

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05374

研究課題名(和文) 根粒菌-マメ科植物共生系における共生生物間の鉄輸送システムの解明

研究課題名(英文) Iron deliver system of the symbiosome membrane in the leguminous plants nodule

研究代表者

稲葉 尚子 (INABA, Shoko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・特任助教

研究者番号：60771699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒の感染細胞内シンビオソーム膜局在鉄輸送体の機能解析のため、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によるダイズ毛状根形質転換系を確立した。シンビオソーム膜局在GmDMT1欠失変異体を作成し、液体培養により増殖させることができた。ミヤコグサのシンビオソーム膜局在鉄輸送体同定のため、他のマメ科植物で同定されたVTLファミリー鉄輸送体のミヤコグサホモログを探索したところ、既知のVTLファミリーであるSen1以外のホモログが見出された。これらの輸送体の変異体に根粒菌を接種して生育させたところ鉄欠乏の症状は見られず、シンビオソーム膜内への鉄の取り込みには複数の鉄輸送体の関与があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズはAgrobacteriumを用いた形質転換が出来るが、形質転換効率は高くなく、遺伝子機能を調べるのは容易ではない。根で発現する遺伝子の機能解析には、本研究で確立したゲノム編集による毛状根形質転換体作成と液体培養による増殖が有用であると考えられる。ダイズとタルウマゴヤシではミヤコグサの窒素固定に関与するSen1のホモログからシンビオソーム膜局在鉄輸送体であるVTLファミリー輸送体が同定されたが、Sen1自体はモリブデン輸送体であり、ミヤコグサでは鉄輸送体は未だ同定されていない。本研究ではホモログである候補輸送体が見出されたが機能は未だ未知であり、今後の研究により明らかにする。

研究成果の概要(英文)：A soybean hairy root transformation system using CRISPR/Cas9 genome editing was established for the functional analysis of the symbiosome membrane-localized iron transporter of soybean nodules. A symbiosome-membrane-localized GmDMT1 deletion mutant was generated by genome editing.

To identify the symbiosome membrane-localized iron transporter in Lotus japonicus, VTL family iron transporters identified in other leguminous plants, were searched for L. japonicus genome and found some homologues other than the Sen1, already known as a VTL family transporter. Mutants of these homologs were inoculated with rhizobia and grown, but no symptoms of iron deficiency were observed, suggesting that multiple iron transporters are involved in the uptake of iron into the symbiosome membrane.

研究分野：植物共生学、植物生理学

キーワード：共生 輸送体 鉄 マメ科植物 シンビオソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は全ての植物の生育に必要な微量元素である。鉄は土壌中に豊富に存在する元素であるが溶解度が低く、世界の高地面積の約3割を占める石灰質アルカリ土壌では、鉄欠乏が主な作物生育阻害要因となっている。植物は土壌中の可給性の低い鉄を獲得するための戦略を発達させており、鉄欠乏に強い作物の作出を目的に、植物の鉄吸収や植物体内の鉄輸送の研究が進んでいる。ダイズなど主要な作物を含むマメ科植物では、一般的な植物の代謝に加え、共生窒素固定の過程においても鉄が要求されるため、マメ科植物に特異的な鉄輸送システムを持つ。マメ科植物は根粒菌に感染し、根に共生器官である根粒を形成する。根粒菌は根粒の感染細胞内で植物細胞膜に由来するペリバクテロイド膜によって植物細胞質と隔離され、共生特異的なバクテロイドと呼ばれる形態に分化し窒素固定を行う。バクテロイドの生理機構には、窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼに加え、フェレドキシン、シトクロームなど鉄を含むタンパク質が必要である。一方、根粒の植物細胞質には根粒内の酸素濃度を調節するヘム鉄タンパク質レグヘモグロビンが多量に存在する。このように根粒感染細胞ではペリバクテロイド膜の内外で鉄が要求される。こうした環境で、バクテロイドは外部環境から隔離されているため、植物細胞質からペリバクテロイド膜を介して鉄を供給しており、鉄を要求する両者の間にはよく統制された鉄輸送システムがあると考えられる。実際にペリバクテロイド膜には鉄輸送能があることが示されており、ここに局在する鉄輸送体として唯一ダイズのGmDMT1が報告されているものの、根粒における機能は明らかではなく、共生者間の鉄輸送を担う鉄輸送体は見つかっていない。マメ科の鉄輸送体について近年立て続けに総説が発表され、依然関心の高い研究対象であることが伺えるがその同定は進んでいない。

