

IPT (Isopentenyltransferase) の組織特異的な発現の解析

Analysis of tissue-specific expression of IPT (Isopentenyltransferase)

手呂内 伸之

大妻女子大学大学院人間文化研究科人間生活科学専攻

Nobuyuki Terouchi

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

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

キーワード：根粒菌, In situ ハイブリダイゼーション, IPT

Key words : Rhizobia, In situ hybridization, IPT

抄録

根粒菌は宿主マメ科植物に感染し、根粒という構造体を形成して、空気中の窒素を固定することが知られている。この根粒形成には根粒菌が分泌するNodファクターを植物が受容して、根粒形成シグナリング系が働いていく。この系の一つに植物ホルモンであるサイトカイニンが関与することが近年、研究されてきている。サイトカイニン合成系の遺伝子としてIPT(Isopentenyltransferase)がある。IPTは、サイトカイニン合成の初期に働く酵素であるが、感染後、1minで発現がピークになることが知られている。本研究では、このIPTの植物の根組織での組織学的な発現を調べた。その結果、根粒菌が感染して、1minから5min程度で維管束部に発現が認められた。合成されたサイトカイニンは、その後、皮層組織に移動して分裂誘導して根粒様構造体形成を誘導することが示唆される。

1. はじめに

根粒形成における感染シグナル経路について、近年様々な知見が得られている。この経路は根粒菌の宿主マメ科植物への感染が引き金となり、植物側の持つ根粒形成に関与する遺伝子が次々と発現していき、根粒形成シグナルを伝達していくことで、最終的に根に根粒形成を誘導する。根粒菌は感染に伴い宿主植物に対して特異的なNodファクターという最初のシグナルを分泌する。これは根粒菌の種類に特異的なリポキチンオリゴサッカライドである。このNodファクターを受容した宿主植物は次のような応答をする。1. 細胞膜の脱分極、2. カルシウムスパイクニング(カルシウムイオンの一過的な変動) 3. アクチンの脱重合と根毛細胞の変形、4. 前感染糸形成と根粒原基の形成 5. サイトカイニンの合成と蓄積、6. 初期の根粒特異的遺伝子(ノデュリン)の発現などである。これら表現型マーカーの時系列に従って対応するNodファクターのシグナリングの分子遺伝学的なモデルが近年、提

唱されて来ている¹⁾。このモデル系における遺伝子の経路ではいくつかの遺伝子が関与している。

この遺伝子的経路の研究において最近、植物ホルモンであるサイトカイニンが根粒形成における感染シグナル系の1つを担っていることが明確になった。それによると、サイトカイニン合成遺伝子の1つであるIPTが根粒菌の感染に伴いごく初期に発現が最大になることが判明した。また、サイトカイニン受容体遺伝子LHK1(Lotus histidine kinase 1)の発現についても感染初期に発現が最大であることが明らかにされた^{2,3)}。

これらサイトカイニン関連遺伝子の宿主マメ科植物に対する根粒菌感染に伴う、組織的な発現の解析を行うことで根粒形成におけるサイトカイニンの役割がより確かなものになると考えられる。そのために本研究では、IPTの組織的な発現について感染経時的な解析を行った。

2. 方法

2.1. 植物および菌の準備

ミヤコグサ(*Lotus japonicus* cv MIYAKOJIMA)を宿主植物と使用した。種子を滅菌溶液<2%(v/v)次亜塩素酸ナトリウム、0.02%(v/v)Tween20>にて滅菌した。滅菌種子を 0.7%(w/v)水寒天培地に播種し、発芽させ<26°C dark>。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°C, 16h 明期、8h 暗期>。

根粒菌はミヤコグサ菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF303099)を使用した。感染実験のためには、TY 液体培地で振とうさせ培養した<28°C、48h、160rpm>。

2.2. 根粒菌による感染

ミヤコグサ菌を培養したミヤコグサに 10⁷/ml に希釈して感染させた。

2.3. 組織の固定

2.5%(v/v)グルタルアルデヒド溶液を用いて根粒菌感染したミヤコグサの根の組織固定を行った。

2.4. パラフィンブロックの作成

固定が終了した植物体をエチルアルコールの各シリーズで脱水処理を行った。次いで、G-nox(Genostaff)を用いて、置換を行い、パラフィンを 60°C で溶解させ、中に試料を入れて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 (ヤマト工機) を使用して、5μm の厚さで切片にした。

