

## 植物微生物相互作用の包括的解析

●田畑 哲之<sup>1)</sup> ◆中村 保一<sup>1)</sup> ◆川口 正代司<sup>2)</sup> ◆佐伯 和彦<sup>3)</sup> ◆南澤 究<sup>4)</sup>

1) かずさ DNA 研究所 2) 東京大学大学院理学系研究科 3) 奈良女子大学理学部 4) 東北大学大学院生命科学研究所

## &lt;研究の目的と進め方&gt;

共生現象は、植物-微生物間の相互作用メカニズムを解明する上で優れた研究対照である。また、養分吸収効率の上昇、耐病性の付加など宿主植物に利益を供与するため農業上の重要性も高い。マメ科植物の多くは自然界で根粒菌と共生関係を築いており、宿主特異性が高い、宿主とバクテリアの両方で新たな器官形成や大きな生理的变化が起こる、物質を介した複雑な相互作用がある、などの特徴をもつ。本研究は、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系を対象として、分子遺伝学的手法に加えてゲノム科学的手法を駆使することによって両者間の相互作用機作およびその遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。

実験材料としては、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) -ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) をモデル系として使用する。ミヤコグサでは、全ゲノム構造情報、900 を越える DNA マーカー、全ゲノムを 20 倍以上カバーする BAC ライブラリー、90,000 を越える EST 情報や cDNA クローンが整備されている。また、EMS やイオンビームで処理したミヤコグサから多数の共生変異体を単離し、対応する遺伝子座の特定を進めている。本研究では、上記ゲノムリソースを活用して共生変異体の原因遺伝子を単離し、その機能を解明する。ミヤコグサ根粒菌については、全遺伝子の構造情報、全ゲノムをカバーするコスミド、プラスミドクローンを利用した遺伝子欠失系により、候補遺伝子の系統的な機能解析を進める。さらに、酵母 Two-hybrid 系によるタンパク質相互作用を改良し、共生窒素固定への寄与が予想される多数の遺伝子産物を対象に大規模な相互作用解析を行う。

## &lt;2008 年度の研究の当初計画&gt;

宿主植物ミヤコグサについては、ゲノム情報より見出した根粒形成の全身的な制御に関わる *CLE* ペプチド遺伝子 *LjCLE1*, *LjCLE2* の感染根における発現部位を特定するとともに、RNAi による機能解析を行う。また、イオンビーム照射で単離した新規根粒過剰着生変異体 *too much love (tml)* およびアーバスキュラー菌根菌と根粒菌双方の共生が破綻した新規共生変異体の原因遺伝子を探索する。

ミヤコグサ根粒菌では、整備を進めている大規模遺伝子破壊系を用いて、相互作用情報から遺伝子機能解析を行う候補として選抜した 127 遺伝子について機能解析を進める。各遺伝子破壊株のミヤコグサへの接種実験を実施し、根粒形成能、形成根粒数を指標に評価する。さらに、佐伯らにより開発されたシングルクロスオーバーと部位特異的組換えを利用した遺伝子破壊系とも組み合わせ、より多くの遺伝子破壊株を取得し、解析候補遺伝子の機能解析や typeIII 系で分泌されるエフェクターの解析を実施する。また、タグ付き挿入変異株ライブラリー (STM) を用いて、ミヤコグサに対する競合的根粒形成能が低下した *M. loti* 変異株の大規模探索を実施する。これと平行して、新開発の第 3 世代 RIVET 系を用いて、根粒特異的に発現するミヤコグサ根粒菌遺伝子のスクリーニングを行う。得られた遺伝子の根粒内での発現量を定量するとともに破壊株の形質を調べる。

## &lt;2008 年度の成果&gt;

ミヤコグサのゲノム情報より根粒形成の全身的な負の制御に関わる可能性がある *CLE* ペプチド遺伝子 *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2* を同定した。これらの発現部位をレーザーマイクロダイセクション法で解析したところ、根粒菌の感染した根の皮層及び表皮を含む組織で発現が誘導されること、その発現誘導には、根粒形成の正の制御因子である *Nod factor* とそのシグナル伝達系の構成因子が必要であることが明らかとなった。しかし、RNAi によって 2 種の *CLE* 遺伝子の発現が 3 割程度まで減少したラインが得られたものの、共生における表現型は観察されなかった。

イオンビーム照射で単離した新規根粒過剰着生変異体 *too much love (tml)* は、これまでに単離されていた *har1* や *klavier* 変異体と異なり、根で根粒数を制御する新規変異体であることが分かった。遺伝子座は第一染色体長腕にマップされ、ダイズゲノムとのシntenシー解析によって遺伝子候補を特定した。