2. 研究の目的

マメ科植物と根粒菌が共生する根粒の感染細胞内では、植物細胞由来のペリバクテロイド膜で隔離された植物細胞質と根粒菌バクテロイドの両者が共に微量元素である鉄を要求する。根粒菌バクテロイドは植物細胞質からペリバクテロイド膜を介して鉄を供給していると考えられるが、この鉄輸送を担う輸送体は明らかになっていない。マメ科植物に特異的な鉄輸送を担う分子機構の全容を解明することを最終目標とし、本研究ではペリバクテロイド膜を介した植物側から根粒菌バクテロイド側への鉄輸送経路解明を目的とする。

3. 研究の方法

ダイズ根粒の感染細胞内のペリバクテロイド膜を介した鉄輸送経路を明らかにするため、一般的に鉄輸送に関わる輸送体は鉄欠乏条件で発現が上がることを利用し、根粒のペリバクテロイド膜およびバクテロイド画分のタンパク質を解析し、鉄欠乏条件で発現が上昇するものうち鉄輸送体の特徴を持つものを鉄輸送体候補として選抜する。候補タンパク質の酵母への形質転換や変異体作成により機能解析を行い、鉄同位体のトレーサー試験によりペリバクテロイド膜を介した鉄輸送経路を特定する。

4. 研究成果

(1)鉄欠乏条件の根粒作製の条件検討

ペリバクテロイド膜に局在し植物細胞側からバクテロイド側へ鉄を輸送するタンパク質は鉄欠乏条件で高発現になると考えた。そこで鉄欠乏状態にある根粒の作製を試みた。まずプラントボックスに滅菌したパーミキュライトを詰め、2つの異なる鉄濃度(20 μ M, 2 μ M)のMMM培地を水耕液として与え根粒菌を接種しダイズを栽培した。回収した根粒の鉄濃度を測定したところ、2 μ M区で 9.06 ± 2.67 mmol/g DW、0.2 μ M区で 8.81 ± 2.67 mmol/g DW(mean \pm SD)と有意差は見られなかった。パーミキュライトから水で抽出される鉄濃度を測定したところ、パーミキュライトからは20 μ M区の2倍の鉄が溶出することが明らかになったため、パーミキュライトの代わりに、水で抽出される鉄がほとんどない豊浦砂を栽培に用いた。しかしながら両処理区間の根粒鉄濃度には差が見られなかった。

(2)ダイズ毛状根形質転換系の構築

候補輸送体の機能解析を行うダイズ毛状根形質転換系の構築のために、これまでにペリバクテ

ロイド膜局在鉄輸送体と報告されている GmDMT1 の毛状根形質転換体の作製を試みた。GmDMT1 の内部配列を CRISPR/Cas9 ベクター pMgP237 に導入し、ゲノム編集用ベクター pMgP237::*GmDMT1* を作製した。これを導入した *Agrobacterium rhizogenes* K599 株の形質転換体を作成した。この *A. rhizogenes* 形質転換体をダイズ子葉に感染させ毛状根を誘導した。毛状根のゲノム DNA を抽出し GmDMT1 の全長を増幅したところ、1 kb 以上の配列が欠失した毛状根形質転換体を確認した。

