

オーキシン極性輸送における流入キャリアーの根粒形成での役割

Role of influx carriers in the polar transport of auxin 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

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，5'アルコキシIAA，AUX1/LAX，PIN

Key words : Nodule, *Lotus japonicus*, Auxin polar transport, 5'alkoxy IAA, AUX1/LAX, PIN

抄録

マメ科植物は、根粒菌と共生することで根粒という構造体を形成し、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、いわゆる窒素固定を行っている。

植物ホルモンのオーキシン (IAA : Indole-3-acetic acid) が根粒形成に関係していることが知られている。根粒は根の皮層細胞の分裂によって形成され、その際にオーキシンの応答が生じる。オーキシンは植物体内を極性輸送されるが、それにはキャリアータンパク質が関係している。細胞膜に存在しているPINやAUX1/LAXなどが知られている。しかしながら、これらキャリアータンパク質と根粒形成機構との関わり合いはほとんど知られていない。本研究ではオーキシンの流入キャリアーであるAUX1/LAXについて、このキャリアーの働きが抑制されたときに根粒形成にどのような影響が出るかを調べた。AUX1/LAX阻害剤である5'-アルコキシIAAを10 μ M、100 μ M、200 μ Mで使用したところ根粒形成は全く観察されなかった。また、100 μ Mと200 μ Mでは根に不定根状のものが生じた。これらから、オーキシンの極性輸送に関係するオーキシン流入キャリアーであるAUX1/LAXの働きによる根の細胞内でのオーキシンの蓄積が根粒形成には必須であることが判明した。

1. はじめに

マメ科植物は根粒菌が感染することで、「根粒」という構造体である共生器官を形成することが知られている。この共生によって空気中の窒素を効率よく利用できる。この根粒形成において、影響する物質として植物ホルモンがある。その中にはオーキシンとサイトカイニンが最もよく知られている。オーキシンについては近年、根粒が形成される過程である根の皮層細胞分裂の際にオーキシンの応答が見られること、また根粒菌の非存在下で根粒様構造体が形成される変異体 (snf2 ; spontaneous nodule formation2) でオーキシン誘導が示されている¹。さらにサイトカイニンのシグナル伝達系がオーキシンの植物体内の極性輸送において排出キャリアーPINをコードしているPIN遺伝子の発現を制御していることが報告されている²。

オーキシンについては1995年に2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid : 合成オーキシン) で根粒菌を処理して、それを非マメ科植物に感染させると、根粒形成過程の一つである根毛の変形 (カーリング) を誘導することが見られた³。また、オーキシン輸送の阻害剤と考えられているNPA (1-N-Naphthylphthalamic acid) を使用して根粒形成への影響を見たところ根粒形成数に影響が報告された⁴。さらに、オーキシンの極性輸送を担っていることが知られているPINが根粒形成に影響していることが報告されている⁵。PINは、オーキシン流出キャリアーとして知られている。また、オーキシン流入キャリアーであるAUX1/LAXも知られている。このキャリアーは周囲から均等にオーキシンを取り込む作用があるものとされている。本研究では、AUX1/LAXキャリアーについて調

べることで、極性輸送の根粒形成への影響の解析を行った。そのため、AUX/LAXキャリアーの特異的な阻害剤であるアルコキシIAAを用いて⁶、根粒形成への着生数や根粒の形態を調べた。これにより、根粒形成におけるオーキシン極性輸送の関与がさらに明白になると考えられる。

2. 方法

2.1. 植物の準備

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 暗期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>。

2.2. 根粒形成用の培地の作成

AUX/LAX キャリアーの阻害剤である 5'アルコキシ IAA を入れた B&D 培地を作成した。

2.3. 5'アルコキシ IAA 入りの B&D 培地へ移植

7 日間培養したミヤコグサを 5'アルコキシ IAA 入りの B&D 培地に移植した。

2.4. 根粒菌による感染

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】培養したミヤコグサ菌は、 $10^7/\text{ml}$ に希釈し、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、5'アルコキシ IAA による根粒の着生数への影響を見た (図 1)。5'アルコキシ IAA による影響は、10、100、200 μM のいずれの濃度でも根粒形成が見られなかった。

