

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450084

研究課題名(和文) マメ科植物窒素固定能改良に向けた共生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the symbiosis mechanism to improve the nitrogen fixation in legume

## 研究代表者

東江 美加(野村美加)(Agarie (Nomura), Mika)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50294749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌が感染すると根粒を着生し、共生窒素固定を行う。本研究ではマメ科植物の共生窒素固定能の改良を目指し、共生窒素メカニズム特に老化メカニズムの解明を行った。感染後2週目、4週目、8週目の根粒からRNAを抽出しマイクロアレー解析により発現変動を調べた。その結果、根粒老化により発現が誘導する遺伝子群の中にフェリチン遺伝子が存在した。qRT-PCR解析によって発現変動を調べた結果、マイクロアレー解析と同様に老化によりその発現が誘導した。さらに老化時に遊離した鉄イオンによりNOシグナルを介してフェリチン遺伝子の発現が増加することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential micronutrient for the legume rhizobium symbiosis and is accumulated abundantly in nodule. Iron homeostasis needs to be strictly controlled to avoid toxicity. Homeostasis of iron in plants is achieved through processes requiring proteins and small organic molecules. Among the molecules, ferritins are a class of iron storage proteins. During nodule senescence, total iron concentration in nodule was decreased, whereas expression of ferritin, Ljfer1, was induced in *Lotus japonicus*. We have identified signal transduction pathway leading to the increase of Ljfer1 in nodule. The Ljfer1 promoter of *L. japonicus* is conserved Iron-Dependent Regulatory Sequence (IDRS). The expression of Ljfer1 was induced by application of iron or sodium nitroprusside. Moreover, application of iron in nodule increased the nitric oxide (NO). These data indicate that iron-induced NO leads to increase the expression of Ljfer1 in the senescence of *L. japonicus* nodule.

研究分野：植物栄養学

キーワード：共生窒素固定 ミヤコグサ 根粒菌 老化

### 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は根粒菌が感染すると新規オルガネラ膜(シンビオゾーム膜)に根粒菌を取り込み、根粒と呼ばれる新しい器官を形成する。その後、植物細胞内に取り込まれた根粒菌はバクテロイドに分化し共生窒素固定を行う。しかし植物全般で見れば植物に作られる瘤の形成は病原菌あるいは線虫の感染により引き起こされるものが多く植物の成長に害を及ぼす。病気を引き起こす瘤形成に関わるメカニズムは殆ど分かっていないため線虫による感染は農薬による対処方法も殆どなく、枯れていくのを待つだけで農業上非常に大きな問題となっている。

マメ科植物に根粒が過剰に着生する変異体は数多く得られているがこれら植物は窒素固定能が高くなりすぎ、エネルギーを過剰に必要とするために収量は逆に低下する。では現存のマメ科植物が最も収量が高いのだろうか。申請者は、この疑問を解明することを目的として研究を行った。マメ科植物と根粒菌共生システムの解明を目的として窒素固定能の増加の可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

マメ科植物と根粒菌共生システムの解明を目的として持続的に共生を維持するメカニズムの解明を行う。

共生はどのように成立し、どのように維持され、またどのようにして破綻するのか、モデルマメ科植物ミヤコグサを用いて検討を行う。

### 3. 研究の方法

ミヤコグサ根粒菌感染により根粒で発現する遺伝子群を経時的に調べる。RNA-seq 解析により根粒で発現する遺伝子(20165 遺伝子)プローブを作成した。それぞれのプローブは60mer オリゴヌクレオチドであり4×44K ホームットのアジレントマイクロアレーブを作成した。

根粒菌感染2, 4, 8週目の根粒からRNAを抽出し、1650ngのcy3ラベルしたcRNAは、カスタムプライムした4×44Kスライドとハイブリダイズし、アジレントマイクロアレーブスキャナでスキャンした。シグナル強度は75パーセントマイルでノーマライズ後、log<sub>2</sub>スケールで比較した。

