

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450085

研究課題名(和文) セルフクローニング技術を用いた根粒菌共生遺伝子利用のための基盤的研究

研究課題名(英文) Development of self-cloning of symbiotic genes of rhizobium

研究代表者

田島 茂行 (Shigeyuki, Tajima)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50116894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は根粒菌のプロテオーム解析、RNAseq解析から共生組織形成、窒素固定活性を制御する根粒菌、マメ科植物遺伝子群を同定し、根粒窒素固定活性を維持する代謝系、更に根粒老化についての機能解析を行ってきた。その結果、根粒菌GS1遺伝子は根粒形成時には影響がないにもかかわらず根粒老化に大きな影響を与える事を示した。またミヤコグサ根粒老化時の遺伝子発現の実態をマイクロアレーによって解析した。希少な植物糖の代謝解析も当研究室では進めている。この共生維持に関与する遺伝子群を発現制御し、根粒菌セルフクローニング技術を開発することによって環境中へ放出するための技術開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We surveyed proteome and RNA seq analysis of nodule tissue formation and during aging using a legume plant (*Lotus japonicum*) and a rhizobium (*Mesorhizobium loti*). Cluster analysis of these gene expression profiles suggested the tissue and age specific metabolic genes of these organisms. The function of the tissue specific genes were surveyed using transgenic *Lotus japonicum*/meosrhizobium system. GS1 (glutamine synthetase I) gene of the *M. loti* was especially curious because the mutant showed strong effect to stimulate aging of the nodules. We studied the function of the gene and developed the technique to perform self-cloning of the gene in rhizobium.

研究分野：植物栄養学

キーワード：遺伝子解析 共生窒素固定 根粒代謝

1. 研究開始当初の背景

マメ科作物での根粒組織形成を支配するシグナル伝達・ホルモン制御遺伝子群は近年急速に明らかにされ、非マメ科重要作物への共生窒素固定能付与が目標となっているが (Oldroyd 2014)、植物細胞へ侵入した根粒菌が植物免疫を制御する機構も活発に研究されている (Hayashi et. al. 2014)。植物免疫に関連する NO、活性酸素、カタラーゼ、エフェクターなど根粒菌代謝シグナルは根粒着生後、経時的に低下する窒素固定活性も制御しており (Hanyuu 2009)、我々は根粒活性発現維持のためには、植物が共生をキャンセルする機構を解析し共生機能ファインチューニングを行う技術開発が必須の課題であると考えた。また大腸菌に比べ根粒菌は分子遺伝学ツールが限定されており、改良根粒菌環境放出のためのセルフクローニング及び組み換え菌同定技術開発も必須の課題になっていた。

2. 研究の目的

根粒菌 Glutamine synthetase I (GS1) 遺伝子欠損が誘導する早期根粒老化の分子機構を、RNA sequencing、マイクロアレー、植物メタボローム手法を結びつけて解析し、根粒共生系維持機構の実態解析を行った。

2) ミヤコグサ菌、ダイズ菌において scarless 組換え体を作成するセルフクローニング技法を開発し、GS1 発現増幅株など遺伝子組み換え菌接種栽培時の組み換え菌生存性をメタゲノム手法で解析した。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ菌 (*Mesorhizobium loti*) の GS1、ダイズ菌 (*B. japonicum* USDA110) GS1 遺伝子について欠損株を作成し、それら GS1 変異体について感染処理後レオナルドジャーを用い、閉鎖温室で栽培することによって、種子形成までの生育表現型を調査した。*B. japonicum* の STM 変異体は部分的にしが存在しないので、東北大学南澤研と連携して整備した。*M. loti* GS1 のバクテロイド化に伴う発現変動、呼吸活性、根粒老化抑制などを示唆するデータは既に得られているので、ダイズ菌について同様の解析を進めた。

