

# 根粒菌感染に伴うサイトカニン受容体遺伝子(LHK1)の組織特異的な発現

Tissue-specific expression of the cytokinin receptor gene (LHK1) following rhizobial infection.

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

Department of Human Life Sciences, Studies 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, ミヤコグサ, In situ ハイブリダイゼーション, LHK1

Key words : Rhizobia, *Lotus japonicus*, In situ hybridization, LHK1,

## 抄録

根粒菌は窒素固定細菌中で最もよく調べられていて、宿主マメ科植物に感染し、根粒を形成して、空気中の窒素を固定することが知られている。根粒菌は、Nodファクターを分泌し、宿主植物が受容して、根において皮層組織を形成している一部の細胞が脱分化して、細胞分裂が起こり、根粒の源である根粒原基が形成される（リプログラミング）。これは、誘導に反応して、すでに分化していた皮層細胞において、新たな器官分化である根粒に向けて転換が生じることになる。この根粒形成の初期過程に関係するものに、形態形成に深く関与する植物ホルモンであるサイトカニンとオーキシンがある。特に、サイトカニンについては以前から研究が進んできている。サイトカニン受容体であるLHK1遺伝子の変異体は根粒形成に影響を与えることが知られている。

本研究では、根粒菌感染に伴うLHK1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、60minで維管束部の師部付近に発現が認められた。サイトカニンは、合成された後、篩管を通過して皮層組織に移動して受容体に到達し、一連の反応を行い分裂誘導して根粒形成を誘導することが考えられた。

## 1. はじめに

窒素固定細菌は、空気中の窒素をアンモニアに還元することが知られている。アンモニアは植物や菌類等によって有機化合物に同化されていく。これら窒素固定細菌の一部は植物と共生して根に根粒を形成する。根粒中で共生した細菌である根粒菌は、アンモニアを合成し、宿主植物に供給される。マメ科植物と一部の非マメ科植物（アサ科 パラスポニア等）には、根粒菌が共生する。一方、カバノキ科植物やバラ科植物などのアクチノリザル植物は、放線菌であるフランキアに感染して窒素固定を行うことが知られている。

植物と微生物の共生について研究していく中で、根粒形成はモデルケースとなっているが、

植物の形態形成を考えるうえでも興味深い事柄がこの根粒形成にはあると考えられる。根粒菌は、宿主マメ科植物から分泌される特異的なフラボノイドを受容すると、根粒形成に関与する遺伝子（*nodulation;nod* 遺伝子）を活性化させ、リポキチンオリゴサッカライドから構成されている Nod factor を分泌し、宿主植物の根において皮層組織を形成している一部の細胞が脱分化して、細胞分裂が起こり、根粒の源である根粒原基が形成される<sup>1,2</sup>。この過程をリプログラミングと呼び、外からの誘導に応じて、すでに分化していた細胞（皮層細胞）の新たな器官分化（根粒）に向けて運命の転換が生じることになる<sup>3,4</sup>。

根粒形成の研究は現在、マメ科植物のミヤコ

グサとダルマウマゴヤシの2つがモデル植物としてよく用いられている。本研究では、ミヤコグサを使用した。ゲノム配列の解読や様々な研究リソースの充実しているマメ科植物である<sup>5</sup>。例えば、特徴として、世代交代も早く2ヵ月ほどで、形質転換系も確立している。さらに、タグラインの整備も進み、感染機構における研究も進んできている<sup>6,7</sup>。ミヤコグサのパートナーである根粒菌のミヤコグサ菌もゲノム解読が進んでいる<sup>8</sup>。このように、共生関係にある生物が両方ともにゲノム解読が進んでいるものは、この2つくらいと考えられる。

根粒形成には、宿主植物の根粒菌への働きかけに始まり、根粒菌の宿主植物へ侵入が生じ、根粒を形成させるとともに、窒素を固定するわけであるが、それぞれの因子が相互作用をして、正確に制御されている。

