本構造を明らかにした。さらに、シロイヌナズナから新奇のキチン応答変異体を分離、原因遺伝子を特定した。また、病原応答と根粒菌共生の関係について、キチン受容体とNodファクター受容体がきわ

めて類似の構造を示すことに着目し、変異体を用いた詳細な機能相補実験を行った結果、Nodファクター受容体は、キチン受容体から進化したと考えられた。

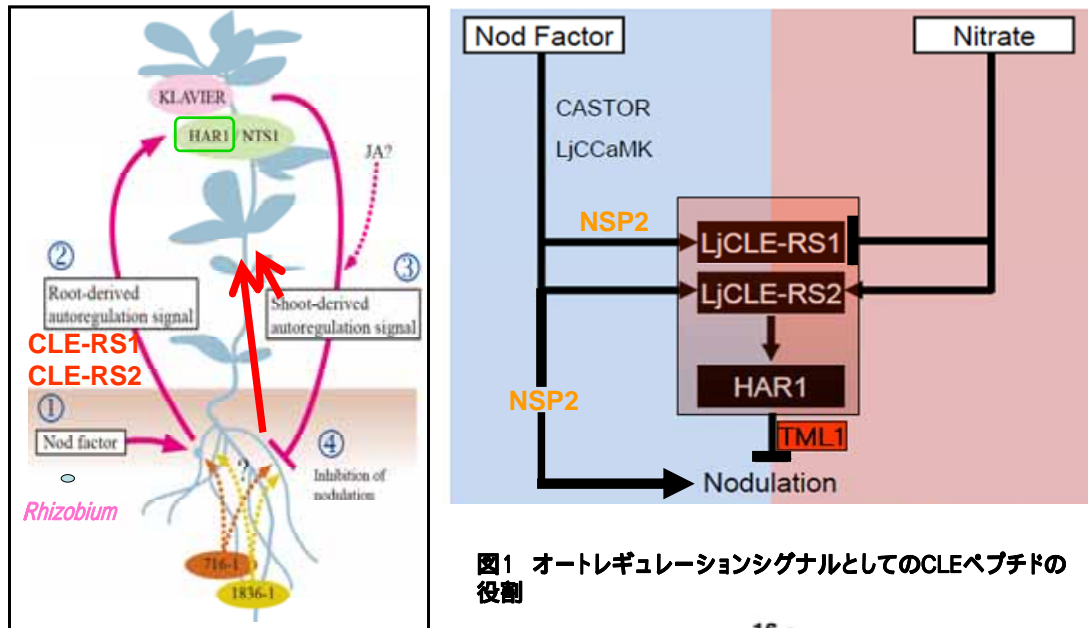


図1 オートレギュレーションシグナルとしてのCLEペプチドの役割

植物免疫系・病原応答のキー分子である一酸化窒素(NO)が根粒菌感染で一過的に発生することに着目し、その根粒菌側の誘導因子が根粒菌表層の多糖類(LPS)であることを明らかにした。このNOの除去にクラス1植物ヘモグロビン(Hb)がスカベンジャーとして働いていることを明らかにし、さらに、クラス1Hbを強発現したミヤコグサでは根粒の窒素固定活性と根粒数がともに大きく増加することを示した(図2)。この結果は、遺伝子工学的手法によって共生窒素固定能力を高めるための1つの戦略を提示するものである。

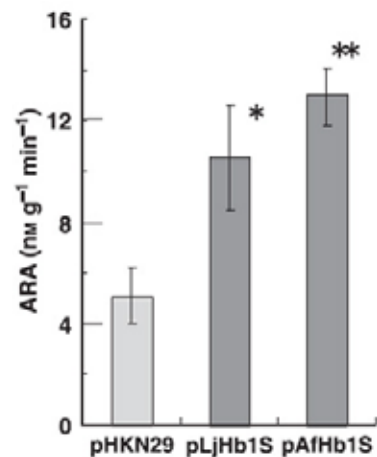


図2 クラス1Hbの発現によるミヤコグサ根粒の窒素固定活性の増加

根粒菌・菌根菌の感染プロセスと細胞内共生体化を制御する宿主因子

本サブテーマでは、微生物シグナルの受容とその直下のシグナル伝達系の後に引き起こされる具体的な共生成立過程、すなわち根粒菌の感染プロセス(感染系形成)や、共生の場としての根粒形成などに関与する宿主因子、さらに窒素固定活性発現の前提である根粒菌の細胞内共生体(バクテロイド)化や窒素固定活性を制御する宿主因子の単離と機能解析を進めた。