ミヤコグサ根粒菌の遺伝子機能解析を効率化する目的で、トランスポゾンを利用した 3 万クローンからなる挿入変異体ライブラリーを構築した。これまでに 9 千クローンについて挿入位置を解析した結果、3680 種類の遺伝子への挿入変異が確認された。新規共生窒素固定関連遺伝子の候補である 127 遺伝子のうち 83 遺伝子がここに含まれており、接種実験の結果、根粒数の増加や減少、根粒形成の遅延、無効根粒の形成などの表現型を示す 27 種類の変異株が得られた。

ミヤコグサ根粒菌の TypeIII 分泌系関連遺伝子の解析から、ミヤコグサ近縁の宿主 *L. halophilus* との共生成立に負の影響を与える原因遺伝子 *mlr6361* を同定した。*MLr6361* の構造を精査することにより、植物病原菌の TypeIII 遺伝子領域で見ついているエフェクター候補と共通する構造上の特徴 (40?45 アミノ酸残基の共通モチーフを 12~25 回繰り返すこと) を見いだした。

独自に開発した汎用性の改良 RIVET 系を運用することにより、共生成立過程または共生成立後に特異的に発現する遺伝子領域を約 50 同定した。これらには、既知遺伝子に加えて少なくとも 15 の機能未知の遺伝子が含まれており、これらの破壊 STM 株は単独では共生を成立可能だが、約半数は野生株と混合感染させた場合に共生能が劣る、すなわち共生成立時の競合に関連する遺伝子であることがわかった。

圃場ないし環境中においてマメ科植物との共生成立に働く根粒菌の遺伝基盤を解明する目的で、*M. loti* の同定済み挿入変異株ライブラリーから、ミヤコグサに対する競合的根粒形成能が低下した変異株の探索を行った。現在までに、探索済み 780 変異株の中から目的変異株候補 27 株の検出に至っている。

## &lt;国内外での成果の位置づけ&gt;

根粒形成の全身的な負の制御系に働き、遠距離移行する可能性の高い *CLE* ペプチド遺伝子をはじめ同定し、論文発表した。*CLE* ペプチド遺伝子の機能解明や遠距離移行の実証にまでは至らなかったが、植物と微生物の共生バランスや器官分化の制御メカニズムに迫る重要な成果である。またシュートで機能する HAR や *Klavier* 受容体型キナーゼ、さらには根で機能する *tml* 新規根粒着生変異体の単離など、共生の全身制御に関わる主要遺伝

子や変異体を次々と単離しており、世界のトップレベルにある。

3万クローンからなるミヤコグサ根粒菌の挿入変異体ライブラリーを作製し、その成果を論文として報告するとともに根粒菌のデータベース (RhizoBase) を通じて詳細情報を公開した。また、ライブラリーをNBRPのミヤコグサリソースセンターに寄託し配布体制を整えた。この変異株ライブラリーはミヤコグサ根粒菌を用いた共生相互作用解析の効率を高めることが期待でき、国内外の研究コミュニティに利用され始めている。

共生細菌の Type III 分泌系エフェクターと病原細菌のエフェクター候補に共通性のあることを見いだしたが、これは共生細菌の遺伝子の解析から病原細菌の遺伝子の構造・機能を予測することができた希な例と言える。スイスとアルゼンチン等でも類似のアプローチが為されているが、*Lotus* 属の近縁宿主系を確立している点で本研究グループが一步先んじている。

競合的条件下で実施された根粒形成能低下変異株の探索としては、我々と同様に STM を適用したアルファルファ根粒菌の研究 (Pobigaylo et al. 2008) を例として挙げられる。しかし、わずか 756 変異株を探索対象とした試行的なもので、ゲノム規模の網羅的探索をめざす点で本研究とは比較にならない。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

*LjCLE-RS1* や *LjCLE-RS2* の RNAi によるノックダウンを試みたが、発現量を十分に抑えることができなかった。これは、ターゲットにする *CLE* 遺伝子が、誘導性でかつ短い遺伝子であることが原因と考えられる。また、*LjCLE-RS1* と *LjCLE-RS2* は同様の機能を持つと思われるが、両者の相同性が *CLE* ドメインの 12 アミノ酸を除いてさほど高くないので、効率的なノックダウンが難しかったのかもしれない。今後共生に限らずマメの遺伝子機能解析を推進するには、homologous recombination によるジーンターゲットングなどの新たな基盤の確立が必要であると思われる。

