

## 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1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580079

研究課題名（和文） ポストゲノム技術を利用した根粒菌有用共生遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） Post genome and functional analysis of beneficial Rhizobium genes for maintaining symbiotic nitrogen fixation of nodules

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

研究成果の概要（和文）：

ダイズ根粒菌、ミヤコグサ根粒菌について感染初期から老化時までの遺伝子発現パターンをプロテオミクス手法により調べ、共生特異的な遺伝子を同定した。ミヤコグサ根粒ミトコンドリアに関しては198個、ダイズ根粒ミトコンドリアに関しては272個のタンパクを同定した。この成果により根粒細胞及びバクテロイドで代謝系成立、維持、崩壊時に特異的に発現増幅する遺伝子群を統括的にまとめ、ポストゲノム手法で機能解析を行った結果、新規な窒素固定に関与する遺伝子群を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Using 2D-electrophoresis proteomics, 278 proteins in *B. japonicum* and 359 in *Mesorhizobium loti* were identified. In *Glycine max* mitochondria 272 proteins and in *Lotus japonicas* mitochondria 198 proteins were identified. The database of these protein expressions was constructed concerning to nodule development. The functional analysis of these genes revealed proteins which have key role for maintaining nitrogen fixation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：

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、プロテオミクス、共生特異的遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌が関与する共生窒素固定は、古くから農業生産上重要な系であった。最近、化学肥料コストの高止まり、肥

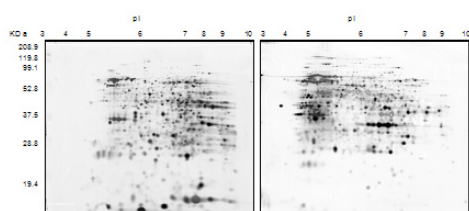
料資源枯渇、気候変動など農業技術再構築を迫る深刻な状況が、広がっている。このような21世紀に要求される環境配慮型低投入技術構築に向けて共生系生物機能の効率的利用

は非常に重要な課題である。一方、かずさDNA研究所の努力等による根粒菌ゲノム解析の急速な進行、マメ科モデル植物であるミヤコグサゲノム塩基配列解析完了によるゲノムデータ公開、ナショナルゲノムリソースプロジェクトによる各種クローンの提供、重要作物であるダイズにおいても遺伝子組み換え技術の進歩、QTL解析の進展、ゲノムシーケンス解析の急速な進展など日本におけるマメ科植物ゲノム情報利用の便宜性は世界最先端の水準にある。日本において既にイネがGM作物の具体的候補として超多収、安定生産を目標として集中的に研究されているが、ダイズなどマメ科作物でも共生系機能や収量要素のポストゲノム技術を利用した集中的解析を行い、マメ科作物の安定的増産、高度利用にむけた目標を追求すべきであると考えられた。

共生系の解析は、上記の条件の中で急速な進歩を遂げた。宿主植物と根粒菌の特異的な相互認識と初期根粒組織形成のメカニズムは、根粒菌の生産する共生シグナル物質 (Nod因子) の受容体をはじめ、根粒形成プログラム応答に関わる遺伝子が相次いでMap-baseクローニングされ、機能解析された。

このように根粒組織形成に関与する植物側シグナル伝達機構が急速に解明されつつあり、更に複雑な系である根粒バクテロイド分化機構、マメ科植物と根粒機能 (窒素固定活性の発現、維持、利用) の発現調節に係わる分子機構についてもポストゲノムレベルの解析が始まっている。

この機構は植物体自身のC/N栄養や組織分化シグナルと根粒菌側からのシグナルが関与する相互応答機構として、複雑に制御されていると考えられ、ポストゲノム技術が有効で



ある。  
(左; 培養根粒菌と右; 根粒バクテロイドの2次元電気泳動図)

申請者はダイズ根粒菌がバクテロイドに分化する過程で発現変動するタンパク群のプロテオーム解析による同定を既に報告している (Hoa et al. 2004)。この根粒菌のバクテロイド化に関連がある可能性があると同定された100以上のタンパク群の中に根粒機能形成・維持に関与するタンパクがあると考え、系統的な遺伝子機能解析を行ってき

た。既にこのアプローチの成果として根粒窒素固定活性へのNAD-malic enzymeの特異的関与を報告した (Tan et al. 2008)。

同様の解析はモデルマメ科植物であるミヤコグサの根粒菌についても我々の研究室でほぼ完了しており、同じようにバクテロイド分化後のタンパクプロファイルは培養時と全く異なっている。このプロファイルは根粒菌を低栄養条件、微好気条件で培養したときのプロファイルともかなり異なっており、植物側からの特異的コントロールが想定される。

