

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17018041

研究課題名（和文） 植物微生物相互作用の包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of interactions between plants and microbes

研究代表者

田畑 哲之（TABATA SATOSHI）

財団法人かずさDNA研究所・副所長

研究者番号：70197549

研究成果の概要（和文）：マメ科植物と根粒菌の相互作用による共生窒素固定に着目し、分子遺伝学およびゲノム科学的手法を駆使して関連遺伝子の同定、機能解析を行った。その結果、共生の成立、根粒の形成およびその制御、窒素固定に関与する多数の遺伝子が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanisms of symbiotic nitrogen-fixation between legumes and rhizobia have been investigated by molecular-genetics and genomics approaches. Genes that are essential or related to the establishment of symbiosis, nodule formation and its regulation, and nitrogen fixation were isolated, and their functions were identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	31,500,000	0	31,500,000
2006年度	28,700,000	0	28,700,000
2007年度	28,700,000	0	28,700,000
2008年度	29,000,000	0	29,000,000
2009年度	29,000,000	0	29,000,000
総計	146,900,000	0	146,900,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：マメ科植物、ミヤコグサ、根粒菌、共生窒素固定、タンパク質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物の大部分は、土壌中のバクテリア、菌類とさまざまな相互作用を通して有機的に「共存」しており、多くの植物とエンドフ

サイトや菌根菌の寄生、共生やマメ科植物と根粒菌の共生をその典型的な例としてあげることができる。なかでも共生現象は、地球生態系の最も基本的な部分を構成する植物、

微生物間の相互作用メカニズムを解明するための優れた系であると同時に、養分吸収効率の上昇、耐病性の付加など宿主植物に利益を供与するため、農業上の重要性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系を対象として、従来の分子遺伝学的手法ならびにゲノム科学的手法を駆使することにより、両者間の相互作用機作およびその遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。マメ科植物と根粒菌の共生系は、1) 宿主特異性が高い、2) 宿主とバクテリアの両者で新たな器官形成や大きな生理的变化が起こる、3) 物質を介した複雑な相互作用がある、などの特徴をもつ。本研究では、ゲノム構造情報を効果的に利用することによって、マメ科植物と根粒菌の両者から共生窒素固定の全過程に関わる遺伝子を網羅的に同定し、その生理的機能と相互作用を解明する。

## 3. 研究の方法

ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)では、EMS やイオンビーム処理によって共生窒素固定のさまざまな過程で異常を示す変異体をこれまでに33系統分離しており、遺伝解析によってそのうちの17遺伝子座を明らかにしている。本研究では、DNA マーカー情報や遺伝子構造情報を十分に活用して、可能な限り多数の遺伝子座に対応する遺伝子の同定、単離を行う。特定された原因遺伝子については、生理学的手法および情報科学的手法を用いて機能の推定を行う。さらに、これらの遺伝子の存在様式を、根粒菌及び菌根菌の両者と共生できないシロイヌナズナ、菌根菌のみと共生が可能なイネのそれと比較することによって、植物がもつ多様な共生能の遺伝的基盤を明らかにする。

ミヤコグサ根粒菌(*Mesorhizobium loti*)においては、ゲノム構造情報を利用した系統的大規模遺伝子破壊系と遺伝学的解析を組み合わせることにより、共生のさまざまな過程に必須な遺伝子を可能な限り多数特定する。この際、すでに作製済みの全ゲノムをカバーするコスミドクローン群を効果的に利用する。同時に、上記の方法で同定された遺伝子産物に共通な機能ドメインを含む全遺伝子のリスト化を行い、共通転写制御領域の検索など情報科学的手法を用いた新規の共生関連遺伝子の同定も試みる。さらに、上記変異体とアレイ技術の組み合わせや酵母 Two-hybrid 系によるタンパク質相互作用の大規模解析によって、同定した遺伝子の制御ネットワーク内における役割についての情報を得る。これと平行して、共生能をもたない根粒菌様細菌と根粒菌との PCR ゲノムスキ

ャンによるゲノム構造比較を行い、共生能獲得の遺伝的背景に関する手がかりを得る。また、共生領域の人為的導入系の開発を試み、宿主特異的相互作用のメカニズムを探りたい。