2.6. プローブの設計

IPT のプローブを以下のように設計した。
Size:359

```
TGTGCCCTTTTGTCGTGGTCCTGGGTGGCATGTTCTT  
CCTTGCCACTGCTCTCTTCTTCCCTCAGCGACCGTGCC  
AAGGCTGAGCAGCAGGTGAACCAGCTGGTGATGCCTC  
CTGCATCCGTGAAAGTCTGAGGTGGTGCCGCTGGGAC  
AGCAATGAAGTGCAGTTTAGGTTGGGAGAGGTTCTCC  
AGCATCCTGGACCGGCAGGACGGTCCCAAAGCTTCCT  
GTGTAACACAGTTGGGTACCCACCCTCTTTGGCCT
```

```
GGGACCGCCAGGACTGAGTGGCCCTATCTTCAAGAAG  
AAGCCGCATCCTCAGTTAGCCTGGAAGGCTGTGTGTG  
CTGGAACCACTCAGTTGGACACAACCTCCAGCCCTGGC  
TGGGGACTGGAGGGCCAAGATAGAAGCCACCGTGCGAG  
CAGGGATTTGGGGAGATTCTGGCCTGCCCTTAGCTCA  
TATGATCTTGAGGGAGCCACTGCCGTCCCTCCTTCGAC  
AGTAGAAACAAGGAGCTGGAGCTTCCTCCATTGTGTG  
CCATGCAAGGCACACTC
```

2.7. プローブの調整

ミヤコグサの cDNA をもとに、クローニングを行った。その後、in vitro transcription 法を用いて、ジゴキシゲニンを標識して、プローブを作成した。

2.8. In situ ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは ISH Reagent Kit(Genostaff) を用いて行った。

組織切片を G-nox で脱パラフィン化した。さらに、エチルアルコールの各種で脱水を行った。切片は 10%NBF (10% Formalin in PBS) で固定した。PBS で洗浄して、3μg/ml proteinase K(Wako Pure Chemical Industries)で処理をした。次いで、PBS で洗浄して、10%NBF で再固定した。切片を 0.2N HCl 上に置き、次いで G-wash(Genostaff)で洗浄した。

ハイブリダイゼーションは、300ng/ml プローブを用いて行った (16h 60°C)。その後、切片を洗浄した (G-wash 10min 60°C、50% Formamide 10min 60°C)。さらに、洗浄をした (G-Wash 10min 60°C、0.1 × G-Wash 10min 60°C、TBST<0.1% Tween20 in TBS> 2回、室温)。

1 × G-Block(Genostaff) (15min 室温) で処理後、切片は、ジゴキシゲニン (anti-DIG AP conjugate; Roshe) <1:2000 dilute with 50 × G-Block in TBST> で処理を行った。

切片は TBST で洗浄し、次の溶液 (100mM NaCl、50mM MgCl₂、0.2M Tween20、100mM Tris-HCl、pH9.5) 上に置いた。

カラーリング反応は、NBT/BCIP(Sigma-Aldrich) 溶液で行った (overnight)。切片は Kernechtrot 染色溶液 (MUTO Pure Chemicals) で対比染色した。

切片は、封入剤 (G-mount<Genostaff>) で封入した。

2.9. 観察

封入した切片を明視野顕微鏡（Olympus BX53）で観察を行った。

3. 結果

IPT プローブを 2.5%(v/v)グルタルアルデヒドで根粒菌を感染させ、感染後の時間ごと（感染後 0min、0.5min、1min、5min）に固定したミヤコグサの根毛のパラフィン切片を使用して ISH を行った。

その結果、アンチセンスプローブ特異的な発現は、感染後 1min と 5min で見られた(図 1 と 2)。また、発現する部位（青色）は根の維管束部であることが観察された。

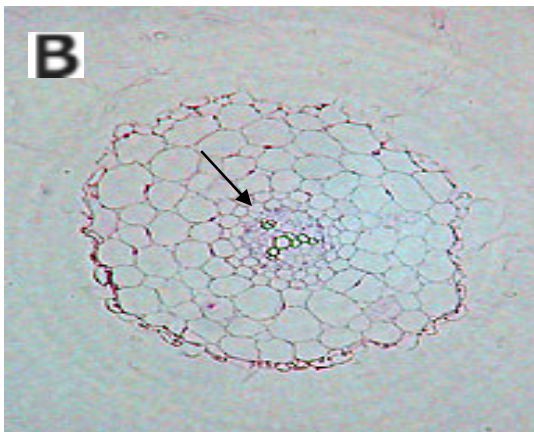
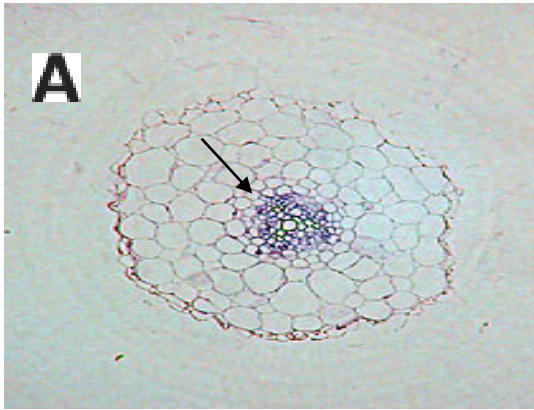


