

ミヤコグサの根粒共生系におけるクラス 1 植物ヘモグロビンの  
機能に関する研究

2019 年 3 月

福留 光拳

# 目次

## 第1章：序論

1-1	マメ科植物-根粒菌の根粒共生系	7
1-2	植物ヘモグロビンの分類と既知の機能	8
1-3	class 1 Hb の一酸化窒素 (NO) 調節と植物の生理応答	10
1-4	植物-微生物相互作用での NO と class 1 Hb	11
1-5	根粒共生系での NO と class 1 Hb	12

## 第2章：根粒共生系における class 1 植物ヘモグロビンの役割

2-1	緒論	14
2-2	方法	16
2-2-1	<i>LjGlb1-1</i> 変異系統の樹立	16
2-2-2	植物の生育条件と根粒菌接種	17
2-2-3	感染過程及び根粒形成とニトロゲナーゼ活性	18
2-2-4	根組織内 NO の観察と放出 NO の定量	18
2-2-5	外因性 NO が共生に及ぼす影響	19
2-2-6	His タグ組換え <i>Glb1-1</i> の産生と活性評価	20
2-2-7	GST タグ組換え <i>Glb1-1</i> の産生と活性評価	21

2-2-8	<i>LjGlb1-1</i> 遺伝子を導入した大腸菌の NO 耐性の測定	21
2-2-9	MOE (Molecular Operating Environment) による <i>LjGlb1-1</i> の立体構造予測	22
2-3	結果	23
2-3-1	<i>LjGlb1-1</i> 変異系統の樹立	23
2-3-2	変異系統の生長	25
2-3-3	<i>LjGlb1-1</i> 変異系統の共生表現型	27
2-3-4	<i>LjGlb1-1</i> 変異系統内外の NO 量	28
2-3-5	NO 供与剤の接種が感染糸形成に及ぼす影響	31
2-3-6	感染中の <i>LjGlb1-1</i> 及び <i>LjGlb1-2</i> の発現プロファイル	32
2-3-7	組換え <i>LjGlb1-1</i> の活性評価	34
2-3-8	<i>LjGlb1-1</i> 産生形質転換大腸菌の NO 耐性	38
2-3-9	MOE (Molecular Operating Environment) を用いた 立体構造予測	39
2-4	考察	41

### 第 3 章：*LjGlb1-1* 遺伝子高発現による共生ニトロゲナーゼ活性の向上

3-1	緒論	45
-----	----	----

3-2	方法	47
3-2-1	<i>LjGlb1-1</i> 遺伝子高発現系統の樹立	47
3-2-2	<i>LjGlb1-1</i> 遺伝子高発現系統の <i>LjGlb1-1</i> 発現量の解析	48
3-2-3	植物の生育条件と根粒菌接種	48
3-2-4	根粒形成とニトロゲナーゼ活性の測定	49
3-2-5	根組織内 NO の観察と放出 NO の検出	49
3-3	結果	50
3-3-1	<i>LjGlb1-1</i> 遺伝子高発現系統の樹立	50
3-3-2	高発現系統の共生表現型	50
3-3-3	高発現系統の根系の NO 量	53
3-4	考察	55

## 第 4 章：*LjGlb1-1* 遺伝子高発現による根粒老化の遅延

4-1	緒論	57
4-2	方法	59
4-2-1	生物材料	59
4-2-2	植物の生育条件と根粒菌接種条件	59
4-2-3	NO 供与剤、NO 除去剤、植物ホルモンによる根粒の処理	59

4-2-4	老齡根粒のニトロゲナーゼ活性測定	60
4-2-5	老齡根粒とホルモン処理根粒の放出 NO 量測定	60
4-2-6	老齡根粒の色の評価	60
4-2-7	根粒老化関連遺伝子の発現解析	61
4-2-8	感染細胞の観察	61
4-3	結果	63
4-3-1	老齡根粒の緑色化の比較	63
4-3-2	高発現系統の老齡根粒のニトロゲナーゼ活性	63
4-3-3	高発現系統の老齡根粒の NO 量	64
4-3-4	高発現系統の老齡根粒の感染細胞崩壊の遅延	65
4-3-5	高発現系統の老化関連遺伝子の発現	67
4-3-6	NO と植物ホルモンが根粒共生系に与える影響	68
4-3-7	植物ホルモンによる NO と <i>LjGlb1-1</i> 遺伝子の誘導	70
4-4	考察	73

## 第 5 章： *class 1 Hb* 遺伝子高発現による根粒共生系の冠水耐性獲得

5-1	緒論	76
5-2	方法	79

5-2-1	生物材料	79
5-2-2	<i>AfHb1</i> 遺伝子発現系統の樹立	79
5-2-3	植物の生育条件と冠水処理	80
5-2-4	ニトロゲナーゼ活性の測定	80
5-2-5	感染細胞の観察	81
5-2-6	NO 量の測定	81
5-2-7	クロロフィル量の測定	81
5-3	結果	83
5-3-1	冠水処理後のニトロゲナーゼ活性	83
5-3-2	冠水処理後の感染細胞	85
5-3-3	冠水処理の地上部に及ぼす影響	86
5-3-4	冠水処理後の根及び根粒の NO レベル	87
5-3-5	冠水処理後の根粒の老化関連遺伝子の発現	89
5-4	考察	91
第 6 章：総括		94
謝辞		102
引用文献		103

# 第1章：序論

## 1-1 マメ科植物-根粒菌の根粒共生系

「共生」の語源は19世紀にドイツの植物病理学者が作った科学用語で、共に (Sym) 生きる (biosis) つまり、二種以上の生物と一緒に生活している (Symbiosis) ことを示す。共生の中でも、互いに利益を与え合う関係を相利共生という。相利共生は動物、植物、細菌の間で広く成立しており、これまでも多くの共生関係が研究対象となってきた。マーグリスの細胞内共生説によって、グラム陰性細菌が細胞内共生することでミトコンドリアとなり、ラン藻類が葉緑体となったことも広く知られている。共生関係にはアブラムシとブフネラのように、共生相手が存在しないと生存出来ないような絶対共生と、よりルーズな共生関係が存在する。マメ科植物と根粒菌の共生は絶対共生ではないものの、共生特異的な器官を形成する特徴的なものであり、古くから共生系のモデルケースとして研究されている。

マメ科植物の多くは根粒菌との共生窒素固定によって、大気中の分子状窒素を窒素源として活用できる。ダイズ、インゲン、エンドウのように、マメ科植物には重要な農作物として知られているものもあり、飼料やバイオマスエネルギーとしても活用されている。また、窒素は、植物の三大栄養素としてリン、カリウムとともに植物の生長に極めて重要な栄養源であるため、根粒共生系は農業・工業応用の観点からも重要視されている。この根