## 4. 研究成果

### (1) ミヤコグサの共生関連遺伝子の解析

マメ科植物は根粒菌との共生バランスを維持するために、根粒形成のオートレギュレーションというシステムを有している。根粒形成のオートレギュレーションは、根粒菌の感染を受けて根からシュートに発信される「Root-derived Signal」と、シュートから根へと発信され過剰な根粒の形成を抑制する「Shoot-derived Signal」により構成されている。我々はこれまでに、根粒形成の全身制御が破綻したミヤコグサ根粒過剰着生変異体 *har1* (*LjSYM78*) を単離し、HAR1 が根ではなくシュートで機能すること、またその原因遺伝子はロイシンリッチリピートをもつ受容体型キナーゼをコードすることを明らかにしてきた。HAR1 と最も高い相同性を示すシロイヌナズナの受容体は、分泌ペプチド CLV3 を受容して茎頂・花芽分裂組織(メリステム)を制御する *CLAVATA1* (*CLV1*) と最も高い相同性をもつことから、HAR1 が受容すると予想される「Root-derived Signal」は、CLV3 様ペプチド(CLE ペプチド)であると考えられた。そこでミヤコグサ Miyakojima MG-20 のゲノム情報から CLE ドメインをもつ39種の遺伝子を検出し、すべての遺伝子について根粒菌感染後の発現応答を解析した。そのうち *LjCLE-RS1*、*LjCLE-RS2*、*LjCLE3* はミヤコグサ根粒菌の感染により根で数十倍から数百倍に発現が上昇することを見いだした。次に、*LjCLE-RS1/2* をアグロバクテリウムによる毛状根系で過剰発現させたところ、根粒形成が強く抑制されること、また過剰発現による抑制効果は形質転換された毛状根のみならず非形質転換根にも及ぶこと、さらに *har1* 変異体バックグラウンドではその抑制が全く観察されないことを見いだした。

根粒形成のオートレギュレーションは、根粒菌の分泌する根粒形成誘導因子 Nod factor によって駆動されることが知られている。そこで、佐伯グループより Nod factor 生産能を欠損するミヤコグサ根粒菌を入手し植物に感染させたところ、*LjCLE-RS1/2* 遺伝子の発現誘導は見いだされなかった。また、Nod factor シグナル伝達系の構成因子であるカリウムイオンチャンネル *CASTOR*、カルシウムカルモジュリンキナーゼ *CCaMK*、GRAS 型転写因子である *NSP2* の各変異体について発現解析を行ったところ、*CASTOR* と *CCaMK* は *LjCLE-RS1/2* の発現誘導に必須であり、*NSP2* は *LjCLE-RS1* の発現誘導に関わっていること

が示された。以上の結果から、*LjCLE-RS1/2* のコードする CLE ペプチドが根からシュートへ遠距離移行する「Root-derived Signal」の分子の実体であり、それらはシュートで機能する HAR1 レセプターのリガンドとして機能していることが示唆された。

*klavier (klv)* はミヤコグサ *Miyakojima MG-20* にイオンビーム照射によって単離された新規超根粒着生変異体で「Shoot-derived Signal」を失っていることが示されている。*har1klv* の 2 重変異体解析からは、*KLV* は *HAR1* と同一経路で機能することが示唆され、*klv* における維管束分化不全が花成や根粒形成という遠距離シグナル伝達を必要とする現象に影響していることが示唆された。また *klv* で *LjCLE-RS1/2* を過剰発現させても *har1* 同様根粒形成の抑制が全く観察されないことを見いだした。ポジショナルクローニングにより原因遺伝子を特定し、相補実験より *klv* の共生、非共生の多面的形質がすべて 1 遺伝子に起因することを明らかにした。*KLV* は、細胞外に 22 個の LRR と 1 つの island を持つ受容体型キナーゼをコードしており、シロイヌナの雄性不稔や胚発生に関わる *RPK2/TOAD2* と最も高い相同性を示した。しかしながら、*klv* 変異体と *rpk2/toad2* 変異体の表現型は大きくことになっており、シロイヌナズナ（アブラナ科）とミヤコグサ（マメ科）で遺伝子機能が大きくことなることが示唆された。マメのメリステムを制御する因子はいまだ不明で報告例がなく、*KLV* が特定された初めてのものである。