まず、根粒菌共生に関して、感染プロセスに関わる宿主マメ科植物遺伝子の単離と機能解析を行い、ミヤコグサからCERBERUSおよびALB1と名付けた2つの遺伝子を同定した。これらの遺伝子の変異体では、感染系の形成が強く阻害され、同時に根

粒の器官形成も不全となる(図3)。サブテーマ1の共生初期シグナル伝達因子との相互関係の解析等の結果、これら遺伝子は感染系形成に必須な役割を担っていることを明らかにするとともに、これら遺伝子産物の構造と機能を推定した。酵母ツーハイブリッド法などにより、これら遺伝子産物と相互作用するタンパク質を複数見だし、解析を続行中である。

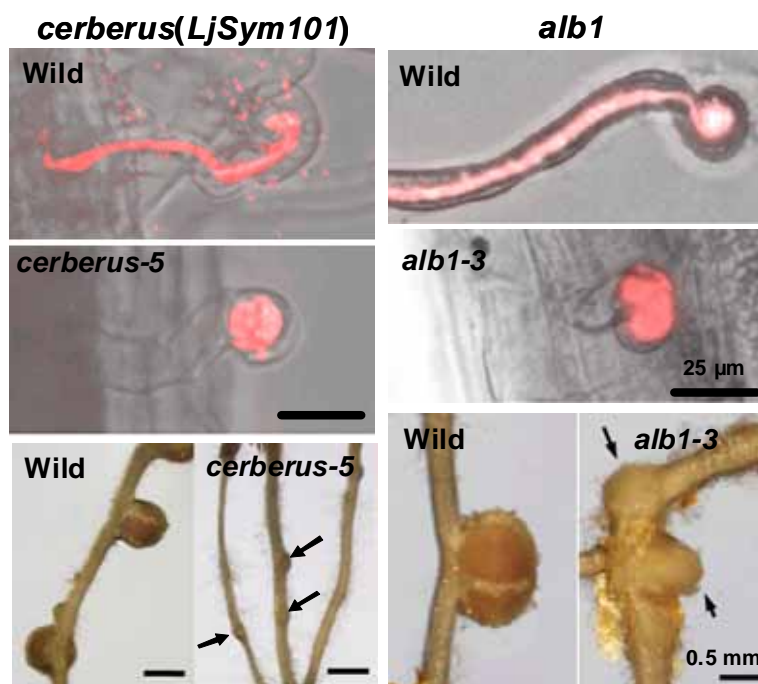


図3 cerberus および alb1 変異体の表現型

根粒を形成し根粒菌の細胞内共生も成立するが、窒素固定活性の発現に異常を示す宿主植物変異体(Fix-変異体)の原因遺伝子について機能解析を進め、それらの1つFEN1遺伝子がホモクエン酸合成酵素をコードしており、共生する根粒菌のニトロゲナーゼ活性中心である鉄・モリブデンコファクターの形成に関与していることを突き止めた(図4)。この発見は、根粒菌が植物との共生によってのみ高効率な窒素固定活性を発現するメカニズムに、はじめて明確な科学的根拠を与えるものであり、窒素固定共生系の成立における植物と根粒菌の共進化を理解する上でも重要な知見となった。さらに、EMS処理、重イオンビーム照射、培養変異などによるミヤコグサ共生変異体集団から、感染系形成や窒素固定活性の制御に関わると想定される多数の遺伝子のクローニングに成功し、それらの詳細な機能解析を進めている。

ダイズ根粒菌のバクテロイド化の過程をプロテオミクスの手法で解析することにより、共生窒素固定に関与する根粒菌側の遺伝子の探索を行った。その結果、バクテロイド化に伴って特異的に誘導される新奇の金属シャペロン遺伝子を見だし、この遺伝子が窒素固定活性にリンクしたバクテロイドの呼吸鎖電子伝達系に関与していることを明らかにした。

