

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380042

研究課題名(和文)ダイズの根粒・菌根二重共生系の成立に関する宿主遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文)Transcription profiles of host plant genes induced in the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses of soybean root

研究代表者

坂本 一憲 (SAKAMOTO, Kazunori)

千葉大学・園芸学研究科・教授

研究者番号：10225807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではダイズの根粒・菌根二重共生系で発現する宿主遺伝子をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析し、二重共生系の成立に必須な遺伝子を探索した。その結果、根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生に共通して発現する遺伝子は34個あることが判明した。この中からType1メタロチオネイン遺伝子とCPRD49遺伝子に着目し発現特性をreal-time RT-PCR法によって検討し、Type1メタロチオネイン遺伝子は根粒と菌根で顕著に発現している遺伝子であることを確認した。また本遺伝子についてはダイズの毛状根形質転換体を作成し、GUS染色法によってダイズ根細胞内における発現部位の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the transcription profiles of host genes induced by rhizobial, arbuscular mycorrhizal and dual inoculations were analyzed to elucidate the host genes involving in the establishment of the dual symbiosis in soybean root. We found that 34 genes of host plant were induced commonly by rhizobial, mycorrhizal and dual inoculations, suggesting that these genes are essential for establishing dual symbiosis. The gene expression of type1 metallothionein and CPRD49 were examined using real-time RT-PCR. It was ascertained that the expression of type1 metallothionein gene was significantly induced in the root nodule and mycorrhizal root of soybean. We tried to examine the spatial expression patterns of type 1 metallothionein gene in the transgenic hairy roots using promoter-gus gene fusions.

研究分野：土壤微生物学

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：ダイズ 根粒菌 アーバスキュラー菌根菌 共生関係 遺伝子発現 DNAマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

ダイズはタンパク源や機能性食品として重要であるが、わが国のダイズの収量水準(約 1.8t ha⁻¹)は世界平均よりも低く年次変動も大きい。また最近では環境保全型農業への対応が強く求められており、化学肥料や農薬に依存しない低肥料・耐病性ダイズの作出が急務の課題となっている。

ダイズには根粒菌とアーバスキュラー菌根菌(以下菌根菌)が二重に共生している。両共生菌はともに宿主であるダイズから光合成炭素の供給を受けながら、根粒菌は窒素固定によってダイズへ窒素を、また菌根菌はリン酸を供給している。また菌根菌は宿主の病害抵抗性を高める働きをしている。従って二重共生系の成立メカニズムが解明されれば、ダイズの窒素・リン酸吸収と病害抵抗性を同時に強化することができ、低肥料・耐病性ダイズの分子育種が可能になると考えられる。

二重共生系の成立に関連する知見として、両共生菌の感染を受容する初期シグナル伝達経路が共通であることが近年明らかにされた(Common symbiosis pathway, Kouchi et al. 2010 等)。また研究代表者である坂本も根粒菌の過剰な感染を抑制しているダイズのオートレギュレーション機構が、同時に菌根菌の樹枝状体形成をも抑制していることを示し(Shrihari et al. 2000; Sakamoto and Tsukui 2005; Sakamoto and Nohara 2009)、本機構が根粒菌と菌根菌との間の共通基盤システムのひとつであることを明らかにした。

一方、ダイズの両共生菌の間に相互作用があることが知られており、菌根形成が根粒着生を増やし窒素固定活性を高めることが明らかにされている(Kawai and Yamamoto 1986; 佐藤ら 1998; Antunes et al. 2006 等)。しかし根粒菌が菌根菌の定着とその機能に及ぼす影響については研究例が少なく、一定の

知見が未だ得られていない(Bethlenfalvai et al. 1985; Xie et al. 1995; Antunes et al. 2006)。そこで坂本は野生型品種のエンレイとオートレギュレーション機構が欠損している関東 100 号を用いて根粒菌が菌根形成に及ぼす影響を調べたところ、根粒着生は菌根菌の樹枝状体形成を抑制しており、これはダイズのオートレギュレーション機構を介したものであることを明らかにした(Sakamoto et al. 2013)。

また引き続き坂本は理化学研究所の関と松井(連携研究者)と協力し、分子レベルで見た根粒共生系と菌根共生系の共通性と特異性の全体像を明らかにすべく、ダイズ根に根粒菌または菌根菌を単独に接種した時に発現する宿主遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、両共生系に共通して発現する宿主遺伝子よりも両共生系のそれぞれに特異的に発現する宿主遺伝子が多いこと、いずれの共生系も細胞膜輸送体(トランスポーター)、病害抵抗性および環境ストレス耐性に関与する宿主遺伝子が顕著に発現していることを明らかにした。このことからダイズはこれまで言われてきた共通基盤システムとともに根粒菌と菌根菌のそれぞれに特異的に作用する遺伝子を数多く所有しており、これらを用いて両共生菌を同時に制御していることが予想された(坂本ら, 2010 年度日本土壌微生物学会講演要旨集)。

