

植物の組織特異的な発現における最適な組織固定の探究

Exploration of optimal tissue fixation method for tissue-specific expression of plants

手呂内 伸之¹

¹大妻女子大学 人間文化研究科 人間生活科学専攻

Nobuyuki Terouchi¹

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

キーワード：根粒菌，組織固定，in situ

Key words : in situ, Rhizobia, Tissue Fixation

抄録

根粒菌は宿主マメ科植物に感染し根粒を形成し，窒素固定を行う．この根粒形成には植物ホルモンが関与することが近年，研究されてきている．特にその中でサイトカイニンの情報伝達系が根粒形成機構に関係していることが示されている．本研究はサイトカイニン情報伝達系遺伝子の根粒菌の感染に伴うマメ科植物における組織特異的な発現の研究のための最適な組織固定法の探究することが目的である．

1. はじめに

根粒菌は宿主マメ科植物の根毛に感染し，その後形成される感染糸中を通して皮層細胞まで侵入していき，形状をバクテロイドに変化させて窒素固定を行う．それと同時に皮層細胞が分裂を繰り返して根粒を形成していく．このバクテロイドで合成された窒素分は宿主植物に供給され，根粒菌は宿主植物から栄養分として炭素化合物を受け取るという共生システムを構築している．この根粒形成に植物ホルモンであるサイトカイニンが関係していることが近年報告されている．Trichine らは宿主植物において，植物ホルモンとして知られているサイトカイニン情報伝達系の遺伝子の一つであるサイトカイニン受容体遺伝子 (*LHK1*) の突然変異体が根粒菌を感染させなくても根粒様構造体を形成することを見いだした¹⁾．これはサイトカイニンの情報伝達系が根粒形成機構に関与していることを初めて考察したものである．さらにこのサイトカイニン合成遺伝子の一つである *IPT* について感染に伴う宿主植物での発現の経時的な変化についても新たな解析が行われて来た．*IPT* はメバロン酸経路と非メバロン酸経路から供給される dimethylallyl diphosphate (DMAPP) と ATP

や ADP (AMP) を基質として植物のサイトカイニンとして知られている trans-zeatin (t-ZR) や N⁶-isopentenyladenin (iP) の前駆物質で N⁶-isopentenyladenosine Triphosphate (iP RTP) や -Diphosphate (iP RDP) を生合成する酵素である．*IPT* はこの最初の生合成の初発反応を担う酵素の遺伝子として近年報告されているものである²⁾．*IPT* が根粒菌の感染において，ごく初期の過程で発現が起こることを初めて示した^{3,4)}．また *LHK1* の感染に伴う発現量の経時変化を解析した^{3,4)}．

このようにサイトカイニンと根粒形成について研究がなされて来たがこれら遺伝子の細胞組織的な解析については未だ行われていない．本研究では宿主マメ科植物であるミヤコグサにおける根粒菌の感染に伴う細胞組織的なサイトカイニン遺伝子 (*IPT*) の発現を調べる前段階としてまず，最適な組織固定法を探究した．

2. 方法

2.1. 植物と菌の準備

ミヤコグサの種子を滅菌溶液 (2% (v/v) 次亜塩素酸, 0.02% (v/v) Tween20) で滅菌した．滅菌した

種子を 0.7%(w/v)水寒天培地で 3 日間培養した (26℃, 暗期下). 次いで発芽した種子を B&D 寒天培地 (1.3% (w/v)) に移植し, 7 日間培養した (26℃, 16h 明期/8h 暗期).

根粒菌はミヤコグサ菌(*Mesorhizobium loti* MAFF 303099)を使用した. 根粒菌は TY 液体培地で 2 日間, 振とう培養した (160 rpm, 28℃).

2.2. 根粒菌による感染実験

培養したミヤコグサ菌を B&D 培地に移植したミヤコグサに 1×10^7 /ml で感染させた.

2.3. 組織の固定

次の固定液を使用し, 感染したミヤコグサの根毛を固定した.

- ①2.5%(v/v) グルタルアルデヒド溶液
- ②G-Fix
- ③FAA(Formalin Acetic acid Alcohol)

2.4. パラフィン包埋

固定したミヤコグサの根毛をエチルアルコールシリーズにて脱水を行った. 次いで G-Nox (Genostaff)を用いて置換を行った. 60℃で溶融させたパラフィン中に試料を浸透させたパラフィンブロックを作成した.

2.5 薄切

パラフィンブロックを回転式マイクロトーム (YAMATO) で 5 μ m の厚さで薄切して切片を作成した.

2.6 プローブの設計

IPT-1 のプローブの設計をした.

2.7 プローブの調整

ミヤコグサの cDNA をもとにクローニングしたのち, *in vitro* transcription 法のもとジゴキシゲニンを標識 (DIG RNA Labeling Mix ; Roche Diagnostics) してプローブを作製した.

2.8 In situ hybridization (ISH)

ISH は ISH reagent kit (Genostaff)を用いて行った.

2.9 観察

切片を Kernechtrot stain solution (Muto Pure Chemicals)で染色し, G-Mount 封入剤(Genostaff)を使用してスライドガラス上に封入した. ZOE イメージャー(Bio-Rad)で観察を行った.

