

微生物・植物相互作用

別役 重之^{1,2*}・寿崎 拓哉³

自然環境中での微生物の生き様を理解するには、他の微生物との異種間・同種間相互作用はもちろんのこと、微生物とは異なる階層の生物である動物や植物との相互作用をも理解する必要がある。特に、一部の微生物は動植物の病原体として振る舞ったり、あるいは動植物の生存に有用な共生微生物として振る舞ったりするものもある。これらを適切に制御してやることで、動植物の病気を抑制し、成長を促進することが可能となる。このような観点でJST ERATO野村集団微生物制御プロジェクトでは微生物同士の相互作用に留まらず、微生物とこれら動植物との相互作用についても研究を進めている。本稿ではそれらのうち、特に植物と病原細菌および共生細菌との相互作用に関する成果に関して紹介する。

植物病原細菌に対する植物免疫

植物免疫誘導シグナルとその空間的制御機構 植物は、細菌や糸状菌などの微生物の感染に対して防御応答を発動する。植物病害の防除は農業において非常に重要な課題であり、農作物を用いて数多くの研究が行われてきた。その結果、ある特定の病原体単離株を認識して、強い防御応答を誘導する抵抗性遺伝子のような遺伝資源が数多く見いだされてきた。近年、モデル植物であるシロイヌナズナなどを用いた遺伝学や生化学を駆使した植物免疫研究が急加速し、それら抵抗性遺伝子の多くがある特定のファミリーに属するタンパク質をコードし、それらが病原体由来因子(「エフェクター」と総称される)を直接・間接的に認識する役割を持つこと、その認識の下流では植物ホルモンであるサリチル酸(SA)などを介して防御応答誘導シグナル系が活性化されていることなどが明らかとされてきた¹⁾。これら抵抗性遺伝子産物を介した防御応答誘導シグナル経路は広く植物種を越えて存在し、病原体エフェクターを認識することで開始されることからエフェクター誘導型免疫(effector-triggered immunity: ETI)と総称されている¹⁾。

ETIが発動すると、多くの場合、感染部位に局所的な植物細胞の自殺を伴い、その細胞死領域周辺には抗菌タンパク質や抗菌化合物生合成系酵素の遺伝子群が活性化していることが報告されており、局所的な病原微生物の

封じ込めに寄与していると想定されている。ETIで誘導される応答は、細胞死なども伴うことから過敏反応(hypersensitive response: HR)と呼ばれている^{1,2)}。

このようにETIは、病原体感染により誘導され、感染部位(HR細胞死)とその周辺(防御応答遺伝子活性化)で異なる応答をすることから、時空間的に制御されていると考えられる。感染後の経時的な応答に関しては各種防御関連遺伝子発現の経時変化などが詳細に解析されてきたが、その空間的な制御機構はほとんどわかっておらず、感染部位周辺にSAの濃度勾配が見られることから、SAが感染部位で合成されたのち拡散して濃度勾配を形成することで、植物細胞はその濃度に沿って細胞死や防御応答といった異なる応答を示すのだろうと漠然と理解されていたのみであった^{2,3)}。

また近年の、より詳細な遺伝学的研究によって、ETI発動にはSAシグナル経路の活性化のみならず、SAとその作用が強く拮抗する植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)経路の活性化も必要であることが示されるようになった^{4,5)}。一般的には、SAは活物寄生性病原体に対する防御応答に必要で、JAは腐生性病原体に対する防御応答や虫による食害などの傷害に対する防御応答に必要とされ⁶⁾、SA-JA間の強い拮抗作用から両者は同時に活性化しないと考えられていた。そのため、これら新たな発見により、強い拮抗関係にあるSAとJAがどのようにして同一感染組織中でそれぞれの機能を果たしているのかという新たな疑問が生じていた。

蛍光レポーター植物とライブイメージング Betsuyakuらは、植物免疫の時空間的制御機構を解析することを目的に、シロイヌナズナを用いて植物免疫応答の時空間的動態を免疫応答マーカー遺伝子プロモーター活性のライブイメージングにより捉える実験系を構築した^{7,8)}。まず、SA応答性マーカー遺伝子としてよく知られている*Pathogenesis-Related Gene 1 (PRI)* 遺伝子とJA応答性マーカー遺伝子である*Vegetative Storage Protein 1 (VSP1)* 遺伝子のプロモーター(*pPRI*および*pVSP1*)に着目し、それらの活性を核局在型の蛍光タンパク質yellow fluorescent protein (YFP)によって可視化できる形質転換植物を構築した。SA依存性防御応答のマーカー