2. 研究の目的

以上のようにダイズの根粒・菌根二重共生系は、両共生菌に共通して作用する宿主遺伝子のみならず、両共生菌のそれぞれに特異的に作用する宿主遺伝子も数多く関与している極めて複雑な系であることが考えられる。またこれらに加えて根粒菌または菌根菌の単独共生系では発現しないが、二重共生系において初めて発現する宿主遺伝子の存在も

予想され、これら二重共生特異的遺伝子が二重共生系の成立の鍵を握っていることが考えられる。

そこで本研究では、まず DNA マイクロアレイを用いて、ダイズの根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生の場合において発現する宿主遺伝子を網羅的に調べ、3つの共生パターンにおいて共通して発現する宿主遺伝子、またそれぞれの共生系において特異的に発現する宿主遺伝子について検討した。次に明らかとなった共通発現遺伝子の中から Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) と CPRD49 遺伝子 (*GmCPRD49*) に着目し、その発現特性を real-time RT-PCR 法を用いて解析した。また *GmMT1* の根細胞内における発現部位をダイズの毛状根形質転換体を用いた GUS 染色法によって明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生において発現するダイズ遺伝子の網羅的解析

ダイズの品種エンレイをワグネルポットに播種しガラス温室内で栽培した。試験区として、非接種(C)区、根粒菌単独接種(R)区、菌根菌単独接種(AM)区および二重接種(RAM)区の4試験区を設けた。根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) と菌根菌 (*Gigaspora rosea* MAFF520062) はダイズの播種時に接種を行ない、播種から6週間後(開花期)にダイズを採取し、Trizol 法を用いて根部から total RNA を抽出した。ダイズのアレイ解析には理化学研究所が中心となって開発し現在アジレント社より市販されているダイズオリゴ DNA マイクロアレイを用いた。まず total RNA から逆転写反応によって cDNA を合成した。次に cDNA を *in vitro* 転写し、得られた増幅 RNA を Cy3 で蛍光標識した。そして増幅 RNA をマイクロアレイにハイブリダイズさせ、アレイ上の各スポットの

蛍光シグナル強度(遺伝子発現値)を測定した。R 区、AM 区および RAM 区の各スポットの発現値を C 区の値で除して発現比を算出し、発現比が2倍以上を示す遺伝子を共生によって発現した遺伝子とした。この際計算する試験区間の値は統計検定を行い、有意差を確認した(有意水準5%)。

(2) *GmMT1* と *GmCPRD49* の発現特性

マイクロアレイ解析で明らかになった共通発現遺伝子の中から、Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) と CPRD49 遺伝子 (*GmCPRD49*) を興味深い遺伝子として選び、これらの遺伝子の塩基配列をダイズ完全長 cDNA 配列データベース (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/rssoy/index>) から取得し、両遺伝子の特異的に増幅するプライマーを設計した。そして(1)と同様に栽培した各試験区のダイズ根の試料について real-time RT-PCR を行い、両遺伝子の発現量を定量した。

GmMT1 については、採取した各試験区のダイズの各器官(根部、根粒、茎部、本葉および成長点)別に遺伝子発現量を測定し、比較を行った。*GmCPRD49* については各試験区の根部と根粒について遺伝子発現量を測定するとともに、乾燥処理を施した試験区も設けて遺伝子発現量を測定した。乾燥処理はC区とR区について行い、6週間栽培したダイズの灌水を停止後24時間放置し、根部、根粒および本葉部を採取し、遺伝子発現量を測定した。

(3) *GmMT1* の細胞内発現部位の解析

本実験では *Agrobacterium rhizogenes* MAFF210265 株を用いて、Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) のプロモーター領域と GUS レポーター遺伝子 (*gus*) との融合タンパク質を発現するダイズの毛状根形質転換体を作製することを試みた。まずプロモーター領域を含めた *GmMT1* を特異的に増幅するプライマーを設計し、ダイズの根細胞から遺伝子配列を増幅した。これを *gus* を含む binary

vector (pDs204h) へ導入してコンストラクトを作製し、これを *A. rhizogenes* に取り込ませた。1 週間程度栽培したダイズの下胚軸に形質転換した *A. rhizogenes* を接種し、14 日間生育させた。発生した毛状根に菌根菌を接種しさらに 6 週間生育させ、毛状根内の GUS 発色部位を観察した。

4. 研究成果

(1) 根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生において発現するダイズ遺伝子の網羅的解析

二重共生したダイズの根粒数は根粒単独共生の場合の約 2.0 倍に増大していた。これに対して二重共生下の菌根形成率は菌根単独共生の場合とほぼ同じであった。以上の結果から、二重共生の結果、根粒着生は促進されるが、菌根形成はほとんど変化しないことが認められた。

