

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570058

研究課題名(和文) マメ科植物の根粒菌監視機構関連分子の同定と共生組織・細胞内での所在

研究課題名(英文) Identification of a plant molecule involved in a surveillance system for the symbiotic nitrogen fixation and its localization in the symbiotic tissues

研究代表者

内海 俊樹 (Uchiumi, Toshiki)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20193881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物による根粒菌のリポ多糖(LPS)認識は、共生成立に重要であるとされているが、LPS認識に関与する植物分子は不明である。ミヤコグサのLPS結合タンパク質(LBP)の遺伝子を同定し、LjLBPと名付けた。これらLjLBPの組換えタンパク質は、大腸菌のLPSと強い結合活性を示した。蛍光タンパク質との融合遺伝子を構築してLjLBPの所在を検討した結果、根組織では細胞外に分泌されること、また、根粒では、細胞内部に侵入した根粒菌を標的としていることが示唆された。しかし、過剰発現や発現抑制、あるいは、変異植物を用いた実験では、LjLBP遺伝子が共生成立に必須であることの証明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Lipopolysaccharide (LPS) of bacteria induces the plant resistance in pathogenic combination and is also involved in the establishment of symbiosis between legumes and rhizobia. However, LPS recognition system is still unknown in plants. Referring LBP of mammals, four LBP-candidates were identified on the genome of *Lotus japonicus* and referred to as LjLBPs. N-terminal barrel of LjLBPs bound with LPS of *Escherichia coli*. Hairy roots transformed with the fusion genes of LjLBPs and mOrange revealed the localization of LjLBPs. LjLBPs were secreted to the outside of the roots and, in the nodule, targeted to the rhizobia that penetrated into the host plant cells. We investigated the symbiotic phenotype of the hairy roots carrying RNAi- and overexpressing- constructs, and mutant lines generated by EMS treatment or LORE1 insertion. However, we could not establish the idea that LjLBPs were essential for the symbiosis between *L. japonicus* and its microsymbiont *Mesorhizobium lotii*.

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 ミヤコグサ 根粒菌 共生窒素固定 リポ多糖 リポ多糖結合タンパク質  
形質転換 毛状根

### 1. 研究開始当初の背景

宿主マメ科植物は、自身の細胞内部に根粒菌を受容したあとも根粒菌を常に「監視」し、その増殖と遺伝子発現を「制御」して共生を成立させているものと予想される。「制御機構」で機能する植物分子として、根粒特異的抗菌性ペプチド群が同定され、その作用機作の解明が急がれている。しかしながら、「監視機構」については、未だ不明である。

共生根粒菌由来のリポ多糖 (LPS) を宿主植物の根に添加すると、病原応答のシグナルである一酸化窒素 (Nitric Oxide, NO) が、根の組織内部で生成される。また、根粒菌の LPS 変異株の多くは、宿主植物の病原応答によって排除され、共生を確立できない。これらのことは、根粒菌の LPS と植物による LPS 認識が、共生系で機能していることを示唆している。そこで、本研究では、「監視機構」の構成要素として、根粒菌体の表層の LPS と宿主植物の LPS 結合タンパク質 (LBP) を考えた。しかし、植物では、LBP の報告例はなく、植物が細菌の LPS を認識する機構は全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、「動物の LPS 認識機構に倣い、LPS 認識に関与する植物の LBP を同定すること」「宿主植物が LBP を介して共生菌の LPS を認識することが、共生成立には必須であることを明確にする」ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、ミヤコグサとその根粒菌の共生系を材料として、ミヤコグサの LBP である LjLBP の共生における機能解明を目指して次の3つのサブテーマを展開した。それぞれのサブテーマと実験方法の概要は、次の通りであった。

