

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780066
 研究課題名（和文） 窒素固定を支える根粒内の細胞タイプ特異的な MATE 型輸送体の解析
 研究課題名（英文） Analyses of cell-type specific MATE transporters in the nodules
 研究代表者
 杉山 暁史（SUGIYAMA AKIFUMI）
 京都大学・生存圏研究所・助教
 研究者番号：20598601

研究成果の概要（和文）：

本研究では、レーザーマイクロダイセクション法を用いた根粒内の細胞タイプ特異的な遺伝子発現解析により見出された MATE 型輸送体に着目して研究を行った。LjMATE1 は根粒の感染領域で発現し、クエン酸を輸送することで感染領域への鉄供給に関与することが明らかになった。LjMATE2 は根粒での発現は低く、アントシアニンを蓄積する Gifu 系統の茎において発現し、液胞に局在することが示された。LjMATE3 は根粒形成過程に伴って発現が上昇し、フラボノイド生合成系と同様に GSH により発現が誘導されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Cell-type specific RNA was extracted with Lasermicrodissection and used for microarray analysis. In this study, expression and functional analyses of cell-type specific MATE transporters in the nodules were performed. LjMATE1 was expressed in the infection zone of nodules and found to transport citrate for Fe translocation to the infection zone of nodules. LjMATE2 was expressed highly in the anthocyanin-accumulating stems and found to be expressed at the tonoplasts. The expression of LjMATE3 was induced during nodulation and also by GSH in a similar way as genes involved in the flavonoid synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

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：共生窒素固定、根粒、ミヤコグサ、MATE 型輸送体、クエン酸、フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

陸上生態系の窒素の 80～90%は生物学

的窒素固定に由来するが、その中でマメ科植物と根粒菌の共生による共生窒素固定は農業的にも極めて重要な性質である。マメ科植物の共生窒素固定は、農学および生物学的重要性から国内外で盛んに研究され、根粒形成に至るシグナル伝達系の同定など多くの成果が挙げられている。その一方で、共生窒素固定において、根粒内の植物細胞（感染細胞と非感染細胞）間及び植物細胞と根粒菌間での様々な低分子化合物の輸送は、共生窒素固定の根幹であり、炭素源と窒素源の交換を担う代謝物が同定されている等、代謝物に関する研究が進んでいるにも関わらず、輸送体に関してはほとんど未解明である。

レーザーマイクロダイセクション法により根粒内の「感染細胞」、感染細胞に隣接する非感染細胞（以下、「隣接細胞」とする）、「非感染細胞」を個別に抽出し、それぞれの細胞で発現する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、植物の輸送体ファミリーとして多くのメンバーを有する MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) 型輸送体の遺伝子のうち、*LjMATE1* が根粒内の感染領域（感染細胞及び隣接細胞）で発現する遺伝子、*LjMATE2* が根粒内の非感染細胞で特異的に発現する遺伝子として見出された。相同性検索の結果、*LjMATE1* はシロイヌナズナのクエン酸輸送体と相同性が高く、実際にアフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析からクエン酸輸送体であることを明らかにした。また、*LjMATE2* はシロイヌナズナのフラボノイド輸送体 (TT12) と相同性が高いことが示された。さらに TT12 と相同性の高い別の MATE 型輸送体 *LjMATE3* も見出された。

2. 研究の目的

本研究では、これら 3 種の MATE 型輸送体による根粒内の低分子有機化合物の輸送を介した共生窒素固定の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

各 MATE 遺伝子の発現を解析するため、葉、茎、根、根粒から cDNA を調製し、RT-PCR 法により発現部位を解析した。また、根粒形成過程での発現を調べるため、ミヤコグサに根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を感染させてから継時的に根及び根粒のサンプリングを行い、リアルタイム PCR 法により発現解析を行った。