マイクロアレイ解析の結果から、根粒単独共生、菌根単独共生、二重共生下で発現する宿主遺伝子は、それぞれ 187 個、441 個、548 個であることが判明した。そして根粒単独共生で特異的に発現する遺伝子は 42 個、菌根単独共生で特異的に発現する遺伝子は 60 個あることが見いだされた。また二重共生では 56 個の遺伝子が特異的に発現することが明らかとなった。加えて根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生に共通して発現する遺伝子は、34 個であることが明らかとなった。

根粒単独共生で特異的に発現した主な宿主遺伝子は、根粒の肥大成長に関与すると思われる細胞壁合成・伸長遺伝子、ファイトアレキシン合成などの防御応答遺伝子、そして乾燥ストレス応答遺伝子などであった。菌根単独共生で特異的に発現した遺伝子は、防御応答遺伝子、乾燥ストレス応答遺伝子、シグナル伝達に関与する遺伝子および細胞膜輸送体の遺伝子などであった。二重共生で特異的に発現した遺伝子は、根粒で特異的に発現

することが知られている Nodulin 遺伝子 (Nodulin26、Nodulin35 および GmN70) が主なものであった。従って二重共生特異的遺伝子は、二重共生によって顕著に増大した根粒着生に応じて発現したものであると考えられる。

根粒単独共生、菌根単独共生および二重共生に共通して発現した宿主遺伝子において、最も多く発現した遺伝子は、アクアポリンと考えられている Nodulin26 や硝酸トランスポーターなどの細胞膜輸送体の遺伝子であった。これらの遺伝子は根粒内でバクテロイドと接している宿主の peribacteroid membrane や菌根菌の樹枝状体と接している periarbuscular membrane 上において発現しているものと考えられる。また輸送体以外の主な遺伝子は、PR タンパク質などの防御応答に関わるタンパク質、Type1 メタロチオネイン、GDSL リパーゼの 1 種である CPRD49 および熱ショックタンパク質などであった。

共通発現した 34 個の遺伝子は、数は多くはないものの、共生系の成立にとって必須な遺伝子であると考えられる。この中には環境ストレス応答遺伝子である Type1 メタロチオネイン遺伝子と CPRD49 遺伝子が含まれており、興味深い。メタロチオネインは細胞内で金属イオンの濃度調整を行っているタンパク質であり、宿主の重金属耐性に関与することも知られている。またメタロチオネインは活性酸素の消去機能もあることが報告されているが (Hssinen et al. 2011) 共生系における機能は未だ明らかにされていない。CPRD49 はササゲの乾燥耐性に関与するタンパク質としてこれまで報告されている (Prayitno et al. 2006)。本研究のアレイ解析においてもアクアポリンと思われる Nodulin26 遺伝子が CPRD49 遺伝子と同様に発現していることから、CPRD49 は微生物と共生した植物体における水の運搬や乾燥耐性に関与している可能性が考えられる。以上のこ

とから、本研究ではマイクロアレイ解析によって明らかになった共通発現遺伝子のうち、Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) と CPRD49 遺伝子 (*GmCPRD49*) に着目し、詳しい発現特性の解析を行うことにした。

(2) *GmMT1* と *GmCPRD49* の発現特性

GmMT1 の遺伝子発現量は菌根単独共生と二重共生下の根部が極めて高いことが認められ、さらに菌根単独共生と二重共生を比較すると菌根単独共生が有意に高かった。次いで発現が高かったのは、根粒単独共生と二重共生の根粒であった。以上に対し、各試験区の茎部、本葉部および成長点、また根粒単独共生の根部における *GmMT1* の発現は低いことが認められた。以上の結果は(1)のマイクロアレイ解析で得られた結果とほぼ一致しており、*GmMT1* は菌根と根粒という共生器官で高い発現を示す遺伝子であることが確認された。

GmCPRD49 の遺伝子発現量は、根粒単独共生と二重共生下の根粒で高いことが認められた。これに対して各試験区の根部における発現は特に認められなかった。以上のように、根粒の結果はマイクロアレイ解析の結果と一致したが、菌根形成との関係については相違が認められた。

灌水を1日停止するという乾燥処理によってダイズは本葉が完全に萎凋し、本葉部の含水率の低下も確認された。しかし根部、根粒および本葉部における *GmCPRD49* の遺伝子発現量は乾燥処理によって低下していた。以上のように *GmCPRD49* の発現は当初の予想に反する結果が多く、共生関係と本遺伝子の発現との関係については今後の詳細な検討が必要であると考えられる。

(3) *GmMT1* の細胞内発現部位の解析

本実験では、*GmMT1* のプロモーター領域の binary vector への導入、次いで構築したコンストラクトの *A. rhizogenes* MAFF210265 株への取込みは成功することができた。また組

