

「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 准教授)

「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、両者の共生を支えるシグナル伝達経路には少なからぬ共通性があることが示唆されている。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を特定する一方、菌根菌の分泌する共生因子 Myc factor (MF) の精製、同定を試みた。

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)

アーバスキュラー菌根形成と根粒形成の双方が破綻したミヤコグサ共生変異体 *sym85* (*sym73*, *sym24*) は、根粒菌の Nod factor を処理しても細胞内でカルシウムオシレーションを示さず、CASTOR や POLLUX と同様、カルシウムオシレーションの発生に必須の因子であることが示された。ポジショナルクローニングにより特定した原因遺伝子は、核孔を形成するヌクレオポリン様タンパク 85 と相同性を示し、NUP85 と命名した。昨年デンマークのチームは根粒形成と菌根形成の双方が破綻した変異体 *sym3* の原因遺伝子がヌクレオポリン様タンパク NUP133 をコードしていることを報告しており、またシロイヌナズナの病原応答が破綻した変異体の原因遺伝子もヌクレオポリン様タンパク NUP96 をコードしていることが報告され、ヌクレオポリンが広く植物と微生物の相互作用に関わっていることが示された。NUP85 の細胞内局在を調べると核膜に局在していたが、細胞間にもドット状にシグナルが観察された。*sym85* 変異体の共生以外の形質を詳細に調べた結果、豆果に含まれる種子数が少なく、花粉管の伸長にも顕著な異常が観察された。以上の結果から、NUP85 は菌根菌や根粒菌との共生のみならず、カルシウムオシレーションや花粉伸長にも必要とされることが明らかとなった。本研究を主に手がけた CREST 研究員の斉藤勝晴博士は信州大に採用となり、

本プロジェクトに新たに信州大齊藤グループを追加した。

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)

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) アッセイのさらなる改良を行った。サンプル処理にペーパーディスクの代わりにガラス繊維濾紙を用いることで擬陽性反応を完全に抑えることに成功すると共に、従来のチューブスラント法を改良した2号角シャーレを用いた平板ゲル法を新たに開発することにより、アッセイは実質的に完成したと言える感度と再現性を示すようになった。しかし、依然として被検植物の 50-70%程度しか呈色反応を示さないため、原因を追究したところ、分与された元の T90 形質転換体の種子に挿入 GUS 遺伝子をヘテロに持つものが混入しており、それ由来の個体から種子を採取したために、結果として GUS 遺伝子を持たない種子が生じたことが判明した。現在、GUS 遺伝子をホモに持つ個体を生育させ、改めて種子の大量採取を行っている。

ミュンヘン大学グループ (林誠)

本年度は昨年度に引き続き *CYCLOPS* の局在解析を行い、更に感染糸変異体 *alb1* の変異遺伝子を同定した。まずミヤコグサの根で RFP-CYCLOPS 融合タンパク質を発現させたところ、*CYCLOPS* が核に局在することが判明した。次に *CYCLOPS* スプライズバリエーションの発現量を調べたところ発現が確認されたので、それを用いて、*cyclops* 変異体の相補実験を行った。その結果、*CYCLOPS* cDNA を導入したものは低率の相補を示したのに対し、*CYCLOPS* スプライズバリエーション cDNA を導入したものはゲノム配列と同等の相補を示した。この結果は、*CYCLOPS* スプライズバリエーションが共生において重要な機能を有していることを示唆している。

alb1 のポジショナルクローニングのため、*Lotus japonicus* Gifu 由来の変異体と *L. burtii* の F₂ 個体 2795 個体をマッピングし、変異遺伝子を約 120kb に絞り込んだ。この領域に予想される遺伝子の塩基配列を調べ、*alb1* の 3 アリル全てに変異を持つ遺伝子を同定した。*ALB1* の cDNA とゲノムを用いて相補実験を行ったところ、どちらでも *alb1* 変異体を相補できた。この遺伝子是非感染根では発現が検出されず、根粒菌感染後、時間の経過に伴って発現の誘導が起こっていた。

ジベレリンによる根粒形成抑制がカルシウム-カルモジュリン依存型プロテインキナーゼ (CCaMK) の下流で働いていることを遺伝学的に明らかにした。

農業生物資源研究所 生理機能研究グループ(梅原洋佐)