#### (1) LBP 遺伝子の発現を強化、及び、抑制した形質転換毛状根の共生成立過程の解析

①過剰発現、及び、発現抑制 (RNAi) 遺伝子にて作出したミヤコグサの形質転換毛状根で、LjLBP の発現増加、または、発現抑制の程度を確認する。

②それぞれの形質転換毛状根に根粒菌を接種して共生過程を詳細に観察し、共生における表現型を確定する。

#### (2) LBP 遺伝子変異植物体の共生成立過程の解析

①TILLING 法にて選抜したミヤコグサの LjLBP 遺伝子変異植物体を使用し、共生における表現型を確定する。

②LORE1 挿入変異による変異体を選抜し、共生における表現型を確定する。

③ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株の LPS の構造を明らかにする。

#### (3) 根および根粒の組織・細胞での LBP の局在部位の解析

①4種の LjLBP と mOrange との融合遺伝子を構築し、共生過程での組織・細胞レベルでの局在位置を検討する。

②サブテーマ (1) 及び (2) の結果と総合して、「植物の LBP による根粒菌 LPS の認識が共生成立に必須である」ことを明確にする。

### 4. 研究成果

各サブテーマの研究成果は、次のとおりであった。

#### (1) LBP 遺伝子の発現を強化、及び、抑制した形質転換毛状根の共生成立過程の解析

①ミヤコグサ LBP 遺伝子の同定と発現特性  
ヒトをはじめとする動物の LBP 遺伝子と相同性の高い遺伝子を検索した結果、ミヤコグサ (*Lotus japonicus* MG20 Miyakojima) のゲノム上に4種の遺伝子を見いだした。これらをミヤコグサの LBP 遺伝子の候補として、LjLBP1、LjLBP2、LjLBP3、LjLBP4、と名付けた。定量的 RT-PCR にて、それぞれの遺伝子の発現を解析したところ、いずれも発現量は低く、根や葉などの器官ごとの発現量に違いはなかった。しかし、LjLBP3 と LjLBP4 の根での発現量は、根粒菌の存在に応答して上昇する傾向が見られた。このことから、4種の LBP は、機能分担している可能性が考えられた。

#### ②LjLBP 過剰発現毛状根の根粒

LjLBP1、LjLBP2、LjLBP3 の3遺伝子について、過剰発現形質転換毛状根の作出を試みた。LBP そのものに溶菌活性があることが予想されたので、ゲノム DNA を用いて過剰発現遺伝子を構築した。また、LjLBP3 と LjLBP4 は、非常に相同性が高いため、LjLBP4 のみを用いた。形質転換毛状根に根粒菌を接種したところ、非形質転換根と同様に根粒の着生が見られた。LjLBP1、LjLBP2 の過剰発現毛状根に着生した根粒は、ばらつきが大きいものの、窒素固定活性は通常根粒より高い傾向があった。また、根粒内部を透過型電子顕微鏡で観察したところ、ペリバクテロイド膜内のバクテロイドの数が、ベクターコントロールと比較して多いことが明らかとなった。このことは、根粒菌がペリバクテロイド膜に包まれたあと、より長い期間、分裂可能な状態にあったことを示唆している。過剰に存在する LjLBP1 と LjLBP2 が、宿主が根粒菌の増殖を制御するタイミングを遅らせた可能性がある。

#### ③LjLBP 発現抑制毛状根の根粒

RNAi による LjLBP1、LjLBP2 の発現抑制毛状根を作出し、ミヤコグサ根粒菌を接種した。LjLBP3 と LjLBP4 については、両遺伝子の発現を抑制した毛状根を作出し、ミヤコグサ根粒菌を接種した。形成された根粒の中には、窒素固定活性のない白色を呈する異常な根粒があったため、透過型電子顕微鏡で観察した。LjLBP1 の発現抑制毛状根の根粒で

は、内部構造が崩壊していた。*LjLBP2*、及び、*LjLBP3/4* の発現抑制では、バクテロイドとそれを包む膜との間隙が大きく、また、膜内部のバクテロイドの数が少ない傾向があった。このことは、LBP が機能しなくなった宿主細胞内部では、根粒菌は正常な共生を確立できないことを示唆しており、非常に興味深い観察結果である。しかし、このような白色根粒の出現頻度は低く、*LjLBP* の発現抑制との関係を明確に示すには至らなかった。*RNAi* による抑制効果にはばらつきがあり、安定した表現型を得ることができなかったものと考えられる。

## (2) LBP 遺伝子変異植物体の共生成立過程の解析

### ① TILLING 法による選抜個体

EMS 処理により得られた 5,000 を超える変異系統の中から、TILLING 法により 13 の変異系統を選抜した。そのうち、*LjLBP1* の 4 系統でアミノ残基置換、*LjLBP2* の 1 系統でナンセンス変異、*LjLBP4* の 2 系統でナンセンス変異が生じていた。これらの系統には、白色の根粒が着生するものがあり、その内部は細胞質の崩壊など、共生が成立していないことを観察した。しかし、EMS による変異が強力であるためか、後代を得ることが困難であり、*LjLBP* の変異により引き起こされる表現型であるのか、あるいは、他の変異に起因するのかについては、明確にすることができなかった。野生型系統と戻し交配をし、得られた後代から変異型ホモ系統を確立する必要があり、現在も継続中である。

