

## 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 25 年 4 月 5 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22580067

研究課題名（和文）SNARE 受容体を介した高機能窒素固定作物の作出

研究課題名（英文）Production with high quality nitrogen fixing legume plants by SNARE

研究代表者

東江（野村）美加（AGARIE (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（和文）：

本研究では根粒菌がマメ科植物細胞内に侵入する時や、共生における小胞を介した物質輸送に着目している。申請者は既に輸送小胞あるいは、標的オルガネラに結合している数十種類の SNARE と呼ばれるタンパク質群の中で根粒菌を取り込むのに重要な SNARE を 3 種見いだしている。この SNARE について突然変異体を用いた詳細な解析を行い、最終的には SNARE 遺伝子を高発現させ、共生微生物を利用した高機能窒素固定付与作物の作出を目的とした。

研究期間内に、ミヤコグサ SNARE 遺伝子の中から共生に関わる候補遺伝子を探し、それぞれの遺伝子群の局在性、RNA、タンパク質発現解析、を行った。本研究期間内に 3 つの候補遺伝子に着目しその遺伝子を RNAi 法により発現抑制させた形質転換体を作成した。得られて形質転換体を用いて表現型解析の他に根粒菌感染検定を行った。最終年度にはマメ科植物で過剰発現体の作出を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Exocytosis and endocytosis are fundamental in plant development, homeostasis and interaction with the environment. These are highly dynamic processes that, even in otherwise static plant tissue, engage a rapid turnover of large areas of membrane surface. SNAREs (soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptors) proteins drive membrane and protein targeting and delivery in eukaryotic cells. Since higher plants have complicated and multiple membrane traffic systems, the membrane fusion system would be important for plant development and signal transduction.

We have screening SNARE genes which interact with nodule development. The suppression of Syn1, Syn37, Gen06 genes by the RNAi could form nodule but the most of the nodules were white in the hairy root nodule. When we infected LacZ-labeled *M. loti*, blue stained *M. loti* could be seen at the nodule. GFP fused Syn1, Syn37, Gen06 proteins revealed that these proteins were located on the plasma membrane or endosome in the *Arabidopsis* cultured cell. These data suggest that Syn1, Syn37, Gen06 SNARE play a vital role in the turnover of integral membrane proteins in signaling and (or) nutrition in the nodule.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
H23 年度	900,000	270,000	1,170,000
H24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物栄養学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：ミヤコグサ、SNARE、根粒菌、共生

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は 2001 年からミヤコグサなどのマメ科モデル植物の「植物・微生物間共生におけるゲノム相互作用」プロジェクトチームに加わり、分子遺伝学的研究基盤を世界に先駆け整備させてきた。その結果、ミヤコグサの共生研究は日本が世界をリードしてこれまでも数多くの成果を発表してきた。2009 年には申請者も窒素固定酵素であるニトロゲナーゼ酵素必須のホモクエン酸は植物から輸送されることを明らかにしている。近年、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についても急速に解明されつつあり、イネにも根粒形成に必要な初期シグナル遺伝子は存在することが明らかになっている。

### 2. 研究の目的

本研究では根粒菌がマメ科植物細胞内に侵入する時や、共生における小胞を介した物質輸送に着目している。申請者は既に輸送小胞あるいは、標的オルガネラに結合している数十種類の SNARE と呼ばれるタンパク質群の中で根粒菌を取り込むのに重要な SNARE を 3 種見いだしている。この SNARE について突然変異体を用いた詳細な解析を行い、最終的に

は SNARE 遺伝子を高発現させ、ダイズ、非マメ科作物に導入し共生微生物を利用した高機能窒素固定付与作物の作出を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Gen06, Syn3, Syn1 SNARE 遺伝子による小胞輸送と根粒形成の役割

Gen06, Syn1, Syn3 遺伝子の根粒内発現解析、細胞内局在解析を行う。

(1)-1 5' 非翻訳領域約 2kb をプロモーター領域として GUS 遺伝子と融合したコンストラクトを作製後ミヤコグサに導入して GUS 染色、GUS 活性の測定を行う。

(1)-2 Syn1, Syn37, Gen06 遺伝子発現を抑制させた形質転換毛状根を作成し DsRed 根粒菌を感染させ、根粒菌感染検定を行う。

(1)-3 シロイヌナズナ培養細胞を用いて Gen06, Syn1, Syn3 遺伝子の細胞内局在性を決定する。

#### (2) マメ科植物及び非マメ科作物へ SNARE 遺伝子導入による過剰発現体作出

マメ科植物の GEN06 遺伝子過剰発現体の作出を行い、共生微生物を過剰に取り込む根粒の作出を試みる。

#### 4. 研究成果

(1)-1 Gen06, Syn1, Syn3 遺伝子の根粒内発現解析、細胞内局在解析を行った。

5' 非翻訳領域約 2kb をプロモーター領域として GUS 遺伝子と融合したコンストラクトを作製後ミヤコグサに導入して GUS 染色、GUS 活性の測定を行った。