### 4. 研究成果

感染後、2週目、4週目、8週目のミヤコグサ根粒の窒素固定活性を測定し、根粒菌を感染後4-5週目まではその活性が上昇しその後低下する。その一方バクテロイドや植物に酸素を供給するために、宿主植物はレグヘモグロビンタンパク質を多量に生産する。レグヘモグロビンはヘムタンパク質であり酸素に対する親和性が高いため低酸素分圧下でも

大量の酸素をバクテロイドに供給することができる。このように共生窒素固定に必要なニトロゲナーゼやレグヘモグロビンタンパク質は鉄を大量に必要としており、クエン酸と共に感染細胞内に輸送されることが明らかとなっている。

窒素固定活性の値から、根粒菌感染2週目の根粒は共生窒素固定活性が開始直後、4週目は成熟根粒、8週目は老化根粒としそれぞれの根粒で発現する遺伝子を比較した。その結果、根粒菌感染2週目と8週目を比較し、老化で発現する遺伝子は641個存在し、減少する遺伝子は416個であった。これら遺伝子についてNCBIのeuKaryotic Orthologous Groups (KOGs)に基づいて分類した(図1)

これら up-regulate 遺伝子、down-regulated 遺伝子は、それぞれさらに2分割した(図2)

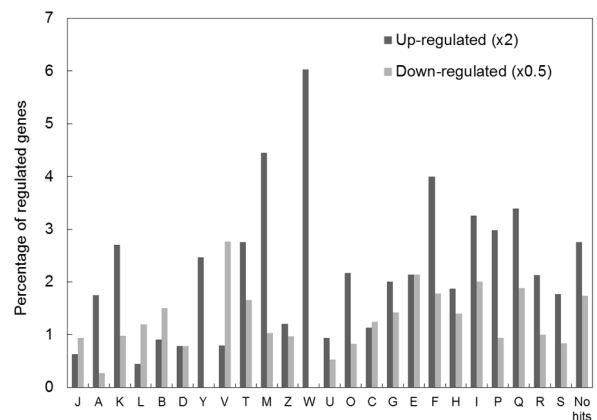


Figure 1 Functional classification according to euKaryotic Orthologous Groups (KOGs) database. Relative frequency of genes belonging to a category is given for 2 data sets: The expression of up-regulated genes (■) and down-regulated genes (▒) were more than two-fold and less than 1/2-fold nodules at 8 wpi compared to nodules at 2 wpi, respectively. J: translation, ribosomal structure and biogenesis, A: RNA processing and modification, K: transcription, L: replication, recombination and repair, B: chromatin structure and dynamics, D: cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, Y: nuclear structure, V: defense mechanisms, T: signal transduction mechanisms, M: cell wall/membrane/envelope biogenesis, Z: cytoskeleton, W: extracellular structures, U: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, O: posttranslational modification, protein turnover, chaperones. C: energy production and conversion, G: carbohydrate transport and metabolism, E: amino acid transport and metabolism, F: nucleotide transport and metabolism, H: coenzyme transport and metabolism, I: lipid transport and metabolism, P: inorganic ion transport and metabolism, Q: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, R: general function prediction only, S: function unknown, No hits. The data represents percentage of number of up- or down regulated genes in each KOGs per number of genes in each classified KOGs.

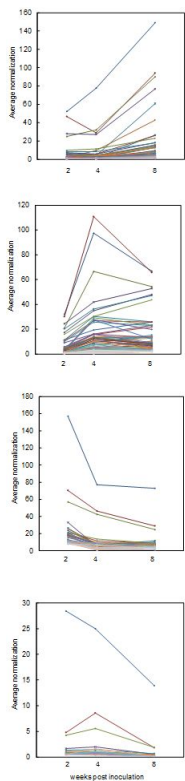


Figure 2 Expression profiles of genes differentially expressed during nodule senescence. The graphs show the expression patterns of significant genes for each cluster. The total number of genes in each cluster is indicated in parentheses. The data are expressed as average normalization and standard deviation (SD). The coefficient of variation (CV) is the percentage of the mean represented by the SD. The top twenty genes in 1 and 2 clusters and 3 and 4 clusters according to the expression pattern of 8 and 2 wpi are shown, respectively.