* 著者紹介 ¹ 龍谷大学 農学部 植物生命科学科 (准教授) E-mail: betsu@agr.ryukoku.ac.jp² JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 微生物・動植物相互作用グループ (グループリーダー)³ 筑波大学 生命環境系 (准教授)

である*pPRI*に関しては、これまでもβ-グルクロニダーゼ遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター植物などを作ることで、さまざまな解析が行われてきた。しかし、前者はサンプルの固定が必要でプロモーター活性の時間的変動を同じサンプルで捉えることが困難であること、後者は高価な基質が必要なことや、その基質がSAシグナル系を活性化させるなどの報告もあり、細胞レベルでの植物免疫の時空間的動態解析には一長一短であった⁹⁻¹¹⁾。一方、核局在型YFPの利用は、特に高価な試薬も必要とせず、通常の蛍光顕微鏡システムを用いることで細胞レベルでの植物免疫動態を簡便に追うことができるという利点がある。また、植物免疫応答時に蓄積される二次代謝化合物由来自家蛍光も、細胞全体で生じる自家蛍光シグナルに対して核特異的なYFP蛍光という形で容易に区別できる。Betsuyakuらはこのレポーター植物を電動制御可能な実体顕微鏡と組み合わせることで、土の上に生えたまま(生きたまま)の植物体の葉で、免疫応答の動態を経時的に計測できる系を構築した^{7,8)}。

シロイヌナズナに感染することができるモデル植物病原細菌、トマト斑葉細菌病菌*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*)のうち、エフェクターである*AvrRpt2*を保有する株(*Pst_a2*)をシロイヌナズナ葉に局所的に高濃度で注入接種すると、接種後12時間程度で接種部位に目視可能なHR細胞死斑を誘導する。Betsuyakuらはこの接種系を用いて接種葉でのSAおよびJA活性の経時観察を行った。その結果、*pPRI*はHR細胞死領域のすぐ外側で接種後13時間あたりをピークとして一過的に強い活性を示し、*pVSP1*はさらにその外側の領域で一過的に強い活性を示すことが見いだされた。このように、マーカー遺伝子プロモーター活性のライブイメージングによって、接種部位(≡HR細胞死領域)を中心に、まずSA領域、そしてその外側がJA領域というように、それぞれ異なる領域を中心に強く活性化していること、すなわち、ETI誘導時には感染部位の周辺組織中に同心円的なSA/JA活性化領域からなる二層構造が形成されるということが明らかとなった(図1)^{7,8)}。

ETIにおけるSA/JA二層構造形成の意義 このSA/JA活性化領域からなる同心円構造の発見により、ETIに必要なSAおよびJAシグナル系が、両者の強い拮抗関係にも関わらず、同じ感染葉で同時に活性化できるメカニズムは理解できるようになった。しかし、この二層構造形成が植物免疫ETIにどのような利点をもたらすのであろうか。まず、SAシグナル系は防御応答の活性化のみならずHR細胞死誘導にも必要で、その異常な活性化をもたらす変異体は細胞死変異体として知られてお