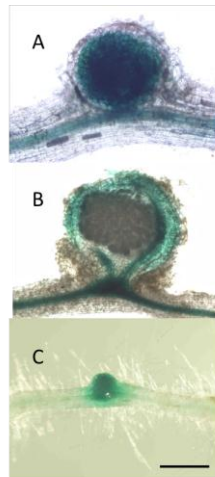


図1 Syn1 (A), Syn37 (B), Gen06 (C)プロモーター::GUSコンストラクトの根粒内発現

その結果、Syn1 は根毛、根粒原基での発現が認められ根粒形成時に関与していることが明らかとなった。一方、Syn3 の発現は殆ど認められず、根粒形成時には殆ど関与していないと示唆された。Syn37 プロモーター::GUS は維管束、また、Gen06 遺伝子プロモーター::GUS は根粒内での局在を確認した (図1)。

(1)-2 Syn1, Syn37, Gen06 遺伝子に着目し RNAi 毛状根形質転換根の解析を行った。また DsRed 根粒菌を感染させることで根粒菌感染検定を行った。

Syn1 遺伝子を発現抑制させると根粒は殆ど形成されず、感染糸が非常に多く形成されることが明らかとなった。Syn37 遺伝子発現を抑制させても根粒は形成し根粒菌も細胞内に侵入できることが明らかとなった。しかし根粒は白い根粒が多く共生窒素固定の欠損が確認できた。

Gen06 遺伝子は根粒のみならず根毛の発現も抑制し、それに伴って根粒数が減少していることが明らかとなった。また、形成された根粒数は少ないものの根粒菌の侵入が認められた (図2)。

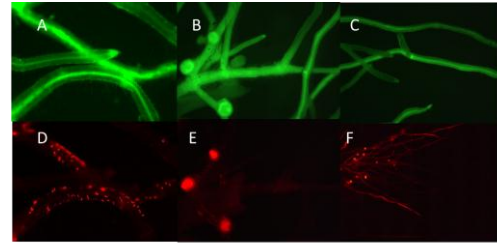


図2 Syn1(A,D), Syn37(B,E), Gen06(C,F)遺伝子を発現抑制させた毛状根形質転換根の表現型 (A,B,C); GFP遺伝子を導入することで遺伝子導入した事を示す (D,E,F); 形質転換毛状根にDsRed根粒菌を感染させた

(1)-3 ナズナ培養細胞を用いた Syn1, Syn37, Gen06 遺伝子の細胞内局在性

GFP 遺伝子の下流に Syn1, Syn37, Gen06 cDNA 遺伝子を融合しナズナ培養細胞に導入した。その結果、Syn1, Syn37 は原形質膜に局在すること、Gen06 は原形質膜或いは初期エンドゾームに局在することが明らかとなった (図3)。

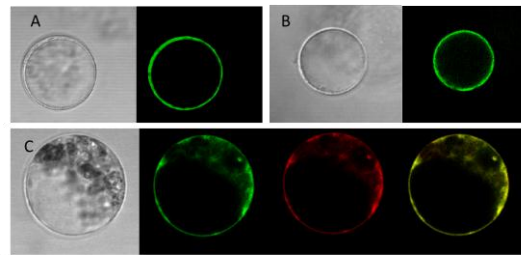


図3 ナズナ培養細胞を用いたSyn1, Syn37, Gen06遺伝子の細胞内局在性 (A) Syn1-GFP、(B) Syn37-GFP、(C) Gen06-GFPコンストラクトをナズナ培養細胞に導入した。RFP-Atsy722を同時に導入(赤)しマージした(黄)

以上の結果、Syn1 遺伝子は根粒初期シグナルから関与し、Gen06 遺伝子は根毛と後期根粒形成に関与していることが明らかとなった。その結果、Gen61 遺伝子が根毛、根粒で発現しており根粒形成、特に感染後の共生時に重要であると推測した。Syn37 は共生窒素固定に関与している事が明らかとなった。一方、オルガネラ膜上の SNARE は数多く存在するが、これまでにシンビオゾーム膜で発現している Syn1, 共生窒素固定が活発な感染細胞、或いは非感染細胞で発現している Syn37 を確認した。Syn1 遺伝子発現を抑制させた Syn1-RNAi の結果、根粒原基は形成されるものの根粒菌の侵入

が確認できなかった。また、プロモーター解析、GFP 融合タンパク質の解析結果から、Syn1 はシンビオゾーム膜に局在する SNARE と推測した。

一方、Syn37 は、根粒細胞内で強い発現を示した。RNAi による発現抑制変異体では根粒数は変わらず、根粒菌の感染も確認できたが、Fix<sup>-</sup> 表現型を示した。以上の結果いくつかの SNARE が根粒形成の小胞輸送に関わることが明らかになってきた。

