

根粒形成における感染シグナル伝達系の解析

Analysis of infection signaling system in the nodulation

川村 景子¹, 手呂内 伸之²

¹大妻女子大学大学院人間文化研究科人間生活科学専攻, ²大妻女子大学短期大学部家政科

Keiko Kawamura¹ and Nobuyuki Terouchi²

¹Studies in Human Life Sciences, Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

²Junior College Division, Department of Domestic Science, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：サイトカイニン, Nod ファクターシグナル伝達系, 根粒形成

Key words : Cytokinin, Nod factor signaling, Nodulation

抄録

【目的】マメ科植物における根粒形成過程において、植物ホルモンであるサイトカイニンが根粒形成(nodulation; Nod)ファクター伝達系に關与するとの報告は少数あるが、感染に伴うサイトカイニン合成の変化や合成されたサイトカイニンの受容に關する知見はほとんどない。本研究では、これらについて明らかにすることを目的とする。【方法】サイトカイニン合成遺伝子(IPT)とサイトカイニン受容体遺伝子(LHK1)の根粒菌感染に伴う発現の変化を RT-PCR 法で分析した。【結果】サイトカイニン合成系の最初期の遺伝子である IPT の感染に伴う発現の経時的変化では、感染後 1 分で最大の発現が見られ、IPT が根粒菌の感染によって活性化することが初めて見出された。次いで、サイトカイニン受容体遺伝子である LHK1 については、感染後 30 分で最大の発現が見られた。【考察】根粒菌の感染において宿主マメ科植物でサイトカイニン合成に關する遺伝子群が重要な働きをする可能性があることが考察される。また、受容体の遺伝子である LHK1 についても、感染に伴う発現の経時的変化の分析により、根粒菌が宿主植物に感染してサイトカイニンが合成・蓄積に要する時間が 30 分ほどかかることが示唆された。

1. 序論

植物の共生で、最もよく研究されているのが、マメ科植物と土壤細菌の根粒菌との関係である。植物には、微生物に対する綿密な防御機構が発達していて、病原菌や病原ウイルスの侵入を検知し、排除するしくみがある。一方で自然界には特定の微生物と共生するものもいる。その中で最もよく研究されているのが、マメ科植物と土壤細菌である根粒菌の関係である。マメ科植物は根粒菌に感染すると根粒と呼ばれる構造体を形成して、根粒菌は空気中の窒素をアンモニウム塩に固定するという、いわゆる窒素固定を行う。植物はその固定されたものを窒素源として生育に利用する。一方、根粒菌は植物から栄養源として有機化合物を受け取る。また、このような根粒菌とマメ科植物の共生関係には宿主特異性があることが知られている。

根粒菌は、単独で土壤中に生息するときには窒素固定能を示すことはなく、マメ科植物との共生によって形態を変化させ、バクテロイドという形状になり、窒素固定に關係する酵素であるニトロゲナーゼ系を発現することが知られている。

本研究では、マメ科植物の中でもミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いた。ミヤコグサは、同じマメ科植物であるエンドウやダイズなどに比べ、ゲノムサイズが約 450Mbp と小さく、遺伝解析が行いやすいことや形質転換をする系も確立していることから、同じような性質を持つダルマウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) とともにマメ科のモデル植物として注目されている。

根粒形成までの過程としては次のようなものが知られている。マメ科植物において、特異的なフ

ラボノイドが根から分泌される¹⁾。それを根粒菌は受容すると根粒形成(nodulation; Nod)ファクターを合成・分泌し、植物に働きかけを行う。この Nod ファクターに対する応答には次の様なものが知られている。まず 1 分以内に根毛細胞の細胞膜の脱分極が起きる。Nod ファクターを感受してから 5 分ほどで、根毛の基部の核領域でカルシウム濃度が周期的に変化する現象であるカルシウムスパイクングがみられる^{2,3)}。さらに、15 分ほどで根毛伸長領域において細胞骨格であるアクチンの脱重合が始まり、根毛の先端に集積する。これらの表現型マーカーの時系列に沿って Nod ファクターの情報伝達系モデルが最近、示されている⁴⁾。

Tirichine らはミヤコグサ菌の感染がないにもかかわらず、ミヤコグサの根粒様構造体を形成する自然突然変異体を分析したところ、植物ホルモンであるサイトカイニンの受容体遺伝子 *LHK1* の過剰発現が関係していることを見出した。それによると、*LHK1* がこの情報伝達系に組み込まれ、この突然変異体は *LHK1* の恒常的な発現によって、下流の遺伝子 *NIN* の活性化を誘導して最終的に根粒様構造体を形成すると考察している。このようにサイトカイニンが根粒形成に関与することは徐々に明らかになってきたが、根粒菌感染に伴ったサイトカイニン合成、蓄積やそれに関する遺伝子についての研究や合成したサイトカイニンを受容する機構の詳細については、未だ知見がほとんど得られていない。本研究では、サイトカイニンに関するこれら未解明である問題を解決するため、以下の研究を進めた。①根粒菌の感染に伴う宿主マメ科植物でのサイトカイニン合成遺伝子

