

# 根粒形成におけるオーキシン極性輸送の役割

Role of auxin polar transport in rhizogenesis

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, 102-8357 Japan

キーワード：根粒, ミヤコグサ, オーキシン極性輸送, BFA, Har1, PIN

Key words : Nodule, *Lotus japonicus*, Polar transport, BFA, Har1, PIN

## 抄録

マメ科植物は、土壌細菌である根粒菌と共生し根粒という構造体を形成することで、利用できない空気中の窒素をアンモニアに変換して窒素源として利用することができる。

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。これは、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である（リプログラミング）。一方、マメ科植物は、根粒へ大量の光合成産物を供給する必要があるため、過剰な根粒形成は植物の成長を著しく阻害する。このため根粒の着生数を最適化する仕組みがある。このような根粒形成に深く関与する植物ホルモンの一つにオーキシンがある。オーキシンは、植物体内を極性輸送するが、これには、オーキシン排出タンパク質であるPIN-FORMED (PIN) が関与していることが知られている。

本研究では、根粒形成とオーキシンの極性輸送との関係を調べた。極性輸送に関係するPINの阻害剤であるBFA (Brefeldin A) を使用したところ、根粒形成数が0.01mMでピークになった。しかし、1mMでは、全く形成しなかった。また、0.1mMでは、過剰な根粒形成を示した。これは着生数の最適化に関係することが知られているHypernodulation aberrant root formation1 (*har1*) の変異体*har1*と状態が類似していることからオーキシンの極性輸送も最適化に関係することが考察された。

## 1. はじめに

宿主マメ科植物は、嫌気性土壌細菌である根粒菌と共生して、根粒と呼ばれる構造体を形成し、空気中の窒素をアンモニウム塩に変換する、いわゆる窒素固定を行っている。この根粒は、宿主マメ科植物の根が脱分化し、細胞分裂して根粒原基が構築されることで生じる（リプログラミング）。根粒形成には、様々な要因が関与していると考えられる。その中で、植物ホルモンが形成に関係するのではないかと指摘されてきた。植物ホルモンで芽や根などの形態形成に関係しているものにオーキシンやサイトカイニンが知られている。そしてこれらが根毛から根粒を分化させるリプログラミングに何らかの働きをしていると考えられ、研究が行われてきた。

オーキシンの1つである2,4-D (2,4dichlorophenoxyacetic acid) で根粒菌を前処理し、非マメ科植物に感染させたところ根毛のカーリングという感染初期過程の現象を誘導した<sup>1</sup>。また、オーキシンの極性輸送を阻害するNPA (N-1-Naphthylphthalamic acid) を使用して、根粒形成への影響を見た<sup>2</sup>。その結果、阻害剤は根粒着生数に影響を与えることが判明した。

近年、根の皮層細胞分裂時にオーキシンの応答が誘導されることが報告され、さらに、サイトカイニンのシグナル伝達系が構成的に働き、根粒菌がなくても根粒様構造体が形成される*snf2* (spontaneous nodule formation 2) 変異体が知られているが、この変異体は、オーキシンの応答を誘導することも知られている<sup>3</sup>。また、サイトカイニ

ンシグナル伝達系は、オーキシシン排出タンパク質 PIN をコードしている PIN 遺伝子の発現をコントロールしていることも報告されている<sup>4</sup>。

そして、根粒形成における、サイトカイニンのオーキシシンに関する役割は、サイトカイニンシグナル伝達系がオーキシシン輸送系に働き、オーキシシンを根粒形成部位に蓄積すると考察されている。

本研究では、オーキシシンの極性輸送に関するオーキシシン排出キャリアーである PIN の根粒形成への関わり合いを解析した。そのため、PIN の阻害剤 BFA を用いて、根粒形成への影響を見た。これにより、根粒形成にオーキシシンの極性輸送が関与していることが解明できる。

## 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、根を切断して、シュート部分を 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* MAFF303099) 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. 根粒形成用の培地の作成

PIN の阻害剤である BFA を入れた B&D 培地を作成した。

### 2.3. BFA 入りの B&D 培地へ移植

7 日間培養したミヤコグサを BFA 入りの B&D 培地に移植した。

### 2.4. 粒菌による感染

培養したミヤコグサ菌は、 $10^7$ /ml に希釈し、培養したミヤコグサに感染させ、培養した【26°C、16h 明期、8h 暗期】。

### 2.5. 観察

感染後、2 週間で観察を行った。

## 3. 結果

ミヤコグサにミヤコグサ菌を感染させ、BFA の根粒着生数の影響を見た (図 1)。BFA の濃度が 0/0.01mM で着生数が最も多くなった。また 1mM では根粒が形成しなかった。

