

「植物の機能と制御」

平成 14 年度採択研究代表者

川口 正代司

(東京大学大学院理学系研究科 助教授)

「共生ネットワークの分子基盤」

1. 研究実施の概要

陸上植物のおよそ 8 割の根にはアーバスキュラー菌根菌が共生し、土壌中のリン酸などのミネラルを効率よく吸収している。一方、マメ科植物は根粒菌と共生し大気中の窒素を固定し利用する。近年根粒菌が感染できない共生初期変異体の多くがアーバスキュラー菌根菌との共生能をも失っていることが示され、共生機構の一部が複数の微生物間で普遍的に使われている可能性が示唆されている。本プロジェクトは、菌根共生系および根粒共生系を支える植物の分子基盤を明らかにすることを目的に、マメ科のモデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* を用い、網羅的な共生変異体の単離からその原因遺伝子に迫る一方、菌根菌との初期相互作用に関与する物質を明らかにすることを試みる。

2. 研究実施内容

東京大学 大学院理学系研究科グループ (川口正代司)

菌根・根粒の形成過程に共通する宿主因子群の一端を分子レベルで解明するために、ミヤコグサから新たに単離された菌根・根粒共生変異体 *sym85* の表現型解析と原因遺伝子の同定を行った。アレリズムテストから *sym85* 変異体は *sym24* および *sym73* 変異体と同一遺伝子内に変異を持つと考えられた。*sym85* 変異体に菌根菌 *Glomus intraradices* を感染させたところ、菌糸が表皮細胞間を通過するものの、表皮と外皮の間で菌糸の伸長が停止しており、ここが感染におけるチェックポイントと考えられた。また根粒菌の Nod factor 処理で誘導されるカルシウムスパイクを調べたところ、*sym85*, *sym73* 変異体ではそれが失われていることが示された。ラフマップの結果 *Sym85* は Gifu, Miyakojima 間の転座領域に落ちたため、新たにパキスタンに自生するミヤコグサ *L. burttii* を交配パートナーとして導入し、*Sym24/73/85* のポジショナルクローニングを行った。ファインマッピングとゲノムシーケンスの結果、ヌクレオポリン様遺伝子 *NUP85* に塩基置換を検出した。*sym85* における共生形質は温度感受性を示すことが示された。

大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科グループ (秋山康紀)

AM 菌の宿主認識反応である菌糸分岐を誘導する物質 branching factor (BF) をミヤコグサ根の分泌物から単離し、根寄生雑草の種子発芽誘導物質であるストリゴラク톤の一種 5-deoxy-strigol と同定した。既知の天然ストリゴラク톤であるストリゴール、ソルゴラク톤、オロバンコール、そして合成アナログである GR24 も同様に BF 活性を示したことから、BF はストリゴラク톤であることを解明した。化学合成により調製した (±)-5-deoxy-strigol と (±)-2'-epi-5-deoxy-strigol をキラル HPLC カラムにより光学分割し、得られた 4 つの立体異性体の BF 活性について調べた結果、D 環の 2' 位の立体化学が R であることが高い BF 活性を示すのに必須であることが分かった。

ミヤコグサの *LjCbp1* 遺伝子のプロモーター活性を指標した Myc factor (MF) アッセイの改良を行った。従来のシャーレ法による問題点を改良したチューブスラント法を新たに開発した。これにより活性サンプルに対する植物の反応性が約 2 倍向上した。AM 菌の胞子中に含まれる MF 活性物質の精製を更に進めたところ、複数の活性物質が存在することが明らかになり、そのうちの一つを同定することができた。

大阪大学 大学院工学研究科グループ (林誠)

根粒菌の感染糸形成における分子機構を解明するために、いくつかの感染糸変異体の相補試験とマッピングをおこなった。その結果、感染糸形成が表皮で阻害されている変異体は *alb1* (*sym74*)、*alb2* (*sym80*)、そして *crk* (*sym79*) の 3 相補グループに分類された。そのうち、*alb1* については、原因遺伝子をカバーするゲノムコンティグが得られた。また、*crk* については遺伝子座の南端側からの染色体歩行が物理的に進捗したものの、遺伝的な距離が変化しなかったため、新たに交配パートナーを Miyakojima から *Lotus burttii* B-303 に変更し、マッピングを行った。