(*Isopentenyltransferase*: *IPT*) の発現の経時的な測定と②合成したサイトカイニンを受容する *LHK1* の感染に伴う発現の経時的な測定を行った。

2. 研究材料と方法

植物としてはミヤコグサ (*Lotus japonicus* var *Miyakojima* G-20)、根粒菌としてはミヤコグサ菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF 303099) を用いた。

実験方法としては、まずミヤコグサの種子を 2% (w/v) 次亜塩素酸溶液で滅菌し 0.7% (w/v) 水寒天培地に置き、26°C、暗黒下で人工気象器にて 3 日間、静置した。発芽後 3 日目のミヤコグサの芽生えを窒素フリーの 1.3% (w/v) B&D 滅菌寒天培地に移し替え 7 日間、静置して培養した。またミヤコグサ菌を 48 時間 TY 液体培地で培養して増殖さ

せた。培養したミヤコグサの根毛に希釈したミヤコグサ菌 (1×10^7 /ml) を 100 μ l 滴下、感染させた。その後、ミヤコグサ菌をミヤコグサに感染させ一定時間ごとに、その 0.1 g を液体窒素で凍結・破碎し RNA 抽出キットで Total RNA を抽出した。抽出した RNA を c-DNA 合成キットおよびサーマルサイクラーを用いて、c-DNA を合成した。合成した c-DNA 濃度はフロオロメーターを用いて測定した。合成した各 c-DNA を希釈し、感染後の *IPT*, *LHK1* 遺伝子の発現の経時的変化を調べた。PCR 終了後、3% (w/v) アガロースゲルを用い、電気泳動を行った。電気泳動後、SYBER Green 溶液で染色し、トランスイルミネーターを用いて観察した。

3. 結果

i) サイトカイニン合成遺伝子 (*IPT*) の発現

3% (w/v) アガロースゲルで電気泳動にかけ RT-PCR 法にて根粒菌感染後の *IPT* における発現の経時的変化を見た。感染後、1 分から 360 分までの *IPT* 遺伝子の発現変化を調べた。その結果、感染後 1 分のバンドが一番濃く、時間とともに薄くなっていることが観察された。RT-PCR 法を用いた測定より、*IPT* 遺伝子の発現は感染後 1 分前後にピークがあると推測できる。

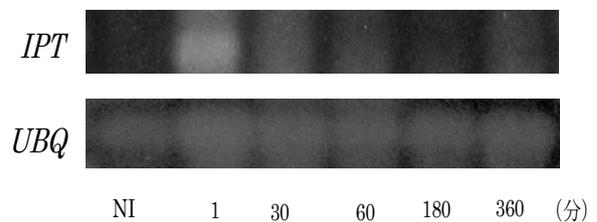


図 1. *IPT* の mRNA 発現の時間経過による観察

NI; Not infection

UBQ; Ubiquitin

ii) サイトカイニン受容体遺伝子 (*LHK1*) の発現
感染による *LHK1* 遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法で分析した。ミヤコグサ菌を感染させ 1 分、30 分、60 分、180 分、360 分後について発現を調べた。その結果、30 分が最も濃く観察された (図 2)。1 分から 30 分にかけて濃くなり、180 分、360 分と経過するに従って、濃さが減少した。

