

根粒形成シグナル伝達系遺伝子*SymRK*の経時的な発現の解析

Analysis of temporal expression of *SymRK* on infection signaling system in the nodulation

手呂内 伸之^{1,2}, 田垣 奈緒³, 細谷 夏実^{1,3}

¹大妻女子大学大学院人間文化研究科, ²大妻女子大学短期大学部家政科,
³大妻女子大学社会情報学部

Nobuyuki Terouchi^{1,2}, Nao Tagaki³, and Natsumi Hosoya^{1,3}

¹Studies in Human Life Sciences, Graduate School of Studies in Human Culture,
Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8357 Japan

²Department of Domestic Science, Otsuma Women's University Junior College Division

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8357 Japan

³Faculty of Social Information Studies, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8357 Japan

キーワード：根粒, Nodファクターシグナル伝達系, *SymRK*

Key words : Nodulation, Nod Factor Signaling, *SymRK*

抄録

根粒菌は宿主マメ科植物が分泌するフラボノイドを受容すると Nod (Nodulation ; 根粒形成) 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根粒形成シグナル伝達系モデルが提唱されている。本研究では、初期感染過程での根粒形成における関連遺伝子と考えられる *SymRK* の発現について、根粒菌の感染に伴う経時変化を分析した。その結果、*SymRK* は感染後 5 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、Nod ファクターに反応して、数十秒で細胞内のアルカリ化が起こり、次いでサイトカイニン合成遺伝子の活性化が感染後 1 分程度でおこるので、この現象はその後、誘導されると考えられた。

1. はじめに

植物は微生物に対する防御機構を発達させ環境ストレスから免れている。その機構の中には共生と呼ばれるストレスを逆に積極的に利用して特定の微生物と宿主植物間で栄養的に利害が一致する仕組みが知られている。共生で最も研究されているのが、マメ科植物と土壌細菌である根粒菌との相互関係である。これは根粒菌がマメ科植物の根に感染することで、根粒を形成し、空気中の窒素を固定し、アンモニウム塩を形成して植物へ供給する。一方、植物は根粒菌に炭素化合物を栄養源として供給する。根粒菌はマメ科植物に感染すると形態を変化させてバクテロイドになり、窒素固定に関与するニトロゲナーゼ系遺伝子群を発現する。また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。

近年、根粒形成機構について様々な興味深い研究が行われてきた。その中で根粒菌が宿主マメ科植物に感染して根粒形成に至るまでの根粒形成シグナル伝達系についての研究がされてきた。この系は宿主植物から分泌されるフラボノイドに根粒菌が応答して Nod ファクターの分泌から始まるものである。Nod ファクターは宿主植物に働き、植物の持つ根粒形成遺伝子が次々に活性化していき最終的に根粒を形成するものである。この系の中にはまた、根粒菌と、リン分や水を植物に供給するアーバスキュラ菌根菌 (AM 菌) の双方に共通する共生遺伝子の存在も知られている。この遺伝子はマメ科植物であるミヤコグサからは *SymRK*, *Caster*, *Pollex*, *Nap85*, *Nap133*, *CCaMK* の 6

つが同定されていて機能解析が行われてきた^[1,2]. さらにこの根粒形成シグナル伝達系において植物ホルモン関連遺伝子も関与していることが報告されている. Tirichine らは根粒菌感染なしでミヤコグサに根粒様構造体を形成する突然変異体を調べたところ, 植物ホルモンの一つであるサイトカイニンの受容体遺伝子 (*LHK1*) が過剰発現していることを明らかにした^[3]. これを受けて Kawamura らはサイトカイニン合成遺伝子 (*IPT*) の感染経時的な発現量を解析したところ感染の最初期で発現のピークが見られることが判明し, この系の一部を担っていることを初めて明らかにした^[4]. また受容体遺伝子 *LHK1* の感染経時的な発現についても研究されている^[5]. このような根粒形成シグナル伝達系の遺伝子における感染経時的な発現解析は現在, *IPT* と *LHK1* しか行われていない (図 1).