特に発育時期全般にわたって解析するため、大型のジャーを用い、自然条件に近い隔離温室で栽培した。

(2) 上記の変異体で作成したミヤコグサ、ダイズ根粒について、根粒菌マイクロアレー、植物側の RNAseq に基づいたマイクロアレーを発育時期別に解析し、根粒菌側、植物側遺伝子発現のクラスター解析を行う。特に活性酸素ラジカル発生に關する遺伝子群の解析を進めた。

(3) 上記の変異体で作成したミヤコグサ、ダイズ根粒について、根圏、根、根粒のメタボローム解析を行った。

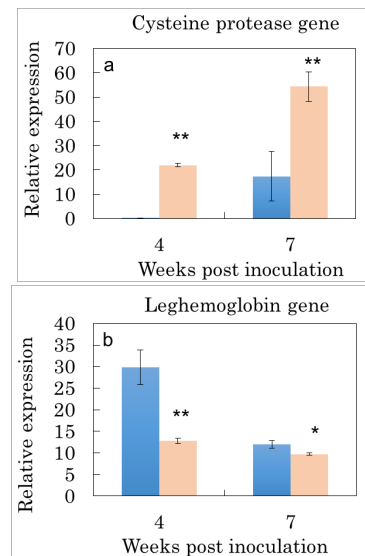
(4) ゲノム DNA 配列データ及び我々がプロ

テオーム解析で得た根粒発育時期別根粒菌遺伝子発現データの結果を利用して、上記遺伝子プロモーター領域を解析し、セルフクローニング手法で組換え体を作成するためのプロモーター構造を選択し、過剰発現組換え体を作成した。

4. 研究成果

申請者は根粒菌のポストゲノム解析を世界に先駆けて行い、各根粒菌について根粒特異的で窒素固定活性に影響の遺伝子の変異体を用いて根粒組織形成、共生機能への影響

を網羅的に検索し、共生形質に影響を与える遺伝子群を見いだしてきた。特に GS1 は生物において炭素代謝・窒素代謝を統合する酵素分子として知られているが、左図に示すようにミヤコグサ根粒



菌 GS1 欠損株は正常株に比べ、根粒着生早期 (4 週間) にミヤコグサ根粒の窒素固定活性が低下するのみでなく、老化マーカーである植物 Cysteine protease 遺伝子発現を誘導し、窒素固定活性発現に關する leghemoglobin 遺伝子発現を押さえている。

共生現象は共生組織形成機構と主に、その窒素固定活性維持機構が今後の研究課題となっており、開花・種子形成と共に植物体が共生をキャンセルし、根粒を老化、壊死させる機構の解明が必要である。これはミコリザや他の共生菌活性とも関連する現象である。

本研究では、植物体が根粒を必要としなくなった時点で、どのような分子機構で老化を誘導するのか、を解析するために、根粒菌 GS1 遺伝子欠損の影響を根粒菌・植物体マイクロアレー、メタボローム解析で調査するが、根粒老化現象を根粒菌側炭素代謝・窒素代謝シグナルから解析する事は独創的な視点である。

本研究の特色の二つ目はセルフクローニング技術を根粒菌に適用し、環境放出に備えた技術開発を行ったことである。セルフクローニング技術は産業微生物において大きく発展しており利用が進んでいるが、例えばマメ科のモデル生物であるミヤコグサと根粒共生を営むミヤコグサ根粒菌においては、人為的に制御可能なプロモーターや温度感受性のプラスミドベクターは使えず、ゲノムを自由に操

作する条件が整っているとは言い難い状態である。ダイズ菌では更に限定された手段しか使えない状態である。

この3年間で我々はミヤコグサ根粒菌のMAFF303099株に適用可能なメガヌクレアーゼ I-SceI を利用した方法及びFRT配列 (Flp Recognition Target) を標的とする組換え酵素 FLP (flippase) を利用した方法の2種のツールを確立した。

