

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名：共生ネットワークの分子基盤

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

#### 研究代表者

川口 正代司 (東京大学大学院理学研究科 教授)

#### 主たる共同研究者

秋山 康紀 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 准教授)

林 誠 (ミュンヘン大学生物学部 教授)

梅原 洋佐 ((独)農業生物資源研究所窒素固定研究グループ 主任研究員)

大友 量 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所  
草地多面的機能研究チーム 主任研究員)

Martin Parniske (ミュンヘン大学生物学部 教授)

斉藤 勝晴 (信州大学農学部 准教授)(平成18年8月～)

畑 信吾 (名古屋大学大学院生命農学研究科 教授)(平成19年4月～)

### 3. 研究内容及び成果

#### 3-1. 研究内容

陸上植物と土壌微生物の最も普遍的な共生は、アーバスキュラー菌根菌との共生である。菌根共生のルーツは古く、植物が海から陸上に進出した4億年前とされ、コケ、シダ、裸子植物を含め、現在の陸上植物のおよそ8割が共生していると言われる。菌根菌は外生菌糸を介して土壌中のリン酸を吸収し宿主に提供する一方、宿主から光合成産物を受け取ることによって増殖し共生関係を成立させている。菌根菌が根に感染すると、皮層細胞内に樹枝状体(アーバスキュール)と呼ばれる枝分かれの多い独特の細胞内器官が形成され、ここで養分が交換されていると考えられている。菌根菌は多くの陸上植物と共生することができるが、例外的にシロイヌナズナを含むアブラナ科等では共生することができないため、共生の分子メカニズムはほとんど明らかにされてこなかった。しかしながら近年、根粒菌が分泌する根粒形成シグナルNod factorの受容系が破綻したマメ科植物の根粒非着生変異体Nod<sup>-</sup>の多くは、菌根菌との共生系も破綻しているMyc<sup>-</sup>変異体であることが判明し、根粒菌や菌根菌との共生に少なからぬ共通のシグナル伝達経路が存在することが明らかになった。これを共生のCommon Signaling Pathwayと呼ぶ。

本研究プロジェクトでは、日本に自生するマメ科のモデル植物ミヤコグサ*Lotus japonicus*を用い、植物と菌根菌の共生に関わるシグナル物質の分子同定を試みると共に、菌類や窒素固定細菌と共生するために進化させてきた植物側遺伝子、そして両者をつなぐCommon Signaling Pathwayの遺伝子を明らかにすることを目的とした。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

#### 3-2. 研究成果

##### 3-2-1. 植物とアーバスキュラー菌根菌のシグナル物質を介したコミュニケーション(秋山グループ)

植物とアーバスキュラー菌根菌(菌根菌)との共生はそれぞれが生産するシグナル物質の相互認識から始まる。植物と菌根菌の生産する共生シグナルはそれぞれbranching factor (BF), Myc factor (MF)と呼ばれている。BFは菌根菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する物質で、根から分泌される脂溶性の低分子化合物であることが分かっていたが、未だ単離されていなかった。一方MFについては、その存在に対する実験的証拠さえなかった。しかし、菌根共生と根粒共生との間で共生初期のシグナル伝達経路Common Signaling Pathwayが

存在することや、根粒菌やその共生シグナルであるNod factorによって誘導される初期ノジユリン遺伝子が菌根菌の感染初期にも誘導されることから、これら共生シグナルの単離・同定を目指して研究を行った。

具体的にはまず、菌根菌や根粒菌によって活性化されるLjCbp1プロモーターにGUS遺伝子が挿入されたミヤコグサT90形質転換体を被検植物として用いるMFアッセイを新規に構築した。本アッセイにおいて、菌根菌 *Gigaspora margarita* や *Glomus intraradices* の孢子抽出物に強い活性が存在することを見出した。T90とsym15-2変異体との交配により得られた植物を用いたアッセイ結果から、この活性物質はCommon Signaling Pathway依存的にLjCbp1プロモーターを活性化することが明らかになった。

3 - 2 - 2 . 菌根菌と根粒菌の共生を支えるCommon Signaling Pathway(川口グループ・林グループ・Parniskeグループ・斉藤グループ・梅原グループ)

