

## 根粒菌感染によるサイトカイニン関連遺伝子の発現解析

Analysis of expression of cytokinin genes by *Rhizobium* inoculation

手呂内 伸之<sup>1</sup>, 川村 景子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大妻女子大学大学院人間文化研究科

<sup>2</sup>大妻女子大学大学院人間文化研究科人間生活科学専攻修士課程

Nobuyuki Terouchi<sup>1</sup> and Keiko Kawamura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University

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

<sup>2</sup>Master's Program for Studies in Language and Culture, 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，根粒菌，根粒形成，Nodファクター

Key words : Cytokinin, *Rhizobium*, Nodule formation, Nod factor

### 抄録

植物ホルモンであるサイトカイニンは植物において細胞増殖の促進に関わることが知られている。最近、マメ科植物において根粒菌感染に伴い生じる根粒構造体の形成にも関与しているとの報告がなされている。本研究ではこのサイトカイニンの関連遺伝子であるIPTおよびLHK1の根粒菌感染による発現の解析を行った。IPTはサイトカイニン合成に関係する酵素であり、合成系の最初期に働くものとして知られている。根粒菌であるミヤコグサ菌をミヤコグサに感染させたところ感染後1分でIPT遺伝子の発現が見られた。また、LHK1はサイトカイニン受容体として知られている。LHK1遺伝子の感染に伴う発現の変化を調べたところ感染後30分が最大であることが示された。これらから根粒形成におけるサイトカイニンの関与が推察される。

### 1. はじめに

根粒菌は宿主マメ科植物の根毛に感染し、根粒を形成する。根粒内では空気中の窒素を固定し、植物に窒素源を供給している。一方、植物からは栄養分として根粒菌は炭素分を受け取る。このように根粒菌と宿主植物は共生をしている。

この根粒形成の機構について、様々な研究が近年行われて来ている。その中で興味深いものとして植物ホルモンによる根粒形成への関与を示す報告がある。

その一つに根粒菌の宿主植物の根毛内への侵入に植物ホルモンであるオーキシンが関係していると考察されているものがある<sup>1)</sup>。それによると、外からオーキシンを与えると根毛の主構成成分であるセルロースを分解するセルラーゼ活性の誘導が認められた。この活性誘導と根粒菌の根毛内への侵入の関係がこの報告では考察されている。

最近、別の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根粒菌の感染から開始される

根粒形成シグナル伝達系の1つを担っているという報告がなされている<sup>2)</sup>。この感染シグナル系は根粒菌が感染する際に分泌するキチンオリゴマーである根粒形成(nodulation : Nod)ファクターを宿主植物の持つ受容体を受容することから始まるもので、次々と根粒形成に関与する遺伝子群が活性化していき、様々な現象を引き起こすことが知られている。そしてNodファクターシグナリング系と呼ばれている。この系におけるサイトカイニンの関与を示す報告で興味深いものはマメ科植物において、根粒菌非感染で根粒様構造体が形成された自然突然変異体を分析したところ、サイトカイニン受容体(LHK1)遺伝子の過剰発現が見られるというものである<sup>3)</sup>。この変異体はサイトカイニンがなくても常にLHK1が過剰に発現をして構造体を形成すると考察されることからLHK1受容体がNodファクターシグナリング系の1つを担うと推測されている。この報告が根粒形成におけるサイトカイニンの働きを分子生物学的に解析した初

めてのものである。しかしながら、根粒菌が宿主マメ科植物に感染し根粒形成をする過程でのサイトカイニンについての分子生物学的な解析はほとんどない。

そこで本研究では根粒菌の感染に伴う宿主マメ科植物におけるサイトカイニン合成に関係する遺伝子(*IPT*)と合成したサイトカイニンを受容する受容体遺伝子(*LHK1*)の発現の解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 植物と根粒菌の培養

植物としてはマメ科植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus* var MIYAKOJIMA G-20)を使用した。種子を次亜塩素酸ナトリウム溶液(2%(w/v))で滅菌した。次いで水寒天培地(0.7%(w/v))にまき、暗黒下に3日間、静置した(26°C)。芽生えをB&D寒天培地(1.3%(w/v))に移植し、7日間人工気象器(日本医科学)で培養した(16時間明期/8時間暗期, 26°C)。

根粒菌としてはミヤコグサ菌(*Mesorhizobium loti* MAFF303099)を使用した。TY液体培地で2日間、振とう恒温槽(TAITEC)で振とうした(160rpm 28°C)。

### 2.2. 根粒菌による感染実験

培養したミヤコグサ菌を、7日間育成したミヤコグサに $1 \times 10^7$ /mlの濃度で感染させた。

### 2.3. RNAの抽出とc-DNA合成

感染させたミヤコグサよりRNA抽出キット(Xprep plant RNAmiini kit; Aplus)を使用してtotal RNAを抽出した。c-DNA合成キット(SuperScript III; Invitrogen)を使用してtotal RNAからc-DNAを合成した。

### 2.4. RT-PCRを用いた発現の解析

根粒菌の感染に伴う*IPT*遺伝子および*LHK1*遺伝子をそれぞれプライマーを用いてPCR装置(TP-500; TAKARA)で増幅させ、3%(w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。発現の解析にはimage Jを使用して行った。

