

SICORP 日本-スペイン、フランス、ドイツ
「食料及びバイオマスの生産技術」分野 事後評価結果

1. 共同研究課題名

「ストレス条件下における植物機能亢進による作物収量の向上」

2. 日本ー相手国研究代表者名（研究機関名・職名は研究期間終了時点）：

日本側研究代表者

榊原 均(名古屋大学 大学院生命農学研究科・教授)

スペイン側研究代表者

ステファン・プルマン(植物バイオテクノロジーゲノミクス研究センター・教授)

ジェサス・ビンセント＝カルバホサ(植物バイオテクノロジーゲノミクス研究センター・准教授)

フランス側研究代表者

アンネ・クラップ(ジャンピエールブーギン研究所・所長)

ドイツ側研究代表者

ユタ・ルディ＝ミュラー(ドレスデン工科大学・教授)

ラルフ・オルミュラー(イエナ大学・教授)

3. 研究実施概要

植物内生真菌である *Piriformospora indica* の感染が引き起こす、植物の成長促進と種々のストレス耐性向上に関わる鍵遺伝子をオミックス解析と機能解析により同定することを目的に国際協働研究が行われた。シロイヌナズナを用いて *P. indica* 感染後のトランスクリプトーム変化、ホルモノーム変化を詳細に解析するとともに、栄養欠乏などのストレス条件下での感染によるトランスクリプトーム変化の違いを比較解析した。なお、榊原（日本）グループは、主要植物ホルモン内生量を網羅的に一斉定量解析し情報共有するとともに、成長促進ホルモンであるサイトカイニンの解析と窒素栄養ストレスに対する耐性亢進機構についても解析した。その結果、*P. indica* 感染による根系成長促進に関連する因子として、オーキシン代謝系とカルシウムシグナル伝達系を見出した。具体的には、オーキシン代謝経路が *P. indica* 感染時におけるオーキシン恒常性維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、感染により特徴的に誘導されるカルシウムシグナル系遺伝子を見出した。種々の解析の結果、*P. indica* 感染によりカルシウムシグナル系遺伝子発現が上昇することで、植物と *P. indica* の相互作用の確立や内生関係の維持が促進され、また根系成長が正に制御されることを示唆する結果を得た。窒素栄養ストレスに対する耐性向上については、上述のカルシウムシグナル系遺伝子の下流に窒素欠乏下で誘導される窒素獲得系遺伝子群があり、これら遺伝子の発現を上昇させることが原因の 1 つである可能性を示した。以上の知見をもとに *P. indica* による成長促進と栄養ストレス耐性亢進機構のモデルを構築した。

日欧研究者の交流の面では、研究期間中に 6 回の合同ミーティングと 2 回の国

際ワークショップを開催し、大学院生、若手研究者も含めた交流が行われた。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況、得られた研究成果及び共同研究による相乗効果

(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況を含む)

本研究では、植物内生真菌の一種である *Piriformospora indica* の感染が、植物の生物学的および非生物学的ストレス耐性を高めるしくみを明らかにし、そのしくみで鍵となる働きをする転写因子を同定することを目的とした。また、同定された転写因子を実用作物に展開し作物生産性の向上を図ることを目的とした。なお、*P. indica* 接種とサンプリングはドイツグループ(G)、トランスクリプトーム解析はスペイン G、ホルモノーム解析は日本 G が分担した。

シロイヌナズナへの *P. indica* 接種後のトランスクリプトーム変化、ホルモノーム変化を詳細に解析し、*P. indica* 感染による根系成長促進に関連する因子として、オーキシン代謝系とカルシウムシグナル伝達系が見出された。具体的には、グルコシノレートやファイトアレキシン生合成経路が活性化され、それによりオーキシン (IAA) の内生量が増加、その影響により IAA のアミノ酸縮合体である IA-Asp の蓄積量が根で有意に増加することが見出された。一方、トランスクリプトーム解析から明らかとなったオーキシン誘導性遺伝子 (オーキシンのアミノ酸縮合を触媒する *GH3* 酵素遺伝子) の多重変異体では *P. indica* 感染による根系成長の促進効果が認められなかったことから、IAA のアミノ酸付加による不活性化経路 (*GH3* 経路) が適切な濃度内でのオーキシン作用の亢進に寄与していることが示唆された。なお、先行研究で示唆された *P. indica* 感染によるサイトカイニンの新規合成の検証を行なった結果、サイトカイニン内生量は増加するものの、その増加量はわずかであり、増加する分子種も先行研究とは異なるものであった。