植物と微生物の最も普遍的な共生は、アーバスキュラー菌根菌（以下 AM 菌）との共生である。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-* の多くは、菌根菌との共生系も破綻している *Myc-* 変異体であることが判明し、根粒菌と菌根菌の両者の共生に少なからぬ共通のシグナル伝達経路「Common Signaling Pathway」が存在することが明らかになってきた。そこで新たに単離したミヤコグサ *Nod-Myc-* 変異体（*sym85*, 1978）を用い、根粒菌や AM 菌との共生に必要とされる宿主因子の同定を試みた。ミヤコグサ新規 *Nod-Myc-* 変異体である *sym85* に AM 菌（*Glomus intraradices*）を感染させ菌根形成について解析を行ったところ、野生型では AM 菌は根表面に付着器を形成し、表皮から皮層の細胞間隙を伸長しながら皮層細胞内に樹枝状体を形成したのに対し、*sym85* 変異体では、AM 菌の菌糸が表皮細胞間を通過するものの、表皮と皮層のあいだで菌糸の伸長が停止し皮層細胞への侵入がブロックされた。また、ミヤコグサの *NUP85* は種子形成にも影響し、花粉管の伸長にも関係していることが示された。*nup85* 変異体に Nod factor を添加し

たところ宿主細胞でのカルシウム振動の誘導は認められなかった。このことから *nup85* 変異体の原因遺伝子はカルシウム振動の発生に必須の因子であることが判明した。*sym85* 変異体は Gifu、Miyakojima 間の転座領域にマップされたため、転座を起こしていないパキスタンのミヤコグサ *Lotus burttii* を交配パートナーとして導入し原因遺伝子を同定した。原因遺伝子は核膜孔を構成するヌクレオポリンの一つ *NUP85* と低いながらも全長にわたって相同性を示した。さらに、イオンビーム照射によって単離した新たな *Nod-Myc-* 変異体 1978 の原因遺伝子についても特定したところ、それはヌクレオポリンの *SEH1* をコードすることが明らかとなった。*SEH1* と *NUP85* は酵母や脊椎動物で直接相互作用することが知られており、マメ科植物においても同様の相互作用が AM 菌や根粒菌との共生に必須である可能性が示された。

## 2. 根粒菌共生関連遺伝子の解析

本特定領域研究では、長期的な計画で研究を展開することが出来る利点を活かし、ミヤコグサと共生関係を結ぶミヤコグサ根粒菌の包括的な遺伝子機能解析を行うことを目的として、酵母の Two-hybrid 法による遺伝子産物の相互作用の大規模解析、トランスポゾンを利用したミヤコグサ根粒菌の大規模挿入変異株ライブラリーの構築、および、作製した挿入変異株を用いた新規共生窒素固定関連候補遺伝子の機能解析を展開した。

酵母の Two-hybrid 法による遺伝子産物の相互作用解析については、マクロアレイ解析による遺伝子発現情報から根粒形成過程で発現が誘導される遺伝子や窒素固定関連遺伝子が活性化される低酸素分圧条件下で発現が誘導される遺伝子、共生窒素固定関連の遺伝子が集中している共生アイランドと呼ばれるゲノム領域に存在する遺伝子など、共生窒素固定に関与する機能を持つことが予測される遺伝子群と、ダイズ根粒菌およびアルファルファ根粒菌にも保存されていて機能が未知の遺伝子群から、合わせて 1,560 遺伝子を解析対象として選抜した。これら全ての遺伝子について、相互作用解析を行った結果、最終的に 1,804 の遺伝子産物（ミヤコグサ根粒菌全遺伝子の 24%）からなる 3,121 の相互作用の候補を同定した。得られた相互作用情報には、酸素分圧や窒素代謝の調節に関与することが知られている *FixL-FixJ* や *NtrX-NtrY* など、既に相互作用関係が明らかになっているタンパク質に加え、機能未知のタンパク質の関わる相互作用が多く含まれており、その半数以上が機能アノテーションの付いたタンパク質との相互作用であった。これらの相互作用解析の結果については、論文として報告するとともに、根粒菌のゲノム