(3)ダイズ毛状根形質転換体への根粒菌感染の検討

(2)で作出した GmDMT1 変異体ダイズ毛状根を培養し、ダイズ根粒菌を感染させ根粒を着生させることを試みた。ダイズ毛状根の培養についてはまず 1/2MSB5 寒天培地上での培養を試みた。ダイズ子葉に *A. rhizogenes* 形質転換体を感染させた直後に誘導された毛状根は伸長するが、毛状根を切り取り新しい培地に移植後は伸長が停止した。そこで 1/2MSB5 の液体培地で植え継いだところ、旺盛な伸長が見られた。1/2MSB5 培地で増殖させた形質転換体毛状根をダイズ根粒菌入りの寒天培地に移植し、毛状根への根粒菌の感染、根粒の着生を試みたが、根粒の形成は見られなかった。

(4)ダイズ毛状根のカルス化および再分化の検討

毛状根からの根粒着生は見られなかったため、形質転換体毛状根をカルス化し植物体を再分化することを試みた。1/2MSB5 液体培地で増殖させた毛状根を、研究で一般的に使用される生育調整物質を組み合わせた複数種類のカルス誘導培地に移植し、カルス化を観察した。その結果、1/2MSB5 培地に 2,4-D 1 mg/l と BAP 0.2 mg/l 加えた培地で旺盛なカルス化が観察された。次に形成されたカルスを生育調整物質の組み合わせを変えた複数種類のシュート誘導培地に移植したが、いずれの培地においてもシュートの再分化は認められなかった。

(5)ミヤコグサのダイズ鉄輸送体 GmVTL1 ホモログの探索

2020 年にダイズの根粒ペリバクテロイド膜の鉄輸送体 GmVTL1a/b および同じくマメ科のタルウマゴヤシのホモログ MtVTL8/4 が同定された。これらの同定は、ミヤコグサの窒素固定能に関与することが示され、さらに酵母の液胞膜局在鉄輸送体 CCC1 と同ファミリーに分類される LjSEN1 に着目し、そのダイズ、タルウマゴヤシホモログとして機能解析が進められたことによるものである。しかし、LjSEN1 自体は鉄輸送能が明らかになっておらず、最近、鉄ではなくモリブデン輸送能を持つことが示された。一方、ミヤコグサの LjMATE1 は根から根粒への鉄の輸送に関与するクエン酸輸送体であり、この変異体は根粒に鉄を輸送できず窒素固定能が低下する。このため、ミヤコグサの根粒が鉄を要求することは明らかである。そこで、LjSEN1 に代わる GmVTL1a/b および MtVTL8/4 のミヤコグサホモログがあると考えた。GmVTL1a/b および MtVTL8/4 のアミノ酸配列を参照配列にミヤコグサのゲノムデータベースに対し Blastp 検索を行ったところ、LjSEN1(Lj4g3v0336340)より相同性の高い遺伝子 Lj0g3v0329079、Lj4g3v0336690、Lj4g3v0336390 を見出した。これらが目的の鉄輸送体かどうかを調べるため、これらの遺伝子の変異体のミヤコグサ LORE1 ラインを取り寄せ、パーミキュライトを詰めたプラントボックスでミヤコグサ根粒菌を接種し無窒素水耕液を与えて生育させた。また、LjSEN1 の変異体 *sen1-1*、*sen1-4* も同様に生育させた。その結果、*sen1-1* は窒素固定能の著しい低下が見られ、*sen1-4* についても明らかな窒素固定能の低下が見られた。一方、LORE1 ラインでは窒素固定能の低下は見られなかった。また、LjSEN1 (Lj4g3v0336340) の LORE1 ラインも取り寄せ同様に生育させたが、*sen1-1* や *sen1-4* のような表現型は見られなかった。



V4

V1

V5

Lj0g3v0329079.1のLORE1 lines
220301播種→220401撮影

図. マメ科根粒ペリバクテロイド膜鉄輸送体のミヤコグサホモログ候補の表現型

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 幸子 (MASUDA Sachiko) (50773347)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関