### ② LORE1 挿入変異による変異体

トランスポゾンである LORE1 が *LjLBP* 遺伝子に挿入された変異体を用い、機能解析することにした。EMS による変異と異なり、*LjLBP* 遺伝子以外の遺伝子に変異が生じている可能性は低く、遺伝子の変異と表現型を関連づけることが容易である。デンマーク・オーフス大学、及び、本邦のナショナルバイオリソースプロジェクトより提供される LORE1 挿入変異体集団の中から、15 系統について、*LjLBP* のコード領域、及び、その近傍に挿入されている変異体を見いだした。しかし、現在のところ、実験に供するに十分な種子と個体数の確保の段階であり、共生に関する表現型の解析までには至らなかった。LORE1 挿入変異体による *LjLBP* の機能解析は有望であり、現在も実験を継続している。

### ③ ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株の LPS の構造

*LjLBP1*、*LjLBP2* 及び *LjLBP3/4* の組換えタンパク質を生産したところ、LPS との結合活性があることが判明した。根粒菌の LPS との結合活性を議論するためには、根粒菌 LPS の構造に関する情報が必要である。そこで、ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株の LPS の構造を解析することにした。

培養菌体より熱フェノール法にて LPS を抽

出し、常法にて精製した。精製した LPS をミヤコグサに接種したところ、根粒菌体を接種した場合と同様に、NO の発生が観察された。このことは、ミヤコグサは MAFF303099 株の LPS を認識して応答していることを示唆している。LPS を部分分解し、各分画について NO 誘導活性を比較したところ、多糖部分とリピド A 部分に強い活性があることが明らかとなった。各種機器分析の結果に基づいて、リピド A 部分の構造を明らかにした (図 1)。O-抗原を含む全体の構造については、現在も解析中である。

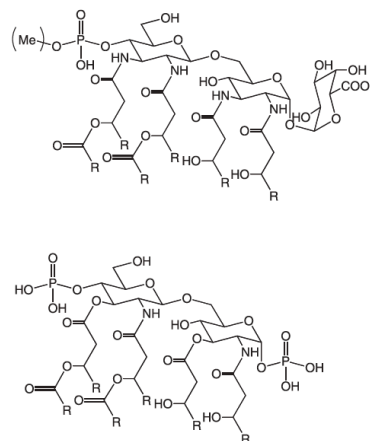


図1. ミヤコグサ根粒菌MAFF303099のリピドAの構造

## (3) 根および根粒の組織・細胞での LBP の局在部位の解析

いずれの *LjLBP* とも、その塩基配列から N 末端側にシグナルペプチドを持つことが予想された。また、*LjLBP1* と *LjLBP2* の過剰発現あるいは発現抑制が、共生に及ぼす影響が大きいと考えられたため、これらの局在を検討することとした。この両者のシグナルペプチドは保存性が高かったため、*LjLBP2* のシグナルペプチド及び LPS との結合に関与する N バレル領域をコードする塩基配列と蛍光タンパク質 mOrange との融合遺伝子を構築した。

*mOrange* 遺伝子のみを導入したミヤコグサの根では、*mOrange* の蛍光は、細胞質及び核で観察された (図 2A)。また、根粒菌の接種により着生した根粒では、根粒菌が存在する感染細胞では *mOrange* の蛍光は観察されず、根粒の外側の細胞の細胞質で蛍光が観察された (図 2B)。

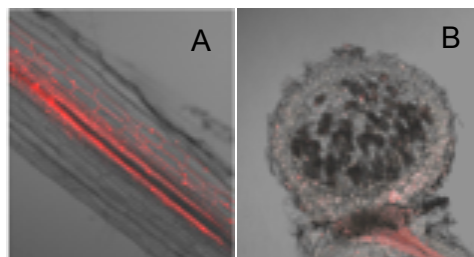


図2. *mOrange* 遺伝子のみ

一方、シグナルペプチド+N バレル+mOrange の融合遺伝子を導入した根では、細胞全体及び根組織の周辺部に強い蛍光が観察された(図3A)。このことは、mOrangeタンパク質が細胞外、さらには根の組織外部に分泌されたことを示唆している。着生した根粒の内部では、根粒菌が存在する細胞の内部で強い蛍光が観察された(図3B)。このことは、膜輸送系で細胞内部を移動するLBPが、細胞内部に侵入した根粒菌へと届けられることを示唆している。即ち、宿主植物細胞内部の根粒菌は、LBPによって認識されている可能性があり、根粒細胞に感染したあとの宿主植物による根粒菌の監視・制御機構を考える上で、非常に興味深い。