## (2) ダイズ、非マメ科植物への SNARE タンパク質過剰発現体の作出

計画ではダイズに導入する予定であったが形質転換体の作出に時間を要することからまず、ダイズではなくモデル植物であるミヤコグサに導入した。

Gen06 遺伝子のミヤコグサで過剰発現体の試みを行った。その結果 Gen06 過剰発現対は若干根粒が大きいことが明らかとなった。今回は毛状根形質転換根の作成であったため今後は全身形質転換体の試みが必要である。さらに今回は Gen06 のみ観察できた。今後はその他の共生に関わる遺伝子の導入も行う必要がある。

## 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 6 件)

1. Arunothayanan, H., \*Nomura, M., Hamaguchi, R., Itakura, M., Minamisawa, K. and Tajima, S. (2010) Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome *c* oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules. **Plant and Cell Physiol.** 査読有 51, 7, 1242-1246, \*corresponding author, doi: 10.1093/pcp/pcq079
2. \*Nomura, M., Arunothayanan, H., Dao, T.V., Le, H. T-P., Kaneko, T., Sato, S., Tabata, S. and Tajima, S. (2010) Differential protein profiles of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid during soybean nodule development. **Soil Science and Plant Nutr.**

査読有 56, 579-590. \*corresponding author, DOI: 10.1111/j.1747-0765.2010.00500.x

3. Thapanapongworakul, N., \*Nomura, M., Dao, T.V., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S. and Tajima, S. (2010) 3-Phosphoglycerate dehydrogenase in *Mesorhizobium loti* is essential for maintaining symbiotic nitrogen fixation of *Lotus japonicus* root nodules. **Plant and Soil**, 査読有 336, 233-240.

\*corresponding author, DOI

10.1007/s11104-010-0471-6

4. Thapanapongworakul, N., \*Nomura, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S. and Tajima, S. (2010) NAD<sup>+</sup>-malic enzyme affects nitrogenase activity of *Mesorhizobium loti* bacteroids in *Lotus japonicus* nodules. **Plant Biotech.** 査読有 27, 311-316.

\*corresponding author,

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/plantbiotechnology>

5. Jannoey, P., Niamsup, H., Lumyong, S., Tajima, S., Nomura, M., and Chairrote, G. (2010)  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) Accumulations in rice during germination. **Chiang Mai J. Sci.** 査読有 37, 1, 124-133., <http://it.science.cmu.ac.th/ejournal/>

6. 明石英幹、滝川祐子、倉持卓司、吉松定昭、野村美加、多田邦尚 (2012) 瀬戸内海備瀬戸海域から得られたドングリシャミセンガイ *Lingula rostrum* (SHAW, 1798) の記録、**南紀生物**, 査読有 54, 19-21, <http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN0020348X>

[学会発表] (計 25 件)

1. Mika Nomura Molecular evolution of C4 photosynthetic genes in various plants セミナー講演 ハノイ教育大学 ベトナム Jan 25<sup>th</sup> 2013

