

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880020

研究課題名(和文) ミヤコグサ - 根粒菌の共生に関わる有機酸動態

研究課題名(英文) Malate dynamics in symbiosis between Lotus japonicus and Mesorhizobium loti

研究代表者

高梨 功次郎 (Takanashi, Kojiro)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：10632119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物の根に形成される根粒では、植物と根粒菌の間で窒素栄養と炭素栄養が交換される。植物から根粒菌へは炭素源としてリンゴ酸が供給されることが示唆されているが、その輸送を担うタンパク質は同定されていない。本研究ではマメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いて、リンゴ酸輸送体候補としてALMTタンパク質の機能解明を行った。また同時に糖輸送体であるSWEET輸送体の機能解明も行った。そして、LjALMT1 およびLjSWEET3が根粒維管束で特異的に発現すること、LjALMT1 はリンゴ酸など2価の有機酸を特異的に輸送すること、LjSWEET3はスクロース輸送能を有することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Symbiotic nitrogen fixation by intracellular rhizobia within legume root nodules requires the exchange of nutrients between host plant cells and their resident bacteria. While exchanged molecules imply nitrogen compounds, carbohydrate, and also various minerals, the knowledge on molecular basis of plant transporters that mediate those metabolite exchanges are still limited. In this study, I characterized two transporter families, ALMT and SWEET. One of LjALMT gene and LjSWEET gene express in nodule vasculature bundles, and their transport activities for malate and sucrose were confirmed with *Xenopus* oocyte and FLET, respectively. The direct involvement of these transporters in nutrient transport into bacteroids was not observed, however, their functions in carbon dynamics in nodules were suggested.

研究分野：農学

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 リンゴ酸 ALMT SWEET 共生窒素固定

1. 研究開始当初の背景

植物は 20 万以上もの代謝産物を生産し、その多くは植物の高次機能に關与している。各々の化合物の生理学的役割は極めて高度かつ複雑であり、多様な環境ストレスから植物個体を直接守るのみでなく、土壤微生物や昆虫等他の生物とのコミュニケーションの手段にも利用される。

マメ科植物はその根において窒素固定細菌(根粒菌)と共生系を確立し、高効率の窒素固定器官である根粒を形成する。根粒で行われる共生窒素固定ではマメ科植物から炭素源としてリンゴ酸がバクテロイドに、またバクテロイドからは固定した窒素が植物に供給される。マメ科のモデル植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus*) とタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*) でゲノム解析がほぼ終了し、共生窒素固定に關与する解糖系酵素など様々な代謝酵素が多数同定・機能解析された。しかしながら、光合成で得られた糖がリンゴ酸としてバクテロイドに供給されるまでの代謝・輸送経路など、根粒内における代謝産物の動態に關しては未だ不明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では共生窒素固定において重要な役割を有するリンゴ酸の動態解明を中心に据え、その輸送体のクローニングと、生理機能の解明を第 1 の目標とする。数種あるリンゴ酸輸送体の中から本研究では、近年様々な生理的役割を担うことが報告されている ALMT (aluminum-activated malate transporter) に着目し、その解析を進める。

また、リンゴ酸の動態解明を行うためには、糖の動態も考慮に入れる必要がある。そこで本研究では SWEET 輸送体ファミリーの機能解明を第 2 目標とする。SWEET は植物 菌根菌相互作用において重要な役割を有する新規の糖輸送体であり、これまでの研究で得られている糖動態の知見に、SWEET の解析を加えることで、根粒内における糖の代謝経路をより詳細に描くことが出来ると考える。さらに、2 つの研究目標から共生窒素固定における詳細な炭素の流れを解明することも目指す。

3. 研究の方法

- (1) 根粒における発現が確認されている ALMTs および SWEET の輸送機能をそれぞれアフリカツメガエルの卵母細胞と酵母を用いて明らかにする。
- (2) ALMTs および SWEET の発現組織、局在膜を明らかにする。
- (3) RNAi 株およびトランスポゾン導入変異株の表現型から、ALMTs および SWEET の生理的役割を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) まず、かずさ DNA 研究所のミヤコグサ・