図 1. 感染後、1min の m-RNA 発現

A: Anti-sense B: Sense

矢印は維管束部分

×100

(撮影者；手呂内伸之 撮影年：2020年)

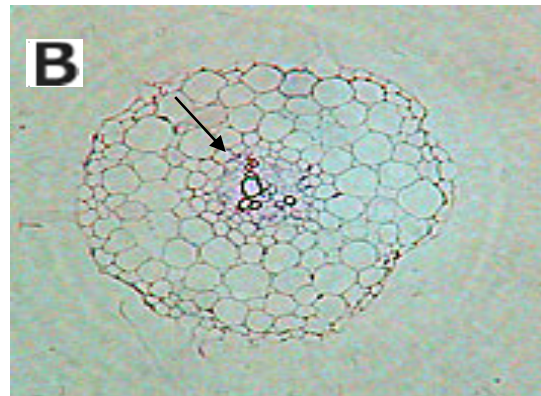
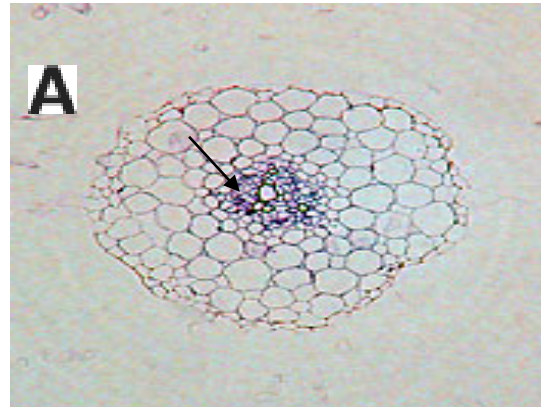


図 2. 感染後、5min の m-RNA

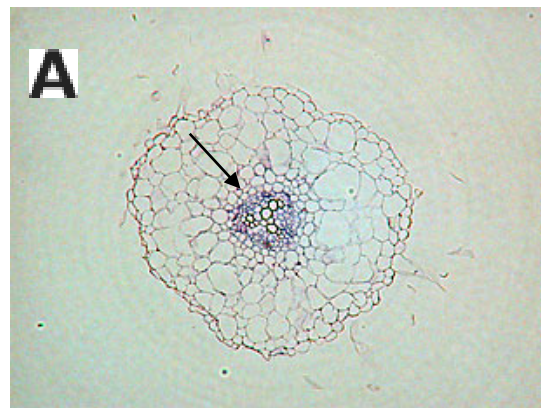
A: Anti-sense B: Sense

矢印は維管束部分

×100

(撮影者；手呂内伸之 撮影年：2020年)

また、感染直後（0min）と感染後、0.5min では発現が弱いことが観察された(図 3 と 4)。



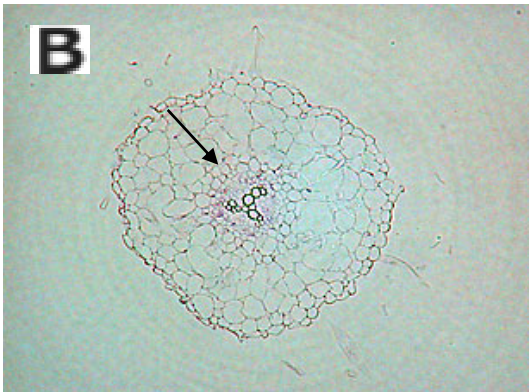


図3 感染直後(0min)の m-RNA 発現

A: Anti-sense B: Sense

矢印は維管束部

×100

(撮影者 ; 手呂内伸之 撮影年 : 2020 年)