ミヤコグサの根毛を用いたアレイ解析の結果、ジャスモン酸 (JA) が感染糸形成を正に制御していることが明らかとなった。またこの効果は窒素による感染糸形成の調節と密接に関係していた。さらに、ジベレリンが感染糸形成を負に制御することも明らかとなった。現在までにエチレンが感染糸形成を負に制御することが知られていたが、エチレンは根毛の形態形成に影響を及ぼすため、これによる 2 次的効果である可能性を否めない。しかしこれら 2 種の植物ホルモンはその有効濃度において根毛の形態形成に影響を及ぼさないため、より直接的に働くと考えられた。

農業生物資源研究所 生理機能研究グループ (梅原洋佐)

分子遺伝学的手法を用いて根粒菌あるいは菌根菌とマメ科植物の共生系成立機構を解明するため、ミヤコグサの変異系統から、根粒菌共生窒素固定を行うことの出来ない植物を選抜した。

C⁶⁺の重イオンビーム照射個体 (Miyakojima) 2,400 系統由来の M2 植物を用いた選抜が

終了し、選抜されたものの中からこれまでに44系統の共生変異体候補で次世代での表現型の再現性を確認した。内訳は無根粒 Nod⁻型12系統、根粒分化不全 Hist⁻型4系統、有効根粒形成不全 Fix⁻型23系統、超着生 Nod⁺⁺型5系統であった。このうち、9系統の Nod⁻について菌根感染を調べたところ、6系統について myc⁻の表現型を示した。また、7系統の Fix⁻変異体についてラフマッピングを行い、4系統(240, 268, 295-3, 1487-1)が新規、1系統(267)が既知の変異体と同座であることを明らかにした。

これまでに単離した Fix⁻変異体 *Ljsym105* が比較的高い単位重量当たりの窒素固定活性を有するが、根粒が肥大せず、早期に老化、崩壊する変異体であることを明らかにした。さらに EMS 処理由来の変異体 N49 から、少根粒型と Fix⁻型の2種類の表現型を示す系統を分離し、それぞれ第1染色体と第6染色体に位置づけた。

畜産草地研究所グループ (大友量)

昨年度に引き続き生物研で得られた培養変異株集団の選抜を実施した。また共同研究者が見いだした根粒共生変異株について、菌根共生に関する表現型解析を行った。

菌根共生特異的変異株のスクリーニングにおいては、過去3年間に渡って713ラインの培養変異集団から694ライン、5,496株についてスクリーニングを行ったが、目的とする変異株を取得することは出来なかった。植物体の栽培には培養試験管を用いて一株毎に行い、バーミキュライトを培土として栄養源に改変 Hornum 液を、菌根菌接種源として *Glomus intraradices* 胞子を用いた。同様の方法で実施した、根粒共生変異体の菌根形成に関する表現型解析では、主に生物研グループで得られた根粒共生変異株から13株を菌根共生にも異常を来した変異株として同定していることから、実施方法に問題はないと考えられる。

ミュンヘン大学グループ (Martin Parniske)

マメ科植物と根粒菌、菌根菌の共生の成立に必要な遺伝子 CYCLOPS は2つの核局在モチーフと、保存されたコイルドコイル領域を持つ新規タンパク質をコードする。CYCLOPS の機能を明らかにするために、CYCLOPS の核局在モチーフの解析を行った。CYCLOPS の核局在モチーフを削除したクローンの GFP フュージョンを作製し、*Nicotiana benthamiana* の表皮細胞に一過的に形質転換し、その局在を確かめたところ、全長 CYCLOPS クローンが核への局在を示すのに対し、核局在モチーフを削ったクローンでは細胞質全体に蛍光が観察された。

次に CYCLOPS と生体内で相互作用するタンパク質を単離するために、酵母2ハイブリッド法によるスクリーニング系の構築を試みた。その結果、核局在の報告されている共生因子カルシウム・カルモデュリン依存型キナーゼ (CCaMK) と相互作用する事を見いだした。さらに *N. benthamiana* における一過的発現系を利用し、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を用いて植物生細胞の核における相互作用を確認した。また、*in vitro* で CYCLOPS が CCaMK によってリン酸化される事を証明した。

3. 研究実施体制

東京大学大学院 理学系研究科研究グループ

①研究分担グループ長：川口 正代司（東京大学大学院、助教授）

②研究項目：

- ・ 菌根・根粒過剰着生変異体の表現型解析と原因遺伝子の同定
- ・ 新奇根粒過剰着生変異体 *klavier* の表現型解析と原因遺伝子の同定

大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科グループ

①研究分担グループ長：秋山 康紀（大阪府立大学大学院、助手）

②研究項目：

- ・ Branching factor の精製と同定
- ・ Myc factor の精製と同定

大阪大学大学院工学系研究科グループ(H14.11～H18.1.15 迄)