C⁶⁺の重イオンビーム照射個体(Miyakojima)2900 系統由来のM2植物を用いた選抜が終了し、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 16 系統、根粒分化不全 Hist⁻型 3 系統、有効根粒形成不全 Fix⁻型 20 系統、超着生 Nod⁺⁺型 5 系統であった。変異体候補についてラフマッピングあるいは既知の変異体との相補性検定を行い、これまでに 7 系統(Hist⁻型 268,1699-1、Fix⁻型 240,295-3,1487-1,1447-2,1792-7)が新規、11 系統が既知の変異体と同座、あるいはその近傍に位置づけられることを明らかにした。

これまでに単離した Fix⁻変異体 *Ljsym105* および N49-GWN に関して、高精度マッピングと遺伝子クローニングに向けた物理地図作製を行った。また、根粒形成が bump の段階で阻害される *Ljsym101* 変異体の表現型解析から、根毛の途中で感染糸形成が阻害され、根粒形成が組織の未分化な bump の状態で停止する変異体であることを明らかにした。原因遺伝子座乗領域を第5連鎖群上の約 87 kb に絞り込み、候補遺伝子を特定した。本変異体のアレル系統 *sym7*, *sym41*, *sym55*, *sym57* において、候補遺伝子領域で変異を検出したので、これを原因遺伝子と同定した。*LjSYM101* は 1485 アミノ酸からなり、中央付近に U-box、C 末側に 3 つの WD40 リピートの特徴を持つドメイン構造を有することから E3 タイプのユビキチンリガーゼである可能性が予測された。

畜産草地研究所グループ (大友量)

(1) 菌根菌非感染変異株 (Myc⁻) の選抜

昨年に引き続き、ミヤコグサの変異株集団を菌根菌 *Glomus intraradices* の接種条件下で栽培し、栽培後の根を染色して菌根菌が感染できない変異株を選抜した。800 ライン以上の変異株から約 7000 株の選抜を行ったところ、いくつかの候補株は得られているものの目的とする変異株の取得には至っていない。

(2) 共生特異的にリン酸化されるタンパク質の探索

菌根菌感染の初期応答でリン酸化されるタンパク質を見出すために、あらかじめ *G. intraradices* を感染させたタマネギをナースプラントに用い、そこにメッシュバッグ内で栽培したミヤコグサを移植して感染初期の根を大量調製した。ここから抽出したタンパク質を PAGE で分析したところ、菌根感染初期にリン酸化量に変動するタンパク質を見出した。

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須な遺伝子 *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-CCaMK* の相互作用は酵母 2 ハイブリッド法や BiFC 法により確認されたが、この相互作用は *CCaMK* の持つキナーゼ活性に依存的であり、キナーゼ不活性型の *CCaMK* では *CYCLOPS* との相互作用を示さないことが示された。

この相互作用のより詳細な解析を行うため、HA 標識 *CYCLOPS* を作成した。HA 標識 *CYCLOPS* を発現させた毛状根よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行ったところ、*CYCLOPS* タンパク質の検出を行うことができた。さらに根粒形成シグナル分子である Nod ファクターを根に処理することによって *CYCLOPS* タンパク質含量の変化をとらえることができた。

信州大学農学部グループ (斎藤勝晴)

菌根および根粒共生の両者の形成過程に関わる分子メカニズムを解明するため、*NUP85* 遺伝子を同定した。ヌクレオポリンは核膜孔を形成するタンパク質群であり、酵母では約 30 種以上が知られている。ヌクレオポリンの一種である *NUP133* に変異をもつミヤコグサ共生変異体では低温条

件下で共生形成能が回復することが報告されている。そこで *nup85* 共生変異体においても同様に温度感受性の表現型を示すか検討したところ、*nup85* 変異体は低温条件下 (18° C) において根粒数および菌根菌感染率が上昇することが明らかとなった。特に、栽培温度の影響は菌根菌の樹枝状体形成に顕著に現れた。野生型ミヤコグサ (Gifu) と *nup85* 共生変異体の生育を比較したところ、栄養生長期の乾物生産には差が見られなかったが、種子数や花粉管伸長速度に関しては *nup85* 共生変異体で有意に低い値を示した。以上のことから *NUP85* 遺伝子は共生の形成過程だけでなく、生殖生長の一部にも関与していることが明らかとなった。