## 2. 研究の目的

本研究では網羅的プロテオーム解析で得た宿主植物・根粒菌相互応答の結果としての根粒菌共生時変動遺伝子の機能解析を行い、共生系に特有な代謝調節機構を明らかにする事を目的としているが、このアプローチの成果は国際的会議でも高く評価されている。

本研究においては、共生窒素固定を支えるバクテロイド内代謝系の各種根粒菌にまたがる普遍的な部分や宿主植物との物質交換に依存する部分、宿主植物C/Nシグナル系に依存する部分などを識別しながら解析し遺伝子組み換えの対象になる有用共生遺伝子の検索と機能解析を行いたい。更に細胞内共生という複雑な根粒機能においてもポストゲノム技術を駆使して解析する事によって、植物細胞、根粒バクテロイド代謝機能統合の実態を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズ及びミヤコグサ根粒菌遺伝子変異体を用いた網羅的解析

① 当研究室でプロテオーム解析されたダイズ及びミヤコグサ根粒菌においてバクテロイド分化、または根粒発達過程に伴い発現誘導される遺伝子の変異体を系統的に作成する。ポストゲノム解析用に準備された2ハイブリッドデータ、STMミュータントラインも利用する。  
② 変異体をダイズもしくはミヤコグサに感染させ、無窒素培地条件で一般的生育、根粒形成、共生窒素固定機能に表現型を示すかどうかを調べた。

③ 表現型に差が出た変異体について、詳細な解析を行う。根粒形成速度、窒素固定活性、老化速度、根粒内代謝産物濃度、各種酵素活性を明らかにし、以下の述べる分子論的解析を行う。本実験は21, 22, 23年度と継続した。

(2) ダイズ及びミヤコグサ根粒菌に於けるNAD-malic enzymeの生理機能解析

①ダイズ、ミヤコグサ根粒菌において NAD-malic enzyme 及び NADP-malic enzyme の単一及びダブル欠損株を作成する。欠損株作成には STM ミュータント及び  $\Omega$  カセットを利用する。酵素活性測定、Western blot により欠損株が出来ていることを確認する。

②各欠損株を宿主植物に接種し表現型を解析する。

③更に呼吸代謝系の変化を確認するため、根粒バクテロイドを単離し $^{14}\text{C}$ -リンゴ酸の代謝経路を解析する。根粒内での代謝物、特に各種有機酸、糖の含量を分析した。

### (3) ダイズ根粒菌 4880 遺伝子の生理的機能解析

本遺伝子はゲノムデータベースで機能未知とされているが、アミノ酸配列から推定すると cytochrome (Cox1) へ金属を渡すシャペロン遺伝子である可能性が高いと考えている。ニトロゲナーゼ反応系へ電子を送るチトクローム系タンパクは各種知られているが、詳細は未知のままである。4880 タンパクは Cox17 と類似のシャペロンの可能性が高い。そこで以下の実験を行う。

①ダイズ根粒菌における *Cox11*, *Cox17*, *ScoI* の遺伝子変異体を作成して根粒窒素固定活性測定、Complement 実験を行う。

②4880 遺伝子と同じオペロンにある遺伝子群についても欠損株を作成し機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内共生である根粒組織形成については、変異体を利用したマップベースクローニングにより共通シグナル伝達経路に関与する遺伝子が次々に明らかになってきた。しかし共通シグナル伝達経路の後の細胞内共生や窒素固定の発現のための因子については Fix-変異株をもちいた解析が行われているものの、知見は極めて少ない。特に宿主マメ科植物と根粒菌が共に分化して複雑な代謝機能を発現して形成する細胞間代謝ネットワークの実体解明までには至っていない。

本研究課題では、ダイズ、ミヤコグサ根粒バクテロイドおよび根粒細胞（特にミトコンドリアなどの根粒内オルガネラ）のプロテオミクス解析を行った。その結果、ダイズ根粒菌に関しては、278 個のタンパク質について感染初期から老化時までの発現パターンを調べることができた。ミヤコグサ根粒菌に関しては、Free living 根粒菌とバクテロイドタンパク質 359 個のタンパク質を同定した。ミ