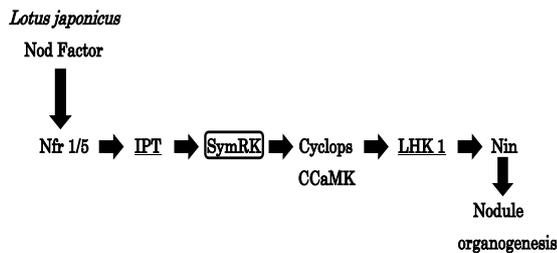


図 1. 根粒形成初期の Nod ファクターシグナル伝達系のモデル

そこで本研究では, 遺伝子の経時的な発現について研究がほとんどされていない, 初期感染シグナル伝達系でみられる一過性のカルシウム変動 (カルシウムスパイク) に関する *SymRK* の発現について解析を行なった.

2. 方法

2.1. 材料

植物: ミヤコグサ (*Lotus japonicus* var Miyakojima G-20)

根粒菌: ミヤコグサ菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF 303099)

2.2. 方法

i) 種子の滅菌

ミヤコグサの種子をサンドペーパー (#100) で摩砕した. 次いで, これらを 90% (w/v) エチルア

ルコールの入ったチューブ中に入れ, 1 分間ボルテックスし, 5ml の滅菌溶液 (2% (v/v) 次亜塩酸ナトリウム, 0.02% (v/v) tween20) の入ったチューブに種子を移し, 1 分間, ボルテックスした後, シューカー (SI-36: TAITEC) で 10 分間振とうした. 滅菌水 (DDW) を用いて洗浄した. 次いで, シューカーで 1 時間, 振とうして滅菌水で再度洗浄した. この作業を 2 回繰り返した.

ii) 種子の播種

滅菌した種子を水寒天プレート (0.7% (w/v)・9cm シャーレ) 上に均等に播き, 26°C, 暗黒下で人工気象器 (LH-100RD: 日本医科学) 中に 3 日間, 静置した.

iii) 植物体の培養

発芽後 3 日目のミヤコグサの芽生えを B&D 滅菌寒天培地 (1.3% (w/v)) の入った角形 2 号シャーレ (EIKEN) 上に均等に 10 個ずつ並べ, 角シャーレの上部の一部をサージカルテープ (Microdore™, 3M), その周囲をビニールテープで覆い静置した. これを人工気象器 (26°C, 16 時間・明期: 58.8 μmol m⁻²s⁻¹, 8 時間, 暗期) 中に 7 日間, 立てて静置して培養した.

iv) 根粒菌の感染

継代培養したミヤコグサ菌を 2ml の YE 液体培地の入った 15ml チューブ中に少量入れ, 2 日間, 振とう培養した (28°C, 160rpm). 振とう培養したミヤコグサ菌の吸光度を測定し, 1×10⁷/ml になるように DDW で希釈した. そして, 7 日間, 培養したミヤコグサの根毛に希釈したミヤコグサ菌を 100 μl 滴下, 感染させた.

v) Total RNA の抽出法

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 0.1g を液体窒素で凍結させ, 破碎した (SK ミル: Tokken, Inc). RNA 抽出キット (Xprep plant RNAmix kit: Aplus) を使用して, 破碎した試料から RNA を抽出した. RNA を抽出後, 各試料の濃度を測定した (Nano Drop1000: Thermo SCIENTIFIC).

vi) c-DNA 合成

抽出した RNA を c-DNA 合成キット (High

capacity c-DNA reverse transcript kit: Applied Biosystems) を用い、サーマルサークル (TP500: Takara) を用いて、下記の条件 (表 1) で c-DNA を合成した. 合成した c-DNA 濃度をフロオロメーター (Quantus: Promega) で測定した.