粒共生系の成立には、マメ科植物-根粒菌間で高度かつ複雑なシグナル分子のやり取りが必要であることから、生物間相互作用の観点からも注目を集めている。シグナル分子には、フラボノイドや Nod ファクターとして知られるリポキトオリゴ糖、ペプチド、一酸化窒素や一酸化炭素を含む多くのガス状小分子など、様々な分子が利用されている。

## 1-2 植物ヘモグロビンの分類と既知の機能

一般に、ヘモグロビンは哺乳動物の血液中に大量に存在しており、酸素 ( $O_2$ ) 運搬に機能することが知られている。ヘモグロビンは哺乳動物に限らず、生物界に広く存在しており、植物も植物ヘモグロビンを持つ。植物ヘモグロビンは、アミノ酸配列や生化学的性質に基づいて3つのタイプに分類される (Trevaskis *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2002; Smagghé *et al.*, 2009) (Fig. 1)。class 1 植物 Hb は、 $O_2$  に対し極めて高い親和性を有し (Sáenz *et al.*, 2004)、その高すぎる  $O_2$  親和性から酸素運搬あるいは酸素センサーとして機能しているとは考えられない (Smagghé *et al.*, 2009)。一方で、細胞内一酸化窒素 (NO) レベルの調節に関与していることを示す証拠 (Igamberdiev and Hill., 2004; Hebelstrup *et al.*, 2013; Perazzolli *et al.*, 2004) や、NO レベルを調節することで、低酸素条件下で細胞エネルギーの保存に機能することが報告されている (Hill *et al.*, 2012)。class 2 植物 Hb はレグヘモグロビン (Lb) の進化的前駆体であり、適度な  $O_2$  親和性を示す (Sainz *et al.*, 2013)。それらの機能は不明であるが、生体内条件下で NO を除去することも可能であり

(Hebelstrup & Jensen, 2008)、発生中の器官や高い代謝を要求する組織で高く発現する (Vigeolas *et al.*, 2011、Elhiti *et al.*, 2013)。class 3 植物 Hb または切断型 Hb の O<sub>2</sub> 親和性は高くなく、いくつかの class 3 植物 Hb は根粒や菌根で誘導される (Vieweg *et al.*, 2005)。また、NO とも相互作用する可能性も報告されている (Sanz-Luque *et al.*, 2015)。Lb に代表される共生型ヘモグロビン (一部の class 2 植物 Hb) は、マメ科植物及びアクチノリザル植物の根粒に存在し、バクテロイドの呼吸及びニトロゲナーゼ活性の安定化のために根粒内を低酸素濃度に維持する役割を持ち (Appleby 1984; Ott *et al.*, 2005)、共生窒素固定に必須である。対照的に、非共生型ヘモグロビンは、植物組織に全身的に発現しており、マイクロモル濃度で見出される (Trevaskis *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 2001; Smagghe *et al.*, 2009)。最近では、その植物生理上での重要性から、フィトグロビンとも称されるようになっている (以降本論文では、特に断りのない限り植物ヘモグロビンとヘモグロビンと称する)。



Fig. 1 植物ヘモグロビンのアミノ酸配列に基づいた分子系統樹.

### 1-3 class 1 Hb の一酸化窒素 (NO) 調節と植物の生理応答

一般に、Hb は、 $O_2$ 、二酸化炭素( $CO_2$ )、一酸化炭素(CO)、硫化水素( $H_2S$ ) 及び NO のような小分子と会合する。class 1 Hb は NO に応答して発現が誘導され(Shimoda *et al.*, 2005; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2011)、哺乳動物の Hb と同様に、NO を  $NO_3^-$  に酸化し除去する (Perazzoli *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2004) ことから、植物内 NO 量の恒常性に寄与していると考えられている。動物と同様に植物でも、NO は生物的、非生物学的ストレスに

対する様々な生理的応答に伴って産生される。また、非ストレス時にも気孔の開閉 (Mata and Lamattina, 2002)、タンパク質の S ニトロシル化、cGMP のニトロ化修飾 (Joudoi *et al.*, 2013) など様々な植物の生理応答に関与する。発生の局在や濃度によって多様なシグナル分子としての役割を担うことから、現在では、NO そのものも植物ホルモンと位置付ける研究者もいる (<https://www.natureasia.com/ja-jp/nature/highlights/23812>)。class 1 Hb は、その NO 量を調節することにより、植物の生理的応答を調節する。class 1 Hb の発現量の変化は、植物の生理応答に変化をもたらす。class 1 Hb を過剰発現する遺伝子組換えシロイヌナズナは、植物内 NO 量が減少し、低酸素ストレスに対する耐性を得る (Hunt *et al.*, 2002)。また、class 1 Hb の発現を抑制した遺伝子組換えシロイヌナズナは、発育不全及び開花遅延を示す (He *et al.*, 2004; Hebelstrup & Jensen, 2008)。これらの知見から、class 1 Hb は、NO 制御を介して植物生理に深く関与していると考えられる。

#### 1-4 植物-微生物相互作用での NO と class 1 Hb

植物-微生物相互作用において、NO は植物の病原応答時に産生され (Mur *et al.*, 2005)、病原体への抵抗性に関与する (Asai & Yoshioka, 2009) ほか、感染応答タンパク質の遺伝子発現のひき金となる (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998)。class 1 Hb も NO 及び病原体に応答して誘導され、病原体への抵抗性に関与する (Shimoda *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2006)。アルファルファの class 1 Hb 遺伝子 (*Mhb1*) を発現するタバコは、NO 耐性及び病

原菌や病原ウイルスへの抵抗性を獲得する。この形質転換タバコでは活性酸素種（ROS）とサリチル酸（SA）の蓄積増加が確認され（Seregelyes *et al.*, 2003）、その後、防御応答関連遺伝子である *PR1a* の発現増加も確認されている（Seregelyes *et al.*, 2004）。綿花の class 1 Hb 遺伝子 (*GhHb1*) は、サリチル酸 (SA)、メチルジャスモン酸 (MeJA)、エチレン (ET)、活性酸素種 (ROS)、NO といった防御応答関連物質により誘導される。*GhHb1* を発現するシロイヌナズナでは、防御応答遺伝子 *PR1* と *PDF1.2* の発現が増加し、*Pseudomonas syringae* 及び *Verticillium dahliae* に対する抵抗性を得る (Qu *et al.*, 2006)。これらの報告から、class 1 Hb は、NO と植物ホルモンを介し、防御応答の調節に関与していると考えられる。

## 1-5 根粒共生系での NO と class 1 Hb

根粒菌と宿主マメ科植物の根粒共生系では、共生根粒菌の接種が、根での NO の産生と class 1 Hb の発現を誘導することが観察されている (Nagata *et al.*, 2008)。NO は、植物の防御応答を惹起するシグナル分子であるが (Wendehenne *et al.*, 2004)、タルウマゴヤシ根粒共生系では、最適な共生確立のために必要とされる (Del Giudice *et al.*, 2011)。ニトロゲナーゼ活性を抑制することでも知られる NO (Trinchant & Rigaud, 1982) は、共生器官である根粒内部においても検出できる (Baudouin *et al.*, 2006)。cPTIO (carboxy-2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxy) の様な NO 除去剤の添加は、ミヤコグサ

