

## 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24年 6月 3日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20370020

研究課題名（和文）ミヤコグサを用いた根粒形成初期シグナリングの分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms underlying the early signaling of nodulation using *Lotus japonicus*

研究代表者

川口 正代司（KAWAGUCHI MASAYOSHI）

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・教授

研究者番号：30260508

研究成果の概要（和文）： マメ科植物の根粒は、根粒菌が分泌するNod factorによって誘導される。本研究課題では、ミヤコグサのNod factorシグナリングの構成因子であるNSP1, NSP2に着目し、HAR1を介した全身的なフィードバック制御との関連を解析した。また根粒形成と菌根形成に必要とされるヌクレオポリンSeh1を特定し、NUP85との相互作用を明らかにした。さらに、HAR1の下流に位置する根制御の新規根粒過剰着生変異体 *tml* を単離し、その原因遺伝子を特定した。

研究成果の概要（英文）： Nod factors secreted from rhizobia lead to the formation of novel organs, termed nodules. We focused on *Lotus japonicus* NSP1 and NSP2, the components of nod factor signaling pathway, and analyzed their actions in relation to HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. Then we identified a nucleoporin Seh1 required for nodulation and arbuscular mycorrhization, and elucidated its physical interaction with NUP85. Furthermore, we identified a novel regulator TML that functions in the roots downstream of HAR1.

交付決定

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物微生物相互作用・共生、シグナル伝達、ミヤコグサ、根粒形成、Nod factor

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の相互作用によって形成される共生窒素固定器官・根粒は、植物の可塑性な発生研究のモデルとして非常に興味深い器官である。その形成は、根粒菌が分泌するNod factorによって誘導される。Nod factorはキチンオリゴ糖を基本格としたリポキチンオリゴサッカライドであ

り、これを宿主であるマメ科植物が認識すると、5分ほどで、細胞内の核周辺部でカルシウムスパイク（カルシウムの周期的な振動）が発生し、根粒形成の開始を制御する *Nin* や *ENOD40* 等の遺伝子発現が誘導される。

*Nin* などの根粒形成開始遺伝子が発現すると、根粒菌は根毛のカーリングによって

取り込まれ、感染系の内部で増殖しながら宿主の細胞内に侵入していく。また平行して皮層組織で細胞分裂が誘導され根粒原基が形成される。このように **Nod factor** は、カルシウムスパイク、遺伝子発現、細胞分裂、器官分化という多くの興味深い現象を伴っている。また、根粒形成の初期過程に必須の遺伝子の多くは、陸上植物で最も普遍的かつ重要なアーバスキュラー菌根菌との共生にも必要であることが近年明らかにされている。**Nod factor** を宿主植物が受容してからのシグナル伝達系を分子レベルで解明することは、根粒形成の初期過程のみならず、アーバスキュラー菌根菌との共生のシグナリングの分子基盤を明らかにする上でも重要である。

これまでに日本に自生するマメ科の草本ミヤコグサを用いて、網羅的な突然変異体のスクリーニングから、約50系統の根粒形成変異体を単離し、遺伝解析から22遺伝子座を特定してきた。それらの共生変異体を **Nod<sup>-</sup>**、**Hist<sup>-</sup>**、**Fix<sup>-</sup>**、**Nod<sup>++</sup>** の4種類の変異体カテゴリーに分類した。**Nod<sup>-</sup>** 変異体からは、遺伝解析とマッピングにより8遺伝子座を同定し、国内外の研究者との協働により6つの原因遺伝子 (**NSP2**, **NUP85**, **CCaMK**, **Castor**, **Pollux**, **Cyclops**) について同定した。一部詳細を述べると **NUP85** はヌクレオポリン様タンパクをコードしており、**Nod factor** の受容により誘導されるカルシウムスパイクに必要な宿主因子であった。また、**NSP2** が **GRAS family** に属する転写因子様タンパクをコードしており、カルシウムスパイクの下流で機能すること、**Nin** や **ENOD40** という根粒形成開始遺伝子の発現誘導に必須であることを見いだした。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景をもとに、本研究課題ではミヤコグサの共生変異体を用いて根粒形成初期シグナリングの分子レベルでのさらなる解明を目指す。特に、根粒菌の感染依存的なフィードバック制御と **NSP1**, **NSP2** の発現制御を明確にするとともに、イオンビーム照射により単離された新規根粒非着生変異体の原因遺伝子を同定し、**Nod factor** シグナル伝達の構成因子との関連を明らかにする。さらに、**HAR1** を介した根とシュートを介した遠距離フィードバック制御機構と **Nod factor** シグナル伝達の構成因子との相互作用を分子レベルで解析することによって、根粒形成初期シグナル伝達の制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Promoter::GUS アッセイ

