

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580068
 研究課題名（和文）
 ミヤコグサ根粒形成過程に関与する小胞輸送の役割
 研究課題名（英文）
 Functional analysis of vesicle transport for nodule formation in *Lotus japonicus*
 研究代表者
 東江 美加（野村 美加）（AGARIE MIKA (NOMURA MIKA)）
 香川大学・農学部・准教授
 研究者番号：50294749

研究成果の概要：

根粒形成、根粒菌細胞内共生について小胞輸送によるオルガネラ形成という観点から小胞輸送の分子レベルでの解明を目的とした。まず、根粒で発現量の増加する SNARE 遺伝子を検索した。その結果、GEN06 遺伝子は根粒形成に従い根粒で発現量が増加する R-SNARE であることが明らかとなった。特に Gen06 遺伝子を抑制した毛状根形質転換ミヤコグサの作成を行った結果、毛状根形質転換ミヤコグサは根粒形成が抑制することが明らかとなった。この結果から Gen06 遺伝子は根粒形成に関与する重要な輸送小胞を担っていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物栄養学

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：SNARE, ミヤコグサ、根粒菌、共生窒素固定、形質転換毛状根

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定は、高等植物と微生物という2種の生物の相互作用によってもたらされる複雑な生物現

象である。近年、ミヤコグサなどのマメ科モデル植物の分子遺伝学的研究基盤が整備された結果、根粒菌の生産する共生シグナル物質（Nod ファクター）の受容体をはじめ、根

粒菌に対する初期応答に関わる遺伝子が相次いで単離され、宿主植物と根粒菌の特異的な相互認識と初期相互作用のメカニズムが急速に解明されつつある。根粒菌は成長中の根毛に付着して根のゴルジ体から分泌される小胞により感染糸が形成されエンドサイトーシ的に表皮細胞に進入し細胞内でバクテロイドと呼ばれる共生に特異的な形態に分化して増殖を停止して植物由来原形質膜由来のペリバクテロイド膜に包まれたシンビオゾームと呼ばれる細胞オルガネラとして安定に維持され窒素固定活性を発現する。こうした根粒菌の細胞内共生のプロセスと窒素固定活性の発現も宿主植物との厳密に特異的な相互作用によって支配されていると考えられるが、植物側にプログラムされた根粒形成の分子機構についてわかっていることは少ない。

2. 研究の目的

根粒菌は植物に感染すると植物細胞由来のオルガネラに取り囲まれ、根粒組織内で新規オルガネラ様に機能する。SNARE (Soluble NSF attachment protein receptor) は小胞輸送に関与するタンパク質として知られており、根粒菌が植物細胞内に取り込まれるときに SNARE タンパク質が関与する可能性が高い。しかしこれまでに SNARE タンパク質が根粒形成に関与するという報告は殆どない。根粒菌が植物細胞内に取り込まれるときにオルガネラ間の小胞輸送に関与する根粒特異的な SNARE 遺伝子に注目して根粒細胞内でのオルガネラ分化における機能を解明する。根粒形成に関与する特異的遺伝子の機能解析、発現調節機構をオルガネラ遺伝子発現の面から解析する。そこで共生器官成立、特に共生窒素固定に関与する分子機構をオルガネラ分化の視点から解析する。

(1) ダイズ根粒皮層、非感染細胞、感染細胞からミトコンドリア、パーオキシゾームなど植物側細胞内オルガネラを単離し、プロテオーム解析の手法で共生特異的タンパク質発現を網羅的に解析する。

(2) 根粒オルガネラプロテオームデータベースを構築し、発現タンパク情報を遺伝子情報と関連づける。そのために、ミヤコグサ大規模 cDNA アレイを用いた根粒形成過程に発現している遺伝子群の網羅的な塩基配列の決定を試みる。