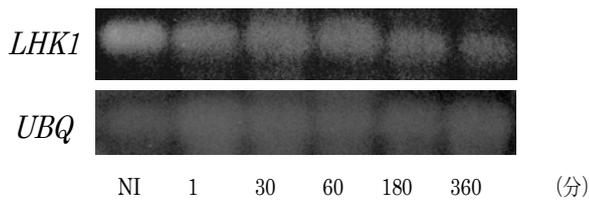


図 2. *LHK1* の発現の時間経過による観察
NI; not infection
UBQ; ubiquitin

4. 考察

本研究では、根粒形成における初期感染過程での根粒菌感染による関連遺伝子と考えられるサイトカイニン合成遺伝子 (IPT 遺伝子) と受容体遺伝子 (*LHK1* 遺伝子) の発現について分析した。サイトカイニンは植物の様々な生理作用 (細胞分裂やシュート誘導など) に関係することが知られている。このようなサイトカイニンであるが、最近では根粒形成に関与しているという報告が少数であるがされている⁵⁾。宿主マメ科植物が分泌するフラボノイドを根粒菌は受容すると Nod ファクターを合成し、分泌する。この Nod ファクターに宿主植物が応答してイオンの流入、カルシウムスパイク、根毛の変形、感染糸形成などの現象と結びつく Nod ファクターシグナリングモデルが提唱されている。このシグナル伝達機構にサイトカイニン受容体である *LHK1* が含まれ、根粒形成の一端を担っているというものである。このように、サイトカイニンの根粒形成過程への関与が推測されているが、根粒菌の感染に伴う合成・蓄積について、あるいは合成されると考えられるサイトカイニンの受容が感染後、いつ起こるのかなどについては全く知見が得られていない。

本研究においては、これら 2 点について解明することが目的である。まず、感染に伴うサイトカイニン合成について、サイトカイニン合成の初発遺伝子である IPT 遺伝子の発現を感染に伴う経時変化から分析した。その結果、感染後 1 分で発現のピークが見られた。この早い反応時間は Nod ファクターの初期応答においては、細胞内のアルカリ化が Nod ファクターを感知して、数十秒で起きる^{6,7)}ことが知られているので、それに次いでこの現象が誘導されると考えられる。この IPT 遺伝子が根粒菌の感染によって活性化することが、初めて本研究で見出されたことにより、根粒形成においてサイトカイニン合成に関するシグナル伝達

系も重要な働きをする可能性があることが考察される。次いで、根粒菌の感染に伴って合成されるサイトカイニンを受容するサイトカイニン受容体遺伝子である *LHK1* 遺伝子について、感染に伴う発現の経時変化を分析した。その結果、感染後 30 分で発現のピークが見られた。これについては、次のように考える。根粒菌が感染して分泌する Nod ファクターが宿主植物の持つ受容体 *NFR1*, *NFR5* に接着して、Nod ファクターシグナリング系を開始する。そして、細胞内の脱分極が起こり、細胞内のアルカリ化が生じ、その後 IPT 遺伝子が活性する。IPT が合成され、サイトカイニン合成が開始し、最終的にサイトカイニンである *trans Zeatin* が作られていく。*LHK1* 遺伝子の発現が 30 分で最大になる理由としては、IPT の触媒作用で *trans Zeatin* 前駆体 (N6-isopentenyl adenine ribotide: *iPRPs*) が形成され、そこからさらに *CYP735A* 遺伝子が働いて、最終的には *trans Zeatin* が作られていくことが現在考えられている^{8,9)}ので、サイトカイニンを合成・蓄積するのに 30 分程度かかるためではないかと推測している。

今後、根粒菌の感染によって IPT 遺伝子が働いて、合成されるサイトカイニン量を定量することで、感染に伴う合成・蓄積量を調べたいと考えている。

5. 主要参考文献

- [1] J A Zuanazzi, et al (1998) Production of Sinorhizobium meliloti nod gene activator and repressor flavonoids from Medicago sativa roots. M.PMI 11,784-794
- [2] Spaik HP (1996) Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. Critical Review in Plant Sciences 15,559-582
- [3] Shaw SL, et al (2003) Nod factor elicits two separable calcium responses in Medicago truncatula root hair cells. Plant Physiol.131, 976-984
- [4] Cárdenas L, et al (2003) The role of Nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in Phaseolus vulgaris. Mol. Plant -Microbe Interact. 16, 326-334
- [5] Tirichine L, et al (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. Science 315,104-107
- [6] Felle HH, et al (1996) Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial

lipochitooligosaccharide signals. *Plant J.* 10, 295-301
[7] Felle HH, et al (2000) How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol.* 124, 1373-1380
[8] Takei K, et al (2004) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1053 -1062
[9] Takei K, et al (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and

CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin *J. Biol. Chem.* 279: 41866-41872

6. 付記

本研究は、平成 26 年 6 月 1 日付で大妻女子大学人間生活文化研究所大学院生研究助成 (A) (DA2608) により研究助成を受け行った。

Abstract

Rhizobium form root nodule in the host legume. Phytohormone cytokinin is reported to be involved in the nodulation (Nod) factor signal transduction. In this study, expression of *IPT* concerning cytokinin synthesis was researched time-dependent change in the inoculation of Rhizobium. The analysis showed that a peak of expression appeared at one minute after infection. Then, a peak of expression was observed at 30 minutes after infection in cytokinin receptor gene *LHK1*. Therefore, it is likely to be a important role signaling system about cytokinin synthesis in nodule formation is discussed.

(受付日 : 2015 年 7 月 6 日, 受理日 : 2015 年 7 月 29 日)

川村 景子 (かわむら けいこ)

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了.