

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880033

研究課題名（和文）マメ科植物の根粒共生プログラムを活性化する新規根粒菌因子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel rhizobial factors that induce the symbiotic program of legume

研究代表者

下田 宜司（SHIMODA YOSHIKAZU）

独立行政法人農業生物資源研究所・植物共生機構研究ユニット・研究員

研究者番号：80415455

研究成果の概要（和文）：マメ科植物は根粒菌と共生することで、根粒菌が固定した空中窒素を利用して生育できる。本研究では、マメ科植物の根粒共生プログラムを活性化させる新規な根粒菌因子を明らかにするため、マメ科植物に正常に共生できない根粒菌変異株を探索し、その変異遺伝子の同定と機能解析および変異株の感染表現型を詳細に調べた。その結果、アデニンなどのプリン塩基の代謝に関わる遺伝子の変異株はマメ科植物への感染に異常をきたし、根粒の発達が途中で停止することが分かった。また変異株が示す根粒形成不全表現型は培地中に植物ホルモンを添加することによって部分的に回復したことから、根粒菌由来のプリン代謝産物がマメ科植物の共生プログラムを活性化する因子として機能している可能性が見いだされた。

研究成果の概要（英文）：Legume plants acquire effectively the nitrogen nutrition by establishing root nodule symbiosis with rhizobia. Here we characterized the symbiotic mutants of rhizobia in order to identify novel rhizobial factors that are required for the induction of symbiotic reactions on host legume. In this work, we found that rhizobial mutants that are disrupted the genes involved in the purine nucleotide metabolisms do not infect normally to host plant roots and induce only small ineffective nodules. The defect in the nodule development was recovered partially by the exogenous application of plant hormones. Our findings indicate the possibility of that the purine derivatives from rhizobia are involved in infection and nodule development on host plants.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：植物微生物相互作用

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：マメ科植物・根粒菌・共生窒素固定

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生は、宿主・根粒菌間のシグナル分子の認識により開始され

る。マメ科植物による根粒菌の認識は、根粒菌が分泌するリポキトオリゴ糖である Nod ファクターを宿主植物が受容することによ

ておこる。Nod ファクターは宿主植物の根において、皮層細胞分裂や共生遺伝子の発現など初期の共生応答を誘導するが、Nod ファクターのみでは完全な根粒の形成までは誘導されない。一方、植物ホルモンの1つであるサイトカイニンの受容体に恒常的活性化型の変異を持つマメ科植物では、根粒菌を接種していない条件下でも根粒がほぼ完全な形まで誘導されることから、根粒の最終段階までの発達にはNod ファクター以外にサイトカイニンシグナル経路の活性化が必要であると考えられる。これまでにダイズに共生する根粒菌がサイトカイニン様の物質を分泌することやNod ファクターを合成できない根粒菌にアグロバクテリウムのサイトカイニン合成遺伝子を導入すると、宿主植物の根に根粒様の構造を形成するなど、根粒菌由来のサイトカイニンが根粒共生に関与する可能性が示唆されていたが、その詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、マメ科植物の根粒共生プログラムを活性化させる新規な根粒菌因子を明らかにするため、宿主植物に対して正常に共生できない根粒菌変異株の探索を行い、その中からプリン塩基の代謝に関わる遺伝子の変異株に着目した。植物ホルモンのサイトカイニンは、プリン塩基の一つであるアデニンの誘導体であることから、プリン代謝遺伝子の変異株が示す共生不全表現型を詳細に解析することにより、根粒菌由来のプリン代謝産物、特にサイトカイニンの共生への関与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ミヤコグサ根粒菌の共生変異株の探索

ミヤコグサ根粒菌のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーより、カルコフローを用いて細胞外多糖の合成に異常をきたすと考えられる変異株を探索した。得られた変異株を野生型のミヤコグサに個別に接種し、根粒共生能を評価した。共生に異常をきたす変異株のうち、プリン代謝に関わる遺伝子の変異株に着目し、以降の解析に用いた。