情報のデータベース(RhizoBase)を通して詳細情報を公開した。

酵母 Two-hybrid 法による解析で得られた相互作用情報を基に、遺伝子発現やオペロン構造、タンパク質の機能ドメインなどの情報を指標として評価することにより、新規な共生窒素固定関連遺伝子の候補 127 遺伝子を選抜した。相同組換えを利用した遺伝子破壊法の効率が悪い根粒菌において、これらの新規共生関連遺伝子の機能解析を効率よく進めることを目的として、トランスポゾンを利用した大規模な挿入変異株ライブラリーを構築した。ライブラリーの構築にあたっては、リソースとしての利用価値を高めるために、トランスポゾン配列上加えた Tag 配列を利用することにより複数の変異株の negative screening や競合実験が可能な Signature Tagged transposon Mutagenesis (STM) の系を採用した。既存の Tag 配列のうち、増幅効率の高い 27 種類の Tag 配列をもつトランスポゾンを用いて、最終的に 3 万クロンの挿入変異株を収集した。得られた挿入変異株のトランスポゾン挿入部位の傾向を確認するために、収集したクロンの 1/3 に相当する 9,000 クローンについて挿入位置を解析した結果、トランスポゾンの挿入はミヤコグサ根粒菌のゲノム上にほぼランダムに起こっていることが確認された。得られた挿入部位の配列情報からミヤコグサ根粒菌全遺伝子の 51% に相当する 3,681 遺伝子についてコード領域内にトランスポゾンの挿入がある変異株が取得された。この変異体ライブラリーをコミュニティに提供する目的で、挿入位置や変異株の表現型などの詳細情報をデータベース化し RhizoBase を通して公開するとともに、ライブラリーをナショナルバイオリソースプロジェクトのミヤコグサリソースセンターに寄託し配布体制を整えた。

作製した挿入変異株ライブラリーを用いた新規共生窒素固定関連の候補遺伝子については、解析した挿入部位の配列情報と、挿入部位の配列未解析のクロンから作製した 3D プールを用いたスクリーニングの結果、選抜した 127 遺伝子のうち 108 遺伝子について挿入変異株が得られている。得られた変異株を用いた宿主植物ミヤコグサ (*L. japonicus* MG-20) への接種試験の結果、これまでに解析が終了している 98 遺伝子の挿入変異株のうち 22 変異株で共生過程における表現型の変化が認められ、これらの遺伝子が共生窒素固定に関する機能を持つことが推定された。検出された表現型を分類すると、根粒数の減少：7 株、根粒数の増加：3 株、根粒形成の遅延：4 株、根粒形成の早期化：1 株、根粒形成の遅延と減少：2 株、根粒形成の遅延と増加：1 株、窒素固定活性の低下：6 株 (根粒数の減少、根粒形成の遅延の表現型

を合わせて示す変異株を含む) のようになった。

ミヤコグサ根粒菌ゲノムの整列化コスミドライブラリーを利用して MAFF303099 株遺伝子の系統的精密破壊を行い、ミヤコグサとの共生に必要な新規遺伝子の探索を行った。その結果、根粒形成の初期過程および根粒形成後の窒素固定能の維持に關与する遺伝子群を特定した。共生初期過程において感染系形成と根粒組織形成に必須な因子として、プリン合成系のアデニロコハク酸リアーゼ遺伝子 *purB*、根粒菌が宿主細胞に侵入してバクテロイド化する際に必須な因子として、アルギニン合成系のオルニチンカルバモイル転移酵素遺伝子 *argF* を同定した。これらは、プリン中間体 AICAR 蓄積の有無が感染初期の相互認識に必須であること、宿主細胞内への侵入の際に適量のアルギニンの供給が必須であることを示した。

根粒菌は、3 型分泌系 (Type III 分泌系) と呼ばれる細菌細胞膜、細胞外膜と宿主細胞膜を貫通する複合体により、宿主機能を制御するタンパク質 (エフェクター) を注入することにより宿主機能 (例えば宿主細胞質内への侵入時に宿主が惹起する防御反応) を制御することが示唆されてきた。そこで、遺伝子破壊や相補実験を行い、ミヤコグサ根粒菌の持つ 3 型分泌系はミヤコグサとの共生に必須な訳ではないが、*Lotus* 属内での種特異性を決定することを明らかにし、種レベルでの特異性に関わるエフェクター遺伝子を同定した。評価においては、新疆ウイグル原産の *Lotus corniculatus* sp. *Fronodosus* とイスラエル原産の *Lotus halophilus* 等が好適であるため、これらを使用した。精密遺伝子破壊株ならびにトランスポゾン挿入株を用いて評価を行った結果、*L. halophilus* との共生成立に負の影響を与える原因遺伝子 *mIrr6361* を同定した。Mlr6361 (3,056 残基) の構造を精査したところ、植物病原菌の Type III 遺伝子領域で見ついているエフェクター候補と共通する構造上の特徴 (40~45 アミノ酸残基の共通モチーフを 12~25 回繰り返すこと) と独特な特徴 (トリプトファン合成系で機能するシキミ酸リン酸化酵素と類似のドメインを持つこと) を見つけた。病原菌排除と同様の機構により、ミヤコグサ根粒菌が *L. halophilus* から攻撃を受けて排除されている可能性が示唆された。