(2) Promoter:GUS を用いた発現解析

根及び根粒における発現組織を明らかにするために、各遺伝子の推定プロモーター領域（上流約 2 kb）に β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を結合したコンストラクトを作成し、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた形質転換により毛状根を作出した。根粒を形成させた毛状根を用いて、GUS 染色を行った。

(3) GFP 融合タンパク質の発現による細胞内局在性解析

細胞内における局在膜を特定することを目的に、各 MATE タンパク質を GFP を融合して異種細胞 (*Nicotiana benthamiana* 及び *Coptis japonica*) にて発現させ、GFP 蛍光の観察を行った。

(4) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた輸送解析

LjMATE1 の輸送基質を明らかにするため

に、アフリカツメガエル卵母細胞に LjMATE1 の cRNA を注入し、クエン酸及びリンゴ酸の輸送解析を行った。(本研究は岡山大学馬建鋒教授との共同研究による)

(5) RNAi 体の作出と表現型の解析

各 MATE 型輸送体の生理的役割を明らかにするために、RNAi 体の作出を試みた。LjMATE1 に関しては得られた RNAi 体の窒素固定活性をアセチレン還元法により測定した。

4. 研究成果

(1) LjMATE1

LjMATE1 はミヤコグサの根粒で特異的に発現し、Promoter:GUS コンストラクトを用いた組織発現解析により根粒の感染領域において発現することが明らかになった。

系統解析により LjMATE1 はこれまでにクエン酸を輸送することが報告されている MATE タンパク質と同じクラスターに位置することが示されたため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた有機酸輸送解析を行った。その結果、LjMATE1 はクエン酸排出活性を示したが、リンゴ酸輸送活性は認められなかった。

さらに、RNAi を用いて LjMATE1 の発現を抑制した形質転換体を作成した。窒素欠乏条件下で根粒菌を感染させて生育させたところ、生育が抑制された。さらに GFP 蛍光をマーカーとした毛状根形質転換法により、形質転換毛状根では根粒の大きさが小さくなることが認められた。

LjMATE1 の発現を抑制させた植物は野生型と比べて窒素固定活性 (アセチレン還元活性として定量) が低く、また Perls 染色により鉄の局在を解析したところ、根と根粒のジャンクションで強い染色が認められ

た。

これらの結果から、LjMATE1 は細胞外にクエン酸を輸送することにより、根粒感染領域内への鉄の供給に参与することが示唆された。

(2) LjMATE2

RT-PCR 法により発現組織解析を行なった結果、マイクロアレイ解析の結果とは異なり、LjMATE2 は根粒においてほとんど発現していないことが明らかとなった。しかし、LjMATE2 はフラボノイドの一種であるアントシアニンが高蓄積するミヤコグサ (Gifu B-129) の茎で特異的に発現が認められた。さらに、系統解析の結果、他の植物においてフラボノイド輸送性の MATE 型輸送体として報告された MATE 分子と相溶性が高いことが明らかとなった。

GFP 融合タンパク質を用いて LjMATE2 の細胞内局在性を調べたところ、LjMATE2 は液胞膜に局在することが明らかとなった。以上より、LjMATE2 は、ミヤコグサの茎においてアントシアニンの液胞への隔離に機能することが推測された。

(3) LjMATE3

LjMATE3 は根粒形成に伴ってその発現が上昇し、Promoter:GUS 形質転換毛状根を用いた GUS 染色により、成熟根粒においては、根粒維管束で強く発現していることが明らかとなった。

次に、LjMATE3 とフラボノイドの関連性について調べるために、GSH 処理による LjMATE3 の発現変動解析を行った。その結果、フラボノイド生合成系遺伝子 (LjIFS1、LjIFS2、LjVRI) と同様の誘導パターンで LjMATE3 の発現が誘導され、LjMATE3 のフラボノイドとの関連性が示唆された。一方