トランスポゾンを利用した挿入変異体ライブラリーの構築では、得られたクローンの 3 割について挿入位置の確認を行うことで、ミヤコグサ根粒菌遺伝子の約 51% に相当する 3680 遺伝子の破壊株を取得することができた。しかし、挿入位置決定の成功率が予想よりも低かったことで、挿入変異が確認されている遺伝子の率が当初計画よりも低くなってしまった。これについては、挿入位置未解析のクローンの 3D プールを作製し、ターゲット遺伝子に対するスクリーニング系を構築することで対応する。

ミヤコグサ根粒菌 TypeIII エフェクターのうち、共生に正の効果を持つものを同定する計画は遅延している。また、ミヤコグサ根粒菌 TypeIII 分泌装置サブユニットとエフェクター候補のプロテオーム解析を行う予定であったが達成できていない。個別の根粒から、根粒菌の分離、プラスミドを大腸菌に移して回収、評価、再導入による確認実験を行う必要のある改良 RIVET 系を用いた実験に多くの人的・時間的資源を費やした為である。

本研究の STM では、分析対象が微生物と植物との共生体であるが故に、STM に付随する各 signature を従来の手法で定量可能かどうか心配があった。結果的には問題なしと判断することができたが、その確認作業に多くの時間を取られ、当初目標の 1,887 遺伝子各々の変異株ライブラリーの探索完了には至らなかった。

#### <今後の課題>

*LjCLE-RS1* や *LjCLE-RS2* の共生における機能を明らかにするため、またマメ科植物に特徴的な遺伝子の機能を明らかにするためにも、ミヤコグサでジーンターゲットング法を確立する必要がある。マメ科植物において過去ジーンターゲットングが成功した例はないが、ゲノム情報が明らかにされた今日必要とされる技術であり、将来的にはタンデムリピートの多いダイズの遺伝子機能解析においても不可欠の技術である。今後は、selection marker や薬剤の検診など、ミヤコグサでのジーンターゲットングに向けた技術開発を行っていきたい。

ミヤコグサ根粒菌では、解析対象として選定した 127 遺伝子のうち挿入変異株が得られていない 44 遺伝子について、挿入位置未解析のクローンを用いた 3D プールをスクリーニングする。これにより、できるだけ多くの候補遺伝子について変異株を取得し、プロジェクト期間内に接種実験による根粒形成能、窒素固定活性への影響を調査する。また、H20 年度の解析で共生窒素固定に対する影響が認められた遺伝子、特に窒素固定活性に影響が認められたものについては、根粒内の細胞の状況を含めて調査するとともに、予測アミノ酸配列情報、相互作用情報、発現情報等を合わせて検討し遺伝子機能の解明をめざす。

*L. halophilus* との共生成立に負の影響を与える Mlr6361 の機能ドメインの同定を行う。このために Mlr6361 を分断して分子タグを付加する遺伝子をゲノム中に埋め込む。また、*L. halophilus* に根粒を形成する *M. loti* 変異株の分離とその変異部位の決定に関する田畑グループの解析結果から、従来は報告されていない TypeIII 分泌系関連遺伝子がゲノム全体に散在していることが示唆された。これらの遺伝子を含む新規 TypeIII 分泌系関連遺伝子をトランスクリプトーム解析により網羅的に同定することをめざす。また、改良 RIVET 系を用いて得られた共生成立での競合に関連する遺伝子について、競合性の定量化を試みるとともに、発現時期の同定を行う。

#### <成果公表リスト>

1.0901081722

Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M.: CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105:20540-20545 (2008)

0901081649

Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, Tabata S, Sato S.: A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*, Plant Physiol. 147 (4) :2030-2040. (2008)

0901081640

Shimoda Y, Mitsui H, Kamimatsuse H, Minamisawa K, Nishiyama E, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M, Shinpo S, Watanabe A, Kohara M, Yamada M, Nakamura Y, Tabata S, Sato S.: Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics, DNA Res. 15 (5) :297-308. (2008)

0806232135

Shimoda Y, Shinpo S, Kohara M, Nakamura Y, Tabata S, Sato S.: A large scale analysis of protein-protein interactions in the nitrogenfixing bacterium *Mesorhizobium loti*, DNA Res. 15:13-23. (2008)

0901100825

Hanyu, M., Fujimoto. H., Tejima, K. and Saeki, K.: Functional differences of two distinct catalases in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 under free-living and symbiotic conditions. J. Bacteriol. in press

0901101911

Itakura M, Tabata K, Eda S, Mitsui H, Murakami K, Yasuda J, Minamisawa K. Generation of Bradyrhizobium japonicum mutants with increased N2O reductase activity by selection after introduction of a mutated dnaQ gene. Appl Environ Microbiol. 74: 7258-64 (2008)

(他、計 13 報)