データベースの miyakogusa.jp (ver2.5) を用いてミヤコグサのゲノム中に存在する LjALMT の検索を行ったところ、ミヤコグサゲノム中には少なくとも ALMT 遺伝子が 11 分子種(全長が 7 分子種、部分配列が 4 分子種)存在することが明らかになった(図 1)。根粒で機能する ALMT を同定するため、各器官における特異的な発現解析を行ったところ、LjALMT1、LjALMT3、LjALMT6 の 3 遺伝子が根粒で発現することが明らかになった。同様に SWEET の検索も行い LjSWEET3 のみが顕著に根粒で発現が高いことを明らかにした。

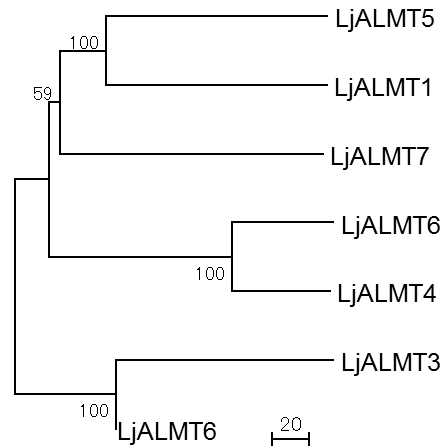


図 1. ミヤコグサ ALMT の分子系統樹

続いて、アフリカツメガエル卵母細胞に上記 LjALMTs 3 遺伝子を発現させ、二電極膜電位固定法によりリンゴ酸などアニオンインジェクション時の電流の測定を行った。LjALMT1 はリンゴ酸に關しては排出活性、及び、 NO_3^- と Cl^- に關しては取り込み活性を有することが明らかになった。さらにコハク酸、フマル酸などの 2 価の有機酸に対しても高い排出活性を有することが分かった。一方で、3 価のクエン酸に対してはコントロールと比べて顕著な排出活性は示さなかった。また、LjALMT3 については、LjALMT3 発現卵母細胞にリンゴ酸をインジェクションすると、コントロールと比べて僅かに高い内向き電流が観察され、さらに外液にリンゴ酸を加えると、ベル型電流が観察されることを明らかにした。一方、LjALMT6 発現卵母細胞ではリンゴ酸インジェクション時に特異的な電流が観察されないことを確認した。

また、これら LjALMTs の植物細胞内における局在を、タマネギ表皮細胞を用いて調べたところ、LjALMT1 は細胞膜に、LjALMT3 および LjALMT6 は液胞膜にそれぞれ局在することが示唆された。

さらに、各 ALMT の ORF 上流 2kb を単離して、Promoter::GUS 形質転換体を用いた組織発現解析を行ったところ、LjALMT1 および LjALMT3 は根粒維管束の師部伴細胞で特異的に発現することが見出されたが、LjALMT6 は特異的な GUS 活性が検出されなかった。

各 ALMT とも、RNAi による遺伝子抑制で顕著な表現型を示さなかったため、根粒内では複数の経路でリンゴ酸の動態が制御されていることが推測された。

(2) 一方、LjSWEET3 は当初、酵母の相補実験による輸送基質の同定を試みたが、LjSWEET3 が酵母においては液胞膜に局在したため、相補実験を行えなかった。代わりに FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 法による実験を行い、既存の SWEET に比べるとやや弱いものの、スクロースに対して、輸送活性を有することが分かった。LjSWEET3 の発現部位を調べたところ、LjALMT1, 3 と同様、根粒維管束で発現しており、その局在膜は細胞膜であった。本遺伝子も RNAi 抑制株で顕著な表現型を示さなかったことから、根粒内では糖や有機酸など一次代謝に関わる経路は複数存在し、互いに相補していることが示唆された。

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 2 件)

Takanashi K., Yokosho K., Saeki K., Sugiyama A., Sato S., Tabata S., Ma J.F., Yazaki K. LjMATE1 - a citrate transporter responsible for iron supply to nodule infection zone of *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* (2013) 54:585-594. 査読有、doi:10.1093/pcp/pct019.

Kamimoto, Y., Terasaka, K., Hamamoto, M., Takanashi, K., Fukuda, S., Shitan, N., Sugiyama, A., Suzuki, H., Shibata, D., Wang, B., Pollmann, S., Geisler, M., Yazaki, K. Arabidopsis ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant and Cell Physiology* (2012) 53:2090-2100. 査読有、doi:10.1093/pcp/pcs149.