アーバスキュラー菌根菌は菌類で独自のクレードを形成する真核生物であるのに対し、根粒菌は原核生物であり、細胞のつくりや共生様式に顕著な違いが認められる。しかしながら、これら2種の共生菌の初期感染プロセスには少なからぬ共通の植物因子が存在することが判明し、これはCommon Signaling Pathwayと呼ばれている。

ミヤコグサ根粒形成変異体sym71, sym73, sym74, sym79, sym80, sym82, sym84, sym85, sym86を単離し、原因遺伝子の同定を試みた。

カルシウムスパイクを含む表現型解析を行い、これら共生変異体について、sym71はcastor、sym73とsym85はnup85、sym74はalb1、sym79はcrinkle、sym82はcyclops、sym86はpolluxと同定・命名した。このうちcastor、pollux、cyclops、nup85、については根粒形成の菌根形成の双方が破綻したCommon Signaling Pathway上の因子であることが菌根菌の感染実験より確認された。

3 - 2 - 3 . 菌根菌との共生に特異的な宿主因子の探索(大友グループ・畑グループ)

Common Symbiosis Pathwayの存在によって、根粒菌と菌根菌の双方の共生に必要とされる宿主因子のみならず、根粒菌との共生に特化した因子を明らかにしてきた。しかしながら、いまだに菌根菌との共生に特異的に働く変異体の報告はない。ミヤコグサを用いて菌根特異的変異体の単離を試み、4年間で約2万株のM2個体を一次選抜に供し、そこから菌根非感染の形質に再現性があり、かつその形質がM3に遺伝する菌根特異的共生変異体を4株得ることに成功した。この選抜試験では、他に27株の菌根共生/根粒共生に共通する変異株も得られた。また、根粒共生変異体の菌根共生に関する表現型解析を行い、13株を新たに根粒共生・菌根共生共通の変異体として同定した。

また、アーバスキュラー菌根共生を行っている植物においては、菌根誘導型リン酸トランスポーターが根の皮層細胞で発現が誘導されることが、ジャガイモ、イネ、タルウマゴヤシ、ミヤコグサなどで知られている。一方、ダイズでは、その菌根誘導型リン酸トランスポーター遺伝子は全く未知である。ミヤコグサの菌根誘導型リン酸トランスポーター遺伝子を同定した手法を適用し、ダイズにおける当該遺伝子を単離することに成功した。

3 - 2 - 4 . 根粒菌の感染プロセスと共生窒素固定を制御する宿主因子の特定(梅原グループ・川口グループ・林グループ)

感染プロセスから窒素固定の分子機構を明らかにすることを目的として、ミヤコグサの根粒及び菌根菌共生変異体の選抜を行った。その結果、再生個体由来の共生変異体15系統(Nod- 2遺伝子座6系統、Hist-1遺伝子座4系統、Fix- 4遺伝子座5系統)、および、重イオンビーム照射植物由来の共生変異体候補44系統(Nod-18系統、Hist-3系統、Fix-26系統、Nod++7系統)が選抜された。さらに、EMS処理植物から単離されたFix-変異体を解析し、新たに少根粒変異体Ljsym88とFix-変異体Ljsym89を単離した。これらのうち、再生個体由来系統15系統、重イオンビーム照射系統14系統、EMS処理変異系統6系統を連鎖地図上に位置づけたところ、13遺伝子座の新規の共生変異体を見いだした。

共生窒素固定系成立過程の後期に関する植物側の分子機構を明らかにするため、新規と判断されたFix-変異体Ljsym89とHist-変異体Ljsym101に関して、変異体の表現型解析を行うとともに、原因遺伝子を単離した。また、alb1、sym80が、根粒形成の初期から感染プロセスに関わる因子であることを見出し、ポジショナルクローニン

グによりAlb1の原因遺伝子を特定した。

### 3 - 2 - 5 . 遠距離シグナル伝達を介した根粒・菌根共生系の解明(川口グループ)

植物の生育や養分環境とバランスの取れた数の根粒が形成されると植物の生育にプラスであるが、過剰な根粒形成はむしろ植物の生育を妨げる。そのため植物は生育に必要以上の根粒を抑制する機構を持ち、根粒の数を適正に制御している。中でも、植物の根に根粒菌が感染すると、根とシュート(植物の地上部)間の遠距離シグナル伝達によりその後の根粒形成が抑制される機構は根粒形成のオートレギュレーションと呼ばれているが、現象としては古くから知られているものの、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。