換えた *A. rhizogenes* をダイズに接種し、毛状根を作製することにも成功した。しかし毛状根内部の GUS 発色部位を観察することはできず、目的遺伝子のダイズへの導入は成功しなかった。成功しなかった原因としては、*A. rhizogenes* へのコンストラクトの導入が実際はうまくいっていなかったこと、あるいは用いた *A. rhizogenes* MAFF210265 株の遺伝子導入能力が低かったことが考えられる。このように *A. rhizogenes* から毛状根への遺伝子導入の方法を確立することが今後の大きな課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Sakamoto, K., Ogiwara, N., and Kaji, T. (2013) Involvement of autoregulation in the interaction between rhizobial nodulation and AM fungal colonization in soybean roots. *Biology and Fertility of Soils*, 49 (8), 1141-1152, 査読有, DOI:

10.1007/s00374-013-0804-8

Okubo, T., Tsukui, T., Maita, H., Okamoto, S., 他20名, Sakamoto, K., 他24名 (2012) Complete genomic sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321:

insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. *Microbes and Environments*, 27, 306-315, 査読有, DOI: 10.1264/jsme2.ME11321

Vano, I., Sakamoto, K., and Inubushi, K. (2011) Phylogenetic relationships among non-pathogenic isolates of dark septate endophytes from Ericaceae plants. *HortResearch*, 65, 41-47, 査読有, DOI無

Alam, S.S., Sakamoto, K., and Inubushi, K. (2011) Biocontrol efficiency of *Fusarium* wilt diseases by a root

colonizing fungus *Penicillium* sp.
Soil Science and Plant Nutrition, 57,
204 - 212, 査読有, DOI:
10.1080/00380768.2011.564996

[学会発表](計8件,うち招待講演1件)

坂本一憲・梶 智光・荻原菜津子・杉本
百合恵・関 原明・松井章造・石田順子・
田中真帆 2013 .ダイズの根粒共生系と
菌根共生系で発現する宿主遺伝子の網
羅的解析(第3報)ダイズの野生型と根
粒超着生変異体との比較,日本土壤肥
料学会名古屋大会,9月13日,名古屋
大学(名古屋市)

Sakamoto, K., Ogiwara, N., Kaji, T.,
Seki, M., Matsui, A., Ishida, J. and
Tanaka, M. 2013. Transcription
profiles of host plant genes induced
by rhizobial, AM fungal and dual
inoculations in soybean root, 18th
International Congress on Nitrogen
Fixation, October 16, Phoenix Seagaia
Resort (Miyazaki city)

坂本一憲・上野 満・福田智代・青柳美
里・園田雅俊・渡辺正巳・西野栄正 2013 .
ダイズの根粒・菌根共生系における
Type1 メタロチオネイン遺伝子の発現,
菌根研究会2013年度大会,11月16日,
東北大学川渡共同セミナーセンター(大
崎市)

坂本一憲・荻原菜津子・梶 智光・杉本
百合恵・関 原明・松井章造・石田順子・
田中真帆 2012 .ダイズの根粒共生系と
菌根共生系で発現する宿主遺伝子の網
羅的解析(第2報)単独共生と二重共生
の比較,日本土壤肥料学会鳥取大会,9
月4日,鳥取大学(鳥取市)

上野満・杉本百合恵・坂本一憲・園田雅
俊 2012 .亜鉛添加および共生微生物の
感染がダイズのメタロチオネイン遺伝

子の発現に及ぼす影響,日本土壤肥料
学会鳥取大会,9月4日,鳥取大学(鳥
取市)

杉本百合恵・坂本一憲・園田雅俊 2011 .
リアルタイム PCR 法を用いたダイズの
根粒および菌根共生系で高発現する宿
主遺伝子の定量解析,日本土壤肥料学
会つくば大会,8月8日,つくば国際会
議場(つくば市)

坂本一憲 2011 .アーバスキュラー菌根
共生系と根粒共生系の共通性と特異性,
日本土壤肥料学会シンポジウム「アーバ
スキュラー菌根菌:研究の最前線と土壤
肥料分野への貢献」(招待講演),日本土
壤肥料学会つくば大会,8月8日,つく
ば国際会議場(つくば市)

坂本一憲・荻原菜津子・梶 智光 2011 .
ダイズの根粒着生と菌根形成の相互作
用に対するオートレギュレーション機
構の関与,植物微生物研究会第21回研
究交流会,8月,岡山大学(岡山市)

[その他]

千葉大学・植物栄養学研究グループ・ホーム
ページ:

<https://sites.google.com/site/plantnlab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 一憲 (SAKAMOTO, Kazunori)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号:10225807

(3) 連携研究者

松井 章浩 (MATSUI, Akihiro)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・特別研究員

研究者番号:90443027