及びアクチノリザル植物であるヤシャブシの根粒において、ニトロゲナーゼ活性を改善する (Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009)。ヤシャブシとミヤコグサの根粒では class 1 Hb の発現量が上昇している (Uchiumi *et al.*, 2002; Sasakura *et al.*, 2006) ことから、根粒内における class 1 Hb は、根粒内 NO の除去を介し、根粒機能の維持に関与していることが予想される。しかし、根粒における class 1 Hb の発現機構については、miR156 や miR172 のようなマイクロ RNA、転写調節因子 AP2-2 の関与 (Yan *et al.*, 2013; Bárbara *et al.*, 2015) や多くの植物ホルモンとのクロストークが複雑に干渉しあっていることから、詳細は不明のままである。

本研究では、ミヤコグサ class 1 Hb (LjGlb1-1) の変異系統、低発現系統、高発現系統及び、ヤシャブシ class 1 Hb (AfHb1) の発現系統をミヤコグサ (*Lotus japonicus* Gifu B-129) から作出し、表現型を解析した。class 1 Hb の NO 制御が根粒共生系の成立過程、維持過程、終了過程でどのように機能するかを明らかにし、さらに、NO 制御能の向上が根粒共生系の長期化やストレス耐性に寄与することを証明した。

## 第2章：根粒共生系における class 1 植物ヘモグロビンの役割

### 2-1 緒論

class 1 Hb は、植物体内の一酸化窒素 (NO) と相互作用することにより、植物の様々な生理応答に関与している。マメ科植物と根粒菌の根粒共生系では、NO が共生成立までの主な過程、さらには、共生成立後の根粒内部にも検出される (Fig. 2)。

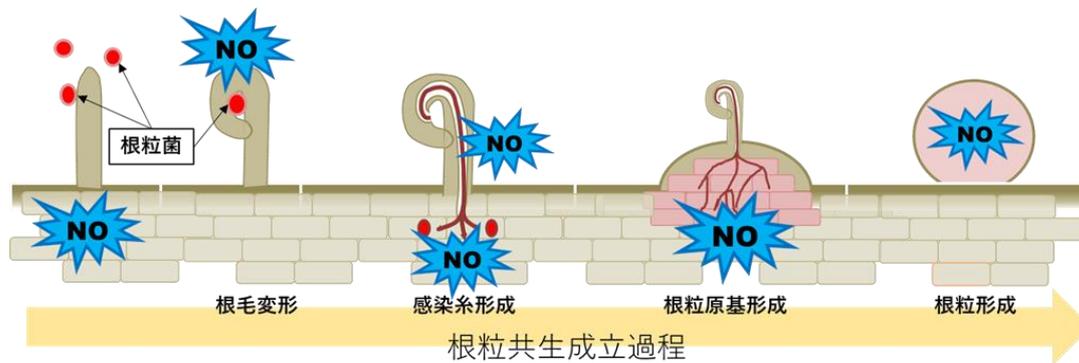


Fig. 2 根粒菌の感染過程と根粒で発生するNOの模式図

NO は窒素固定酵素 (ニトロゲナーゼ) を阻害するほか、根粒共生系に必須であるレグヘモグロビン (Lb) の機能も阻害する事から、共生窒素固定系における NO の制御は、極めて重要であると考えられる。また、NO は防御応答シグナル分子でもあるため、根粒菌の宿主への感染 (侵入) 時にも NO 量制御は重要であると考えられる。ミヤコグサでは、class 1 Hb の 1 つである *LjGlb1-1* が感染から共生窒素固定までの様々な段階で発現していることや、根粒で発現が高いことが分かっており、*LjGlb1-1* 遺伝子の発現部位と NO が検出される部位とは完全に一致している。*LjGlb1-1* 遺伝子は NO に応答して発現する

(Shimoda *et al.*, 2005) ことや、組換え LjGlb1-1 は NO 除去能を持つことも報告 (Shimoda *et al.*, 2009) されている。これらのことから、ミヤコグサでは、根粒共生時に発生する NO を LjGlb1-1 によってコントロールし、効率的な共生系の成立に寄与しているのではないかと仮説をたてた。

この仮説を証明するため、本研究では LjGlb1-1 の変異系統と低発現系統を作出し、植物内外の NO レベルと共生表現型を解析した。また、NO 供与剤が根粒共生系に与える影響について検討し、LjGlb1-1 の変異系統と低発現系統の表現型と比較した。さらに、変異型と野生型の LjGlb1-1 組換えタンパク質を産生し、吸収スペクトルと立体構造予測、NO 除去活性試験から NO 反応性と共生への影響について考察した。

## 2-2 方法

### 2-2-1 *LjGlb1-1*変異系統の樹立

本研究では、ミヤコグサの野生型系統である *Lotus japonicus* B-129Gifu 系統、Gifu の EMS 処理により得られた変異体集団から TILLING により選抜された 1 アミノ酸置換系統、Gifu のレトロトランスポゾン LORE1 挿入変異集団より得られた低発現系統を使用した。

ミヤコグサの TILLING 変異系統 (Perry *et al.*, 2009) は、RevGenUK (<http://revgenuk.jic.ac.uk/>) より、*LjGlb1-1* に変異を有する M3 種子を購入した。ゲノム DNA は M4 植物の葉から DNeasy Plant Kit (Qiagen) を用いて調製した。変異系統は、親系統であるヘテロ変異系統 (m/w) の自家受精により、変異型ホモ系統 (m/m) 野生型ホモ系統 (w/w) を作出した。変異型ホモ系統と野生型ホモ系統は、5'-AGTCTAGAGTAATCACATCAATTCCACC-3'、5'-TGAGTCTAAGAAGATGATGGCTTCA -3'のプライマーを用いた PCR で増幅された DNA 断片の塩基配列で識別した。反応条件を 94°C 30 秒、57°C 1 分、72°C 1 分、25 サイクルとし、増幅産物の塩基配列を決定した。野生型及び変異型のホモ系統に由来する M5 植物を、後の実験に使用した。

LORE1 コレクション (Fukai *et al.*, 2012; Urbański *et al.*, 2012; Małolepszy *et al.*, 2016) から、*LjGlb1-1* の 5'-非翻訳領域 (UTR) にレトロトランスポゾン LORE1 挿入を有するヌ

ル変異体 (30096642 系統; 以後簡略化するために 96642 と略記する) が選抜され、スペイン・Aula Dei 研究所の Manuel Becana 博士より提供を受けた。PCR によって LORE1 挿入のホモ系統であることを確認した。96642-fw プライマー 5'-CATGGCATGAGGCTTGAGCTGGG-3' 及び 96642-rev プライマー 5'-TGAAACCACTCTCTTCTCGCCGCA-3' を使用して WT LjG1b1-1 を増幅し、96642-fw プライマー及び LORE1 プライマー P2 5'-CCATGGCGGTTCCGTGAATCTTAGG-3' を用いて LORE1 挿入 LjG1b1-1 を増幅した。