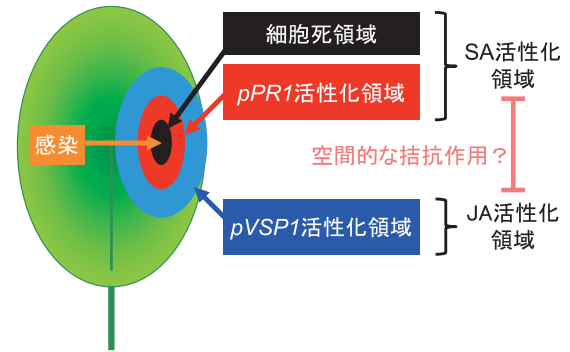


図1. ETI時に現れる同心円的SA/JA二層構造パターン

り、多くの場合、植物個体の矮化を伴うなど正常な成育に有害となる^{12,13)}。SA活性化領域のすぐ外側でJAが活性化することでSA-JA拮抗作用が空間的に作用して、植物自身にも有害に作用しうるSA活性化領域が必要最小限に抑制されていることがまず想定される⁷⁾。また、SA活性化領域の中心にはHRによる細胞死領域が顕れるが、このような領域は死細胞を好む腐生菌や昆虫食害の格好のターゲットとなりうる^{7,14)}。また、これら生態学的な利点のみならず、ETI時にはJA経路が*Pst_a2*株の成育抑制そのものに寄与していることやSA経路と複雑な相互作用を行っている可能性も報告されている^{4,5)}。これらのことはSA/JA二層構造形成がETIという免疫システムそのものに関与している可能性を示唆している。植物は、感染部位を中心に同心円的に異なる防御応答シグナル系を活性化させることで、感染部位からの距離に応じた適切な免疫応答を誘導して「免疫応答の場」のようなものを形成しているのかもしれない⁷⁾。動物のように免疫に特化した細胞を持たずに、各細胞がそれぞれ自然免疫を発動すると考えられている植物にとって、何らかの細胞間シグナルを用いて感染部位周辺に適切な「免疫応答の場」を形成することはその生存戦略上、意義のあることなのかもしれない。

感染の現場における植物と病原細菌の相互作用を理解するには、植物免疫の時空間的制御機構に加えて、病原細菌の局在や病原性因子の発現様式を理解する必要がある。Betsuyakuらは*Pst*がバイオフィーム様コロニーを植物細胞間隙に形成することも見いだしている(未発表)。

以上のように、イメージングを用いた植物免疫の時空間的解析系が確立されたことで、SA-JA二層構造形成という新たな現象が見いだされ、実際の感染の現場における植物免疫への理解が深まった。イメージングという切り口を用いた今後のさらなる研究の進展、植物免疫や細菌病原性への理解の深まり、それら知見を用いての農業現場への応用展開が期待される。

植物と共生微生物との相互作用

植物微生物共生 動くことのできない植物は、土壌中のさまざまな微生物と共生関係を築くことで、栄養に乏しい環境の中でも生き抜いている。植物と微生物の共生と聞くと、多くの方がまず思い浮かべるのがマメ科植物と根粒菌の共生（根粒共生）ではないだろうか。根粒共生では、植物は根に根粒と呼ばれるこぶ状の器官を形成し、その中に、大気中の窒素を植物が利用できるかたちに変換してくれる根粒菌（窒素固定細菌）を共生させることで、窒素栄養を得ることができる。また、多くの陸上植物は、真菌類の一種であるアーバスキュラー菌根菌（以下、菌根菌）と共生することで、リン栄養や水を得ている。これまでの研究から、植物の祖先が海から陸上に進出した約4億5千万年前には、すでに植物と菌根菌は共生（菌根共生）関係にあったと推測されている。その一方で、根粒共生は約6千万年前に始まったと考えられている。また、これまでの分子遺伝学研究的の進展により、植物は共通共生経路（common symbiosis pathway: CSP）と呼ばれる根粒共生と菌根共生の共通制御に関わるシグナル伝達経路を持っていることが明らかにされている。これらの知見に基づき、植物の進化の過程で菌根共生がまず誕生し、その約4億年後に菌根共生に関わる因子を一部流用することによって根粒共生が誕生したと考えられている¹⁵⁾。その一方で、根粒共生、菌根共生それぞれがどのような仕組みによって成立しているのか、また、その共通した制御にはどのような仕組みが関わっているのかについては、未解明な点が多い。

Suzakiらは、マメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いて、根粒共生を正常に行うことのできない突然変異体のスクリーニングを行い、新規変異体*lack of symbiont accommodation (lan)*を単離した¹⁶⁾。野生型の植物では、根粒菌を根の中に取り込む際に、感染糸と呼ばれるトンネル状の構造が形成され、それが根粒菌の通り道となる（図2）。*lan*変異体では、感染糸の形成数が著しく減少していた。その一方で、*lan*変異体では、細胞と細胞の間を通る方法で根粒菌が根の内部へと侵入することがわかった。また、根粒菌を植物に感染させてから窒素固定を行う根粒が形成されるまでの日数を調べたところ、*lan*変異体は野生型よりも多くの日数がかかることがわかった。したがって、*lan*変異体で見られる細胞と細胞の間を通る根粒菌の侵入様式は、野生型の植物で見られる感染糸を介した侵入様式と比べて、根粒菌を受け入れて共生を成立させる方法としては効率の悪いものであることが示唆された。このことから、変異の原因である

*LAN*遺伝子は、感染糸の形成を介して効率的に根粒菌へ受け入れて機能的な根粒を作るために必要な因子であると推察される。また、*lan*変異体に菌根菌を感染させたところ、菌根菌との共生器官である樹枝状体の形成がほとんど観察されなかった。この結果は、*LAN*遺伝子は、根粒菌との共生だけでなく、菌根菌との共生にも必要な因子であることを示唆している¹⁶⁾。

