

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570052

研究課題名(和文) 宿主植物の共生変異体を用いた窒素固定機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of nitrogen fixation system using host plant symbiotic mutants

研究代表者

菅沼 教生 (Norio, Suganuma)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40179114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌と共生して空中窒素を固定する。このような共生窒素固定機構の分子基盤を確立するために、窒素固定能力に異常をきたしたマメ科モデル植物ミヤコグサのFix-変異体を用いて、窒素固定に必須の宿主植物遺伝子を同定し、機能の解明に取り組んだ。その結果、植物の全身で発現し、根と根粒では維管束で発現する、小胞を介した物質輸送に関与するSNAREタンパク質をコードする遺伝子が窒素固定活性に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Leguminous plants fix atmospheric nitrogen gas in symbiotic association with rhizobia. In order to establish a molecular basis for legume and rhizobial symbiotic nitrogen fixation, we studied Fix- mutants of the model legume, Lotus japonicus, and tried to identify the responsible genes and reveal the function of those genes. One of Fix- mutants was shown to be defective in a member of Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (SNARE) proteins involved in vesicle trafficking, which is expressed ubiquitously in shoot, roots, and nodules and the transcripts are detected in the vascular tissues.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子・生理科学

キーワード：共生 根粒 窒素固定 変異体 ミヤコグサ

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は、根粒菌と共生し、根粒と呼ばれる特殊な器官を形成する。根粒では、共生した根粒菌が大気中の窒素ガスを固定する。宿主である植物は、根粒に共生した根粒菌が固定した窒素を生育に利用することができる。そのため、マメ科植物は、化合態窒素がなくても旺盛に生育することができる。

このようなマメ科植物と根粒菌の共生は、根粒という器官の形成と窒素固定という機能の発現の大きく2つのステージに分けることができる。このうち、器官形成の機構は、根粒菌の根粒形成遺伝子群が単離され、続いて、それら根粒形成遺伝子群の発現を誘導する物質フラボノイドが宿主植物で同定され、さらに、フラボノイドによって発現が誘導された根粒形成遺伝子群によって生成される根粒形成シグナル化合物オリゴキトサッカライドが同定されたことで、宿主植物と根粒菌との間で交わされるコミュニケーションの実体が分子レベルで解明された。そして、マメ科のモデル植物ミヤコグサやタルウマゴヤシを用いることで、根粒形成に必須の宿主植物遺伝子が次々と同定され、機能解析が進められている。

一方、窒素固定に必要な根粒菌の窒素固定遺伝子群は同定されているが、根粒菌が根粒細胞に内部共生した後、どのようにして根粒菌が窒素固定機能を発揮するかといった機能発現の機構には不明な点が多く残されている。多くの根粒菌は、単独で生活する場合には、窒素固定を行わない。根粒菌は、宿主植物細胞に内部共生することで、はじめて窒素固定機能を発揮する。このことは、共生した根粒菌の窒素固定機能の発現には、宿主植物がとりわけ重要な役割を果たすことを示している。実際に、宿主植物の変異体の中に、根粒は形成されるものの窒素固定活性に異常がみられる Fix 変異体が単離されており、内部共生した根粒菌の窒素固定機能の発現に必須の宿主植物遺伝子が存在すると考えられる。

これまでに、ミヤコグサの Fix 変異体を解析することで、*SST1*、*IGN1*、*FEN1*、*SEN1* の4種類の根粒菌の窒素固定機能の発現に必須の宿主植物が同定されてきている。このうち、*SST1* は硫酸トランスポーターをコードし、窒素固定酵素ニトロゲナーゼに、ニトロゲナーゼにとって必須な元素である硫黄元素を宿主植物から根粒菌に輸送する役割を果たすことが明らかにされた。また、*FEN1* はホモクエン酸合成酵素をコードし、ニトロゲナーゼ複合体に含まれる FeMo-cofactor の成分の一つであるホモクエン酸を宿主植物側で生産することが発見された。しかし、*IGN1* と *SEN1* の窒素固定機能の発現に果たす正確な役割は不明である。

## 2. 研究の目的

共生窒素固定は、根粒特異的に分化した宿

主植物側の共生特異的な代謝システムによって支えられていると考えられる。したがって、それに関与する宿主植物遺伝子は極めて多いと予想される。そこで、新たなミヤコグサの Fix 変異体の作出に取り組んだところ、これまでに同定された遺伝子とは異なる新規と予測される Fix 変異体が単離された。