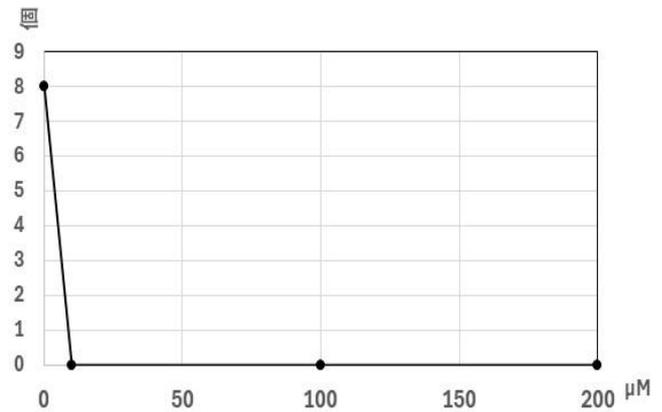


図 1. 5'アルコキシ IAA による根粒形成への影響

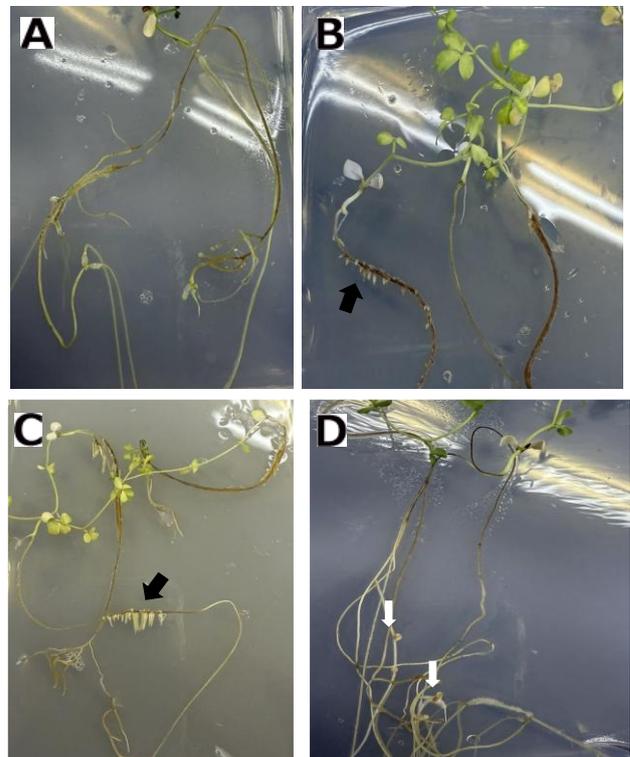


図 2. A: 5'アルコキシ IAA 10mM、B: 5'アルコキシ IAA 100mM、C: 5'アルコキシ IAA 200mM、D: 5'アルコキシ IAA 0mM、白矢印は根粒、黒矢印は根毛様構造体 (撮影年: 2025年 撮影者: 手呂内伸之)

根粒形成の様子を観察したものが図 2 である。5'アルコキシ IAA 存在下では根粒は全く観察できなかった (図 2A、B、C)。5'アルコキシ IAA 100mM では、根毛様のものが観察された (図 2B)。また、200mM では、100mM の時より長い根毛様なものが観察された (図 2C)。一方、10mM では、このような構造体は見られなかった (図 2A)。

4. 考察

本研究では、植物ホルモンの一種であるオーキシン極性輸送が根粒形成にどのように関与するかを解析した。特に、オーキシンの極性輸送において取り込みキャリアーである AUX1/LAX キャリアーについて働きを抑えることが知られている阻害剤である 5'-アルコキシル IAA を用いて根粒形成への影響を見た (図 1 と図 2)。

その結果、5'-アルコキシル IAA を加えると、どの濃度でも根粒形成は見られなかった (図 1)。これは、5'-アルコキシル IAA は、オーキシンの細胞内への流入に関与している AUX/LAX キャリアーを阻害する阻害剤であるので、この阻害作用によりオーキシンの極性輸送ができなくなり、そのために根粒形成に必要なオーキシン量が得られなくなるので、根粒が形成できなくなると考えられる。また、根の様子を見たところ、この阻害剤を加えたところ細かい根が生えていることが観察された (図 2B と 2C)。これもオーキシンの極性輸送が阻害剤により抑えられているため、不定根状の根が生じたと考察される。

一方、オーキシンの極性輸送における流出キャリアーである PIN についての研究はすでにされている。阻害剤である BFA (Brefeldin A) を使用して濃度ごとに根粒形成への影響を見たところ、根粒形成数のピークがみられた⁵。

オーキシンの極性輸送は、流入キャリアーの AUX1/LAX と流出キャリアーである PIN によって行われるが、この仕組みが根粒形成に影響を及ぼすことが本研究によってさらに示された。しかしながら、オーキシンの流入と流出ではその影響が異なり、特に流入が阻害されると全く形成が見られないこと、流出キャリアーである PIN の阻害剤を用いた研究⁵からも阻害剤の濃度によって根粒着生数が異なることから、根粒形成には細胞内でのオーキシン濃度が影響を与えることが示された。

このように、オーキシンの極性輸送が根粒形成に影響を与えることが示唆された。

謝辞

研究で使用した根粒菌 (*Mesorhizobium lotii* 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る。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Terouchi N. et al. (1999) Nodule formation is affected by auxin transport inhibitor. *Bull otsuma Women's Univ. home Econ.* 35 p161-165.
- 5) Terouchi N. (2024) Role of auxin polar transport in rhizogenesis. *Int J Hum Cult Stud.* 24 p628-631.
- 6) Tsuda E. et al. (2011) Alkoxy-auxins Are Selective Inhibitors of Auxin Transport Mediated by PIN, ABCB, and AUX1 Transporters. *JCB* 286 p2354-2364.

付記

本研究は大妻女子大学戦略的個人研究費 (N2410) の補助を受けたものである。

Abstract

Leguminous plants form nodules through a symbiotic relationship with rhizobia. This relationship allows the plants to convert atmospheric nitrogen into ammonia, which they then use as a nitrogen source. This process is known as nitrogen fixation.

The plant hormone auxin (IAA: indole-3-acetic acid) is known to be involved in nodule formation. Nodules form through the division of root cortex cells, which triggers an auxin response. Auxin moves within plants via polar transport, which involves carrier proteins. PIN and AUX1/LAX proteins, which are present in cell membranes, are known to be involved in this process. However, the relationship between these carrier proteins and nodule formation is not well understood. In this study, we investigated the effects on nodule formation when the function of AUX1/LAX, an auxin influx carrier, was inhibited. Using the AUX1/LAX inhibitor 5'-alkoxyIAA at concentrations of 10 μ M, 100 μ M, and 200 μ M resulted in complete absence of nodule formation. Additionally, adventitious root-like structures formed on the roots at 100 μ M and 200 μ M. These results suggest that auxin accumulation within root cells, mediated by the AUX1/LAX auxin influx carrier involved in auxin polar transport, is essential for nodule formation.

(受付日：2025年8月19日，受理日：2025年9月11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。