2. 三好貴紘、阿部哲、野村美加、田島茂行 : モデルマメ科植物ミヤコグサ EMS 変異体系の解析、日本土壤肥料学会関西支部会、岡山、2012.12.6-12.7
3. 山崎大樹、十川蒼、林誠、横田圭祐、野村美加、田島茂行 : ミヤコグサにおける SNARE 遺伝子 Syn1 の役割、日本土壤肥料学会 関西支部会 , 岡山 , 2012.12.6-12.7
4. Mika Nomura: Mechanisms of Rhizobia Penetration into Plant Cells by Vesicle Trafficking、ファイトジーンの可能性と未来 V 農学先端研究国際フォーラム、高松 2012.12.3.
5. Mika Nomura, Evolution of C4 photosynthetic genes and expression in the various plants セミナー講演 チェンマイ大学 タイ Nov. 1st 2012
6. Mika Nomura, Takahiro Miyoshi, Hiroki Yamasaki, Aoi Sogawa, Chungopast Sirinapa, Keisuke Yokota, Makoto Hayashi, Shigeyuki Tajima. The vesicle trafficking in *Lotus japonicus* nodules. The 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Phuket Thailand, Oct 28-31,2012
7. Sirinapa Chungopast, MikaNomura, Shigeyuki Tajima, Nanthipak Thapanapongworakul, Hiroyuki Matuura, A mechanism of nitrogen-fixing symbiosis between *L. japonicus* and *M. loti*, glutamine-synthetase deficiency mutant. The 2<sup>nd</sup> Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Phuket Thailand, Oct 28-31,2012
8. S. Chungopast, M. Nomura, S. Tajima, N. Thapanapongworakul, H. Matsuura, Y. Shimoda and S. Sato, Metabolic Regulation of nodule senescence between *L. japonicus* and *M. loti* mutant (STM 30) symbioses. 植物微生物研究会、神戸 2012.9.25-9.27
9. 十川 蒼, 山崎 大樹, 三好 貴紘, 林 誠, 横田 圭祐, 野村 美加, 田島 茂行 : Synare 遺伝子 Syn1 の根粒形成における役割、植物微生物研究会、神戸 2012.9.25-9.27
10. 野村美加 : 根粒共生機能発現における SNARE 遺伝子の役割、土壤肥料学会、鳥取 2012.9.4-9.6
11. 田島茂行 : 根粒菌アミノ酸代謝の根粒内窒素固定反応に与える影響、土壤肥料学会、鳥取 2012, 2012.9.4-9.6
12. M. Nomura, T. Miyoshi, H. Yamasaki, A. Sogawa, S. Chungopast, K. Yokota, M. Hayashi, S. Tajima, Study of vesicle trafficking in *Lotus japonicus* nodules. Molecular Plant-Microbe Interactions 7.29-8.2 2012.Kyoto
13. S. Tajima, M. Nomura, N. Thapanapongworakul, A. Enoki, H. Matsuura, Auxotrophic and anaplerotic amino acid metabolism in *Mesorhizobium loti*. Molecular Plant-Microbe Interactions 7.29-8.2 2012.Kyoto
14. 野村 美加 : マメ科植物の共生に関与する小胞輸送について ファイトジーンフロンティア香川2012.3.7.
15. Aoi Sogawa, Keisuke Yokota, Makoto Hayashi, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima: Functional analysis of Snare

- gene in *Lotus japonicus* nodule. 植物生理学会 京都 2012.3.16-18
16. Shigeyuki Tajima, Mika Nomura, Nanthipak Thapanapongworakul, Ayao Enoki and Hiroyuki Matsuura, FUNCTIONAL ANALYSIS OF AMINO ACID METABOLISM MUTANTS OF MESORHIZOBIUM LOTI. 17回国際窒素固定会議, Australia, 150.2011.11.27-12.2
  17. Mika Nomura, Eiji Kinoshita, Kazuya Akimitsu, and Shigeyuki Tajima. Effect of D-psicose application to rice and screening of D-psicose insensitive rice plants. 国際希少糖学会, 116. 2011.11.9-11.12 高松
  18. 松浦寛幸, 榎彩緒, Nanthipak 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, 岡山, 2011.9.20-9.22
  19. 三好貴紘, 山崎大樹, 奥村翔, 佐藤修正, 下田宜司, 林誠, 横田圭祐, 野村美加, 田島茂行, 共生に関与するミヤコグサ SNARE と相互作用するタンパク質の検索, 植物微生物研究会, 岡山, 2011.9.20-9.22
  20. 山崎大樹, 三好貴紘, 野村美加, 田島茂行. ミヤコグサの共生に関わる SNARE 遺伝子の機能解析, 日本土壌肥料学会, つくば, 55. 2011.8.8-8.10
  21. 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, 日本土壌肥料学会, つくば, 55. 2011.8.8-8.10
  22. Ayao Enoki, Nanthipak Thapanapongworakul, Yoshihiro Ishigami, Hiroyuki Matsuura, Shusei Sato, Yoshikazu Shimoda, Satoshi Tabata, Mika Nomura and Shigeyuki Tajima: Screening of *Mesorhizobium loti* mutants for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in *Lotus japonicus* 第一回植物微生物共生と窒素固定に関するアジア国際会議、宮崎 126.2010.9.20-24
  23. Yousuke Hase, Yousuke Kanki, Takahiro Miyosi, Hiroki Yamasaki, Makoto Hayashi, Mika Nomura, Shigeyuki Tajima: Functional analysis of Gen06 genes in *Lotus japonicus* nodules. 第一回植物微生物共生と窒素固定に関するアジア国際会議、宮崎 127.2010.9.20-24
  24. 竹藤豊、野村美加, 石井祐一、玉置雅紀、一見和彦、多田邦尚、田島茂行: 香川県春日川河口域のアオサ種の同定及びその生理学的応答、日本陸水学会、弘前、2010.9.17-9.20
  25. 細川欣秀、中村達哉、下村憲司郎、秋光和也、何森健、野村美加、田島茂行: 希少糖 D-Psicose におよび D-Allose のイネに対する生育阻害効果の解析、土壌肥料学会、北海道、2010.9.7-9.9
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
東江(野村)美加 (AGARIE (NOMURA) MIKA)  
香川大学・農学部・准教授  
研究者番号：50294749
  - (2) 連携研究者  
田島茂行 (TAJIMA SHIGEYUKI)  
香川大学・農学部・教授  
研究者番号：50116894