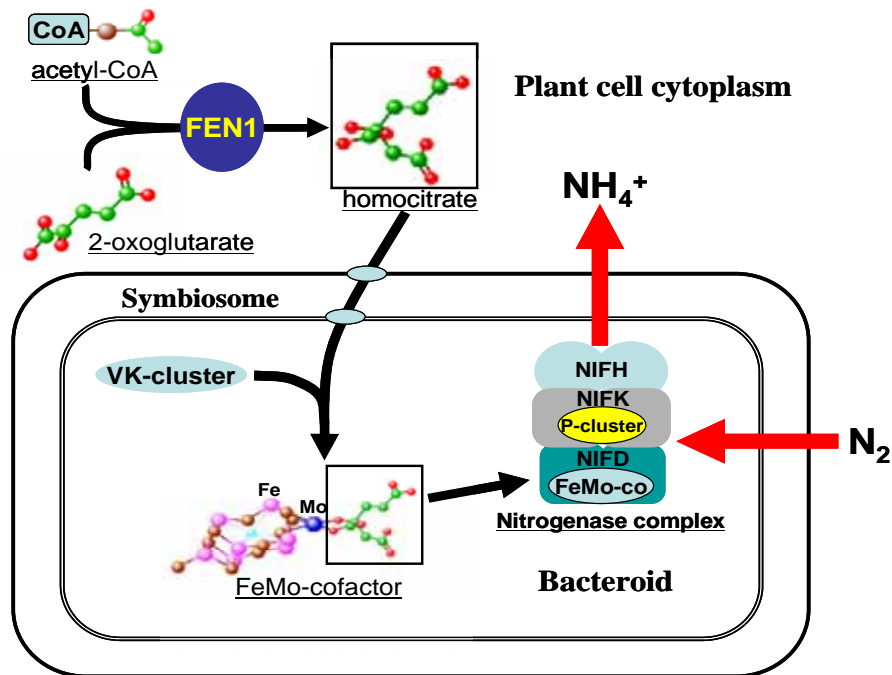


図 4 根粒特異的遺伝子 FEN1 はニトロゲナーゼの活性中心の必須因子ホモクエン酸をバクテロイドに供給する。

菌根菌共生に関しては、ダイズを材料にして、菌根特異的なリン酸トランスポーター、アンモニウムトランスポーターを同定し、それらがアーバスキュルを囲む植物由来の膜組織上に局在することを示した(図5)。また、これらの発現が、リン酸吸収や窒素吸収という共生によってもたらされる機能においてのみならず、共生の成立それ自体に重要な意義をもっていることを明らかにした。