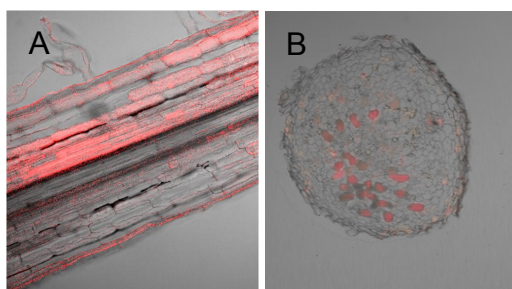


図3. LjLBP2とmOrangeの融合遺伝子

#### (4) まとめ

本研究では、ミヤコグサを材料として、植物のLBP遺伝子を同定し、その遺伝子産物が細菌のLPSと結合することを明らかにすることができた。しかし、残念ながら、宿主植物がLBPを介して共生菌のLPSを認識することが、共生成立には必須であることを明確にするまでには至らなかった。EMS処理の変異植物集団から、変異系統を確立するのに時間を要し、実験に適した系統の確立に至らなかったことが、その要因のひとつである。また、RNAiによるLjLBP遺伝子の発現抑制効果にばらつきが大きかったことも挙げられる。ただし、本研究の結果からは、LjLBPの発現抑制や変異が共生に重大な影響を及ぼす可能性を排除してしまうことはできず、LORE1変異系統を使用した実験を遂行し、明らかにする必要がある。LjLBPの局在部位の解析結果は、根の組織に侵入する前の根粒菌、あるいは、宿主細胞内部に侵入した根粒菌を標的としている可能性があり、宿主植物の「監視機構」を明らかにする上で重要な知見である。LjLBPの変異系統の共生表現型を明確にすることができれば、LPSとの結合活性及びNO産生との関連に関する既知の知見と合わせて、宿主植物の「監視機構」の一端に迫ることが可能であろう。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

(1) Hashimoto M, Tanishita Y, Suda Y, Murakami E, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiumi T. Characterization of nitric oxide-inducing Lipid A derived from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide. *Microbes and Environments*, 27, 490-496 (2012). 査読有

(2) Murakami E, Nagata M, Shimoda Y, Kucho K, Higashi S, Abe M, Hashimoto M, Uchiumi T. Nitric oxide production induced in roots of *Lotus japonicus* by lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti*. *Plant and Cell Physiology*, 52, 610-617 (2011). 査読有

[学会発表] (計19件)

(1) 内海俊樹. 植物の共生：根粒共生系における宿主植物の共生菌飼育戦略. 第29回日本微生物生態学会大会シンポジウム共生の生物学～微生物との素敵な出会い. (招待講演) 2013年11月23日～11月24日. 鹿児島.

(2) Uchiumi T. Cysteine rich peptides as host-derived molecules that regulate microsymbionts. One day Workshop in “Lessons from interaction between plant and microbe: strategies in symbiosis and competition.” (招待講演) 2013年11月12日～2013年11月12日. Kobe University Brussels European Centre, Brussels, Brussels Belgium.

(3) Kado T, Osuki K, Hashimoto M, Magata M, Murakami E, Tanishita Y, Suda Y, Kucho K, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. Class 1 plant hemoglobin supports infection process of rhizobia by modulating nitric oxide, 18th International Congress on Nitrogen Fixation. 2013年10月14日～2013年10月18日. 宮崎.

(4) Hashimoto M, Mizukami M, Suda Y, Kucho K, Abe M, Uchiumi T. Characterization of O-polysaccharide derived from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013年10月14日～2013年10月18日. 宮崎.

(5) Kado T, Osuki K, Kucho K, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. Mutation of class 1 hemoglobin affects the infection of *Mesorhizobium loti* to its host plant *Lotus japonicus*. The 2nd Asia Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2012年10月28日～2012年10月31日. Phuket, Thailand.