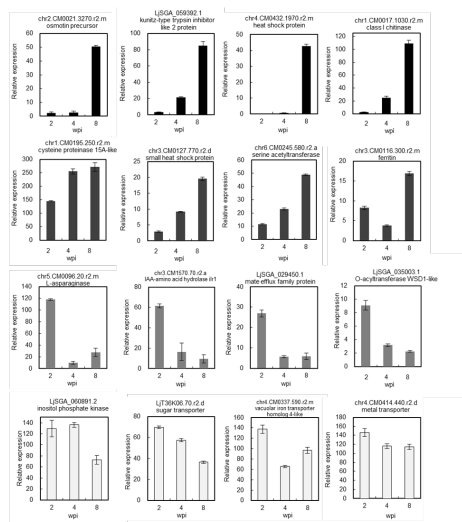


Figure 3 Comparison of relative expression levels in the microarray analysis with qRT-PCR. Representatives of genes in cluster 1 (■), cluster 2 (■), cluster 3 (■) and cluster 4 (■) during nodule development. The expression profile was normalized to ubiquitin. All of the data are shown as  $\pm$  SD. Wpi: weeks post inoculation

また、マイクロアレー解析の再現性は RT-PCR を行う事で確認した (図 3)。

以上の結果から、根粒老化により発現が誘導する遺伝子群の中にフェリチン遺伝子が存在した。qRT-PCR 解析によって発現変動を調べた結果、マイクロアレー解析と同様に老化によりその発現が誘導した (図 4)。

ICP-MS 解析により経時的に根粒内の鉄イオン濃度を測定した結果、感染後 2 週目にはその値が最大となりその後徐々に低下していることが明らかとなった (図 5)。

感染 8 週目には根粒内の全鉄含量が低下しているのは老化により根粒から他組織へ転流していることを示唆している。

老化時にはニトロゲナーゼやレグヘモグロビンタンパク質の分解が引き起こることが予想されるがこの時に放出される鉄イオンはそのまま細胞内に遊離するとフェントン反応により活性酸素が発生してしまう。そのため遊離した鉄イオンは一旦フェリチンタンパク質により取り込まれ鉄貯蔵タンパク質として蓄積していると推測した。フェリチンタンパク質遺伝子プロモーター領域を調べた結果、IDRS(iron-dependent regulatory sequence)が保存していることが明らかとなった。そこで鉄を含む溶液中で根粒を浸した結果、予想通りフェリチン遺伝子の発現が増加した。さらに NO の基質を添加し NO の発生を誘導してもフェリチン遺伝子発現が増加した (図 6)。

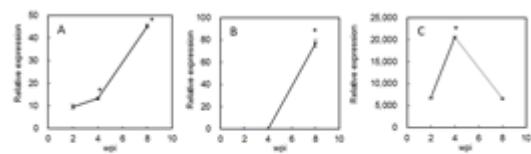


Fig. 4 Expression of leghemoglobin (a), and ferritin (b) genes during nodule development. Total RNA was isolated from nodules at 2, 4, 8 wpi, respectively. The amount of transcripts were estimated by quantitative real time RT-PCR. The expression was normalized to ubiquitin. Error bar indicates mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences ( $P < 0.01$ ) compared with M. loti-inoculated nodule at 2 wpi are indicated by asterisk.

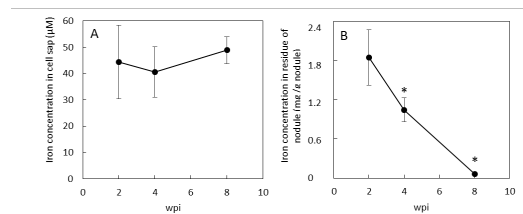


Fig. 5 Iron concentration of cell sap (A) and the residues (B) from the nodules at 2, 4, and 8 wpi by ICP-MS. Error bar indicates mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) compared with M. loti-inoculated nodule at 2 wpi are indicated by asterisk.