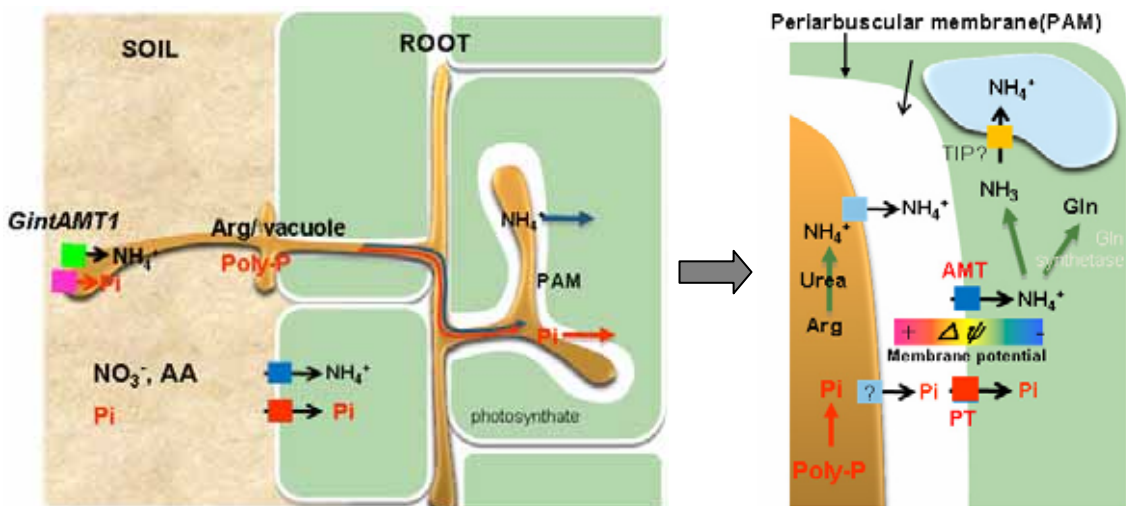


図 5 菌根菌の菌糸中で Pi は Poly-P に、NH₄ は Arg に変換され、内生菌糸およびまたは樹枝状体で再び Pi および NH₄ となり、PAM に局在するリン酸トランスポーター (PT) およびアンモニウムトランスポーター (AMT) で宿主に取り込まれる。

微生物のゲノム情報に基づく植物・微生物間相互作用の解析

根粒菌は宿主マメ科植物への感染に際して、活性酸素種 (ROS) 除去酵素の発現や、表層膜成分の変動、菌体外への多糖類や蛋白質の分泌などによって、宿主の防御応答を抑制・回避すると考えられる。こうした宿主防御応答の回避機構は、Nodファクターを介した初期認識過程とは異なる機構で、根粒菌の宿主決定に関与している可能性が高い。根粒菌の全ゲノム解読とそれに基づいたリソース整備により、これらの問題を微生物ゲノムの面から解明するための新たな条件が生まれてきた。

ミヤコグサを含む多数のLotus属植物と、根粒菌 *M. loti* の相互作用において、同属異種間の親和性の差異を生み出す原因の1つが、3型分泌系に依存することを明らかにし、3型分泌系によって宿主細胞に送り込まれる親和性の決定因子を同定した。また、根粒菌感染時の宿主マメ科植物の防御応答であるROSを除去するために、根粒菌のある種のカタラーゼが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、ROSは共生成立後のバクテロイドの呼吸によっても生み出され、これは窒素固定活性の制限要因となるが、根粒菌カタラーゼの強発現によって、窒素固定活性を高める可能性が示された(図6)。