## 2-2-2 植物の生育条件と根粒菌接種

種子の表面をサンドペーパーにより傷つけ、有効塩素濃度 2% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌し、蒸留水で洗浄、吸水処理後、0.5% 寒天プレートに播種した。25°C で 5 日間、暗所でインキュベート後、Fåhraeus (1.5% 寒天) 培地 (Fåhraeus, 1957) または Jensen (0.9% 寒天) 培地 (Pajuelo and Stougaard, 2005) に実生を移植した。表現型解析時は、実生を Fåhraeus 培地上で生育させ、各実生に *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000) または MAFF303099 DsRed (Maekawa *et al.*, 2009) を  $10^6$  細胞ずつ接種した。リアルタイム qRT-PCR による発現解析時は、実生を Jensen 培地上で生育させ、*M. loti* R7A を  $10^7$  細胞ずつ接種した。接種の 1, 2, 4, 6 日後にそれぞれ根を収集し、液体窒素中で急速冷凍後、使用するまで -80°C で保存した。同じ齢の菌未接種根をコントロールとして用いた。プレート培地

は、黒いボール紙によって根系を遮光した。根粒非着生時の表現型解析時は、Fåhraeus 培地に終濃度 1.5 mM の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を添加した。全ての実験系で、プレートを 25°C、明期 16 時間/暗期 8 時間の条件でインキュベートした。

### 2-2-3 感染過程及び根粒形成とニトロゲナーゼ活性

感染系 (IT) は MAFF303099 DsRed 接種 2 週間後にカウントした。Małolepszy ら (2015 年) に従い、IT を 2 つの群 (incipient IT と long IT) に分けてカウントした。本研究では、elongating IT も long IT に分類した。菌接種 4 週間後に、根粒数、各植物長及び生重量を測定した。根粒のニトロゲナーゼ活性は、アセチレン還元活性検出法 (Shimoda *et al.*, 2009) に従った。1 cm × 15 cm に切って滅菌水に浸した濾紙にミヤコグサをのせ、容量 33 ml の試験管に入れた。試験管の口をシーラムキャップで蓋をし、さらにシーラムキャップの縁をパラフィルムでシールした。シリンジで試験管内の空気を 3.3 ml 抜き、アセチレンガスを 3.3 ml 注入した。試験管を 25°C で 1 時間インキュベートした後、試験管内の空気を 1 ml シリンジで取り、ニトロゲナーゼにより還元されて生じたエチレンは、ガスクロマトグラフィー (島津ガスクロマトグラフィー GC-8A) で定量した。

### 2-2-4 根組織内 NO の観察と放出 NO の定量

5 日齢の実生の根内の NO 産生は、(Nagata *et al.*, 2008) の手法に従い、蛍光顕微鏡で観

察した。実生に *M. loti* MAFF303099 または滅菌蒸留水を接種し、3 時間インキュベートした。その後、20  $\mu$ M の 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM DA; Sekisui Medical, Japan) で 1 時間処理した。NO の除去効果を検討する実験では、NO 除去剤 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) を DAF-FM DA と同時に 3 mM の濃度で処理した。蛍光写真は共焦点画像を A1si-90i 顕微鏡 (Nikon, Japan) 及び Eclipse90i 顕微鏡 (Nikon, Japan) を用いて撮影した。蛍光写真の蛍光強度を画像解析ソフト Image J により評価した。根から放出される NO の量は、*M. loti* MAFF303099 接種 4 時間後に、Tominaga ら (2009) に従って評価した。根を 7  $\mu$ M の DAF-FM で 3 分間処理し、ES-2 マイクロ UV 可視蛍光分光光度計 (Malcom; Japan) を用いて、DAF-FM 溶液の蛍光強度を測定した。励起波長 495nm 及び蛍光波長 519nm として検出した。放出 NO 量は、根の生重量あたりの相対蛍光強度として算出した。

#### 2-2-5 外因性 NO が共生に及ぼす影響

5 日齢の実生に *M. loti* MAFF303099 DsRed を接種し、同時に 500  $\mu$ M の SNAP または 100  $\mu$ M の SNP を接種した。SNAP 及び SNP は、単独または 500  $\mu$ M の cPTIO と同時に接種した。接種 2 週間後に、感染糸 (incipient IT と long IT) の数をカウントした。

## 2-2-6 His タグ組換え Glb1-1 の産生と活性評価

Champion pET200 / D-TOPO ベクター (Invitrogen) 中で、Sainz ら (2013) に従って LjGlb1-1 タンパク質 (WT) を発現させた。A102V 及び E127K 変異 LjGlb1-1 は、Mutagenex (Somerset, NJ, USA) により PCR に基づく置換によって変異を誘導した。DNA の塩基配列と得られたタンパク質のアミノ酸配列の両方を決定して、アミノ酸置換を確認した。

N 末端ポリ His タグを有するタンパク質は、0.2 mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside を用いて 37°C で 6 時間、*E. coli* C41 (DE3) 細胞 (Lucigen) で発現させた。培養菌体を 50 mM リン酸カリウム (pH7.5) に懸濁し、超音波破碎し、遠心分離により沈殿を除去した。上清を 30-75% 硫酸アンモニウムで分画し、得られた沈殿をリン酸緩衝生理食塩水 [PBS; 50 mM リン酸カリウム (pH7.5) + 150 mM NaCl] に再懸濁し、Ni アフィニティーカラム (HiTrap Chelating HP; GE Healthcare) にロードした。カラムを 5  $\times$  PBS + 20 mM イミダゾールで洗浄し、組換えタンパク質を PBS + 250 mM イミダゾールで溶出した。タンパク質をフェリシアン化物で酸化し、PBS で透析し、濃縮後、Soret 吸収帯の吸光度を測定し、検量線に基づいて定量した。Hb<sup>3+</sup>、Hb<sup>2+</sup>、(Hb<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>) 状態における LjGlb1-1 タンパク質 (WT 及び A102V, E127K) の Soret 可視スペクトルを、UV 可視 Lambda 25 分光光度計 (Perkin-Elmer) で測定した。Hb<sup>2+</sup> は Hb<sup>3+</sup> に微量の亜ジチオン酸塩を添加することによって生成され、Hb<sup>2+</sup> は NAP-5 mini-column (GE Healthcare) に通すことによって形成された。組換えタンパク質の NOD 活性は、2 つの NO 供与体 NONOate

(DEA; 20  $\mu$ M)と S-nitrosoglutathione (GSNO; 1 mM)、及び NO 特異的電極 (ISO-NOP) を使用して測定した。