## 3. 結果

### 3.1. *IPT* 遺伝子の発現

*IPT* 遺伝子での感染後の発現は感染後1分が最大値であり、時間の経過とともに発現量は減少が見

られた。(図1)。*IPT* 遺伝子の発現は根粒菌の初期感染過程で見られることがわかった。

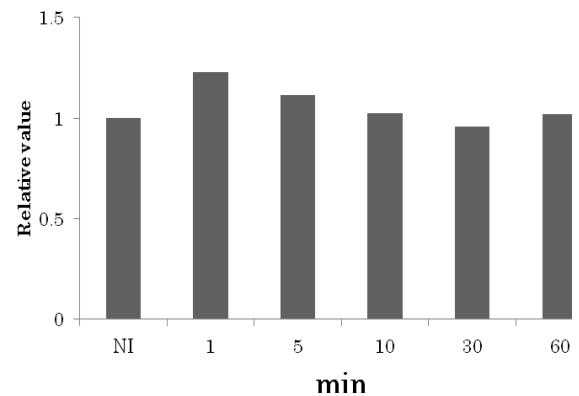


図1. 感染による*IPT* 遺伝子の発現

プライマー配列:

F: GTGTTGGTGATGGGAGCTACAG

R: GGTGGCGAGGTCAATGGA

NI: Not infection

### 3.2. *LHK1* 遺伝子の発現

ミヤコグサ菌の感染に伴う*LHK1* 遺伝子の発現は感染して30分で最大の発現が見られた(図2)。30分以降は発現が減少した。

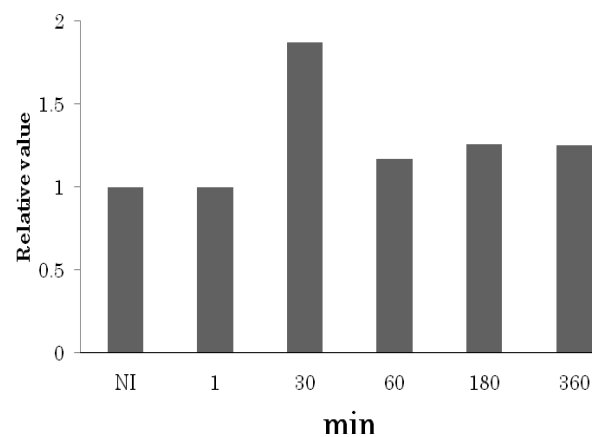


図2. *LHK1* 遺伝子の発現の変化

プライマー配列:

F: TGAGGTGCTTGACCCGAGTA

R: GTGTTGGTGATGGGAGCTACAG

NI: Not infection

## 4. 考察

### 4.1. *IPT* 遺伝子の発現

*IPT* は植物においてサイトカイニン合成の最初

期の反応であるアデニンヌクレオチドとジメチルアリルニリン酸を基質とするイソペンテニルアデニンヌクレオチド合成の酵素として働くことが知られている<sup>3)</sup>。この IPT 遺伝子の根粒菌感染に伴う発現の変化を見た。感染後 1 分で発現量が最大になり、10 分で非感染状態での発現量に戻るものが RT-PCR から判明した (図 1)。感染して極めて早い時間にサイトカイニン合成系の初発遺伝子である IPT の発現が見られる。このことは感染に伴い合成されたサイトカイニンが根粒形成シグナリング系のシグナルの役割を果たしていることが推測される。

#### 4.2. LHK1 遺伝子の発現

サイトカイニンのシグナリング系においてはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において *Arabidopsis histidine kinase* (AHK) がサイトカイニン受容体として最初に同定された。LHK1 はこの AHK 類似のものとしてミヤコグサで近年同定された<sup>2)</sup>。AHK は細胞の外から内に向かって受容体ドメイン-ヒスチジンキナーゼドメイン (His-Kinase)-レシーバードメイン (D) から構成されている。サイトカイニンを受容体ドメインに接着すると His-kinase からリン酸基がレシーバードメインに伝達され、それが核極在型レスポンスレギュレーター (RR) にさらに伝達されることでサイトカイニンシグナルが細胞内に伝達されていき、下流に存在するサイトカイニン関連遺伝子を活性化することでサイトカイニンの生理作用を誘導す

ると考えられている<sup>4)</sup>。

LHK1 遺伝子が根粒菌の感染後 30 分で最大の発現を持つことが示された (図 2) ことよりサイトカイニン合成は感染後 30 分で最大になることが考えられる。そしてサイトカイニンを受け取った LHK1 はサイトカイニンシグナルを RR に伝達しサイトカイニンの生理作用を誘導して、根粒構造体の形成を誘導するとともに、Nod ファクターシグナリング系の遺伝子も活性化することで窒素固定が行われることが推察される。

#### 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 俊樹教授より提供を受けた。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 (S2626) の補助を受けたものである。

#### 引用文献

- 1) Terouchi N. et al.: Microbios 84, 117-125 (1995)
- 2) Tirichine L. et al.; Science 315, 104-107 (2007)
- 3) Takai K. et al.; Plant Cell Physiol. 45, 1053-1062 (2004)
- 4) Ha S. et al.; Trends in Plant Science 17, 172-176 (2012)

#### Abstract

Nodule organogenesis is initiated by dedifferentiation of root cortical cells that reenter cell cycle and form nodule primordial. Cytokinin has a central role in the formation of root nodules following inoculation with rhizobia. We showed that rhizobia induced the expression of IPT, cytokinin synthesis enzyme gene, LHK1, cytokinin receptor gene, in *Lotus japonicus*. Here we show that cytokinin signaling is required for nodule synthesis.

(受付日: 2015 年 6 月 28 日, 受理日: 2015 年 7 月 7 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。(理学博士)

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。