3. 結果と考察

作製した各 RNA プローブ (IPT-1, HK1-1, HK1-2) の品質を確認する目的で, 組成の異なる組織固定液 (2.5%GA, G-Fix, FAA) を使って作製したミヤコグサ根毛のパラフィン切片を使って ISH (Probe Validation) を行った. その結果, IPT-1 では 2.5%GA 固定サンプルの維管束にアンチセンスプローブ(AS) 特異的な発色が見られた(Fig 1). G-Fix 固定サンプルでも維管束に同様な発色が見られたがその発色強度はとても弱く(Fig 2), FAA 固定サンプルでは特異的と思われる発色はほとんど見られなかった(Fig 3).

以上より GA による固定が最も適するものと考えられ, 今後の実験に使用する.

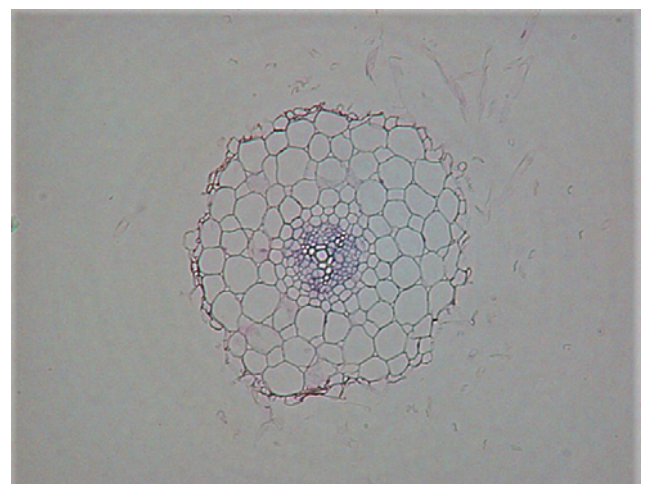


Fig. 1 2.5% GA で固定したミヤコグサ根の切片 (AS) $\times 100$

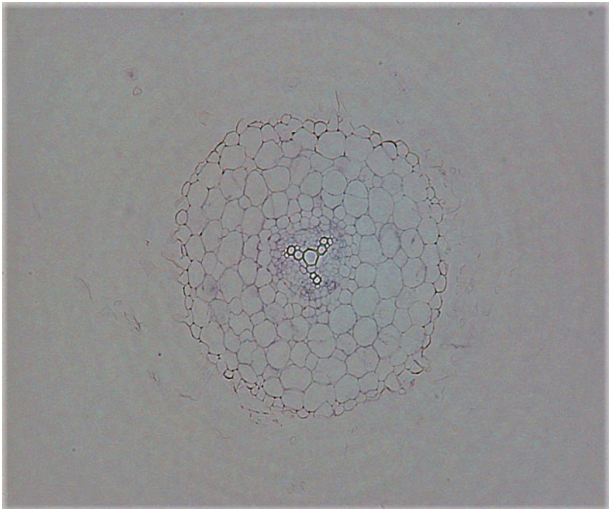


Fig. 2 G-Fix で固定したミヤコグサ根の切片(AS) ×100

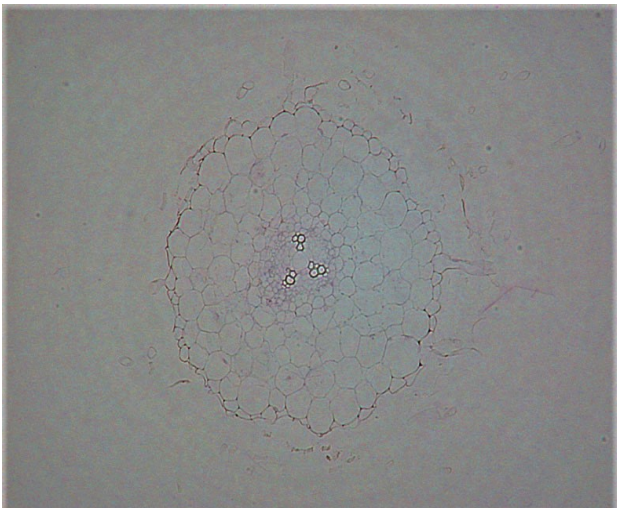


Fig. 3 FAA で固定したミヤコグサ根の切片(AS) ×100

謝辞

研究で用いたミヤコグサ菌(*Mesorhizobium loti* MAFF303099) は鹿児島大学大学院 理学系研究科 内海 俊樹博士より提供を受けた。ここに謹んでお礼を申し上げる。

付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究費 (S2937) の補助を受けたものである。

引用文献

- 1) Tirichine L, et al. (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315,104-107.
- 2) Takei K, et al. (2004) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1053 -1062
- 3) Terouchi N, et al. (2015) Analysis of expression of cytokinin genes by *Rhizobium* inoculation. *Int J Hum Cult Stud* 25: 136-138
- 4) Kawamura K, et al. (2016) Analysis of infection signaling system in the nodulation. *Int J Hum Cult Stud* 26: 103-110

Abstract

Rhizobium is infected with host legume plants and forms nodules, and nitrogen fixing is performed. In recent years, it has been studied that nodule formation involves plant hormones. In particular, the cytokinin signaling system is shown to be involved in the nodulation mechanism. This study aims to explore the optimal tissue fixation method for the study of tissue specific expression of cytokinin signaling genes in legume plants infected *Rhizobium*.

(受付日：2018年2月5日，受理日：2018年2月14日)

手呂内 伸之 (てろうち のぶゆき)

現職：大妻女子大学大学院人間文化研究科教授

東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。(博士<理学>)

専門は植物生理学。現在は植物と微生物の相互関係を研究している