### 2-2-7 GST タグ組換え Glb1-1 の産生と活性評価

LjGlb1-1 タンパク質 (WT) の生産は、pGEX4T-3::LjGlb1-1 cDNA プラスミド (Shimoda *et al.*, 2009) を使用した。A102V 及び E127K 変異 LjGlb1-1 の cDNA コンストラクトは PrimeSTAR@ Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) のプロトコルに基づいて作製した。 *E. coli* Origami (Novagen) へヒートショック法を用いて形質転換し、得られた形質転換体を *E. coli* Origami (pGEX-4T-3/ljglb1-1<sub>A102V</sub>・pGEX-4T-3/ljglb1-1<sub>E127K</sub>) 及び *E. coli* Origami (pGEX-4T-3/LjGlb1-1) とした。0.8 mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside を用いて 16°C で 20 時間発現させた。50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に菌体を懸濁後、超音波破碎機 (三井電気精機株式会社、UX-050) で菌体を破碎し上清を回収した。Glutathione Sepharose 4B beads (Protenova) のプロトコルに基づいて、上清から GST 組換えタンパク質を精製し、ブラッドフォード法で定量した。精製後の組換え Glb1-1 の Hb<sup>3+</sup>, Hb<sup>2+</sup>, Hb<sup>2+</sup>O<sup>2</sup> への状態変化及び NO 除去活性試験は、Smaghe ら (2008)、Sturms ら (2011)、Wang ら (2013) に従った。

### 2-2-8 *LjGlb1-1* 遺伝子を導入した大腸菌の NO 耐性の測定

*E. coli* Origami (pGEX-4T-3/ LjGlb1-1) と、*E. coli* Origami (pGEX-4T-3/ ljglb1-1<sub>A102V</sub>) または pGEX-4T-3/ ljglb1-1<sub>E127K</sub>) とベクターコントロール *E. coli* Origami (pGEX-4T-3) を用いた。それぞれの大腸菌を 50 µg/ ml アンピシリン入り M9 培地 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, NaCl 0.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 15 g, 蒸留水 500 ml, 1 M MgSO<sub>4</sub> 1 ml, 2 M glucose 5.6 ml, 1 % vitaminB1 1 ml, 1 M CaCl<sub>2</sub> 0.1 ml) 20 ml で 37°C, 16h 培養し、IPTG を 0.8 µM になるように加えてさらに 10 h 培養した。この大腸菌培養液を 50 µg/ ml アンピシリン入り IPTG 0.8 µM の M9 培地で OD<sub>600</sub> が 0.2 になるよう希釈し、試験管に 5 ml ずつ分注した。それぞれの培養液について 2 つの試験管を用意し、そのうち 1 つの試験管内の培養液には SNP (Sodium nitroprusside) を最終濃度 500 µM になるように添加した。26 °C のインキュベーター内で 10 h 振盪培養し、培養液の OD<sub>600</sub> での濁度を分光光度計 (Ultrospec 3300 pro) を用いて測定した。

### 2-2-9 MOE (Molecular operating environment) による LjGlb1-1 の立体構造予測

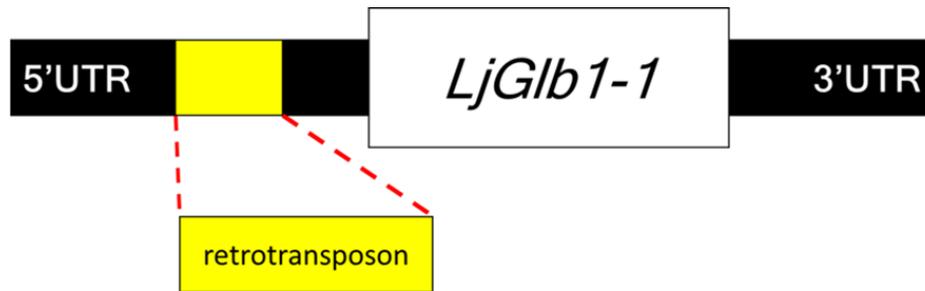
LjGlb1-1 及びその変異体のアミノ酸配列は、テンプレートにシロイヌナズナのクラス 1 ヘモグロビンである AHB1 (PDB アクセション 3zhw) を使用した。LjGlb1-1 及びその変異体の立体構造モデルは、ソフトウェア MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group) の MOE-ホモロジー機能で構築した。モデル構造の信頼性は Verify3D プログラムにより確認した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 *LjGlb1-1*変異系統の樹立

TILLING (Targeting Induced Local Location IN Genomes) 法によりミヤコグサの class 1 Hb 遺伝子 *LjGlb1-1* に点突然変異がヘテロに生じた植物体を自家受粉することで、変異型ホモ系統と野生型ホモ系統を作出し、生長が Gifu と殆ど変わらない二つの変異系統、A102V と E127K を選抜した。A102V は *LjGlb1-1* の 102 位のアラニンがバリンへと変異した系統であり、E127K は 127 位のグルタミン酸がリシンへと変異した系統である。102 位アラニンは、ヘムの配位に重要である 104 位ヒスチジン (Andersson *et al.*, 1996) の近くに保存されている。127 位グルタミン酸は class 1 Hb の間で保存度が極めて高い (Fig. 3)。





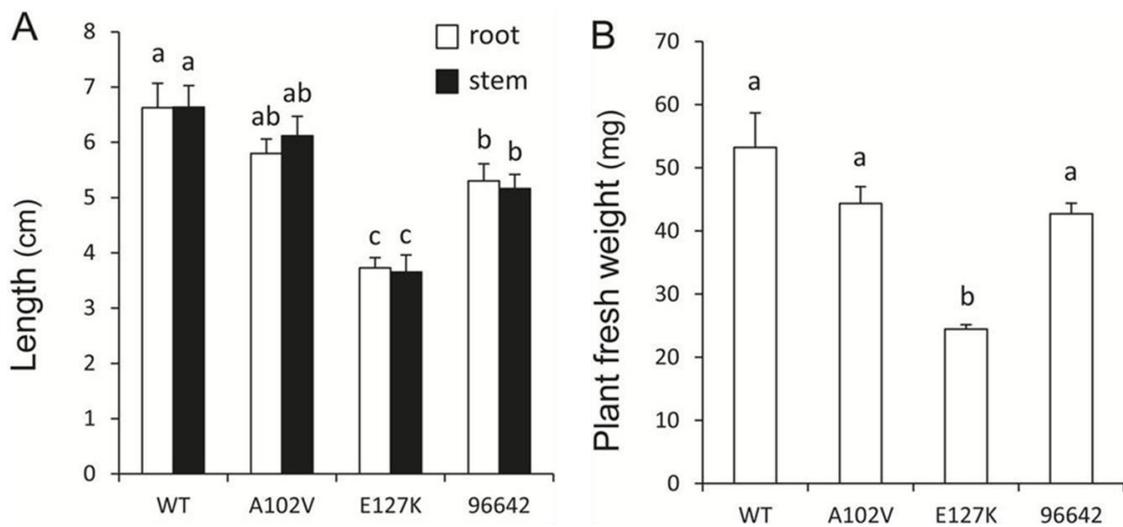
**Fig. 4 LORE1挿入位置の模式図**

*LjGlb1-1*遺伝子開始コドンの11bp上流にレトロトランスポゾン LORE1が挿入し、発現量がWTの1%未満に抑えられた系統の模式図。

### 2-3-2 変異系統の生長

1 アミノ置換変異の2系統 (A102V, E127K) 及び LORE1 挿入低発現変異の1系統の植物体について、*M. loti*MAFF303099 接種4週後に、植物長 (Fig. 5A) と生重量 (Fig. 5B) を測定した。E127K 及び 96642 系統は、WT よりも根と茎が短く、E127K 系統は生重量も軽かった。また、全ての突然変異体は、WT と同じ地上部長/根長比を示した。根粒菌を接種せず、1.5 mM の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を窒素源とした生育条件でも植物生長を測定した (Table. 1)。