根粒形成の開始は組織間あるいは細胞間のコミュニケーションにより緻密に制御されていると考えられる。**NSP1** と **NSP2** の発現する組織を特定し、根粒菌の感染によってどのように発現パターンが変動するかを明らかにする。**NSP2** プロモーターは変異体の根粒非着生表現型を相補した開始コドンから 5.1-kbp の領域を用いた。**NSP2 promoter::GUS** 遺伝子は *Agrobacterium tumefaciens* を用いた胚軸形質転換法でミヤコグサに導入した。得られた形質転換体の **GUS** 活性を無処理、あるいは根粒形成過程で調べた。また、**NSP2 promoter::GUS** 形質転換ラインと **har1** 変異体を交配して、**NSP2 promoter::GUS** を **har1** 変異体に導入した。野生型と **har1 background** で発現領域が異なるかどうか調べた。

### (2) NSP2 過剰発現体の表現型解析

**NSP2** を過剰発現させた形質転換体を用いて、根粒形成過程での **NSP2** の役割、さらには他の制御因子とのタンパク質レベルの相互関係について検討した。**DsRED** を発現する根粒菌を **NSP2** 過剰発現体に接種して、感染初期過程での影響について詳細に細胞組織レベルで調べた。さらに、発現レベルが異なる形質転換ラインで根粒数と根粒形成領域を調べた。

### (3) NSP2 タンパク質の検出

**NSP2** のアミノ酸配列からペプチド抗体を作製した。野生型と **har1** 変異体の根の先端領域を集め、根粒菌接種後の **NSP2** タンパクのレベルの変動を解析した。

### (4) har1 変異体における NSP2 の過剰発現解析

根粒形成のオートレギュレーションの中で **NSP2** が果たす役割を明らかにするために、**har1 background** で **NSP2** を過剰に発現させ、**har1** と比べて根粒数が増加あるいは根粒形成領域が広がるかどうか調べた。

### (5) 新規根粒非着生変異体の原因遺伝子の同定

ミヤコグサ Miyakojima MG-20 の種子に  $C^{6+}$  ビーム照射して単離された新規根粒非着生変異体 **vena (1978)** と **daphne** さらには根粒過剰着生変異体 **too much love (tml)** の原因遺伝子を同定するために、**Gifu B-129** を交配し、ポジショナルクローニングを行った。その結果同定された候補遺伝子については、*Agrobacterium* による相補実験を行った。さらに、原因遺伝子の発現、タンパク質の局在解析等を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Nod factor シグナル伝達系の構成因子 *NSP2* の感染依存的な発現抑制

ミヤコグサより単離した根粒形成の開始に必要とされる GRAS ファミリーの転写因子 *NSP2* のプロモーターに *GUS* 遺伝子を連結させたコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介した stable 形質転換法でミヤコグサに導入した。その後、ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* に対する応答を解析した。その結果、野生型では *NSP2* は根で構成的に発現しているものの、感染後 7 日目の根粒形成能の高い根の先端領域で *GUS* の発現の低下が観察された。またリアルタイム PCR により根の先端部位での *NPS1*, *NSP2* 等の遺伝子の発現解析を行った結果、感染後 1 日で *NSP2* の発現が抑制されることが分かった。一方、*NPS1* ではそのような発現変動は観察されなかった。このことから *NSP2* は他の Nod factor シグナル伝達系の構成因子と異なり、感染依存的な根粒形成能と根粒菌の受容能の低下を引き起こしていることが示唆された。

