

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580067
 研究課題名（和文）
 エネルギー代謝系遺伝子変異体を用いた共生窒素固定効率制御機構の解析
 研究課題名（英文）
 Regulation of nitrogen fixation in the energy metabolizing deficient mutants
 研究代表者
 田島 茂行（TAJIMA SHIGEYUKI）
 香川大学・農学部・教授
 研究者番号：50116894

研究成果の概要：

根粒菌が土壤中で生活しているスタイルから共生スタイルへ変化する時のタンパク質の変化や、根粒オルガネラ（ミトコンドリア）タンパク質について網羅的に解析を行い、共生窒素固定に関与するタンパク質を検索した。このプロテオーム解析結果を利用してダイズ根粒菌バクテロイドで発現するタンパク質発現を抑制させた根粒菌破壊株を作製し、根粒形成あるいは共生窒素固定に関与するバクテロイドタンパク質を検索した。その結果、Bj80 変異株が共生窒素固定に関与する遺伝子を欠損していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード:バクテロイド、ダイズ、根粒菌、共生窒素固定、プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、穀物で全窒素の 28-40%、牧草で 40-70% を占め

る重要な農業形質である。細胞内共生である根粒組織形成についての分子論的解析は変異体の Map-base cloning が強力なアプロー

チとなり、この数年間で急速に進展した。この結果、一連のタンパクキナーゼを介した根粒菌、菌根共通の共生組織形成シグナル伝達系が明らかになった。次の目標は二つの生物が共に分化して、複雑な代謝統合機能を発現している共生組織特有の機能発現の解析、窒素固定効率の向上である。例えば、何故根粒菌が自分に必要以上の窒素固定を行うアンモニア生産工場になってしまうか、この植物側制御機構は依然不明である。この解析に必須なミヤコグサ及び根粒菌のゲノムシーケンスは終了し（かずさ DNA 研究所 2004 及び 2006）、タンパクレベル、代謝物レベルでの解析も可能になり、モデルマメ科植物からダイズなど重要作物での機能解析研究展開が視野に入ってきた。当研究室はマメ科共生窒素固定系のグローバルなトランスクリプトームプロジェクトに参加し、モデルマメ科植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus*)と根粒菌マクロアレー解析 (2004)、根粒菌、ミトコンドリアのプロテオーム解析 (2004)、ミヤコグサタンパクキナーゼ解析 (2005) を発表してきている。この成果に基づいて、ミヤコグサ PEPC 遺伝子 (2006)、共生特異的リングフィンガー遺伝子 (2006)、Snare 遺伝子 (2006) 等が窒素固定活性や根粒形成などの表現型に影響を与えることを見いだしてきた。

2. 研究の目的

ダイズ根粒菌の NAD-malic enzyme 欠損株を用い、ミヤコグサと同様の解析を行う。そのためにバクテロイドを含む感染細胞と含まない非感染細胞を分別し、細胞間の代謝比較、根、感染細胞、非感染細胞間の物質輸送系比較、マクロアレー、real-time PCR による根、感染細胞、非感染細胞間の遺伝子発現比較、呼吸及び窒素固定活性を分析する。

3. 研究の方法

ダイズ根粒と根からミトコンドリアタンパク質をパーコール密度勾配により分画した。その後二次元電気泳動を行い CBB 染色後ゲルからタンパク質を切り出し、ペプチドマスフィンガープリント(PMF)法と N 末端アミノ酸シーケンスにより同定を行った。また、ダイズバクテロイドタンパク質についても同様に同定を行う。バクテロイドタンパク質については、感染後 10,28,56 日目のバクテロイドタンパク質を分画し経時的な発現を調べた(図1)。根粒菌 Free living と比較してバクテロイド分化で発現が増加したタンパク質をコードしている遺伝子破壊を試みた。遺伝子破壊はカナマイシンカセットを導入することで行った。