(3) 根粒オルガネラ分化に関連するオルガネラ膜間の小胞輸送に関わる遺伝子を検索し、アンチセンス手法を用いて形質転換体を作成し、その機能解析を行う。

3. 研究の方法

ダイズ根粒と根からミトコンドリアタンパク質をパーコール密度勾配により分画した。その後二次元電気泳動を行い CBB 染色後ゲルからタンパク質を切り出し、ペプチドマスフィンガープリント (PMF) 法と N 末端アミノ酸シーケンスにより同定を行った。また、ダイズバクテロイドタンパク質についても同様に同定を行う。

マクロアレイの結果、ミヤコグサ根粒で発現している約 9000 クローンのシーケンスを行った。シーケンス反応は Big Dye terminator 法により反応させ ABI3100 シーケンサーを用いて解析を行った。

かずさ DNA 研究所が公開しているミヤコグサデータベースを基にミヤコグサ根粒で発現している SNARE 遺伝子をスクリーニングし、これら遺伝子の発現を調べた。

全ての遺伝子について遺伝子発現及び細胞内局在性、毛状根形質転換根作成を試みた。

4. 研究成果

(1) ダイズ根粒、根からミトコンドリアを単離してプロテオーム解析を行った。その結果根粒ミトコンドリア 465 スポット、根ミトコンドリア 383 スポットを検出しタンパク質の同定を行った。特に根粒ミトコンドリアで発現が強く増加するタンパク質としてウレイド合成に関わる phosphoserine aminotransferase やフラボノイド合成に関与する Flavanone 3-hydroxylase レグヘモグロビン合成に関与する S/R-rich ribonucleoprotein 等のタンパク質同定に成功した(表-1)。全てのデータをまとめ根粒ミトコンドリアで共生に関与する新規な代謝プロファイルを作成した。

(2) マクロアレイ解析についてはコンソーシアムを設立し、EST シークエンスが充実しているミヤコグサ根粒内の経時的発現、ミヤコグサ根粒菌のバクテロイドと free-living の発現プロファイルについて調べた。根粒菌の種類によって異なる共生に関する生理学的解析はタイ北部に生息する根粒菌を用いて研究をおこなった。ダイズプロテオーム解析を行い、データベースの充実を痛感した。同じマメ科植物ミヤコグサ根粒を用いたマイクロアレイ解析の結果、根粒で発現している EST クローン約 9000 クローンのうち 7321 クローンの 5' 末端塩基配列を決定し、シロイヌナズナのデータベースを基に機能別に分類を行った(図1)。

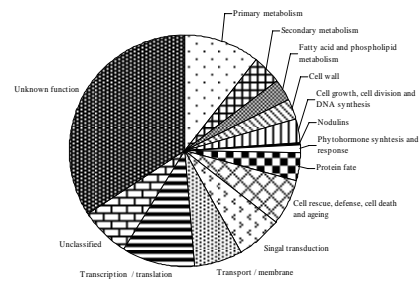


図1 5' -EST シークエンスの機能的分類

(3) ミヤコグサに存在する snare 遺伝子を EST ライブラリーから 20 個検索し、シークエンスを行った。本研究では、この遺伝子に対して全て細胞内局在性を調べた。また RNAi 法による遺伝子抑制形質転換体の作成を試みた。殆どの遺伝子は RNAi により遺伝子発現を抑制させても根粒形成の形態的变化は観察できなかったが幾つかの遺伝子に関しては、根粒着生に異常をきたしていることが明らかとなった(図2)。現段階では、根粒菌が植物細胞内へ進入しているのか定かではないが根粒細胞内での物質輸送に重要な SNARE を絞り込むことができたと思われる。