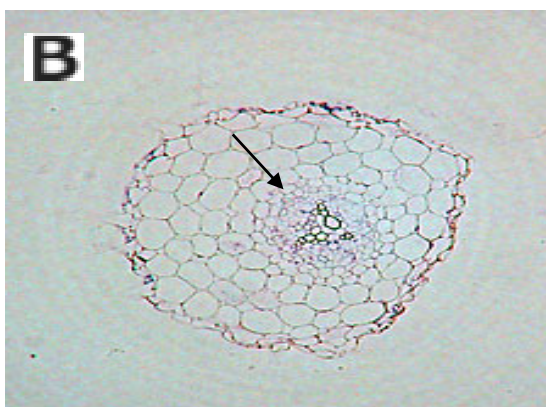
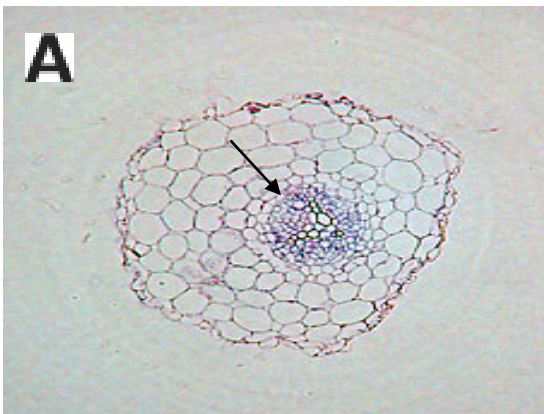


図4 感染後、0.5min の m-RNA 発現

A: Anti-sense B: Sense

矢印は維管束部

×100

(撮影者 ; 手呂内伸之 撮影年 : 2020 年)

4. 考察

サイトカイニンは、根粒形成における構造体の形成に関与することは明らかになっている。その中でサイトカイニン合成・蓄積について *IPT* の根粒菌感染後の経時的な発現を解析した研究で、発現量は感染後、1min で最大になることが報告されている。*IPT* は根粒菌の感染後、初期に活性化することが推測された^{2,3)}。

本研究では、*IPT* の組織的な発現の知見を得ることが目的である。その結果、感染後 1min から 5min で発現が見られたことにより、根でサイトカイニンが感染直後に合成が開始されることが推測される。また、根の維管束部分で特異的な発現が観察されることから、根粒菌の感染におけるサイトカイニン合成は次のように考えられる。

Nod ファクターが根粒菌から分泌され、根毛細胞にある NFR1/NFR5 受容体に結合し、根粒形成におけるシグナルが進んでいく。その後、根毛のカーリングや感染糸形成を生じ、皮層細胞の分裂をして根粒様構造体が形成される。根粒菌は感染糸を通して、皮層細胞に運ばれ、バクテロイドに形状変え、窒素固定を行う。

本研究では、根粒形成シグナル経路の 1 つと考えられる、サイトカイニン合成反応系に存在する、*IPT* の発現部位を解析した。根粒菌感染後の経時的な観察の結果、感染後 1min、5min で強い発現が維管束部で見られることにより (図 1, 2)、サイトカイニンは植物が根粒菌に感染して初期に、維管束部で合成が開始され、合成されたサイトカイニンが皮層細胞の分裂を誘導して、根粒様構造体を形成することが考えられる。その後、別の Nod ファクターシグナル系の NIN などが働いて感染糸形成し、根粒菌を皮層組織まで運んでいくのではないかと推測される。

今後は別のサイトカイニン関連遺伝子の感染に伴う組織的な発現について解析を行いたいと考えている。それにより、根粒形成におけるサイトカイニンの役割を鮮明にできると思われる。

謝辞

研究で使用した根粒菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF303099) は、鹿児島大学大学院 理学系研究科 内海俊樹博士から割譲されたものである。ここに謝意を申し上げたい。

引用文献

- 1) Trichine L, et al. A gain of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315, 2007, p104-107.
- 2) Terouchi N, et al. Analysis of expression of cytokinin genes by Rhizobium inoculation. *Int J Hum Cult Stud* 25. 2015, p136-138
- 3) Kawamura K, et al. Analysis of infection signaling system in the nodulation. *Int J. Hum Cult Stud* 26. 2016, p103-110

付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究費 (S20511)の補助を受けたものである。

Abstract

It is known that rhizobia infect host legumes and form a nodule, which fixes nitrogen in the air. In this nodule formation, the plant accepts the Nod factor secreted by the rhizobia, and the nodule formation signaling system works. In recent years, it has been studied that the plant hormone, cytokinin is involved in one of these systems. *IPT* (Isopentenyltransferase) is a gene of the cytokinin synthesis system. *IPT* is an enzyme that acts in the early stages of cytokinin synthesis. It is known that the gene expression peaks 1 min after infection.

In this study, I investigated the histological expression of *IPT* in plant root tissues. As a result, the expression was observed in the vascular bundle in about 1 to 5 minutes after infection. It is suggested that the synthesized cytokinin then migrates to the cortical layer tissue and induces division to induce nodule-like structure formation.

(受付日：2021年11月24日，受理日：2022年1月20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