本研究では、根粒菌の窒素固定機能の発現に必須の宿主植物遺伝子をより多く単離、同定することを目的に、これら Fix 変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニング法により同定し、機能の解明に取り組んだ。これにより、最終的に共生窒素固定機構の分子的な基盤を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験系統の作製

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の ecotype Miyakojima 系統から作出した Fix 変異体を実験に用いた。表現型解析には、Fix 変異体に Miyakojima 系統をバッククロスして得られた後代の系統を用いた。また、マッピングには、Fix 変異体に Gifu 系統を交配して得られた後代の系統を用いた。

### (2) ポジショナルクローニング

F2 劣性ホモ個体を育成し、葉から DNA を抽出した。抽出された DNA を用いて、SSR マーカーにより、連鎖解析を行った。さらに、かずさ DNA 研究所が提供するゲノム情報を用いて、新たな DNA マーカーを作製し、連鎖解析を行った。最終的に、DNA マーカーで挟み込んだ領域に予測される遺伝子の塩基配列を野生型と Fix 変異体で比較し、原因遺伝子を特定した。

### (3) 相補実験

原因遺伝子の候補が得られたら、野生型の遺伝子、また、遺伝子のプロモーターおよびターミナー領域をクローニングした。そして、クローニングした断片を、毛状根形質転換系を用いて、変異体に導入し、変異形質が遺伝子導入によって相補するかどうかを調べた。

### (4) 遺伝子の発現解析

同定された原因遺伝子の組織別、また、経時的発現様式をリアルタイム PCR 法により調べた。また、in situ hybridization 法と promoter-GUS( -glucuronidase) 法により、遺伝子の空間的発現様式を調べた。

### (5) 表現型解析

変異体の生育、根粒着生数、窒素固定活性を経時的に調べた。また、根粒の内部構造を光学顕微鏡、さらに電子顕微鏡を用いて観察した。

### (6) 相互接ぎ木実験

野生型と変異体の幼植物体を地上部と地

下部に切断し、縦に切り込みを入れた地下部に切り口を斜めに切断した地上部を差し込み、インキュベーターで育成した。

#### (7)RNA-Seq 法

実生と根粒から RNA を抽出し、cDNA 化した断片を次世代シーケンサーを用いて、塩基配列を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1)F04 変異体の解析

F04 変異体 (図 1) は、根粒着生数は正常であるが、根粒の窒素固定活性が正常な根粒の 3 分の 1 から 10 分の 1 程度と低い変異体である。根粒の内部構造を光学顕微鏡で観察すると、感染細胞がみられるが、正常な感染細胞と異なり液胞が観察されなかった。つぎに、電子顕微鏡を用いて感染細胞の微細構造を観察したところ、F04 変異体の根粒では、根粒菌の共生割合が少ない感染細胞や膨張したシンビオソームを含む感染細胞が観察された。これらの結果から、F04 変異体は、他の多くの Fix 変異体で見られる早期老化の徴候を示す変異体であることが明らかになった。



図1 ミヤコグサFix変異体LjSyp71

F04 変異体の候補となる原因遺伝子は、マッピングによって同定された。そこで、毛状根形質転換系を用いて、野生型の遺伝子を変異体に導入した。その結果、変異形質が回復したことから、同定された遺伝子が F04 変異体の原因遺伝子であると判断された。F04 変異体の原因遺伝子は、タンパク質の一次構造から、小胞を介した物質輸送に参与する Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein Receptor (SNARE) タンパク質をコードすると推定された。SNARE タンパク質は、輸送小胞の膜の表面と目標となる膜の表面に配置され、両者の SNARE タンパク質が特異的に結合することで、小胞と膜が融合し、小胞の中味が輸送される。F04 変異体の原因遺伝子は、目標となる膜に配置される SNARE タンパク質と相同性がある。中でも、植物に特有の SYP7 タンパク質グループに含まれる SYP71 タンパク質と最も相同性が高かった (図 2)。そこで、F04 変異体の原因遺伝子を、LjSYP71 と命名した。

LjSYP71 は、根粒のみならず根、茎、葉など植物の全身で発現していた (図 3)。また、根粒の発達に伴って、発現はやや増大した。さらに、in situ hybridization 法と