ヤコグサ根粒ミトコンドリアに関しては 198 個、ダイズ根粒ミトコンドリアに関しては 272 個同定を行った。この成果により根粒細胞及びバクテロイドで代謝系成立、維持、崩壊時に特異的に発現増幅する遺伝子群を統括的にまとめた。さらに共生窒素固定活性に発現量が増減する遺伝子群、特に代謝遺伝子群について変異株を作成後共生窒素固定能を測定した。その結果ダイズ根粒菌変異株を用いた結果から共生に必要な金属シャペロンを見だし、ミヤコグサ根粒菌 STM 変異株を用いた結果から分岐アミノ酸は植物側からバクテロイドへ提供され、Ser, Gly のアミノ酸はバクテロイド内の発現によってのみ依存しており、植物側から提供されることはないこと、NAD-マリックエンザイムは共生時に必要であり、老化時には重要ではないことを明らかにした。

(2) プロテオーム解析の結果、ダイズ根粒菌バクテロイド分化により発現量が増加するタンパク質を選択し、変異体或いは二重変異体を作製した。根粒菌変異体は、 $\Omega$  カセット、トランスポゾン挿入変異体作成技術を利用して共生窒素固定に関与する遺伝子群を検索した。その結果、Hypothetical protein である b114880 タンパク質が欠損した菌株をダイズに感染させた場合に窒素欠乏の症状が現れた。このタンパク質はシトクローム C への銅を輸送するシャペロンタンパク質に存在する領域 (HX<sub>10</sub>MX<sub>22</sub>HXM) を保存しており、STRING データにより b114880 と相互に発現するタンパク質を調べた結果、ScoI ホモログタンパク質である b1r1131 が見いだされた。これを証明するために b114880, b1r1131 二重変異株を作成しダイズに感染させると B114880 単一変異株よりさらに顕著な窒素欠乏を示した。また、二重変異株のシトクローム C 活性はバクテロイド状態での活性が野生株の活性の 10% 以下に低下することから、b114880 タンパク質はバクテロイド誘導型シトクローム C に特異的に銅を輸送するための金属シャペロンであると考えられる。バクテロイド誘導型シトクローム c オキシダーゼ遺伝子は FixNMOP 以外に新規な heme-copper シトクローム c が存在する。しかし新規なシトクローム c オキシダーゼ遺伝子は FixNOPQ 遺伝子ほどバクテロイドでの発現は強くない。また、Cox11 ホモログの遺伝子 b1r1174 遺伝子はバクテロイドでの発現が低下する。以上の結果、バクテロイド条件下では、b114480 銅金属シャペロンが誘導した後、b1r1131 を介してシトクローム c オキシダーゼへ銅を受け渡していると結論づけた。

### (3) 根粒菌内代謝遺伝子

根粒菌はマメ科植物と共生するとバクテロイドへと分化し、その応答は形態的にもタンパク質レベルでも変化する。本研究室ではこれまでにミヤコグサ根粒菌のバクテロイド分化におけるタンパク質応答についてプロテオーム解析により網羅的に調べてきた。その結果、主要なタンパク質以外に機能未知タンパク質がバクテロイド分化により増加することを明らかにしてきた。本年度は、その一つであるABCトランスポーターアミノ酸結合タンパク質を欠損させた根粒菌変異株 (STM42) をミヤコグサに感染させると、窒素固定能が減少することを明らかにした。この遺伝子はインゲン根粒菌 aapJ と高い相同性を示すもののバクテロイドを抽出後、遊離アミノ酸量を定量した結果、Lys, Arg, His, Ornといったカチオン性アミノ酸量が野生株バクテロイドより減少していることが明らかとなった。この結果からインゲン根粒菌では、Glu, Aspの輸送として知られているトランスポーターと相同性が高いミヤコグサ根粒菌アミノ酸トランスポーターは、共生により積極的にカチオン性アミノ酸をバクテロイド内へ流入を行っていることを示している。さらに、グルタミン合成酵素欠損変異株 STM30根粒菌をミヤコグサに感染させると老化根粒の増加が観察された。STM30感染根粒のCN比を測定すると野生株を感染させたときと比較してCN比が高くなることを明らかにした。

