

自己評価報告書

平成23年 5月 6日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20370020

研究課題名 (和文) ミヤコグサを用いた根粒形成初期シグナリングの分子機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying the early signaling of nodulation using *Lotus japonicus*

研究代表者

川口 正代司 (KAWAGUCHI 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

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：シグナル伝達、ミヤコグサ、根粒形成、Nod factor

1. 研究計画の概要

マメ科植物と根粒菌の相互作用によって形成される根粒は、植物の可塑性な発生研究のモデルとして非常に興味深い器官である。その形成は、根粒菌が分泌する Nod factor によって誘導される。Nod factor はキチンオリゴ糖を基本格としたリポキチンオリゴサッカライドであり、これをマメ科植物が認識すると、根毛細胞において核周辺部でカルシウムスパイクが発生し、根粒形成の開始を制御する *Nin* や *ENOD40* 等の遺伝子発現が誘導される。本研究課題ではミヤコグサを用い根粒形成初期シグナリングの分子レベルでの解明を目指す。特に、これまでミヤコグサで特定してきた GRAS ファミリーに属する推定転写因子 NSP1, NSP2 やヌクレオポリン NUP85 などの細胞・組織レベルの機能を明確にするとともに、HAR1 を介した全身的なフィードバック制御機構にどのように関連するかを分子レベルで明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) ミヤコグサより単離した根粒形成の開始に必要なとされる GRAS ファミリーの転写因子 NSP2 のプロモーターに GUS 遺伝子を連結させたコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介した胚軸形質転換法でミヤコグサに導入した。その後、共生根粒菌 *Mesorhizobium loti* に対する応答性を解析した。その結果、野生型では感染後7日目の根の若い領域で GUS 発現の低下が観察された。この NSP2 遺伝子の発現量の低下が、感染依存的な根における根粒形成能と根粒菌の受容能の低下を示している可能性があり、極めて興味深い結果となった。さらにステージが進むと GUS の発現は根粒原基の下部組織で顕

著に観察されるようになり NSP2 発現のパターン変動と根粒原基形成との関連が示唆された。一方遠距離シグナル伝達による負のフィードバック制御が破綻した *har1* 根粒過剰着生変異体では、根粒菌感染後の GUS 活性の顕著な低下は観察されなかった。一方、NSP1 については、NSP2 のような菌の感染依存的な発現パターンの変動は観察されなかった。

(2) NSP2 タンパクのペプチド抗体を用いて、根端領域で根粒菌感染後の挙動を解析した。非特異的バンドが NSP2 タンパクの近くに存在するために検出に難航したが、最終的に野生型の根で感染にともなう NSP2 タンパク量の減少を検出することに成功した。しかし *har1* 変異体では減少は観察されず、HAR1 は NSP2 の安定性に寄与していることが示された。

(3) Nod factor シグナル伝達系に位置し、根粒形成と菌根形成の2つの現象が破綻した新規ミヤコグサ Nod-変異体 1978 (*nena*) を単離し、ポジショナルクローニングにより候補遺伝子を特定した。さらに相補実験によって原因遺伝子であることを確認した。*NENA* の原因遺伝子は、核孔を形成するヌクレオポリンの一種をコードしており、酵母や動物の SEH1 と同源性が観察された。酵母や動物では SEH1 は NUP85 と相互作用することが知られている。Y2H で解析したところ、*NENA* は以前我々が特定したミヤコグサ NUP85 と相互作用することが示された。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) Nod factor シグナル伝達系を構成する

2つの推定転写因子のうち、NSP2が根粒菌の感染によって発現パターンを変動させ、それが過去報告されている生理現象（根粒形成のオートレギュレーション）と良い相関にあることを見いだした。さらに根で働く NSP2 タンパクの根粒菌感染依存的な減少には宿主植物の地上部で機能する HAR1 受容体が関わっていることを発見した。さらに、根粒形成と菌根形成の両者が破綻した新規共生変異体 *nena* から、NUP85 と相互作用しうる新たなヌクレオポリンを同定することに成功し、Nod factor シグナル伝達のみならずアーバスキュラー菌根菌との共生においても、NUPs が必須であることを明らかにした。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 根粒形成を根で負に制御する新規因子 TOO MUCH LOVE の特定と NSP1, NSP2 との関連の解析

Nod ファクターシグナル伝達系に位置する2つの推定転写因子 NSP1, NSP2 と、根粒形成のオートレギュレーションに関わり根で機能する新規制御因子 TOO MUCH LOVE (TML) の解析を通じて、Nod ファクターシグナル伝達とオートレギュレーションの分子接点をさらに解明する。具体的には、TML のポジショナルクローニングにより原因遺伝子であることを確定する。TML の発現パターンをリアルタイム PCR とプロモーター-GUS アッセイにより明らかにする。TML と NSP1, NSP2 の相互作用を酵母2ハイブリッドシステム等により検証する。さらに、NSP2 タンパク質の感染依存的な低下に TML が関わっているかを明らかにする。

(2) Nod ファクターシグナル伝達系が破綻した新規根粒非着生変異体 *daphne* の表現型解析と原因遺伝子の特定

ミヤコグサにイオンビーム照射を行い根粒形成が全くみられない新規共生変異体 *daphne* を単離した。*daphne* は、根粒菌が感染しても根に細胞分裂が誘導されず根粒原基がまったく形成されない変異体だが、根粒菌が細胞内共生する上で必要とされる感染糸形成が過剰に形成されるという大変興味深い表現型をもつ。この原因遺伝子を特定することにより、分化した根の細胞がプログラムされ分裂能を獲得するプロセスと、菌の感染を適切に制御する分子機構の解明を行う。また DAPHNE と Nod factor シグナル伝達系を構成するサイトカイニンレセプター LHK1 との関連を、LHK1 の構成的機能獲得変異体を用いて明らかにする。DAPHNE の特定に成功した場合、NSP1, NSP2, NIN との関連を明らかにする。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計10件)

①Groth, M., Takeda, N., (他8名, 8番目). *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscularmycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22: 2509-26 (2010) 査読あり

② Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Saganuma, N., Kawaguchi, M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol.* 51: 1381-97 (2010) 査読あり

③ Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S. and Kawaguchi, M. Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50: 67-77 (2009) 査読あり

④Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., (他7名, 10番目) *TOO MUCH LOVE*, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 259-268 (2009) 査読あり

⑤Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., (他16名, 16番目) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intercellular accommodation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 20540-5 (2008) 査読あり

[学会発表] (計3件)

[図書] (計4件)

①Magori S, Tanaka A and Kawaguchi M. **Wiley-Blackwell-VCH.** Physically-induced mutation: ion beam mutagenesis. In The Handbook of Plant Mutation Screening, (2010) 3-16.

②川口正代司: **化学同人**、ミヤコグサで根粒菌や菌根菌との共生とその進化を知る 研究を支えるモデル生物 (2009) 162-164.

③川口正代司: **化学同人**、植物生理学 微生物との共生 (2009) 192-203.

④斎藤勝暗・川口正代司: 総合出版社文一総合出版社、"アーバスキュラー菌根共生系から根粒共生系への進化" (2008) 237-263.