LjMATE2 では、このような GSH による発現誘導は認められなかった。

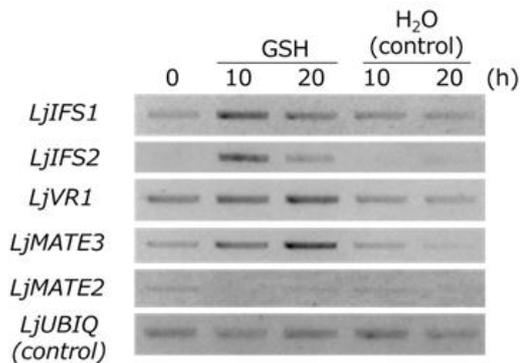


図. GSH 処理後の *LjMATE2* および *LjMATE3* の発現解析

0 : GSH 処理前、GSH 10 : GSH (10mM) 処理の 10 時間後、GSH 20 : GSH (10mM) 処理の 20 時間後、H₂O 10 : 水処理の 10 時間後、H₂O 20 : 水処理の 20 時間後

GFP 融合タンパク質を用いた *LjMATE3* の細胞内局在性の解析を行ったが、この方法では GFP 蛍光が膜局在パターンを示さず、*LjMATE3* の局在を明らかにすることはできなかった。また、*LjMATE3* に対するペプチド抗体を作成し、ミヤコグサのミクロソーム画分を不連続ショ糖密度勾配遠心法により分画し、ウエスタンブロッティングを行った。しかし、*LjMATE3* の細胞内局在性を明らかにすることはできなかった。

LjMATE3 の根粒における生理的役割の解析を行うために、RNAi による *LjMATE3* の発現抑制毛状根を作製しこれを観察した。しかし、現在までのところ発現抑制が十分でないのか、コントロールの根粒と比べ、明確な違いは認められなかった。

LjMATE3 は、根粒内組織においてフラボノイド生合成遺伝子と同様の部位（根粒の根粒菌感染領域の外側）で発現しており、

一部のフラボノイド生合成遺伝子と同様 GSH によってその発現が誘導されることが見出された。フラボノイドは病原性微生物からの防御に機能することが知られている。マメ科植物の根粒形成中期～後期においても、フラボノイドが微生物からの防御に働く可能性を検討したい。

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 2 件)

① Takanashi, K., Yokosho, K., Saeki, K., Sugiyama, A., Sato, S., Tabata, S., Ma, J.F., Yazaki, K. (2013) *LjMATE1* - a citrate transporter responsible for iron supply to nodule infection zone of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.*, 54, 585-594 doi: 10.1093/pcp/pct019 (査読有)

② Takanashi, K., Takahashi, H., Sakurai, N., Sugiyama, A., Suzuki, H., Shibata, D., Nakazono, M., Yazaki, K. (2012) Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 25, 869-876 doi: 10.1094/MPMI-01-12-0011-R (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① Yoshihiro Ota, Kojiro Takanashi, Akifumi Sugiyama, Toshio Aoki, Kazufumi Yazaki "Analysis of MATE-type transporters, *LjMATE2* and *LjMATE3* in *Lotus japonicus*" International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, 2013 年 3 月 28 日 (倉敷市芸文

館、倉敷市)

②太田喜寛，高梨功次郎，杉山暁史，青木俊夫，矢崎一史「ミヤコグサの MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の解析」第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 22 日 (岡山大学、岡山市)

③太田喜寛，高梨功次郎，杉山暁史，青木俊夫，矢崎一史「ミヤコグサで発現する MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の解析」第 22 回植物微生物研究交流会、2012 年 9 月 26 日 (神戸大学、神戸市)

④山下 和晃、杉山 暁史、矢崎 一史「ダイズ根においてフラボノイド配糖体を分泌する輸送体の探索」第 21 回植物微生物研究交流会、2011 年 9 月 21 日 (岡山大学、岡山市)

⑤太田喜寛，高梨功次郎，杉山暁史，矢崎一史「ミヤコグサ根粒における MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の発現解析」第 21 回植物微生物研究交流会、2011 年 9 月 21 日 (岡山大学、岡山市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LPGE/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 暁史 (SUGIYAMA AKIFUMI)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：20598601