(6) Kado T, Osuki K, Hashimoto M, Nagata M, Murakami E, Tanishita Y, Suda Y, Kucho K, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. Nitric oxide and

class 1 hemoglobin in the symbiosis between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. The 2nd Asia Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. (招待講演) 2012年10月28日~2012年10月31日. Phuket, Thailand.

(7) 角友博, 小薄健一, 九町健一, 阿部美紀子, 東四郎, 内海俊樹. Class 1 ヘモグロビンの変異は *Mesorhizobium loti* の宿主植物 *Lotus japonicus* への感染に影響する. 植物微生物研究会. 2012年9月25日~2012年9月27日. 神戸.

(8) Kado T, Osuki K, Kucho K, Abe M, Higashi S, Uchiyama T. Mutation of class 1 hemoglobin affects the infection of *Mesorhizobium loti* to its host plant *Lotus japonicus*. 10th European Nitrogen Fixation Conference. 2012年9月2日~2012年9月5日. Munich, Germany.

(9) Hashimoto M, Tanishita Y, Suda Y, Murakami E, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiyama T. Characterization of NO-inducing lipid A from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012年7月29日~2012年8月2日. 京都.

(10) Kado T, Osuki K, Kucho K, Abe M, Higashi S, Uchiyama T. Mutation of class 1 hemoglobin affects the infection of *Mesorhizobium loti* to its host plant *Lotus japonicus*. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012年07月29日~2012年8月2日. 京都.

(11) Hashimoto M, Tanishita Y, Suda Y, Murakami E, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiyama T. Characterization of NO-inducing Lipid A from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide. American Society for Microbiology 112th General Meeting. 2012年06月16日~2012年06月19日. San Francisco, USA.

(12) 蘭正人, 小薄健一, 鈴木章弘, 原仁俊, 山下健司, 石原真美, 小林優子, 浅見忠男, 九町健一, 東四郎, 阿部美紀子, 内海俊樹. 根粒着生オートレギュレーションと $\beta$ -1,3-glucanase 遺伝子(*LjGluI*)の発現. 日本植物生理学会. 2012年3月16日. 京都.

(13) Murakami E, Takayama H, Osuki K, Nagata M, Hori T, Shigeoka M, Sahara M, Muto S, Nagano Y, Kucho K, Abe M, Sato S, Higashi S, Uchiyama T. Lipopolysaccharide binding protein, a new requirement for legume-rhizobium symbiosis. 17th International Congress on Nitrogen Fixation. 2011年11月29日. Fremantle, Australia.

(14) Hashimoto M, Tanishita Y, Suda Y,

Murakami E, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiyama T. Characterization of NO-inducing Lipid A from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide. 第84回日本生化学会大会. 2011年9月23日. 京都.

(15) 角友博, 谷村陽一郎, 九町健一, 阿部美紀子, 東四郎, 内海俊樹. 微生物との共生における植物ヘモグロビンの生理機能. 植物微生物研究会第21回研究交流会. 2011年9月21日. 岡山.

(16) Hashimoto M, Tanishita Y, Suda Y, Murakami E, Nagata M, Kucho K, Abe M, Uchiyama T. Structure and NO-inducing activity of lipopolysaccharide from *Mesorhizobium loti*. IUMS 2011 XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011年9月7日. 札幌.

(17) 内海俊樹. マメ科植物の根粒菌制御機構. 第17回インターゲノミクスセミナー. (招待講演) 2011年7月12日. 神戸大学.

(18) 橋本雅仁, 谷下洋平, 隅田泰生, 村上英一, 永田真紀, 下田宜司, 東四郎, 九町健一, 阿部美紀子, 内海俊樹. 根粒菌リポ多糖の植物根に対する一酸化窒素産生誘導能とその構造. 第20回内毒素・LPS研究会. 2011年6月25日. 東京.

(19) 村上英一, 高山仁美, 重岡麻由美, 佐原麻菜, 橋本雅仁, 九町健一, 武藤さやか, 永野幸生, 阿部美紀子, 東四郎, 内海俊樹. 根粒菌との共生に関するミヤコグサのリポ多糖結合性タンパク質. 日本動物学会・日本植物学会・日本生態学会九州支部地区合同長崎大会. 2011年5月22日. 長崎.

[その他]

ホームページ等

植物微生物研究室ホームページ

<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~uttan/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内海 俊樹 (UCHIYAMA TOSHIKI)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 20193881