PCR ゲノムスキャンおよび 50-mer オリゴアレイを用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション (cgh) によるゲノム構造比較を行い、国内の野生ミヤコグサの根粒から単離された根粒菌菌株と国外のミヤコグサ近縁宿主の根粒から単離された菌株の比較を行った。その結果、国内株と国外株の共生アイランドが共通の祖先から進化してきたものの、国内

株では一旦は共生アイランドに挿入された 4 型分泌系遺伝子群を置換するように 3 型分泌系遺伝子群が挿入され、独自に進化を遂げて種レベルでの宿主特異性に機能していることが判明した。

自然環境では複数の根粒菌株が宿主植物根圏、感染過程等で競争を起こし、これらの競争能力の高い株が宿主との共生に到達できる。この競合的根粒形成能は、根粒菌と宿主植物の共進化に重要な役割を果たしていると考えられてきたが、その実態はほとんど解明されていない。そこで、宿主植物内や根圏環境といった複雑系において負の表現型を示す変異株を選抜することが可能な手法 Signature-tagged mutagenesis (STM) を用いて、ミヤコグサ根粒菌の同定済み変異株ライブラリーの中から、共生できない競合能の低下・欠損した根粒菌変異株を探索した。その結果、non-redundant な 1,887 遺伝子の変異株の中から、植物接種後に生じる根粒占有率が他の根粒菌クローンに比べて低いもの 69 株、および高いもの 3 株を第一段階として選抜した。うち低占有率株は、続いて実施した個別の接種試験により、共生窒素固定能あり (Fix<sup>+</sup>) 56 株とその欠損 (Fix<sup>-</sup>) 13 株とに分類することができた。更にその Fix 株から、根粒形成能欠損 (Nod<sup>-</sup>) 3 株を見いだした。以上の Fix 株の変異遺伝子の一部は *nifK*, *nifU* 等の既知窒素固定関連遺伝子であったが、その他は共生特異的な役割が未解明なプリン合成経路、アミノ酸合成経路、C1 代謝、転写制御等々への関与が推定される遺伝子であり、その解析によって共生成立に必須な新規機能の解明への展開が期待されるものであった。また、単独接種では Fix<sup>+</sup> と判定された 56 変異株、および STM で高占有率と判定された 3 変異株については、その変異の原因遺伝子が根粒菌の競合能をそれぞれ正ないし負に調節するものであると予想され、特に生態系中での根粒菌の共生成立に重要な性質の解明につながる可能性を秘めている。

#### 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 70 件)

Asamizu, E., Shimoda, Y., Kouchi, H., Tabata, S., Sato, S.: A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 147(4), 2030-2040 (2008)

Shimoda, Y., Shinpo, S., Kohara, M., Nakamura, Y., Tabata, S., and Sato, S.: A large scale analysis of protein-protein

interactions in the nitrogenfixing bacterium *Mesorhizobium loti*, *DNA Res.*, 15(1):13-23. (2008)

Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19, 610-624 (2007)

[学会発表](計 95 件)

岡本暁、中川知己、佐藤修正、田畑哲之、川口正代司、ミヤコグサにおける CLV3 様遺伝子の機能解析、第 51 回日本植物生理学会年会

中務弘基、下田宣司、中村保一、田畑哲之、佐藤修正、ミヤコグサ根粒菌 STM 変異株の共生に関する表現型とタンパク質間相互作用情報を基にした新規共生関連遺伝子の機能類推、第 32 回日本分子生物学会年会

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

根粒菌タンパク質間相互作用 DB

<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田畑 哲之 (TABATA SATOSHI)

(財)かずさ DNA 研究所・副所長

研究者番号: 70197549

##### (2) 研究分担者

川口 正代司 (KAWATUCHI MASAYOSHI)

基礎生物学研究所・

共生システム研究部 門・教授

研究者番号: 30260508

佐伯 和彦 (SAEKI KAZUHIKO)

奈良女子大学・理学部・教授

研究者番号: 40201511

南澤 究 (MINAMISAWA KIWAMU)

東北大学大学院・生命科学研究科・教授

研究者番号: 70167667

##### (3) 連携研究者

なし