*lan*変異体の原因遺伝子を特定したところ、メディエーターと呼ばれる基本的な遺伝子発現制御に関わるタンパク質複合体のサブユニットの一つをコードしていることがわかった。実際に、*lan*変異体では、根粒共生や菌根共生過程において発現が誘導される遺伝子の発現が抑制されていた。さらに、CSPに関わる遺伝子の変異体と*lan*変異体の2重変異体の解析から、*LAN*はCSPとは一部独立に働くことがわかった¹⁶⁾。

*LAN*の発見により、これまで知られていた共通共生経路とは異なる、根粒・菌根共生の新たな共通制御システムが見いだされた。今後は*LAN*がどのようなタンパク質と相互作用することで共生遺伝子の発現を制御するのかを明らかにし、植物微生物共生制御機構の全容解明に迫っていきたい。植物微生物共生の仕組みを理解することは、微生物との共生能力を向上させる植物の開発につながる。また、根粒共生に必要な遺伝子セットを特定できれば、非マメ科植物のような根粒菌と共生することができない植物にも将来的には根粒形成能を付与できるようになるかもしれない。このような研究により作られた作物を利用して、微生物との共生をうまく活用して窒素やリン栄養を得ることができれば、貧栄養な土地における作物の栽培や、化学肥料に頼らないクリーンな農業の実現に貢献する可能性が期待できる。

窒素栄養に応答した根粒共生の制御機構 先述の通り、マメ科植物は根粒共生を介して大気中の窒素を栄養として得ることができることから、根粒共生は植物にとっては良いことばかりのように思われる。しかし、実際のところは、根粒共生を成立させるためには、植物は

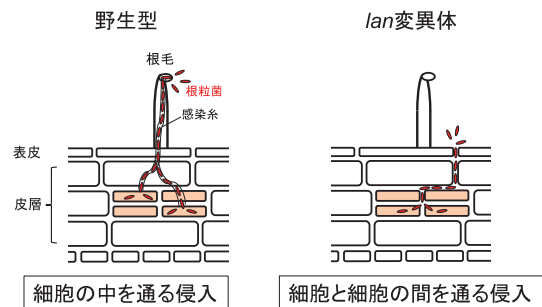


図2. 野生型と *lan* 変異体における根粒菌の侵入パターン

自ら生産した光合成生産物を窒素固定反応などのエネルギー源として根粒菌へ供給する必要がある。そのため、植物は光合成産物を根粒共生のために消費しすぎることによって成長に悪影響を及ぼさないように、自身の根に作る根粒を適切な数に保つ仕組みを有している^{17,18)}。また、土壤中に窒素栄養が豊富に存在する場合には、根粒を介さずに窒素栄養を根に直接取り入れる方がエネルギーのロスが少なく済む。土壤中に窒素栄養が豊富に存在するときに根粒共生が抑制される現象は古くから知られているものの、その制御機構についての理解はあまり進んでいなかった。

Nishidaらは、硝酸態の窒素栄養が豊富に存在する土壌でも根粒を形成するミヤコグサ突然変異体のスクリーニングを行い、新規変異体 *nitrate unresponsive symbiosis 1* (*nrsym1*) を単離した¹⁹⁾。*nrsym1* 変異体は、硝酸を含まない土壌では野生型と同様の根粒共生を示した。高濃度の硝酸を添加した場合、野生型の植物は根粒を作らなくなるのに対し、*nrsym1* 変異体は硝酸を含まない条件とほとんど変わらない成熟根粒を形成した。したがって、NRSYM1 は高濃度の硝酸に反応して根粒共生を抑制する際に働く因子であることがわかった。*nrsym1* 変異体の原因遺伝子を特定したところ、NIN-LIKE PROTEIN (NLP) と呼ばれるタイプの転写因子をコードしていた¹⁹⁾。

これまでの研究から、宿主植物が備えている根粒の数を適切に保つ仕組みは、根と地上部を介した全身的なシグナル伝達 (autoregulation of nodulation: AON) によって制御されていることがわかっている¹⁷⁾。野生型植物では、AONにおいて根粒菌の感染を根から地上部へ伝えるためのシグナルとして働く CLE ペプチドをコードする *CLE-RS2* 遺伝子の発現が、根粒菌の感染だけでなく硝酸によっても強く誘導されることが知られていた²⁰⁾。一方、*nrsym1* 変異体では、硝酸を添加しても *CLE-RS2* 遺伝子の発現は誘導されないため、硝酸に反応した *CLE-RS2* 遺伝子の発現を NRSYM1 転写因子が制御している可能性が考えられた。そこで、*CLE-RS2* 遺伝子が NRSYM1 の直接の標的遺伝子であるかを検証した結果、NRSYM1 転写因子は硝酸に反応して *CLE-RS2* 遺伝子の発現を直接誘導し、AON と同様の機構を用いて全身的に根粒の数を制御していることが明らかとなった (図3)¹⁹⁾。