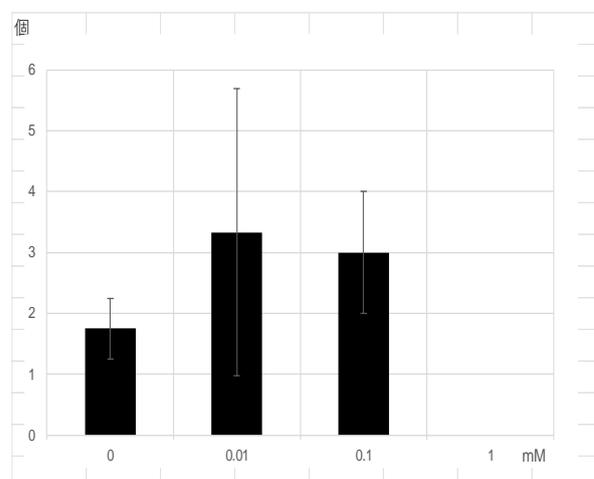


図 1. BFA による根粒形成への影響 (bar=SD)

根粒形成の様子を観察した (図 2)。BFA0 と 0.01mM では根粒の観察が見られた (図 2A,B)。BFA0.1mM では根粒の形状が通常のものとは異なるものが観察された (図 2C,E)。BFA1.0mM では根粒形成は見られなかった (図 2D)。

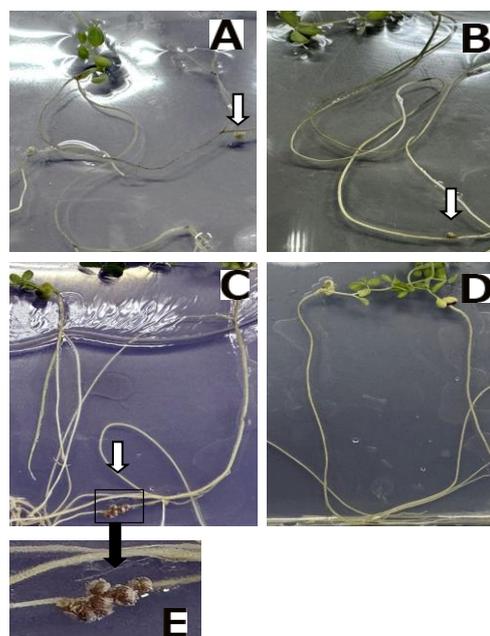


図 2. BFA による根粒の性状 A:BFA 0mM, B:BFA0.01mM, C:BFA0.1mM, D: BFA1.0mM, E:C を拡大したもの×50 矢印は根粒 (撮影年: 2024 年 撮影者: 手呂内伸之)

#### 4. 考察

根粒はリプログラミングが起こることで生じるものである。このようなリプログラミングに植物ホルモンであるオーキシンが関与していることが考えられている。

本研究では、近年解明されてきたオーキシン極性輸送の関わる排出キャリアータンパク質である PIN について根粒形成との関係を PIN の阻害剤 BFA を用いて調べた。

本研究の結果は、BFA0.01mM が根粒形成数でピークを示した (図 1)。また 1mM では根粒の形成が全く観察されなかった (図 1)。

一方、根粒の形状を観察したところ、コントロールや BFA0.01mM では通常の根粒が形成された (図 2A,B) ところが、BFA0.1mM では、異常な形状のものが観察された (図 2C,E)

BFA0.1mM において、根粒形成の異常が見られたが、このように根粒が多数並んで形成される現象は、*har1* 変異体で見られるものである<sup>5</sup>。マメ科植物は、根粒菌と共生して、窒素栄養分が少ない環境でも生育ができる。しかし、窒素固定や根粒形成には多くの光合成産物を必要とする。従って、根粒着生が必要以上になされると、植物の生育に著しい影響が出る。これを避けるためにマメ科植物においては、根粒形成の最適化を行う仕組みが存在している。この仕組みは、葉で働く Har1 受容体キナーゼが重要な役割を担っており、*har1* 変異体では過剰な根粒形成をし、植物の成長を阻害することが知られている。また Har1 受容体の下流域である根で働く根粒抑制因子である TML (*too much love*) の存在も近年、報告されている<sup>6</sup>。このように根粒形成の制御において、Har1 受容体と TML 間の情報伝達系についても、最近マイクロ RNA (mi-RNA) が関与することが報告されている<sup>7</sup>。この mi-RNA (miR2111) は、TML の mRNA のターゲット領域に接合して、切断する。