この根粒形成の初期過程に関係するものとして、植物の形態形成に深く関与する植物ホルモンであるサイトカイニンとオーキシンがある。これについては、研究が以前からされている<sup>9</sup>。近年では、ミヤコグサとダルマウマゴヤシでサイトカイニン受容体が同定されている<sup>10,11,12,13</sup>。ミヤコグサの受容体であるLHK1は、すでに発見されていたシロイヌナズナを受容体であるAHK4と類似であった。LHK1遺伝子の劣性変異は根粒形成に影響を及ぼすことも知られている<sup>11</sup>。また、根粒形成の完全の喪失には、*lhk1*のみならず、*lhk1a*と*lhk3*という別のサイトカイニン受容体遺伝子の変異も必要であることもわかってきた<sup>14</sup>。一方、LHK1の優性変異体であるspontaneous nodule formation 2; *snf2*変異体も知られている<sup>12</sup>。この変異体は、LHK1の点変異体で、サイトカイニンシグナリングが構造的に発出することで、根粒菌が不在でも、皮層細胞分裂が生じ、根粒様構造体が形成される。このようにサイトカイニン受容体の劣性および優性変異体の解析から、根粒形成におけるサイトカイニンの役割がより明白になってきている。また、根粒菌の感染に伴うサイトカイニン合成系遺伝子であるIsopentenyl transferase (*IPT*)の発現についても最近、研究がされている<sup>15,16</sup>。

本研究は、根粒菌感染に伴う、LHK1の組織学的な発現を調べたものである。この研究で、根粒形成における、サイトカイニンの役割がよ

り明白になると考える。

## 2. 方法

### 2.1. 植物および菌の準備

ミヤコグサ(*Lotus japonicus* cv MIYAKOJIMA)を使用した。種子を滅菌溶液<次亜塩素酸ナトリウム【2%(v/v)】+ Tween20【0.02%(v/v)】に浸潤させて滅菌した。滅菌した種子を水寒天培地【0.7%(w/v)】に播種し、26°C dark条件下で発芽させた。発芽種子は、B&D1.3%(w/v)寒天培地に移植後7日間、培養した<26°C, 16h 明期、8h 暗期>。

根粒菌としては、ミヤコグサ菌(*Mesorhizobium loti* MAFF3030099)を使用した。感染実験のために、TY液体培地で振とうさせ増殖した【28°C、48h、160rpm】。

### 2.2. 根粒菌による感染

培養したミヤコグサ菌は、10<sup>7</sup>/mlに希釈し、ミヤコグサに感染させた。

### 2.3. 組織の固定

2.5%(v/v)グルタルアルデヒド(GA)溶液を用いて、ミヤコグサ菌に感染させたミヤコグサの根の組織を固定した。

### 2.4. パラフィンブロックの作成

組織固定が終了したミヤコグサを各濃度のエチルアルコールで段階的に脱水処理を行った。次いで、G-nox(Genostsff)を用いて、置換を行い、パラフィンを60°Cで溶融させ、中に置換処理をしたミヤコグサ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)で、5μmの厚さの切片にした。

### 2.6. プローブの設計

LHK1のプローブを以下のように設計した。

Size:147

```
TTGTTGCTGATGGGTCTTGGGTTCAAGATGCAGCAGAGCCACCACCTGTGGCTTTGAAGTTACATGAGCAAGCTGGGAGCCAGAGAAAGTTCACTTTTCATTCAGAACTTCAGAAACTGGTTTCTACCCCTTCTGTTTGTATGGTTC
```

### 2.7. プローブの調整

ミヤコグサ cDNA をもとに、クローニングを行った後、ジゴキシゲニンを標識として、プローブ作成を *in vitro* transcription 法を用いて行った。

## 2.8. In situ ハイブリダイゼーション

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

組織切片を G-nox で脱パラフィン化させ、各濃度のエチルアルコールで段階的に脱水を行った。その後、切片は 10% NBF (10%(v/v) Formalin in PBS) で固定した。PBS で洗浄後、3 $\mu$ g/ml proteinase K (Wako Pure Chemical Industries) で処理を行った。次いで、PBS で洗浄して、10%(v/v) NBF で再固定した。切片を 0.2N HCl 上に静置し、次いで G-wash (Genostaff) で洗浄した。

プローブ(300ng/ml)を用いてハイブリダイゼーションを行った (16h 60 $^{\circ}$ C)。その後、切片を洗浄した (G-wash 10min 60 $^{\circ}$ C、50% Formamide 10min 60 $^{\circ}$ C)。さらに、洗浄液 (G-Wash 10min 60 $^{\circ}$ C、0.1 $\times$  G-Wash 10min 60 $^{\circ}$ C、TBST<0.1% Tween20 in TBS) で、2回、室温で洗浄を行った。