[学会発表](計 13 件)

Mayuko Yoshimizu, Akifumi Sugiyama, Yuka Saida, Kojiro Takanashi, Davide Sosso, Wolf B Frommer, Kazufumi Yazaki. Functional Analysis of LjSWEET3, a candidate of sugar transporter in the nodule of *Lotus japonicus*, 第 55 回日本植物生理学会年会、2014.3.18、富山

Kojiro Takanashi, Kengo Yokosho, Hirokazu Takahashi, Kazuhiko Saeki, Akifumi Sugiyama, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Mikio Nakazono, Jian

Feng Ma, Kazufumi Yazaki, LjMATE1 assists the Fe translocation to nodules by providing citrate, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 2013.10.16、宮崎

吉水麻祐子、杉山暁史、齊田有桂、高梨功次郎、Davide Sosso, Wolf B Frommer、矢崎一史、ミヤコグサ根粒で発現する糖輸送体候補遺伝子 LjSWEET3 の解析、第 31 回日本植物細胞分子生物学会、2013.9.10、札幌

Yoshihiro Ota, Kojiro Takanashi, Akifumi Sugiyama, Toshio Aoki, Kazufumi Yazaki, Analysis of MATE-type transporters, LjMATE2 and LjMATE3 in *Lotus japonicus*. International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, 2013.3.28、倉敷

Yuka Saida, Akifumi Sugiyama, Kojiro Takanashi, Davide Sosso, Wolf B Frommer, Kazufumi Yazaki. Analysis of a SWEET transporter in nodules of *Lotus japonicus*, International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, 2013.3.28、倉敷

Kazuaki Yamashita, Akifumi Sugiyama, Kojiro Takanashi, Kazufumi Yazaki, Biochemical analysis of flavonoid secretion in soybean, 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013.3.25、仙台

Yuka Saida, Akifumi Sugiyama, Kojiro Takanashi, Kazufumi Yazaki, Characterization of LjSWEET4 in nodules of *Lotus japonicus*, 第 54 回日本植物生理学会年会、2013.3.22、岡山

太田喜寛、高梨功次郎、杉山暁史、青木俊夫、矢崎一史、ミヤコグサの MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013.3.22、岡山

齊田有桂、杉山暁史、高梨功次郎、矢崎一史、ミヤコグサ根粒における糖輸送体候補 SWEET の解析、分子生物学会 2012 年度大会、2012.12.14、博多

山下 和晃、杉山 暁史、高梨 功次郎、矢崎 一史、ダイズ根のフラボノイド分泌に関わるダイズ遺伝子の探索、第 22 回植物微生物研究交流会、2012.9.26 神戸

齊田有桂、杉山暁史、高梨功次郎、矢崎一史、ミヤコグサ根粒で発現する SWEET 輸送体の機能解析、第 22 回植物微生物研究交流会、2012.9.26 神戸

太田喜寛、高梨功次郎、杉山暁史、青木俊夫、矢崎一史、ミヤコグサで発現する MATE 型輸送体 LjMATE2 および LjMATE3 の解析、第 22 回植物微生物研究交流会、2012.9.26 神戸

高梨功次郎、ミヤコグサ根粒で機能する

膜輸送体の解析、第 6 回ダイズ研究会、
2012.9.21、佐賀

〔図書〕(計 2 件)

Takanashi K. and Yazaki K., ABC
Proteins and Other Transporters in
Lotus japonicus and *Glycine max*, M.
Geisler (ed.), *Plant ABC Transporters*,
Signaling and Communication in Plants
22, (2014). doi:
10.1007/978-3-319-06511-3_10
杉山暁史、高梨功次郎、伊藤嘉昭、福島
整「二結晶型分光器を用いた蛍光 X 線分
光法で植物中の元素の振る舞いを調べ
る」バイオサイエンスとインダストリー、
(2013)71: 340-342.

〔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
<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LPGE/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高梨 功次郎 (TAKANASHI Kojiro)
京都大学生存圏研究所
研究者番号：10632119