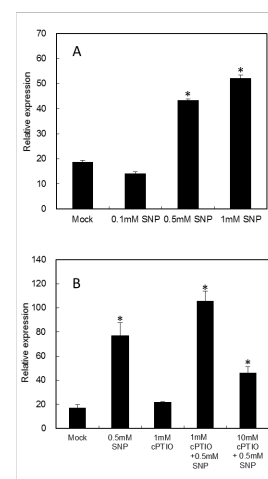


Fig. 6. Expression of ferritin gene treated with a various concentration of SNP (A) and with or without cPTIO (B). Mock represents control treated with distilled water. The amount of transcripts were estimated by means of quantitative real-time RT-PCR normalized to ubiquitin transcripts. Error bar indicates mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences ( $P < 0.01$ ) compared with the distilled water are indicated by asterisk.

以上の結果から、根粒老化時には遊離した鉄イオンはNOの発生を誘導し、そのシグナルを介してIDRSに結合している因子を分解後、フェリチン遺伝子の発現を増加させていると考えた。

#### 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 3 件)

1. Ohtsu, N, Ichida, S, Yamaya, H, Ohwada, T, Itakura, M, Hara, Y, Mitsui, H, Kaneko, T, Tejima, K, Tabata, S, Saeki, K, Omori, H, Hayashi, M, Maekawa, T, Murooka, Y, Tajima, S, Simomura, K, Agarie-Nomura, M, Uchiumi, T, Suzuki, A, Shimoda, Y, Abe, M, Minamisawa, K, Arima, Y, Yokoyama, T. (2015) Peribacteroid solution of soybean root nodules partly induces genomic loci for differentiation into bacteroids of free-living *Bradyrhizobium japonicum* cells, *Soil Science and Plant Nutrition*, 61, (3) 461-470
2. Chungopast, S., Hirakawa, H., Sato, S., Handa, Y., Saito, K., Kawaguchi, M., Tajima, S., Nomura, M. (2014) Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis. **Plant Biotechnology**, 31: 345-349.  
<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.1021a>
3. Chungopast, S., Thapanapongworakul, P., Matsuura, H., Dao, T.V., Asahi, T., Tada, K., Tajima, S., and Nomura, M (2014) Glutamine synthetase I-deficiency in *Mesorhizobium loti* differentially affects nodule development and activity in *Lotus japonicus*, *Journal of Plant Physiology*, 171, 104-108.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Expression of ferritin in *Lotus japonicus* nodule, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2015年12月, 愛媛 Chungopast Sirinapa, Mallika Duangkhet, Jian Feng Ma, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura
2. Effect of MYB transcription factor during nodule development in *Lotus japonicus*, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2015年12月, 愛媛 Supriadi, Rahayu Widyastuti, Dwi Andreas Santosa, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura
3. 根粒老化時に発現するフェリチンタンパク質はNOによって誘導する, 植物微生物研究会, 2015年9月, つくば 野村美加, Sirinapa

Chungopast, 田島茂行

4. Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis., 3<sup>rd</sup> Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation 40, Oct. 28-30 China, 2014 Chungopast, S., Hirakawa, H., Sato, S., Handa, Y., Saito, K., Kawaguchi, M., Tajima, S., Nomura, M.
5. ミヤコグサ Qa-SNARE 遺伝子 Syn1 の根粒形成および種子形成への関与, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月, 香川 十川蒼, 小澤拓也, 山崎大樹, 三好貴紘, 京正晴, 田島茂行, 野村美加
6. Genetic screening and prediction of genes function involved in nodule senescence in the *L. japonicus* and *M. loti* symbiosis, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月11,12日, 香川 S. Chungopast, H. Hirakawa, S. Sato, Y. Handa, K. Saito, M. Kawaguchi, S.Tajima, M. Nomura
7. ミヤコグサ根粒誘導性シスエレメントの同定及びその機能解析, 日本土壌肥料学会 関西支部講演会, 2014年12月, 香川 三田村梨帆, 森毅, 多田安臣, 山本義治, 佐藤修正, 半田佳宏, 齋藤勝晴, 川口正代司, 田島茂行, 野村美加

〔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:  
出願年月日:  
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  
野村 美加 (NOMURA, Mika)  
香川大学・農学部・教授

研究者番号: 50294749

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：