1 $\times$ G-Block (Genostaff) で処理 (15min 室温) 後、切片は、ジゴキシゲニン (anti-DIG AP conjugate; Roshe) <1:2000 dilute with 50 $\times$ G-Block in TBST> で処理を行った。切片は、TBST で洗浄した後、溶液 (100mM NaCl、50mM MgCl<sub>2</sub>、0.2M Tween20、100mM Tris-HCl、pH9.5) 上に静置した。

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。

最後に、切片は、封入剤 (G-mount <Genostaff>) で封入した。

## 2.9. 観察

明視野顕微鏡 (Olympus BX53) で切片の観察を行った。

## 3. 結果

ミヤコグサ菌をミヤコグサに感染させ、感染後の時間ごと (感染後(10min、30min、60min) に GA で固定させた根毛のパラフィン切片を使用し、LHK1 プローブにて 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 30min では、特異的に発現する部位が見られた (図 1B)。60min では、維管束部の中で、

特に師部付近が特に発現が顕著であることが観察された (図 1C★)。なお、根粒菌非感染のコントロールは、変化が見られなかった (図 1G, H)。

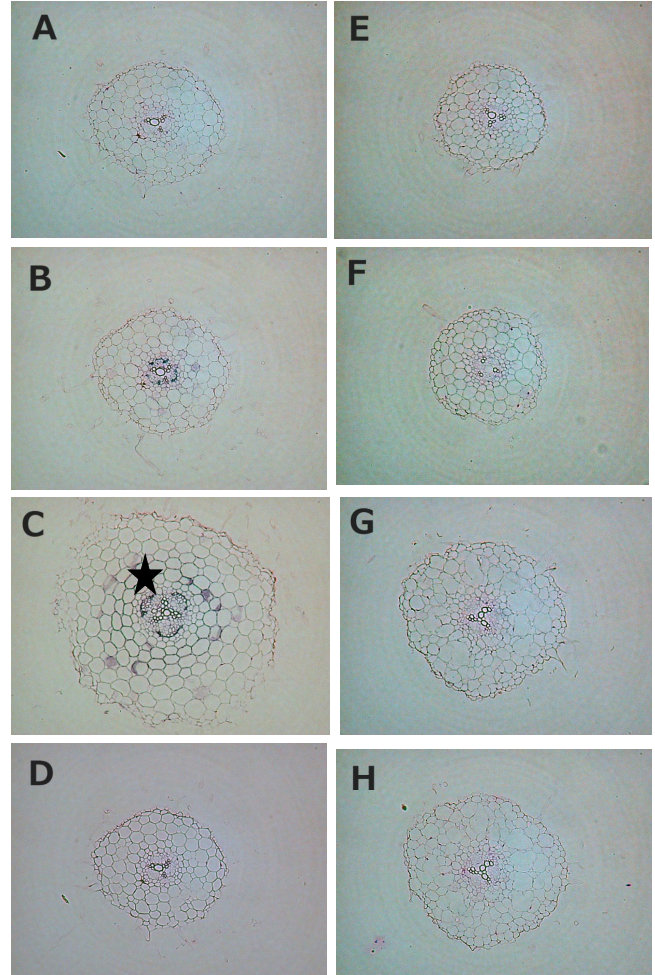


図 1 ミヤコグサ菌を感染させたミヤコグサの根毛における LHK1 の発現

Anti-sense A:感染後 10分 B:感染後 30分 C:感染後 60分<★は師部> Sense D:感染後 10分 E:感染後 30分 F:感染後 60分 Control G:Anti-sense H:Sense $\times$ 100  
(撮影年:2021年 撮影者:手呂内 伸之)

## 4. 考察

細胞増殖・分化に関するサイトカニンが根粒形成において重要な役割を行っている。本実験で研究した、サイトカニン受容体である LHK1 の機能喪失変異体が根粒形成を阻害をすることで根粒形成を正に制御することが判明している<sup>11</sup>。

本研究では、LHK1 の根粒菌感染に伴う、組織的な発現を調べるのが目的である。LHK1 の感染



経時的発現については、近年調べられていて、感染後、30分で発現のピークが見られた<sup>15,16</sup>。また、サイトカイニン合成酵素遺伝子である *IPT* についても同様に発現の経時的な変化が調べられていて、感染後1分がピークであることが判明している<sup>15,16</sup>。また、*IPT* についても組織的な発現の解析もされていて、感染後1分で維管束系に発現のピークが見られた<sup>17</sup>。