3. 研究実施体制

(1)「東京大学大学院 理学系研究科」グループ

①研究者名

川口 正代司 (東京大学大学院 助教授)

②研究項目

- ・HAR1 レセプターキナーゼによって認識される遠距離シグナル物質の探索
- ・新奇超根粒着生変異体 *klavier* の原因遺伝子の同定と機能解析

(2)「大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科」グループ

①研究者名

秋山 康紀 (大阪府立大学大学院 助教授)

②研究項目

- ・Myc factor (MF) の精製と同定

(3)「ミュンヘン大学 (林誠)」グループ

①研究者名

林 誠 (ミュンヘン大学 教授)

②研究項目

- ・共生変異体のマッピングと原因遺伝子の同定

(4)「生物資源研究所 窒素固定研究」グループ

①研究者名

梅原 洋佐 ((独)生物資源研究所 主任研究員)

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

(5)「畜産草地研究所」グループ

①研究者名

大友 量((独)農業・食品産業総合技術研究機構 畜産草地研究所 主任研究員)

②研究項目

- ・菌根特異的共生変異体の選抜する
- ・菌根共生初期に変動する生化学シグナルの同定と解析

(6)「ミュンヘン大学(Martin Parniske)」グループ

①研究者名

Martin Parniske(ミュンヘン大学 教授)

②研究項目

- ・菌根・根粒形成に必須とされる CYCLOPS の機能解析

(7)「信州大学」グループ H18.8～

①研究者名

斎藤 勝晴(信州大学 助教授)

②研究項目

- ・菌根・根粒形成に必須とされる *NUP85* 遺伝子の解析

4. 成果発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Murakami Y, Miwa H, Imaizumi-Anraku H, Kouchi H, Downie JA, Kawaguchi M, Kawasaki S. Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, A putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA Research* 13, 255-265 (2006)
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S and Stougaard J. Dereglulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441, 1153-1156 (2006)
- Nakagawa T and Kawaguchi M. Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiol.* 47, 176-180 (2006)
- 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 Md S, Shibata S, Wang T, Yokota K, Larsen K, Kanamori N, Madsen E, Radutoiu S, Madsen LH, Radu TG, Krusell L, Ooki Y, Banba M, Betti M, Rispaill N, Skot L,

- Tuck E, Perry J, Yoshida S, Vickers K, Pike J, Mulder L, Charpentier M, Muller 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 80-91 (2006)
- Yano K, Myra L.-T, Hio T, Higashi K, Murooka Y, Imaizumi-Anraku H, Kawaguchi M, and Hayashi M. New nodulation mutants responsible for infection thread development in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 801-810 (2006)
- Lombardo F, Heckmann A.B, Miwa H, Perry J.A, Yano K, Hayashi M, Parniske M, Wang T.L. and Downie J.A. Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1444-1450 (2006)
- Hossain Md. S, Umehara Y, Kouchi H. A Novel Fix⁻ Symbiotic Mutant of *Lotus japonicus*, *Ljsym105*, Shows Impaired Development and Premature Deterioration of Nodule Infected Cells and Symbiosomes *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 780-788 (2006)
- Brachmann A, and Parniske M. The Most Widespread Symbiosis on Earth *PLoS Biology* 4, 1111-1112 (2006)
- Mellersh D, and Parniske M. Common symbiosis genes of *Lotus japonicus* are not required for intracellular accommodation of the rust fungus *Uromyces loti*. *New Phytologist* 170, 641-644 (2006)
- Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmölling T, Parniske M, and Ludwig-Müller J. Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 480-494 (2006)
- Takeda N, Kistner C, Kosuta S, Winzer T, Pitzschke A, Groth M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Parniske M. Proteases in plant root symbiosis. *Phytochemistry* 68, 111-121 (2007)
- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie J.A, Parniske M, Hayashi M and Kawaguchi M. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*, 610-624 (2007)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:2 件)