4. 研究成果

ダイズ根粒タンパク質は、感染後 7, 10, 14, 21, 28, 49 日目のそれぞれのバクテロイドタンパク質から抽出した。比較として Free living 根粒菌からもタンパク質を抽出した。それぞれの根粒から抽出したバクテロイドタンパク質は二次元電気泳動を行い、PMF 法によるタンパク質の同定およびイメージマスターを用いて画像解析を行った。278 個のアノテーションによるタンパク質スポットのうち、167 個のタンパク質を同定することが出来た。このタンパク質について発現パターンに応じて 4 個のクラスターに分類した(図1)。Free living タンパク質とバクテロイドタンパク質を比較した結果、44 個のタンパク質がバクテロイドでのみ同定できた。そのうち、31 個は感染後 7 日目に発現量が増加したタンパク質であった。また、バクテロイドで発現しているタンパク質の中で 87 個のタンパク質が感染のステージによって

発現量の増減が確認できた。

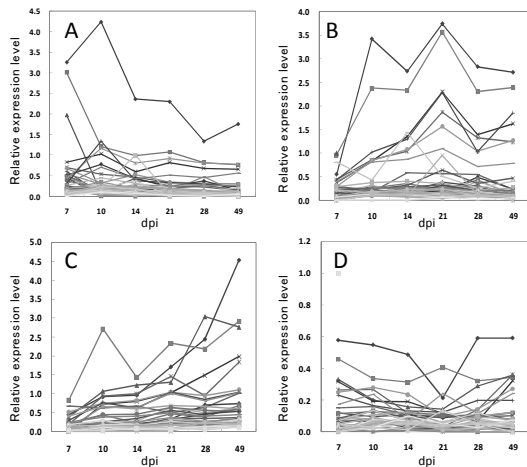
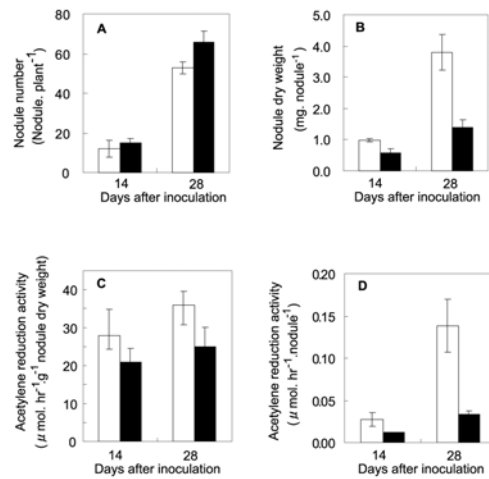


図1 根粒菌バクテロイドタンパク質の経時的な変化

窒素固定が活発な感染後21日、28日目に増加するタンパク質をコードしている遺伝子にストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入した遺伝子破壊株の作成を行った。この変異株をダイズに感染させ、窒素飢餓の症状が観察されるか調べた。その結果、NAD-malic enzyme や 488hypothetical protein 遺伝子を欠損させた根粒菌をダイズに感染させると、ダイズ根粒のアセチレン還元活性の低下が見られダイズに窒素欠乏の症状が観察された(図2)。NAD-malic enzyme 欠損株 (DME:: Ω) 根粒に蓄積している有機酸量を野生株根粒と比較した結果、DME:: Ω 根粒でリンゴ酸や α ケトグルタル酸の蓄積量がそれぞれ、1.5倍、3倍増加していた。また、DME:: Ω バクテロイドの二次元電気泳動を行い、野生株バクテロイド二次元電気泳動パターンと比較した結果、アミノ酸サイクルに関与するタンパク質が減少していた。



(図2) DME 変異根粒菌感染ダイズ (白) と野生株感染ダイズ (黒) の形態的特徴

一方、Hypothetical proteinである488タンパク質が欠損した菌株をダイズに感染させた場合も窒素欠乏の症状が現れた。このタンパク質はシトクロームCへの銅を輸送するシャペロンタンパク質に存在する領域(HX₁₀MX₂₂HXM)を保存していた。この結果から、バクテロイド誘導型シトクロームCに特異的に銅を輸送するためのシャペロンが存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