### (2) プリン代謝遺伝子変異株の感染表現型の解析

プリン代謝遺伝子変異株の感染表現型を詳細に解析するため、GUS 遺伝子を発現するプラスミドを3つの遺伝子 (mlr7447、ml10057、mlr3811) の変異株に導入し標識した。GUS 標識した変異株を野生型のミヤコグサに接種しそれぞれの感染表現型を解析した。

### (3) アデニンおよびサイトカイニン存在下での根粒着生表現型の解析

プリン代謝遺伝子変異株の根粒着生不全表現型に対するアデニンおよびサイトカイニンの影響を調べるため、これらの物質を含む培地上での変異株の根粒着生表現型について解析を行った。さらにサイトカイニンの受容体に恒常的活性化型の変異を持つミヤコグサ変異体において根粒菌変異株の根粒着生表現型を解析した。

## 4. 研究成果

(1) カルコフローを用いた根粒菌変異株のスクリーニングにより、根粒形成に異常があると考えられる変異株を19株(9遺伝子)、窒素固定に異常があると考えられる変異株を30株(13遺伝子)、根粒着生数が低下する変異株を15株(6遺伝子)同定した。それぞれの変異株についてトランスポゾンが挿入されている遺伝子を決定したところ、根粒形成に異常がみられる変異株の原因遺伝子のうち4遺伝子がプリンの代謝に関わると考えられる遺伝子であった。

(2) GUS 標識したプリン代謝遺伝子変異株の感染表現型を解析した結果、野生型の根粒菌を接種したミヤコグサでは根の広い範囲で複数の感染が認められるのに対し、3つの遺伝子変異株 ( $\Delta$  mlr7447、 $\Delta$  ml10057、 $\Delta$  mlr3811) はいずれも、感染の頻度が野生株に比べ顕著に低下することがわかった (図1)。

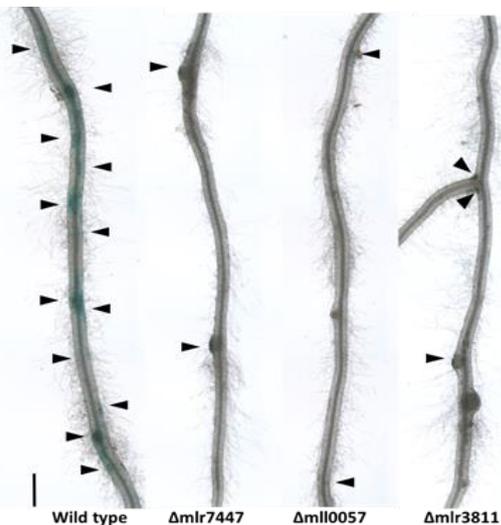


図1 野生型ミヤコグサの根におけるプリン代謝遺伝子変異株の感染部位。矢印は根粒菌が感染している部位を示す。

また根粒の発達段階における感染を調べたところ、変異株はいずれも根粒原基の表面に留まり、皮層部分への感染は見られなかった。変異株接種4週間後のある程度発達した根粒の内部には若干の感染が認められたが、野生型を接種した場合と比較すると、根粒のサイズや形、根粒内の菌密度が明らかに低下していた(図2)。これらの事から根粒菌のプリン合成は宿主への正常な感染に重要であると考えられる。

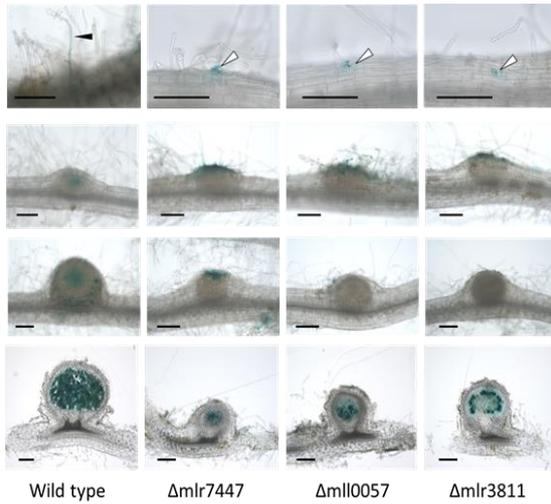


図2 根粒の発達段階におけるプリン代謝変異株の感染。青く染まっている部分は根粒菌の感染部位を示し、矢印は感染糸を示す

(3) アデニンおよび3種のサイトカイニン(ベンジルアデニン、ゼアチン、カイネチン)をミヤコグサの成長に影響を与えない濃度で培地に加え、変異株の根粒着生表現型を確認したところ、50 mMのアデニンおよび0.2 μMのゼアチン存在下において、根粒の形成(無効根粒および根粒原基形成)が部分的に相補されたことから、根粒菌のプリン代謝物は根粒の発達にも関与している可能性が考えられる(図3, 図4)。