ミヤコグサにおいて根粒過剰着生変異体har1がシュートで働き根粒形成のオートレギュレーションの破綻した変異体であること、さらにその原因遺伝子がシロイヌナズナの茎頂分裂組織のサイズを制御するCLAVATA1(以下、CLV1)と最も高い相同性を示す受容体型キナーゼであることを明らかにした。シロイヌナズナのCLV1はCLV3様ペプチドをリガンドとして認識していることが知られている。そこでHAR1は、CLV3様ペプチドをリガンドとして認識していることを想定し、ミヤコグサのゲノム情報から、遠距離移行すると予想されるHAR1リガンドの探索を行った。さらに沖縄県宮古島由来の早咲きミヤコグサMiyakojima MG-20にイオンビーム照射することにより新規根粒過剰着生変異体klavier (klv)を単離し、その原因遺伝子を特定した。

## 4 . 事後評価結果

### 4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
0	36	151	42	23	2	0

論文数は多いとは言えないが、菌根菌・根粒菌形成に共通するシグナル伝達経路の宿主因子同定に関する論文が連続してNatureに掲載され、引用される回数も多い等、質の高い論文を出していることは評価される。

特許の数は少ないが、研究の内容から判断してやむを得ない。

### 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

総合的には、国際的に競争の激しい分野において新しい知見を数多く見だし、この分野を先導する成果を上げたことは高く評価できる。菌根菌・根粒菌形成に共通のシグナル伝達経路に関わる宿主因子CASTOR, POLUX, NUP85, CYCLOPSの同定や、菌根菌に対する宿主植物認識シグナル物質Branching Factor (BF)の構造決定に成功するなど、共生機構に関する重要な知見が得られた。具体的には世界に先駆けてBFの同定に成功したほか、菌根菌・根粒菌共通の情報伝達経路に関わる7つの宿主因子のうち4つの因子を同定するなど、この分野を先導する成果が得られた。同定した宿主因子の中でCASTOR, POLUX, NUP85はNod Factorと協働してカルシウムスパイクを起動させ、それによるイオンの流出が感染の初期過程に重要な役割を果たしていることを示した。また、ミヤコグサのゲノム情報から33種のCLE遺伝子を検出し、その発現と菌感染との関係から根粒菌の共生をシステム的に制御する因子(LjCLE1, LjCLE2)の特定に成功した。一方、共生遺伝子産物の相互作用に関しては、そのほとんどが未解明の課題として残されているが、CYCLOPSとCCaMKが相互作用しているのを見いだしたことは、転写制御ネットワーク解明の端緒となる成果である。一方、菌根菌共生シグナル物質Myc factor (MF)の同定は成功しなかったが、困難な課題に果敢に挑戦したことは評価したい。

科学技術への貢献に関しては、植物の養分吸収、窒素固定において重要な共生関係を理解するものとして極めて重要な課題である。生物学および天然物化学の両側面からのアプローチにより共生のメカニズム解明に迫る優れた成果を数多く生みだし、自然科学の発展に大きく貢献する研究である。現状では菌根菌や根粒菌の

農業現場での利用は進んでおらず、本課題の成果は新しい利用技術の開発につながるものと期待される。しかしながら、現時点では共生に関わる分子機構全貌解明の糸口を掴んだ段階であり、病害抵抗性機構解明への応用や新しい育種技術の開発というような農業技術への貢献は今後の研究の成果に負うところが大きい。

今後の展開としては、根粒菌と比較して菌根菌共生の情報伝達経路に関しては培養システムの確立が十分なされていないために研究が遅れている。しかし、プロジェクト後半には世界に先駆けて菌根菌特異的共生変異体の取得に成功しており、今後は菌根菌特異的な宿主因子の同定や情報伝達経路の解明が期待できる。また、MFの同定は困難を極めているが、アッセイ系は確立しており、今後世界に先駆けて同定できるものと期待できる。今後はBFやMFと宿主因子の相互作用や、下流で働く因子の解析を行い、最終的には共生成立の分子機構の全容に迫るモデルを示してほしい。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

Nature(2005, 2005, 2005, 2006)の4件。

日本植物学会奨励賞:林 誠(2005)。

農芸化学奨励賞:秋山康紀(2006)。

日本植物学会学生奨励賞:今泉(安楽)温子(2007)。