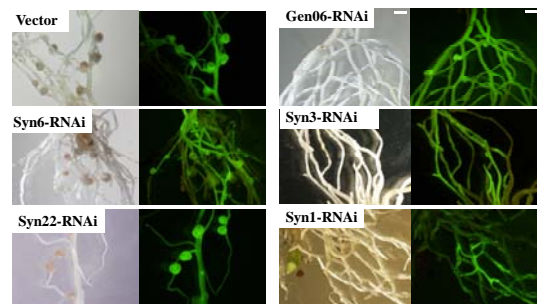


図2 毛状根形質転換法を利用して SNARE 遺伝子発現を抑制した形質転換根。緑色に蛍光している根、根粒が形質転換根を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Nomura, M., Tan, D.V., Arunothayanan, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kouchi, H. and Tajima, S. The 5'-end expressed sequence tags of *Lotus japonicus*. Plant Biotechnology. 25, 173-175. (2008) 査読有
2. Dao, T.V., Nomura, M., Hamaguchi, R., Kato, K., Itakura, M., Minamisawa, K., Sinsuwongwat, S., Le, H.T.P., Kaneko, T., Tabata, S., and Tajima, S. NAD-Malic Enzyme Affects Nitrogen Fixing Activity of *B. japonicum* USDA 110 Bacteroids in Soybean Nodules. Microbes and Environment 23, 3, 215-220. (2008) 査読有
3. Taketa, S., Amano, S., Tsujino, S., Sato, T., Saisho, D., Kakeda, K., Nomura, M., Suzuki, T., Matsumoto, T., Sato, K., Kanamori, H., Kawasaki, S. and Takeda, K. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105.4062-4067(2008) 査読有

〔学会発表〕 (計 10 件)

1. 長岡功微菜、古味光紗、真鍋友美、神吉陽輔、浅水絵里香、佐藤修正、田畑哲之、野村美加、田島茂行：ミヤコグサSNARE 遺伝子の機能解析。日本土壤肥料学会関西支部、2008.11.28、徳島
2. 野村美加、Dao Van Tan, 田島茂行、ダイズ・ミヤコグサ根粒バクテロイドプロテオーム解析から見えてくること、植物微生物研究会、2008.9.17-19、奈良
3. 真鍋友美、古味光紗、長岡功微菜、神吉陽輔、浅水絵里香、佐藤修正、田畑哲之、野村美加、田島茂行、ミヤコグサSNARE 遺伝子群の機能解析、植物微生物研究会、

2008.9.17-19、奈良

4. Hattahaya Arunothayanan, Tan Van Dao, Rie Hamaguchi, Ayaka Noda, Manabu Itakura, Kiwamu Minamisawa, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima. Nobel metalloshaperone in the assembly of cytochrome c oxidase of soybean nodule bacteroids 日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、名古屋
5. Nanthipak Thapanapongworakul, Tan Van Dao, Kimihiho Toma, Shusei Sato, Yoshikazu Shimoda, Satoshi Tabata, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima. Screening of *Mesorhizobium loti* mutants for symbiotic N₂ fixation in *Lotus japonicus* 日本土壤肥料学会、2008.9.9-13、名古屋
6. 野田朱花、DAO VAN TAN、濱口理恵、加藤賢祐、南澤究、板倉学、野村美加、田島茂行、共生窒素固定に関するダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) バクテロイドタンパク質の検索、植物微生物研究会、2007.9.19-21、鹿児島
7. Hattahaya Arunothayanan, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima, Characterization of mitochondrial proteins from soybean and *Lotus japonicus* nodules. 植物微生物研究会、2007.9.19-21、鹿児島
8. 上田知幸・藤井美帆・野村美加・田島茂行、PEPC 酵素を抑制した形質転換ミヤコグサ根粒における代謝産物の解析、日本土壤肥料学会、2007.8.22-24、東京
9. Dao Van Tan, Le Phuong Hoa, Mika Nomura, Kazuhiko Saeki, Kiwamu Minamisawa, Takakazu Kaneko,

Satoshi Tabata , Shigeyuki Tajima,
Proteome analysis of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid differentiation during soybean nodule development, 日本土壤肥料学会、
2007.8.22-24、東京

10. 古味光紗、真鍋友美、長岡功微菜、浅水絵里香、佐藤修正、田畑哲之、竹川薫、野村美加、田島茂行、ミヤコグサ根粒菌との共生に関するミヤコグサSNARE遺伝子群の検索、植物微生物研究会、
2007.8.22-24、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 美加 (野村 美加) (AGARIE MIKA
(NOMURA MIKA))

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：50294749

(2) 研究分担者

田島 茂行 (TAJIMA SHIGEYUKI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50116894