### 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8件)

① Takeshi Fukumoto, Akihito Kano, Kouhei Ohtani, Yumiko Yamasaki-Kokudo, Bong-Gyu Kim, Kouji Hosotani, Miu Saito, Chikage Shirakawa, Shigeyuki Tajima, Ken Izumori<sup>1</sup>, Toshiaki Ohara, Yoshio Shigematsu, Keiji Tanaka, Yutaka Ishida, Yoko Nishizawa, Yasuomi Tada, Kazuya Ichimura, Kenji Gomi and Kazuya Akimitsu, Rare sugar D-allose suppresses gibberellin signaling through hexokinase-dependent pathway in *Oryza sativa* L., **Planta**, 査読有り, 2011, 234: 1083-1095

② Min Wei, Keisuke Takeshima, Tadashi Yokoyama, Kiwamu Minamisawa, Hisayuki, Mitsui, Manabu Itakura, Takakazu Kaneko,

Satoshi Tabata, Kazuhiko Saeki, Hirofumi Omori, Shigeyuki Tajima, Toshiki Uchiumi, Mikiko Abe, Satoshi Ishii, and Takuji Ohwada, Temperature-Dependent Expression of Type III Secretion System Genes and Its Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*, **MPMI**, 査読有り, 2010, 23: 628-637

③ Isamu Kameshita, Sachiko Shimomura, Kazushi Nishio, Noriyuki Sueyoshi, Tetsuyuki Nishida, Mika Nomura, and Shigeyuki Tajima, Expression and characterization of PKL01, an Ndr kinase homolog in *Lotus japonicas*, **Journal of Biochemistry**, 査読有り, 2010, 147: 799-807

④ Mika Nomura, Hattaya Arunothayanan, Tan Van Dao, Hoa Thi-Phuong Le, Takakazu Kaneko, Syusei Sato, Satoshi Tabata and Shigeyuki Tajima, Differential protein profiles of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid in soybean nodule development, **Soil Sci. Plant Nutrition**, 査読有り, 2010, 56:579-590

⑤ Nanthipak Thapanapongworakul, Mika Nomura, Yoshikazu Shimoda, Shusei Sato, Satoshi Tabata and Shigeyuki Tajima, NAD-malic enzyme, not NADP-malic enzyme, affects nitrogenase activity of *Mesorhizobium loti* bacteroids in root nodules, **Plant Biotech**, 査読有り, 2010, 27, 311-316

⑥ Hattaya Arunothayanan, Mika Nomura, Rie Hamaguchi, Manabu Itakura, Kiwamu Minamisawa and Shigeyuki Tajima, Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome *c* oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules, **Plant Cell Physiol.**, 査読有り, 2010, 51: 1-5

⑦ Nanthipak Thapanapongworakul, Mika Nomura, Van Dao Tan, Yoshikazu Shimoda, Syusei Sato, Satoshi Tabata and Shigeyuki Tajima, 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Mesorhizobium loti* is essential for maintaining symbiotic nitrogen fixation of *Lotus japonicus* root nodules, **Plant and Soil**, 査読有り, 2010, 336: 233-240

⑧ Tsuneo Hakoyama, Kaori Niimi, Hirokazu Watanabe, Ryohei Tabata, Junichi Matsubara, Shusei Sato, Yasukazu Nakamura, Satoshi Tabata, Li Jichun, Tsuyoshi

Matsumoto, Kazuyuki Tatsumi, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima, Masumi Ishizaka, Koji Yano, Haruko Imaizumi-Anraku, Masayoshi Kawaguchi, Hiroshi Kouchi & Norio Suganuma, Host plant genome overcomes a lack of bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation, **Nature**, 査読有り, 2009, 462, 514-517

〔学会発表〕(計3件)

①Shigeyuki Tajima, Mika Nomura, Nanthipak Thapanapongworakul, Ayao Enoki and Hiroyuki Matsuura, FUNCTIONAL ANALYSIS OF AMINO ACID METABOLISM MUTANTS OF MESORHIZOBIUM LOTI, 第17回国際窒素固定会議、2011年11月27～12月2日、オーストラリア

②松浦寛幸, 榎彩緒, Nantipak Thapanapongworakul, 佐藤修正, 下田宜司, 野村美加, 田島茂行, ミヤコグサ根粒菌の共生窒素固定に関わるアミノ酸代謝の解析、植物微生物研究会、2011年9月20日～9月22日、岡山大学

③野村美加, 松浦寛幸, 榎彩緒, 田島茂行, ミヤコグサ根粒菌変異体を用いた共生窒素固定の解析、2011年8月8日～8月10日、つくば国際会議場

④

〔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：  
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

### (2) 連携研究者

( )

研究者番号：