本研究によって、NRSYM1 転写因子が硝酸に反応した根粒共生制御の中心的な働きを担うことが明らかとなった。NRSYM1 は、さまざまな下流因子を使い分け

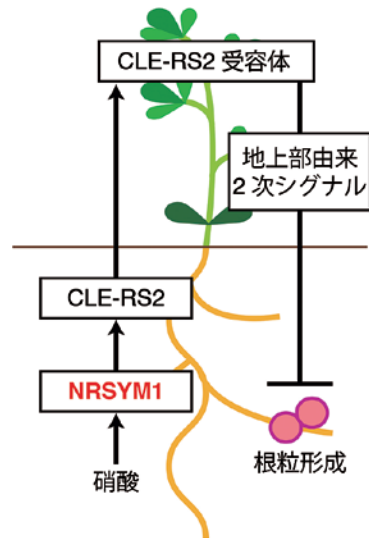


図3. 硝酸に反応した根粒形成抑制モデル

ることで根粒共生を多面的に制御していると考えられる。今後は *CLE-RS2* 遺伝子以外の NRSYM1 標的の遺伝子を同定することで、硝酸に反応した根粒共生の制御機構の全容解明に迫っていきたい。窒素栄養に反応した根粒共生の抑制の仕組みを理解することは、窒素肥料と根粒共生による窒素源の獲得の両立のために重要であり、NRSYM1 の研究から得られた知見は、マメ科作物の効率的な肥料管理など、持続可能な農業の実現に貢献する可能性が期待される。

まとめ

本稿では野村 ERATO の微生物-動植物相互作用グループにおける植物免疫と根粒共生に関わる研究の進展を紹介した。どちらも基礎研究ながら、農業現場での応用展開が期待される研究である。さらに同グループでは、本稿では紹介しきれなかった植物病原細菌の病原性や、動物生殖細胞に関する研究も精力的に行っている。ぜひ他の媒体でそれら研究成果発表に注目していただきたい。

謝 辞

本稿における成果は科学研究費助成事業 (22880008 および 23780040, 18H04773, 19H03239) と戦略的創造研究推進事業 (PRESTO117665 および JPMJER1502) の助成を受けて実施いたしました。

文 献

- 1) Dodds, P. N. and Rathjen, J. P.: *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 539 (2010).
- 2) Enyedi, A. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2480 (1992).
- 3) Fu, Z. Q. *et al.*: *Nature*, **486**, 228 (2012).
- 4) Tsuda, K. *et al.*: *PLoS Genet.*, **5**, e1000772 (2009).
- 5) Liu, L. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 13099 (2016).
- 6) Glazebrook, J.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 205 (2005).
- 7) Betsuyaku, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **59**, 8 (2018).
- 8) Betsuyaku, S. *et al.*: *J. Vis. Exp.*, **144**, e59147 (2019).
- 9) Ohshima, M. *et al.*: *Plant Cell*, **2**, 95 (1990).
- 10) Murray, S. L. *et al.*: *Mol. Plant Microbe Interact.*, **15**, 557 (2002).
- 11) Jordá, L. and Vera, P.: *Plant Physiol.*, **124**, 1049 (2000).
- 12) Delaney, T. P. *et al.*: *Science*, **266**, 1247 (1994).
- 13) Lorrain, S. *et al.*: *Trends Plant Sci.*, **8**, 263 (2003).
- 14) Tsuda, K.: *Plant Cell Physiol.*, **59**, 3 (2018).
- 15) Parniske, M.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 763 (2008).
- 16) Suzaki, T. *et al.*: *PLOS Genet.*, **15**, e1007865 (2019).
- 17) Oka-Kira, E. and Kawaguchi, M.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 496 (2006).
- 18) Nishida, H. and Suzaki, T.: *Plant Cell Physiol.*, **59**, 1733 (2018).
- 19) Nishida, H. *et al.*: *Nat. Commun.*, **9**, 499 (2018).
- 20) Okamoto, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **50**, 67 (2009).