①研究分担グループ長：林 誠（大阪大学大学院、助手）

②研究項目：

- ・ 変異系統のマッピングと遺伝子同定
- ・ 感染糸形成に関与する植物ホルモンの解析

ミュンヘン大学（林）グループ(H18.1.16～)

①研究分担グループ長：林 誠（ミュンヘン大学、教授）

②研究項目：

- ・ 変異系統のマッピングと遺伝子同定
- ・ 感染糸形成に関与する植物ホルモンの解析

農業生物資源研究所 生物機能研究グループ

①研究分担グループ長：梅原 洋佐（農業生物資源研究所、チーム長）

②研究項目：

- ・ 共生変異体の単離と戻し交配による変異体系統の確立
- ・ 共生変異体の原因遺伝子の連鎖地図へのマッピング
- ・ 共生変異体の原因遺伝子のポジショナルクローニング

畜産草地研究所 草地生態グループ

①研究分担グループ長：大友 量（畜産草地研究所、主任研究官）

②研究項目：

- ・ 菌根共生特異的変異体のスクリーニング:大友、小島、安藤
- ・ 根粒共生変異体の菌根共生に関わる表現型解析:小島、大友
- ・ 共生特異的細胞内因子の生化学的同定(予定):大友、小島

ミュンヘン大学グループ (Parniske)

①研究分担グループ長: Martin Parniske (ミュンヘン大学、教授)

②研究項目:

- ・ Cyclops の機能解析

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Akiyama K, Matsuzaki K and Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824-827 (2005)
- Takeda N, Okamoto S, Hayashi M and Murooka Y. Expression of *LjENOD40* genes in response to symbiotic and non-symbiotic signals: *LjENOD40-1* and *LjENOD40-2* are differentially regulated in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1291-1298 (2005)
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S, Shikazono N, Tanaka A, Watanabe Y, Fukuhara I, Nagata T and Kawaguchi M. *klavier (klv)*, a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in leaf vein and floral induction. *Plant Journal* 44, 505-515(2005)
- Krusell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kraemer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N and Udvardi MK. The sulfate transporter *SST1* is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17, 1625-1636 (2005)
- Kistne C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneno T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ, Szczyglowski K and Parniske M. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* 17, 2217-2229 (2005)
- Udvardi MK, Tabata S, Parniske M and Stougaard J. *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 10, 222-228 (2005)
- Parniske M. Plant-fungal associations: cue for the branching connection. *Nature* 435, 750-751 (2005)
- Kawaguchi M. “Activator” and “Inhibitor” leading to generation and stabilization of symbiotic organ development in legume. *Biological Nitrogen Fixation*, Wang Y-P et al. eds. 179-182 (2005)
- Hayashi M, Tansengco ML, Suganuma N, Szczyglowski K, Krusell L, Otto T and Udvardi M

- Methods for studying nodule development and function. *In: Lotus japonicus Handbook*, pp. 53-82, Márquez AJ, ed. Springer, Dordrecht (2005)
- Sandal N, Petersen TR, Murray J, Umehara Y, Karas B, Yano K, Kumagai H, Yoshikawa M, Saito K, Hayashi M, Murakami Y, Wang X, Hakoyama T, Imaizumi-Anraku H, Sato S, Kato T, Chen W, Hossain MdS, Shibata S, Wang TL, Yokota K, Larsen K, Kanamori N, Madsen E, Radutoiu S, Madsen LH, Radu TG, Krusell L, Ooki Y, Banba M, Betti M, Rispaill N, Skøt L, Tuck E, Perry J, Yoshida S, Vickers K, Pike J, Mulder L, Charpentier M, Müller J, Ohtomo R, Kojima T, Ando S, Marquez AJ, Gresshoff PM, Harada K, Webb J, Hata S, Suganuma N, Kouchi H, Kawasaki S, Tabata S, Hayashi M, Parniske M, Szczyglowski K, Kawaguchi M and Stougaard J. Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: Recombinant inbred lines, comparative genetic maps and map position of 35 symbiotic loci. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 80-91 (2006).
 - Nakagawa T and Kawaguchi M. Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiol.* 47, 176-180 (2006).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)