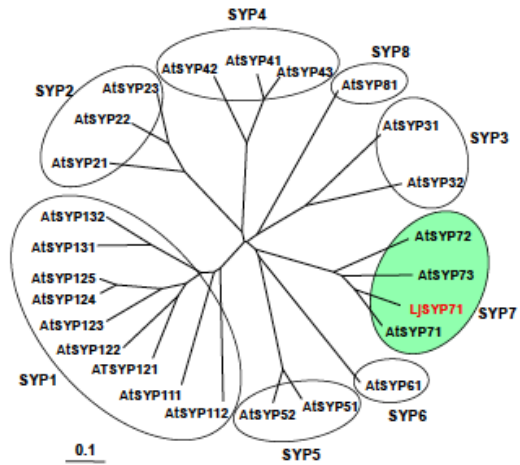


図2 LjSYP71タンパク質とArabidopsisのSYPタンパク質との相同性

promoter-GUS 法によって、根と根粒では、維管束で発現することが明らかになった (図 4)。これらの結果から、根粒菌が共生した感染細胞から離れた維管束で発現する遺伝子が根粒菌の窒素固定活性を制御するといった植物の全身的な制御機構の存在が示唆された。

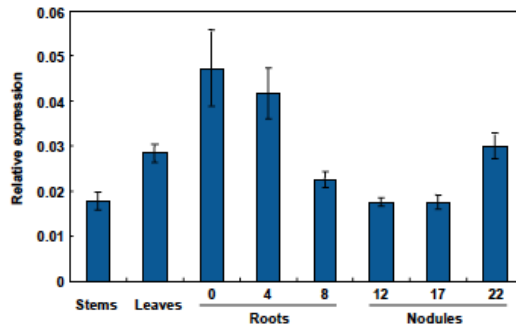


図3 LjSYP71遺伝子の器官別および経時的発現様式

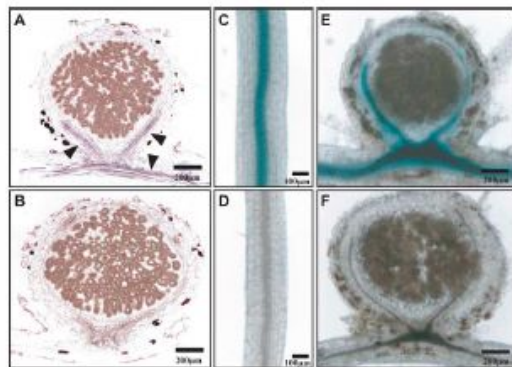


図4 LjSYP71遺伝子の根および根粒における空間的発現様式

そこで、野生型と LjSyp71 変異体との間で相互接ぎ木実験を行った。その結果、LjSyp71 変異体の地下部に野生型の地上部を接ぎ木すると、LjSyp71 変異体の変異形質が部分的に回復することが明らかになった。この結果から、窒素固定活性を制御するシグナル物質が存在し、シグナル物質は LjSYP71 タンパク質が関与する小胞輸送システムによって、地上部で篩管に放出され、根粒に輸送される全身的な制御機構の存在がさらに強固なもの

となった。

さらに、LjSYP71 タンパク質が関与する小胞輸送システムに関わる窒素固定活性を制御するシグナル物質の手がかりを得るために、野生型と *Ljsyp71* 変異体の根粒及び実生で発現する転写産物を RNA-Seq 法を用いて、比較、解析した。その結果、根粒では、検出された 16,383 遺伝子のうち、986 種類の遺伝子が *Ljsyp71* 変異体において減少し、863 種類の遺伝子が増大していることが明らかになった。また、実生では、それぞれ 91 種類と 79 種類の遺伝子の変動していた。さらに、根粒と実生で変動していることが明らかになった遺伝子のうち、34 種類の遺伝子は、根粒と実生で共通に変動していた。両者で共通に変動が検出された遺伝子は、*LjSYP71* 遺伝子の変異し、タンパク質が正常に機能しなかったことによって発現が変動した遺伝子であると考えられる。したがって、これらの遺伝子の中に、LjSYP71 タンパク質が関与する小胞輸送システムに何らかの関連がある遺伝子が含まれていると推測された。今後は、これら遺伝子の発現を詳細に検討し、*Ljsyp71* 変異体で特異的に変動した遺伝子を特定していく予定である。

#### (2)F34 変異体の解析

F34 変異体は、白色とピンク色の 2 種類の根粒が形成され、窒素固定活性が低い変異体である。F34 変異体の原因遺伝子を同定するために、F34 変異体と野生型との交配によって得られた F2 劣性ホモ個体 1,285 個体の連鎖解析を行った。その結果、原因遺伝子の位置を約 200kb のゲノム領域に絞り込むことができた。しかしながら、F34 変異体のこの領域に予測される遺伝子のエクソン領域に塩基配列の変異を検出することはできなかった。引き続き、原因遺伝子の同定に取り組んでいく必要がある。