表 1. c-DNA の合成条件

Step1	Step2	Step3
37°C	95°C	4°C
60min	5min	∞

vii) *SymRK* の発現の経時的変化の解析 (RT-PCR)
合成した各 c-DNA を 50ng/ml に滅菌水で希釈した. サーマルサークルを用いて、RT-PCR を行った (表 2). PCR 終了後、アガロースゲル (3%(w/v): Agarose21, NIPPON GENE) を用い、電気泳動 (500mA, 100V) を行なった. 電気泳動後、Syber Green I 溶液 (Promega) でゲルを染色した (30min). 次いで、トランスイルミネーター (302nm; MTN-1, Funakoshi) を用いて撮影した. なお、*SymRK* 遺伝子とコントロールとして用いた *UBQ*(Ubiquitin) 遺伝子のプライマーを用いて、RT-PCR を行った (表 3).

表 2. *SymRK* の RT-PCR 条件

Step1	Step2	Step3
98°C	64°C	72°C
10s	1min	1min

30cycle

SymRK プライマー

F: GGGTGCTCCCCTCAACTACA

R: TGGGTGAGACAAGGACTGTGTT

UBQ プライマー

F: TTATGGTTTATTTGGGCCTTTTATG

R: GCCAGAAGAGGCCACAACA

表 3. *UBQ* の RT-PCR 条件

Step1	Step2	Step3
98°C	50°C	72°C
10s	1min	1min

30cycle

3. 結果

RT-PCR 法にて根粒菌感染後の *SymRK* における発現の経時的な発現の変化を見た. その結果、感染後 5 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. (図 2 上). また、コントロールとして恒常的に発現する *UBQ* 遺伝子の発現を確認したところ、発現の変動の変化が見られなかった (図 2 下).

SymRK



UBQ



NI 1 5 10 20 30
(min)

図 2. *SymRK* の mRNA 発現量の時間経過による観察
ミヤコグサ菌感染後 1 分から 30 分まで *SymRK* の発現の変化を調べたもの (上).

コントロールとして *UBQ* の発現をみたもの (下). NI: Not infection

4. 考察

RT-PCR 法にて根粒菌感染後の発現の経時的変化を観察した. その結果、感染後 5 分の発現がピークとなり時間とともに下がっていくことが観察された.

カルシウムの一過性の変動であるカルシウムスパイクングに関しては、根粒菌感染のごく初期に見られることが報告されている. 本実験でそれと関係する *SymRK* の発現のピークが感染後 5 分で見られることから、この現象が初期に生じることを裏付けることになると考える. 今後、*SymRK* の遺伝子発現を定量化してより厳密に発現の解析をしたいと考えている.

謝辞

研究で使用した根粒菌 (*M. loti* MAFF303099) は鹿児島大学大学院理学系研究科 内海 俊樹教授より提供を受けたものである. ここに謹んでお礼を申し上げます.

付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究(S1925)の補助を受けたものである.

引用文献

- [1]Felle, H. H et al. Plant J. 1996, p.295-301.
[2]Felle, H. H et al. Plant J. 1998, 13, p.455-463.

[3] Tirichine L. et al. Science 2007, 315, p.104-107.

[5] Terouchi N. et al. Int J Hum Cult Stud, 2015, 25,

[4] Kawamura K. et al. Int J Hum Cult Stud, 2016, 26,
p.103-106.

p.136-138.

Abstract

When rhizobia accept flavonoids secreted by host legumes, they synthesize and secrete Nod factors. A nodule formation signal transduction model has been proposed in which the host plant responds to this Nod factor and is linked to phenomena such as ion influx, calcium spiking, root hair deformation, and infection thread formation. In this study, we analyzed the expression of *SymRK*, which is considered to be a related gene due to rhizobial infection during the initial infection process in nodule formation. As a result, the expression peak of *SymRK* was observed 5 minutes after infection. This fast reaction time is due to the fact that in the initial response of the Nod factor, intracellular alkalization reacts with the Nod factor and occurs in several tens of seconds, and then the activation of the cytokinin synthesis gene occurs in about 1 minute after infection. Activity of *SymRK* is thought to be induced after these processes.

(受付日：2020年10月21日，受理日：2020年11月9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人間生活科学専攻，短期大学部家政科家政専攻 教授

東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。

専門：植物と相互作用を行う微生物について研究を行っている。特に，根粒菌の初期感染過程について分子生物学的な解析を行っている。