A102V 系統の地上部長、A102V 及び 96642 系統の地上部重量以外は、変異系統の生長は WT と比較して低い値を示した。A102V, E127K 系統の親系統であるヘテロ変異系統 (m/w) 由来の *LjGlb1-1* の野生型ホモ系統 (w/w) は、いずれの表現型も WT と同様だった (Table. 1, 2B)。



**Fig. 5 LjGlb1-1変異系統の生長表現型**

発芽5日後、実生に *M. loti* MAFF303099を接種し、窒素を含まないFähræus寒天培地で4週間生育した。(A) 根と茎の長さ、(B) 植物の生重量を測定した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ に基づいて有意差がないことを示す。(±SE; WT n = 18、96642 n = 30、その他 n = 12-16)

**Table. 1 LjGlb1-1変異系統の植物長及び生重量**

	WT	A102V	E127K	96642	A102V (w/w)	E127K (w/w)
Shoot length	4.68 ± 0.09 a	4.33 ± 0.20 ab	3.29 ± 0.24 c	3.86 ± 0.15 b	4.69 ± 0.17 a	4.56 ± 0.12 a
Shoot weight	29.83 ± 1.19 a	27.00 ± 1.65 a	20.67 ± 1.73 b	26.31 ± 0.87 a	30.11 ± 1.67 a	29.89 ± 1.11 a
Root length	5.37 ± 0.21 a	4.13 ± 0.23 b	2.00 ± 0.33 c	3.73 ± 0.22 b	5.40 ± 0.18 a	5.09 ± 0.14 a
Root weight	29.25 ± 1.04 a	23.89 ± 2.21 b	12.67 ± 0.87 c	24.54 ± 1.53 b	29.78 ± 1.19 a	27.56 ± 1.31 a
Leaf number	4.92 ± 0.15 a	4.11 ± 0.31 b	2.56 ± 0.45 c	3.92 ± 0.14 b	4.89 ± 0.11 a	4.78 ± 0.15 a

植物を1.5mMのNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>を含有するFähræus培地上で3週間生育した。植物生長は植物長と生重量で評価した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ に基づいて有意差がないことを示す。

Table. 2A LjGlb1-1変異系統の共生表現型

	WT	A102V	E127K	96642
Nodule number	7.17 ± 0.51 a	5.22 ± 0.30 b	2.67 ± 0.28 c	4.93 ± 0.42 b
ARA	11.18 ± 0.72 a	9.64 ± 0.51 ab	2.71 ± 0.60 c	8.54 ± 0.69 b
Incipient ITs	2.88 ± 0.13 a	4.43 ± 0.42 b	8.15 ± 1.28 b	4.52 ± 0.61 b
Long ITs	32.08 ± 1.41 a	17.11 ± 0.98 b	5.98 ± 0.93 c	11.57 ± 0.82 d
Total ITs	34.95 ± 1.42 a	21.54 ± 1.30 b	14.00 ± 2.05 c	16.09 ± 1.21 c

植物体に *M. loti* MAFF303099（根粒数および窒素固定活性測定時）またはそのDsRed発現株（感染係数測定時）を接種し、窒素を含まないFåhraeus培地で生育した。窒素固定（アセチレン還元）活性（ARA）は接種4週後に測定し、nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produced min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> FWとして算出した。IT数は接種2週後に測定し、根1cmあたりの数を算出した。

Table. 2B LjGlb1-1野生型ホモ系統（w/w）の共生表現型

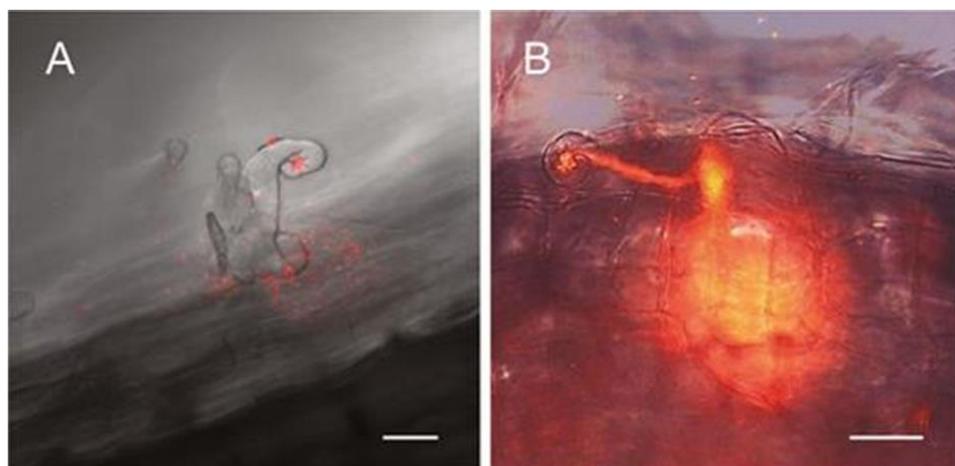
	WT	A102V w/w	E127K w/w
Plant length	14.3 ± 0.5 a	12.8 ± 0.8 a	13.5 ± 0.4 a
Nodule number	6.8 ± 0.2 a	6.6 ± 0.2 a	6.3 ± 0.3 a
Incipient ITs	2.9 ± 0.1 a	2.5 ± 0.2 a	2.5 ± 0.2 a
Long ITs	32.0 ± 1.4 a	28.4 ± 1.0 a	28.8 ± 1.3 a
Total ITs	35.0 ± 1.4 a	30.9 ± 1.1 a	31.3 ± 1.4 a

ヘテロ変異系統（w/m）から得られた野生型ホモ系統（w/w）（M5種子）の表現型。植物長さはcm、IT数は根1cmあたりの数を示す。値は平均±SE。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at P=0.05に基づいて有意差がないことを示す。

### 2-3-3 LjGlb1-1変異系統の共生表現型

WT 及び *LjGlb1-1* 変異 3 系統の共生表現型を、*M. loti* MAFF303099 接種 4 週後に検討した。まず、根粒数とアセチレン還元活性を測定した（Table. 2A）。変異系統はいずれも根