連携研究者が検討した第一の方法は、以下の図に示したメガヌクレアーゼ I-SceI を利用した方法である。まず、根粒菌では複製不能な複製起点と I-SceI 標的配列 (18bp)、カナマイシン耐性遺伝子とを持つベクターを作製、これに根粒菌ゲノム断片と任意のDNA断片をクローン化後、根粒菌に導入、相同組換えによりベクターごとゲノムに組み込んだ根粒菌株を作製する。次に、得られた菌株中で、一過的に I-SceI 遺伝子を発現させて、ゲノムDNAに二重鎖切断を引き起こし、組換え修復機構を利用することで、ゲノム内に余剰配列を残さない操作を実現するものである。

従来根粒菌遺伝子を操作して表現型を検討した報告例はあるが、安定性に問題があり、種子形成を含め生育時期全般にわたって表現型を確認した例はきわめて少ない。環境放出を志向する根粒菌では必須な技術であるが報告事例がなく、整備された根粒菌ゲノムリソースを利用して、根粒菌を改良し環境中で利用するための基礎的技術研究が必要であると考える。

本研究では学部で整備されている大型隔離温室、特定網室を利用し改良根粒菌の土壤中での安定性も検討した。

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)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Ohtsu, N, Ichida, S, Yamaya, H, Ohwada, T, Itakura, M, Hara, Y, Mitsui, H, Kaneko, T, Tejima, K, Tabata, S, Saeki, K, Omori, H, Hayashi, M, Maekawa, T, Murooka, Y, Tajima, S, Simomura, K, Agarie-Nomura, M, Uchiumi, T, Suzuki, A, Shimoda, Y, Abe, M, Minamisawa, K, Arima, Y, Yokoyama, T. (2015) Peribacteroid solution of soybean root nodules partly induces genomic loci for differentiation into bacteroids of free-living *Bradyrhizobium japonicum* cells, *Soil Science and Plant Nutrition*, 61, (3) 461-470
2. Chungopast, S., Hirakawa, H., Sato, S., Handa, Y., Saito, K., Kawaguchi, M., Tajima, S., Nomura, M. (2014) Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis.

Plant Biotechnology, 31: 345-349.

<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.1021a>

3. Chungopast, S., Thapanapongworakul, P., Matsuura, H., Dao, T.V., Asahi, T., Tada, K., Tajima, S., and Nomura, M (2014) Glutamine synthetase I-deficiency in *Mesorhizobium loti* differentially affects nodule development and activity in *Lotus japonicus*, *Journal of Plant Physiology*, 171, 104-108.

〔学会発表〕(計7件)

1. Expression of ferritin in *Lotus japonicus* nodule, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2015年12月(愛媛県・松山市), Chungopast Sirinapa, Mallika Duangkhet, Jian Feng Ma, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura
2. Effect of MYB transcription factor during nodule development in *Lotus japonicus*, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2015年12月(愛媛県・松山市), Supriadi, Rahayu Widyastuti, Dwi Andreas Santosa, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura
3. 根粒老化時に発現するフェリチンタンパク質はNOによって誘導する, 植物微生物研究会, 2015年9月(茨城県・つくば市), 野村美加, Sirinapa Chungopast, 田島茂行
4. Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis., 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation 40, Oct. 28-30, 成都(中国), 2014 Chungopast, S., Hirakawa, H., Sato, S., Handa, Y., Saito, K., Kawaguchi, M., Tajima, S., Nomura, M.
5. ミヤコグサ Qa-SNARE 遺伝子 Syn1 の根粒形成および種子形成への関与. 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月(香川県・高松市), 十川蒼, 小澤拓也, 山崎大樹, 三好貴紘, 京正晴, 田島茂行, 野村美加
6. Genetic screening and prediction of genes function involved in nodule senescence in the *L. japonicus* and *M. loti* symbiosis, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月11,12日(香川県・高松市), S. Chungopast, H. Hirakawa, S. Sato, Y. Handa, K. Saito, M. Kawaguchi, S.Tajima, M. Nomura
7. ミヤコグサ根粒誘導性シスエレメントの同定及びその機能解析, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月(香川県・高松市), 三田村梨帆, 森毅, 多田安臣, 山本義治, 佐藤修正, 半田佳宏, 斎藤勝晴, 川口正代司, 田島茂行, 野村美加

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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