次に *NSP2* タンパクのペプチド抗体を作成し、根の先端領域で根粒菌感染後のタンパク質量の変動を解析した。ウエスタンブロット解析の結果、強い非特異的バンドが *NSP2* タンパクの近くに出現したため、検出条件の検討に手間取ったが、最終的に *NSP2* タンパクを再現よく検出することができた。根粒菌を感染させると、野生型の根の先端領域において、*NSP2* タンパク量の減少が観察された。しかし根とシュート間の遠距離シグナル伝達が破綻した *har1* 変異体では、タンパク量の減少は観察されなかった。このことから、シュートで働く *HAR1* レセプター様キナーゼは遠距離シグナル伝達を介して根の先端領域における *NSP2* タンパクの分解等に関わっていることが示唆された。

根粒菌の感染を受けてから根の先端領域でフィードバック制御が生じる現象は 1980 年に Bauer らによって報告されたが、その後 30 年以上その分子機構は明らかにされていない。今回の知見は、*NSP2* が根粒菌感染のフィードバック制御のターゲットとなっていることを示唆するものであり、極めて興味深い。

##### (2) 根粒形成と菌根形成の初期過程が破綻したミヤコグサ変異体 *nen* (1978) の原因遺伝子の同定

Nod factor シグナル伝達系に位置し、根粒形成とアーバスキュラー菌根形成の初期過程が破綻したミヤコグサ 1978 変異体 *nen* についてポジショナルクローニングで候補遺伝子を特定した。さらに相補実験によってそ

れが原因遺伝子であることを確認した。*NENA* の原因遺伝子は、細胞核の核孔を形成するヌクレオポリンの一種をコードしており、酵母や動物の *SEH1* と相同性が検出された。実際 GFP を用いて *NENA* の細胞内局在を調べてみると、核膜に観察された。また興味深いことに、原形質連絡と思われる部位にもスポット上に GFP 蛍光が確認された。酵母や動物では *SEH1* は *NUP85* と相互作用することが知られている。酵母ツーハイブリッドシステムで解析したところ、*NENA* は以前我々がミヤコグサより特定したヌクレオポリン *NUP85* と相互作用することが示された。

##### (3) Nod ファクターシグナル伝達系が破綻した新規根粒非着生変異体 *daphne* の表現型解析と原因遺伝子の特定

ミヤコグサにイオンビーム照射を行い根粒形成が全くみられない新規共生変異体 *daphne* を単離した。*daphne* は、根粒菌が感染しても根に細胞分裂が誘導されず根粒原基がまったく形成されない変異体だが、根粒菌が細胞内共生する上で必要とされる感染系形成が過剰に形成されるという大変興味深い表現型を示した。マップベースクローニングの結果、*daphne* の根粒非着生の表現型はゲノム上の二ヶ所と連鎖しており、さらに inverse PCR 法により、既知共生遺伝子 *NIN* の約 7kb 上流での染色体間の相互転座が生じていることを見出した。既に報告のある *nin* との交配によるアレリズムテストの結果、*daphne* は新規の *nin* アレルであることが判明した。*nin* の根粒非着生の表現型は *daphne* と同様であるが、感染系を全く形成しない点で *daphne* とは正反対の表現型である。これまで、「感染」と「器官発生」の二つの現象を司る分子メカニズムを互いに分離して解析することは実験的に困難であったが、*daphne* はそれを可能にするはじめての変異体になりうることが示唆された。

##### (4) 根粒形成を根で負に制御する新規因子 TOO MUCH LOVE (TML) の特定

根粒菌が分泌する Nod factor は根粒形成を誘導するという正の制御因子として機能するだけでなく、*HAR1* を介した負の遠距離制御系を活性化することによって根粒形成を抑制する。Nod factor は *NSP2* 等を介して根粒抑制活性のある *CLE-RS1/2* 遺伝子を根で顕著に誘導する。*TML* を介したフィードバック制御機構と *CLE-RS1/2* の関連を明らかにするために、*tml* 根粒過剰着生変異体において *CLE-RS1/2* を過剰発現させた。その結果、根粒形成の抑制は全く観察されなかった。このことから *TML* は *CLE-RS1/2* 遺伝子によるフィ