粒着生数が少なく、E127K 及び 96642 系統は、根粒重量当たりのアセチレン還元活性も低かった。感染糸 (IT) の観察とカウントは DsRed 標識 MAFF303099 接種 2 週間後に行った (Table. 2A)。IT は Incipient IT (Fig. 6A)、Long IT (Fig. 6B) をそれぞれカウントし、Total IT ももとめた。3 つの変異系統はいずれも Incipient IT 数が多く、Long IT 数が少なかった。また、Total IT 数も有意に少なかった。いずれの表現型も、A102V, E127K と親を同じとする *LjGlb1-1* の野生型ホモ系統では WT と同様の表現型を示した (Table. 2B)。

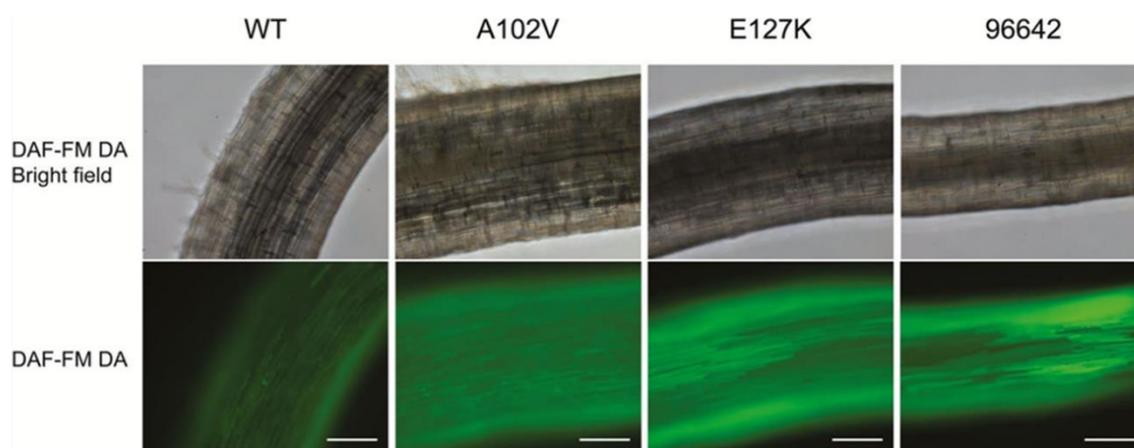


**Fig. 6 DsRed根粒菌接種14日後の感染糸 (IT) の蛍光顕微鏡観察写真**  
(A) incipient IT and (B) long IT  
Scale bars=25  $\mu$ m.

#### 2-3-4 *LjGlb1-1* 変異系統内外の NO 量

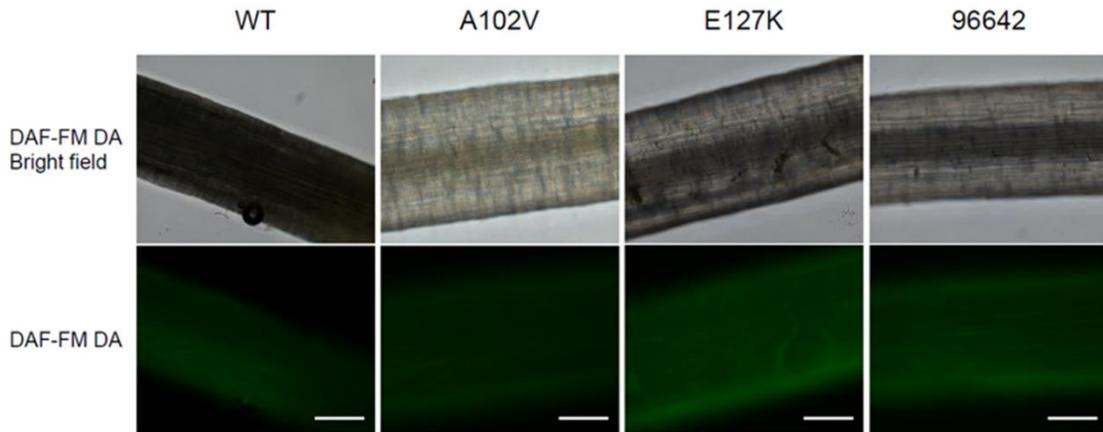
class 1 Hb は生体内で NO 濃度を調節すると考えられている (Hebelstrup *et al.*, 2013 ; Wally *et al.*, 2013) ため、WT 及び 3 つの変異系統の根内の NO レベルを比較した (Fig. 7)。NO 特異的蛍光試薬 DAF-FM DA で、*M. loti* の接種 3 時間後に根を 1 時間処理した。この

化合物は細胞透過性を持ち非蛍光性であるが、細胞内エステラーゼによって脱アセチル化され、DAF-FM になることで内因性 NO と反応し、高蛍光ベンゾトリアゾールを形成する。WT の根では、NO の産生を示す蛍光強度は、*M. loti* 接種の 4 時間後に増加し、以前の報告 (Nagata *et al.*, 2008) と一致した。A102V、E127K、及び 96642 の変異系統では WT と比べ、より強い蛍光シグナルが観察された。このシグナルは NO 除去剤 cPTIO の共接種によって減少する (Fig. 8) ことから、NO 特異的なシグナルであることが確認できた。根からの放出 NO 量は、非浸透性の NO 特異的蛍光試薬である DAF-FM を用いて測定し、根の生重量あたりの相対蛍光シグナルとして算出した (Fig. 9)。蛍光強度は、WT よりも 3 つの *LjGlb1-1* 変異系統の根において有意に高かった。この結果は根内の NO 観察結果と一致した。

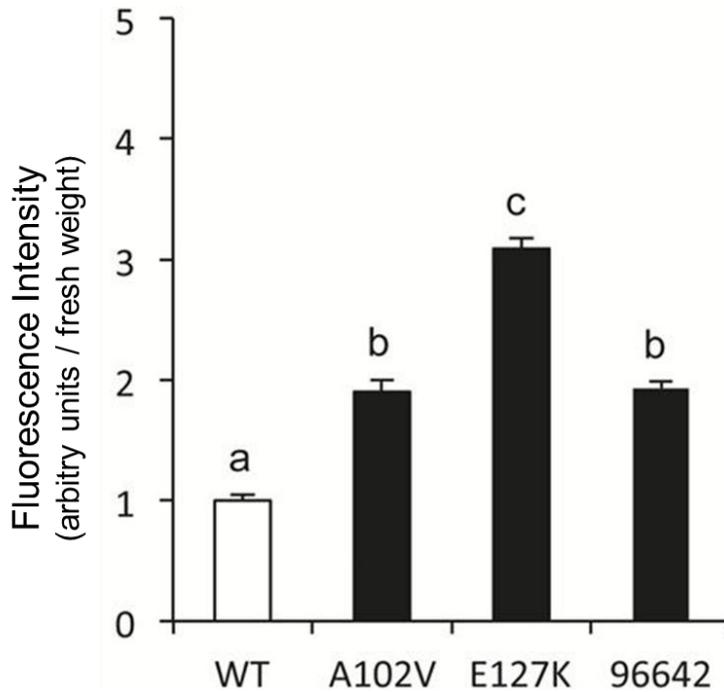


**Fig. 7 WTおよび変異系統の根におけるNO産生の蛍光イメージング**

実生に *M. loti* MAFF303099株添加後3時間インキュベートし、その後DAF-FM DAで1時間処理した。全ての画像は、同一設定の共焦点顕微鏡で撮影した。蒸留水処理した根 (negative control) は、検出可能な蛍光を示さなかった。スケールバー=200  $\mu$ m