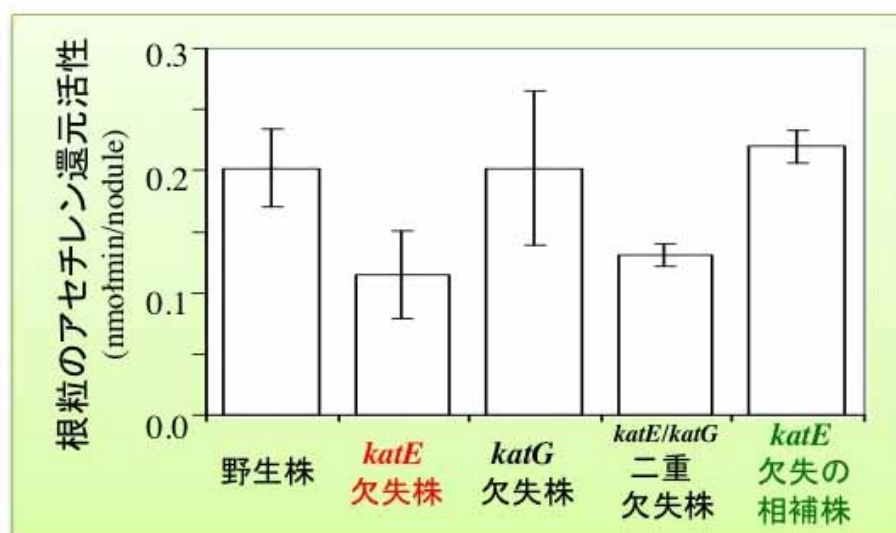


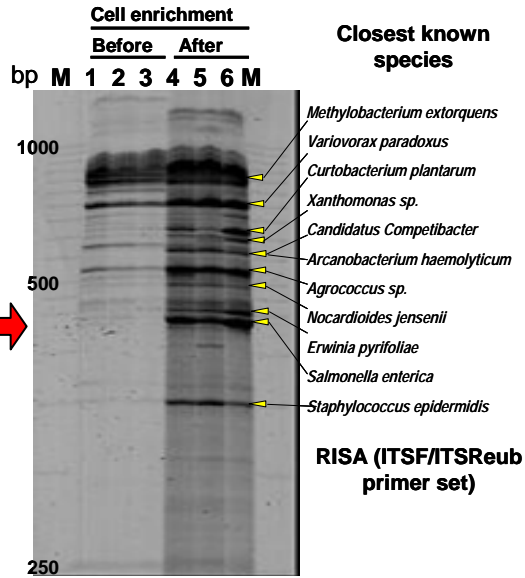
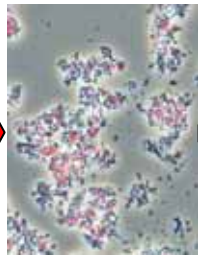
図6 ミヤコグサ菌の2種のカタラーゼのうち、発現量の少ないKatEが共生には重要である。

植物体内の細胞間隙や通導組織に棲息する植物内生菌(エンドファイト)は、植物の生育促進、耐病性の付与、窒素固定など、様々な面で植物生産に寄与している。しかし、これら内生微生物は多くが難培養性と考えられ、その実体はほとんど不明である。本研究では、ダイズを主たる対象にして、植物体の茎や根からエンドファイトを効率的に濃縮する方法を確立し、次いでこの濃縮細菌群から抽出したゲノムDNAの解析によって、包括的なエンドファイト群集構造を明らかにした。さらに、ダイズの根粒菌共生に関する遺伝子型や窒素栄養条件によるエンドファイト群集構造の変化の様相を解明し、この結果から、サブテーマ1で取り上げたオートレギュレーションの機構が、

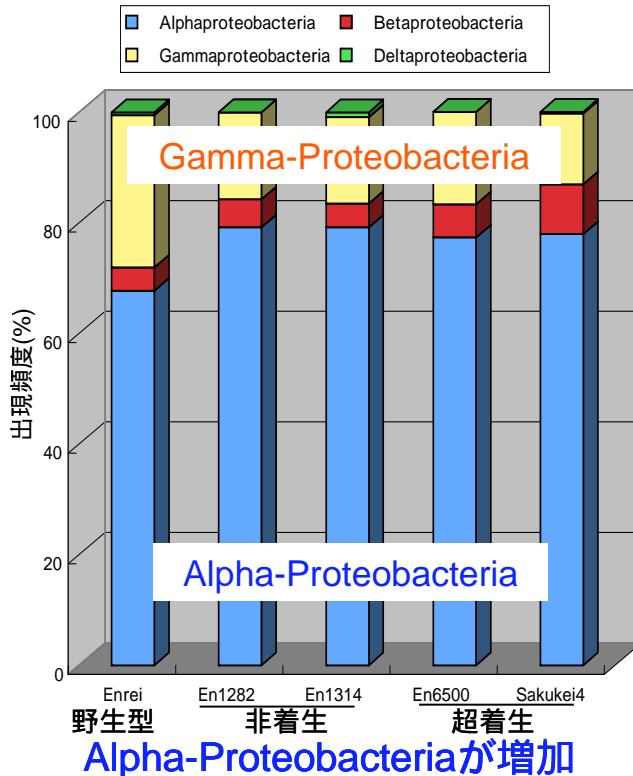
エンドファイト群集構造にも深く関わっていることを示した(図7)。これらは、エンドファイト細菌群集に関する微生物生態学的なはじめての包括的解析であり、有用微生物の農業利用のための重要な基盤情報である。

内生細菌群集の濃縮法を確立

ダイズ茎100g
密度勾配遠心



Gamma-Proteobacteriaが減少



植物材料:ダイズ茎

Enrei (Nod+)

En1282 (Nod-; *NFR1*)

En1314 (Nod-; *NFR1*)

En6500 (Nod++; *HAR1*)

Nod⁺⁺とNod⁻は共通した群集構造を示す。

図7 ダイズエンドファイトの濃縮と、ダイズ共生遺伝子型がエンドファイト群集構造に与える影響