一方、トランスクリプトーム解析により、*P. indica* 感染によりカルシウムイオンセンサーとしての機能を持つファミリー遺伝子の発現上昇が見出された。変異体を用いて *P. indica* 感染の影響を検証した結果、特定の変異株で根の成長促進効果の減衰を認めた。そこで、影響が大きかった変異体を用いて解析した結果、野生株 (Col-3) では誘導されなかった防御関連遺伝子の多くが、*P. indica* 接種した変異株では発現増加することを認めた。以上の結果から、このカルシウムイオンセンサー遺伝子が植物の一般的な防御反応を抑制し、植物と *P. indica* の相互作用の確立や維持を助ける鍵遺伝子であるという仮説モデルが得られた。

一方、*P. indica* 感染植物の窒素栄養ストレスに対する耐性亢進を解析し、高親和性硝酸イオン輸送体遺伝子 *NRT2.4*, *NRT2.5* や窒素同化系酵素であるグルタミン合成酵素遺伝子 *GLN1.4* など、窒素欠乏時に誘導される遺伝子が、*P. indica* 感染で発現上昇していることを見出した。なお、カルシウムセンサー遺伝子変異体ではこれら *NRT2* 遺伝子の発現誘導が抑制されることが報告されていたこ

とから、同遺伝子は植物の防御反応の抑制だけではなく、窒素制限条件下での硝酸イオン吸収誘導の正の制御に関わるなど、*P. indica* 感染時に複数の制御系に作用することが推察された。以上の知見を踏まえ、カルシウムセンサー遺伝子を鍵遺伝子とした *P. indica* による成長促進と栄養ストレス耐性亢進機構のモデルが構築できた。以上のように、当初の目的をほぼ達成したと考えられる。

2017年9月に行われたキックオフ会議（第1回 ICPS 会議）において全体計画と役割分担について議論され、非生物学的ストレスに特化した研究を行うことに計画変更された。当初の提案自体が過大なものであると理解できるが、計画設計が不十分であるという評価意見があった。生物学ストレス応答の解析は必要な課題であることから、今後の継続研究が展開されることが期待される。また、今回の解析がシロイヌナズナに限定され、応用作物としてのイネ科作物等への展開が行われなかったことも残念な結果であるが、他の双子葉作物での解析・展開を期待したい。

なお、本国際共同研究の相乗効果を生み出すために、おおよそ半年に1度のペースで計6回の合同ミーティングが開催され、さらにイエナとベルサイユでの合同ミーティング時に国際ワークショップ「Plant performance under stress」が開催されるなど、日本側、欧州側双方から多くの若手研究者、技術者の参画により有意義な交流を進めることができたことは評価できる。また、プロジェクト期間中の論文発表は総説1報であったが、今後、主要成果が原著論文として発表されることが期待される。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、わが国の科学技術力強化への貢献

本研究は、土壤微生物と植物の相互作用機構を活用することで、化学肥料の投与量低減においても作物生産性を維持できる技術開発につながる研究として、持続可能な開発目標（SDGs）「2. 飢餓をゼロに」「15. 陸の豊かさを守ろう」への貢献が期待されるとともに、21世紀型農業のモデルとなると考えられる。

本研究で明らかとなった植物内生真菌の一種 *Piriformospora indica* の感染が植物の非生物学的ストレス耐性を高めるしくみとして、ホルモン分析から、植物成長ホルモンであるオーキシンのアミノ酸縮合体の1つである IAA-Asp 蓄積量が *P. indica* 感染シロイヌナズナの根で有意に増加することを見出すとともに、カルシウムイオンセンサー遺伝子がシロイヌナズナの一般的防御反応を抑制し、オーキシン恒常性維持と *P. indica* 感染による根系成長に寄与しているという仮説モデルが構築されたことは科学的に重要な知見である。一方、このオーキシン代謝は、アブラナ科に特有であることが示唆されることから、作物として重要なイネ科への展開は困難であろうと考えられる。

一方、窒素栄養ストレスに対する耐性亢進機構の研究においてカルシウムセンサー遺伝子の下流に *NRT2.4*, *NRT2.5* の硝酸イオン吸収系遺伝子があることが明らかになったことの意義も大きい。このことから、先行研究での *P. indica*

感染によるサイトカイニン新規合成の活性化は、直接的な制御ではなく、同遺伝子を介した硝酸イオン吸収促進による二次的な効果であるという結論が導かれた。

鍵遺伝子の有力候補であるカルシウムセンサー遺伝子は、ゲノム解析の結果、栽培イネ (*Oryza sativa*) ゲノム上に見出せなかったことから、イネ科等への一般化は困難であろうということが推察された結果は、実用展開を考える上で残念である。しかし、同鍵遺伝子は、内生菌の定着や維持に加え、硝酸イオンの効率的な取り込みにも関わる可能性が高いことから、今後双子葉作物への展開に期待が持たれる。