#### (3)F39 変異体の解析

F39 変異体は、根粒菌を接種した条件では、根粒は形成されるものの、窒素固定活性が低く、生育が抑制される変異体である。F34 変異体と同様に、着生した根粒には白色とピンク色の 2 種類の根粒が形成されるという特徴がみられる。

F39 変異体の候補となる原因遺伝子は、マップベースクローニングによって同定された。そこで、毛状根形質転換系を用いて相補実験を行った。しかしながら、F39 遺伝子のゲノム領域、あるいは、カリフラワーモザイクウイルスの 35S promoter 制御下で F39 遺伝子の cDNA を F39 変異体に導入したが、F39 変異体の変異形質は回復しなかった。現在、ミヤコグサユビキチンプロモーターを用いて相補実験を継続している。

#### (4)F62 変異体の解析

F62 変異体は、根粒の窒素固定活性が野生

型の半分程度検出される変異体である。F62 変異体の原因遺伝子を同定するために、F62 変異体と野生型との交配によって得られた F2 劣性ホモ個体 876 個体の連鎖解析を行った。その結果、原因遺伝子を約 250kb の領域に絞り込むことができた。しかしながら、かずさ DNA 研究所によれば、この領域のゲノム塩基配列は完全には解読されておらず、F62 変異体の原因遺伝子を同定するには至らなかった。

#### (5)その他の変異体の解析

F04、F34、F39、F62 変異体の他に、これまでに作出された 7 系統の変異体の表現型解析を行った。その結果、F53、F54、F176 変異体では、窒素固定活性が野生型に比べ、顕著に低いことが明らかになった。原因遺伝子のラフマッピングを行ったところ、これらは、これまでにマップされている Fix 変異体の原因遺伝子とは異なる領域に遺伝子がマップされたことから、新規の Fix 変異体であることが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計3件)

箱山雅生・河内宏・菅沼教生(2013)共生菌の遺伝子欠落を補う宿主植物 生物の科学 遺伝、査読無、67:441-446  
Hakoyama, T., Oi, R., Suga, E., Adachi, Y., Kobayashi, M., Akai, R., Sato, S., Fukai, E., Tabata, S., Shibata, S., Wu, G.J., Hase, Y., Tanaka, A., Kawaguchi, M., Kouchi, H., Umehara, Y., and Suganuma, N. (2012) The SNARE protein SYP71 expressed in vascular tissues is involved in symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Physiol*, 査読有、160: 897-905 DOI:http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.200782  
Hakoyama, T., Niimi, K., Yamamoto, T., Isobe, S., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Kumagai, H., Umehara, Y., Brossuleit, K., Petersen, T.R., Sandal, N., Stougaard, J., Udvardi, M.K., Tamaoki, M., Kawaguchi, M., Kouchi, H., and Suganuma, N. (2012) The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiol*, 査読有、53: 225-236 DOI: 10.1093/pcp/pcr167

#### [学会発表](計5件)

Suganuma, N., Saeki, C., Abo, M., Nishida, H., Handa, Y., Shigenobu, S. and Kawaguchi, M. (2013,10,18) Host plant shoot controls rhizobial

symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation, Miyazaki

Hakoyama, T., Suganuma, N., Kouchi, H., Hayashi, M. and Fujiwara, T. (2013,10,14-10,18) Analysis of a host factor required for efficient symbiotic nitrogen fixation in model and crop plants -Functional analysis of *Lotus japonicus* SEN1 protein-. 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation, Miyazaki

箱山雅生、菅沼教生、河内宏、林誠、藤原徹(2013,3,21-3-23)窒素固定能の発現に必須なミヤコグサ SEN1 タンパク質の機能解析 第54回日本植物生理学会、岡山大学

Hakoyama, T., Oi, R., Hazuma, K., Suga, E., Adachi, Y., Kobayashi, M., Akai, R., Sato, S., Fukai, E., Tabata, S., Shibata, S., Wu, G.J., Hase, Y., Tanaka, A., Kawaguchi, M., Kouchi, H., Umehara, Y., and Suganuma, N. (2012,7,29-8,2) A SNARE protein expressed in vascular tissue affects symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. XV International Congress of Plant-Microbe Interactions, Kyoto

箱山雅生、多井諒、弭間和哉、須賀江里、足達由佳、小林麻由美、佐藤修正、深井英吾、田畑哲之、柴田哲、呉国江、長谷純宏、田中淳、川口正代司、河内宏、梅原洋佐、菅沼教生(2011,9,21) SNARE タンパク質 LjSYP71 が欠損したミヤコグサ共生変異体 第21回植物微生物研究交流会、岡山大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

菅沼 教生 (SUGANUMA Norio)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40179114