オーキシンの極性移動は、PIN1 が根の中心柱に存在し、根端方向にオーキシンを移動させ、PIN4 が根冠にあり、根端まで移動させ、同じく根冠にある PIN3 は横方向に移動させる。PIN2 は皮層に存在して根冠部のオーキシンをシュート方向に移動させることが知られている。

BFA は、細胞膜に局在している PIN1 の細胞膜からの小胞輸送を阻害し、細胞内に PIN1 を局在させることが知られている。BFA 処理による根粒

着生数の増大は、根粒着生に関するコントロールがオーキシンの極性輸送と関係していることが示唆される。また BFA0.1mM で根粒の着生が異常形状を示し、*har1* 変異体による形状と類似していることから根粒着生をコントロールしている Har1 受容体を中心とする、根粒形成のコントロール機能にオーキシン極性輸送が関係していることがさらに示唆される。

今後は、根粒共生の維持に必須な mi-RNA の移動とオーキシンの極性輸送の関わり合いについて調べていきたい。

#### 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) Terouchi N. et al. (1995) Auxin-induced release of cellulolytic activity from rhizobia and the promotion of effects of this activity on root hair curling in *Avena sativa*. *Microbios*84, p117-125.
- 2) Terouchi N. et al. (1999) Nodule formation is affected by auxin transport inhibitor. *Bull otsuma Women's Univ. home Econ.*35, p161-165.
- 3) 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.
- 4) Rightmyer A.P. et al. (2011) Psuedonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncuula* in response to auxin transport inhibitors. *Mol. Plant-Microbe Interact*24, p1372-1384.
- 5) Nishimura R. et al. (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*420, p426-429.
- 6) Magori et al. (2009) TOO MUCH LOVE, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*22, p259-268.
- 7) Okuma N. et al. (2020) MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.*11, p5192.

## 付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究費 (N2312) の補助を受けたものである。

## Abstract

Leguminous plants symbiotically form structures called rhizobia, which are soil bacteria, and form rhizoids, which convert unavailable airborne nitrogen into ammonia, which can be used as a nitrogen source.

In the root, some of the cells that form the cortical tissue are dedifferentiated and cell division occurs, forming the nodule primordium, which is the source of the rhizoids. This is a conversion that occurs in the already differentiated cortical cells toward a new organ differentiation, the rhizobial (reprogramming). On the other hand, legumes need to supply large amounts of photosynthate to rhizoids, and excessive nodule formation severely inhibits plant growth. For this reason, there is a mechanism to optimize the number of rhizoids formed. One of the plant hormones deeply involved in rhizobial formation is auxin. Auxin is transported polarity in the plant body, and it is known that PIN, an auxin efflux protein, is involved in this process.

In this study, we investigated the relationship between rhizobial formation and polar transport of auxin. Using BFA, an inhibitor of PIN-FORMED (PIN), an auxin efflux carrier involved in polar transport, the number of nodules formed peaked at 0.1 mM. However, at 1 mM, they did not form at all. At 0.1 mM, excessive rhizobial formation was observed. This is similar to that of the mutant *har1* of Hypernodulation aberrant root formation1 (*Har1*), which is known to be related to the optimization of the number of nodules formed.

(受付日 : 2024 年 7 月 1 日, 受理日 2024 年 8 月 22 日)



手呂内 伸之 (てろうち のぶゆき)

現在 : 大妻女子大学大学院人間文化研究科教授

### プロフィール :

東京大学大学院理学系研究科終了後, 大妻女子大学に勤務.  
学位は博士 (理学), 専門は植物生理学.  
1990 年代より植物と微生物の共生に関する研究を行っている.

### 主な著書, 論文 :

Nobuyuki Terouchi et al. (1990) Hair Curling Induced in Heterologous Legumes and Monocots by Flavonoid-Treated Rhizobia. *Plant Cell and Physiol.* 31;113-118.  
Nobuyuki Terouchi et al. (1990) Rhizobium Attachment and Curling in Asparagus, Rice and Oat Plants. *Plant Cell and Physiol.* 31; 119-127.  
Nobuyuki Terouchi et al. (1995) Auxin-induced Release of Cellulolytic Activity from Rhizobia and the promotion of Effects of This Activity on Root Hair Curling in *Avena sativa*. *Microbios* 84: 117-125. など.