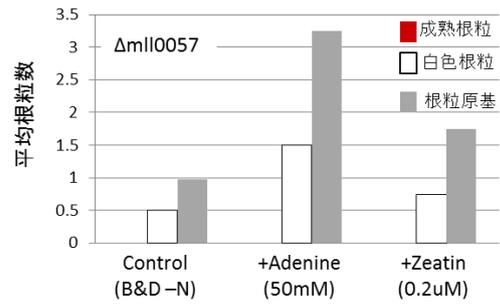
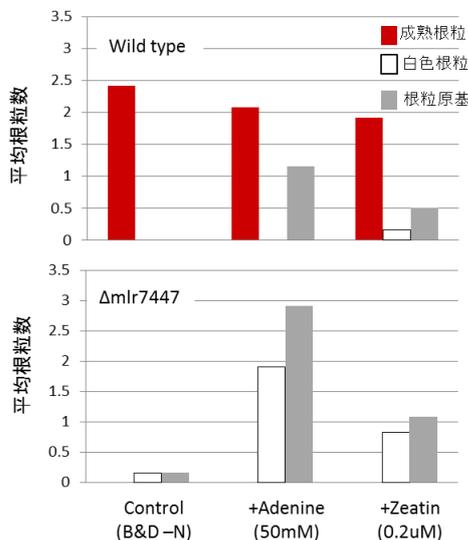


図3 アデニンおよびサイトカイニンを含む培地上での根粒着生数。根粒の数は成熟根粒、白色根粒、根粒原基に分け、6個体の平均着生数として示した。

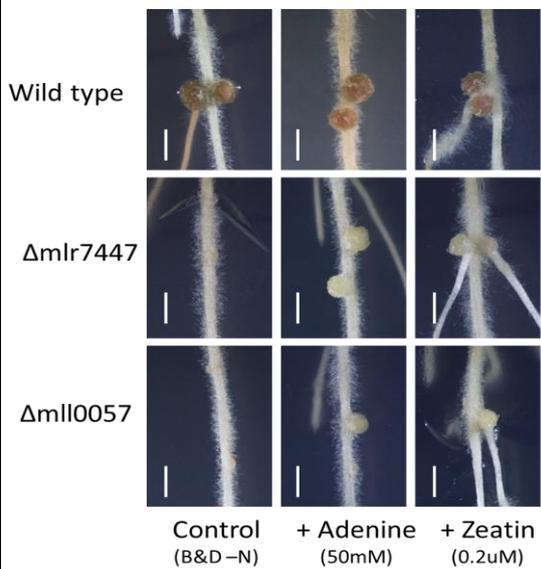


図4 アデニンおよびサイトカイニンを含む培地上での根粒着生表現型

しかしながら、サイトカイニン受容体に恒常的活性化型の変異を持つミヤコグサにプリン代謝遺伝子の変異株を接種しても野生型を接種した場合にみられるような窒素固定活性のある根粒は着生しなかった事から、窒素固定活性の発現には別の要因が必要であると考えられる。

本研究で得られた成果は、根粒菌のプリン代謝とサイトカイニンの根粒共生への関与を示したものであり、今後、宿主植物の遺伝子発現や共生変異体などを利用した解析を行うことにより、根粒菌の感染機構の解明に貢献できるものと考えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

下田宜司、佐藤修正、林 誠、Identification and characterization of symbiotic mutants of *Mesorhizobium loti*、第35回 日本分子生物学会 2012年12月13日 福岡国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下田 宜司 (SHIMODA YOSHIKAZU)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物

共生機構研究ユニット・研究員

研究者番号：80415455