ードバック制御に必須であることが示された。次に *TML* の候補遺伝子を野生型に導入し過剰発現したところ、根粒形成は抑制されず逆に顕著に増加した。同様な表現型は候補遺伝子の RNAi によっても観察された。遺伝子の過剰発現や抑制により顕著に根粒数が増加するという報告例は過去になく、世界初の発見となった。

以上、本研究課題を通じて、Nod factor シグナル伝達の分子レベルの解明が大きく進んだ。Nod factor は根粒形成の誘導のみならず、CLE-RS1/2 ペプチドや HAR1、TML を介した遠距離フィードバック制御にも関わっている。本研究では、Nod factor の根粒形成の正と負の制御に関わる分子機構の解明に貢献することができたと思われる。

#### 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Groth, M., Takeda, N., (他 8 名, 8 番目). *NENA*, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscularmycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22: 2509-26 (2010) 査読あり

② Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., Kawaguchi, M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol.* 51: 1381-97 (2010) 査読あり

③ Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S. and Kawaguchi, M. Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50: 67-77 (2009) 査読あり

④Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., (他 7 名, 10 番目) *TOO MUCH LOVE*, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 259-268 (2009) 査読あり

⑤Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., (他 16 名, 16 番目) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intercellular accommodation.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 20540-5 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

①武田直也、Martin Parniske、川口正代司 : Re-evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Phenotypes in Root Nodule Symbiosis Mutants Reveals a Novel Common Symbiosis Factor in *Lotus japonicus*. 日本植物生理学会 第 53 回年会 2012 年 3 月 16 日-18 日京都産業大学 (京都府)

②養老瑛美子、寿崎拓哉、川口正代司 : ミヤコグサ新規根粒非着生変異体 *daphne* の解析. 日本植物生理学会 第 53 回年会 2012 年 3 月 16 日-18 日京都産業大学 (京都府)

③養老瑛美子、寿崎拓哉、川口正代司 : 新奇根粒非着生変異体 *daphne* の表現型解析. 日本植物学会 第 75 回大会 2011 年 9 月 17 日-19 日東京大学教養学部 (東京都)

④馬郡慎平、吉良 (岡) 恵利佳、柴田哲、梅原洋佐、河内宏、佐藤修正、田畑哲之、川口正代司 : **TOO MUCH LOVE**: 根粒形成の遠距離シグナリングに関わる根の制御因子. 日本植物学会 第 73 回大会 2009 年 9 月 17 日-20 日 山形大学 (山形県)

⑤村上泰弘、富澤紗織、福井理恵、東久仁子、葉山真歩子、高橋宏和、中園幹生、川口正代司 : 根粒形成の開始に必要なミヤコグサ推定転写因子 NSP1, NSP2 の発現変動とフィードバック制御との関連. 日本植物学会 第 73 回大会 2009 年 9 月 17-20 日 山形大学 (山形県)

⑥ Masayoshi Kawaguchi : Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. International Congress on Nitrogen fixation June 14-19 2009 Montana, USA.

⑦村上泰弘、富澤紗織、福井理恵、川口正代司 : ミヤコグサ GRAS タンパク *LjNSP2* の過剰発現による根粒形成パターンの異常. 日本植物学会 第 72 回大会 2008 年 9 月 25-27 日高知大学 (高知県)

⑧ Masayoshi Kawaguchi : Systemic regulation of nodulation via long-distance signaling. 33<sup>rd</sup> FEBS Congress, 11<sup>th</sup> IUBMB Conference June 28-July 3 2008 Athens, Greece.

[図書] (計 4 件)

① Magori S, Tanaka A and Kawaguchi M. **Wiley-Blackwell-VCH.** Physically- induced mutation: ion beam mutagenesis. In The Handbook of Plant Mutation Screening, (2010) 3-16.

② 川口正代司 : **化学同人**、ミヤコグサで根粒菌や菌根菌との共生とその進化を知る 研究を支えるモデル生物 (2009) 162-164.

③ 川口正代司 : **化学同人**、植物生理学 微生物との共生 (2009) 192-203.

④ 齋藤勝暗・川口正代司: 総合出版社文一総合出版社、"アーバスキュラー菌根共生系から根粒共生系への進化" (2008) 237-263.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/miyakohp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 正代司 (KAWAGUCHI MASAYOSHI)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・教授

研究者番号 : 30260508