本研究の結果は、感染後30分で維管束組織、そして60分で師部付近に発現が見られた(図1B,1C)。師部にサイトカイニン受容体である *LHK1* が局在することは、合成されたサイトカイニンが篩管を通過して根毛まで移動してくることが推定される。そこでサイトカイニンの受容が起こり、一連のサイトカイニンシグナリングが開始され、砂防分裂の誘導が生じて、根粒が形成されていくと考えられる。

根粒形成には、サイトカイニンだけでなく別の植物ホルモンであるオーキシン関与も指摘されている。皮層細胞の分裂時にオーキシン誘導が生じることが近年、報告されている<sup>18</sup>。*Snf2* 変異体において、自発的根粒形成をするが、この時にオーキシン応答の誘導が見られた。また、オーキシンの極性輸送を阻害すると、根粒菌を感染させなくても根粒様構造体が形成されることが見られた。オーキシンの排出キャリアーに関与する *PIN* 遺伝子の発現をサイトカイニンシグナリングが制御することも判明している<sup>19,20</sup>。

今後は、これらの知見からサイトカイニンシグナリングがオーキシンを根粒形成部分に局在化する働きが推測されることから、サイトカイニンシグナルが関与するオーキシンの蓄積を解析したいと考えている。

## 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) Breuer C. et al. (2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase IV complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19. p3655-3668
- 2) Yang W. C. et al. (1994) Rhizobium Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6. p1315-1426
- 3) Crespi M. et al. (2008) De novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* 1: rel 1
- 4) Suzuki T. et al. (2014) Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21. p18-22
- 5) Sato S. et al. (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 15. p227-239
- 6) Fukai E. et al. (2012) Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant J* 69. p720-730
- 7) Urbanski, D. F. et al. (2012) Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant J* 69. p731-741
- 8) Kaneko T. et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7. p331-338
- 9) Suzuki T. et al. (2013) Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front Plant Sci* 4. p42
- 10) Gonnzalez-Rizzo S. et al. (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Synorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18. p2680-2693
- 11) Murry J. D. et al. (2007) A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence nodule organogenesis. *Science* 315. p101-104
- 12) Trichine L, et al. (2007) A gain of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315, p104-107.
- 13) Frugier F. et al. (2008) Cytokinin; secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci* 13 p115-120
- 14) Held M. et al/ (2014) *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell* 26 p678-694
- 15) Terouchi N, et al. (2015) Analysis of expression of cytokinin genes by Rhizobium inoculation. *Int*

- J. Hum Cult Stud 25. P136-138
- 16) Kawamura K, et al. (2016) Analysis of infection signaling system in the nodulation. Int J. Hum Cult Stud 26. p103-106
- 17) Terouchi N. (2022) Analysis of tissue-specific expression of IPT (Isopentenyltransferase) Int J. Hum Cult Stud 32. p22-26
- 18) Suzuki T. et al. (2012) Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus Japonicus* is accompanied by auxin response. Development 139 p3997-4006
- 19) Plet J. et al. (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. Plant J 65 p622-633
- 20) Rightmyer A. P. et al. (2011) Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. Mol. Plant-Microbe Interact 24 p1372-1384

#### 付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究費(S2118)の補助を受けたものである。

#### Abstract

Rhizobia are the best studied of the nitrogen-fixing bacteria and are known to infect host legumes, form nodules, and fix nitrogen in the air. The rhizobia secrete Nod factors, which are accepted by the host plant, and some cells that form cortical tissue in the roots are dedifferentiated, cell division occurs, and the nodule primordium, the source of the rhizobium, is formed (reprogramming). This results in a conversion toward a new organ differentiation, the nodule, in the already differentiated cortical layer cells in response to induction. Involved in this initial process of nodule formation are the plant hormones cytokinin and auxin, which are deeply involved in morphogenesis. Cytokinin, in particular, have been studied for some time. Mutants of the LHK1 gene, a cytokinin receptor, are known to affect nodule formation.

In this study, we examined the histological expression of LHK1 in plant root tissues upon rhizobial infection. The results showed that rhizobium infection resulted in expression near the master part of the vascular bundle section at 60 min. It was suggested that cytokinin, after being synthesized, migrates through the sieve tubes to the cortical tissue to reach the receptor, where it undergoes a series of reactions to induce division and induce nodule formation.

(受付日：2022年12月6日，受理日：2022年12月23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