1. Nomura, M., Tan, D.V., Arunothayanan, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kouchi, H. and Tajima, S. The 5'-end expressed sequence tags of *Lotus japonicus* Plant Biotechnology. 25, 173-175. (2008) 査読有
2. Dao, T.V., Nomura, M., Hamaguchi, R., Kato, K., Itakura, M., Minamisawa, K., Sinsuwongwat, S., Le, H.T.P., Kaneko, T., Tabata, S., and Tajima, S. NAD-Malic Enzyme Affects Nitrogen

Fixing Activity of *B. japonicum* USDA 110 Bacteroids in Soybean Nodules. *Microbes and Environment* 23, 3, 215-220. (2008) 査読有

3. Min, Wei, Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., Saeki, K., Omori, H., Tajima, S., Uchiumi, T., Abe, M. and Ohwada, T. Soybean Seed Extracts Preferentially Express Genomic Loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the Initial Interaction with Soybean, *Glycine max* (L.) Merr DNA Research 23, 215-220 (2008) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 上田知幸、Nanthipak Thapanapongworakul、熊谷研吾、当真公彦、畑信吾、野村美加、田島茂行：ミヤコグサ変異体を用いた共生窒素固定に関与する遺伝子群の解析. 日本土壤肥料学会関西支部、2008.11.28.徳島
2. 野村美加、Dao Van Tan, 田島茂行、ダイズ・ミヤコグサ根粒バクテロイドプロテオーム解析から見えてくること、植物微生物研究会、2008.9.17-19、奈良
3. 野田朱花、Dao Van Tan, Hattahaya Arunothayanan, Nanthipak Thapanapongworakul, 上田知幸、熊谷研吾、当真公彦、南澤究、板倉学、野村美加、田島茂行、共生窒素固定に関与するバクテロイドタンパク質の機能解析、植物微生物研究会、2008.9.17-19、奈良
4. Hattahaya Arunothayanan, Tan Van Dao, Rie Hamaguchi, Ayaka Noda, Manabu Itakura, Kiwamu

Minamisawa, Mika Nomura,

Shigeyuki Tajima. Nobel

metalloshaperone in the assembly of cytochrome c oxidase of soybean nodule bacteroids日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、名古屋

5. Nanthipak Thapanapongworakul, Tan Van Dao, Kimihiho Toma, Shusei Sato, Yoshikazu Shimoda, Satoshi Tabata, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima. Screening of *Mesorhizobium loti* mutants for symbiotic N₂ fixation in *Lotus japonicus* 日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、名古屋
6. 上田知幸・藤井美帆・野村美加・田島茂行、PEPC酵素を抑制した形質転換ミヤコグサ根粒における代謝産物の解析、日本土壤肥料学会、2007.8.22-24、東京
7. Dao Van Tan, Le Phuong Hoa, Mika Nomura, Kazuhiko Saeki, Kiwamu Minamisawa, Takakazu Kaneko, Satoshi Tabata, Shigeyuki Tajima. Proteome analysis of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid differentiation during soybean nodule development, 日本土壤肥料学会、2007.8.22-24、東京
8. 古味光紗、真鍋友美、長岡功微菜、浅水絵里香、佐藤修正、田畑哲之、竹川薫、野村美加、田島茂行、ミヤコグサ根粒菌との共生に関与するミヤコグサSNARE遺伝子群の検索、植物微生物研究会、2007.8.22-24、鹿児島
9. 野田朱花、DAO VAN TAN、濱口理恵、加藤賢祐、南澤究、板倉学、野村美加、田島茂行、共生窒素固定に関与するダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)バクテロイドタンパク質の検

索、植物微生物研究会、2007.9.19-21、
鹿児島

10. Hattahaya Arunothayanan, Mika
Nomura, Shigeyuki Tajima,
Characterization of mitochondrial
proteins from soybean and Lotus
japonicus nodules. 植物微生物研究会、
2007.9.19-21、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 茂行 (TAJIMA SHIGEYUKI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50116894

(2) 研究分担者

東江 美加 (野村 美加)

(AGARIE MIKA (NOMURA MIKA))

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：50294749