**Fig. 8 WTおよび変異系統の根におけるNO産生の蛍光イメージング**  
 実生に *M. loti* MAFF303099株添加後3時間インキュベートし、その後DAF-FM DAとcPTIOで1時間処理した。全ての画像は、同一設定の共焦点顕微鏡で撮影した。スケールバー=200 $\mu$ m



**Fig. 9 *M. loti* 接種後の、WTおよび変異系統の根から放出NO量**  
 DAF-FM溶液の蛍光強度をプレートリーダーで測定し、根の新鮮重量あたりの相対蛍光強度として算出した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at P=0.05に基づいて有意差がないことを示す。(±SE; n = 9)

### 2-3-5 NO 供与剤の接種が感染糸形成に及ぼす影響

NO が *LjGlb1-1* 変異系統の共生表現型の異常に関与しているかをさらに詳細に調べるため、外因性の NO が共生表現型にあたえる影響について評価した (Table. 3)。WT の根に *M.loti* 接種と同時に NO 供与剤である SNAP を添加し、IT の観察及び Incipient IT、Long IT、Total IT をカウントした (Table. 3A)。SNAP の添加は、Incipient IT 数の増加と、Long IT 及び Total IT 数の減少をもたらした。更に、NO 除去剤である cPTIO を SNAP と一緒に添加すると、IT に対する SNAP の効果が緩和し、NO が根粒共生系に関与する分子であることが示された (Table. 3A)。異なる NO 供与剤である SNP の添加実験においても同様の結果が得られた (Table. 3B)。

Table. 3A NO供与剤 (SNAP) とNO除去剤 (cPTIO) が感染形成に及ぼす影響

	Control	SNAP	cPTIO	SNAP + cPTIO
Incipient ITs	25.4 ± 2.7 a	9.8 ± 1.2 b	28.7 ± 2.4 a	26.0 ± 3.3 a
Long ITs	2.7 ± 0.3 a	8.0 ± 1.1 b	4.9 ± 0.6 b	3.8 ± 0.5 a
Total ITs	28.1 ± 3.0 a	17.8 ± 1.9 b	33.6 ± 2.4 a	29.7 ± 3.7 a

植物に *M. loti* MAFF303099 DsRed を接種し、100µl の 500µM SNAP、500µM cPTIO、または両方の化合物の共添加を各根に適用した。IT の数は、根 1cm あたりの数を算出した。すべて菌接種 2 週間後に測定した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at P=0.05 に基づいて有意差がないことを示す。(± SE, n=9-11)

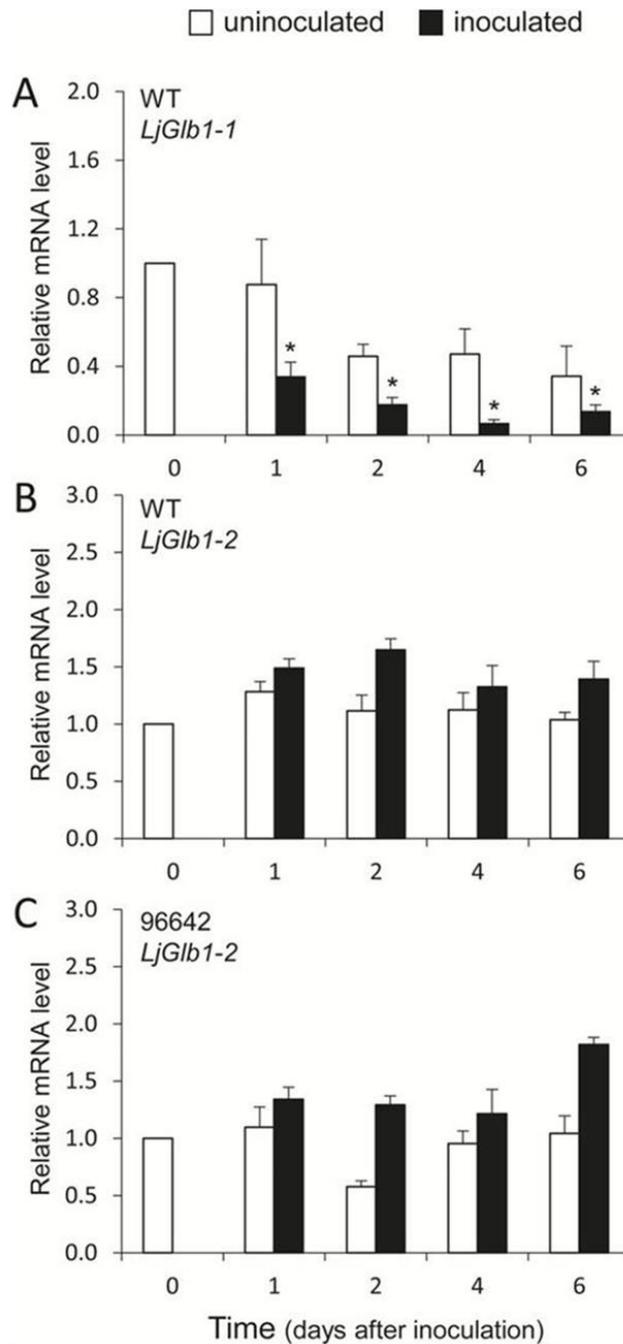
Table. 3B NO供与剤 (SNP) が感染糸形成に及ぼす影響

	Control	SNP
Incipient ITs	3.6 ± 0.4 a	10.5 ± 0.7 b
Long ITs	25.5 ± 2.1 a	6.6 ± 0.7 b
Total ITs	29.1 ± 2.1 a	17.2 ± 1.2 b

植物に *M. loti* MAFF303099 DsRed を接種し、100 $\mu$ l の 100 $\mu$ M SNP を同時に添加した。IT の数は、根 1cm あたりの数を算出した。すべて菌接種 2 週間後に測定した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at P=0.05 に基づいて有意差がないことを示す。

### 2-3-6 感染中の LjGlb1-1 及び LjGlb1-2 の発現プロファイル

ミヤコグサゲノムは、LjGlb1-1 と LjGlb1-2 の二つの class 1 Hb をコードしており、そのうち LjGlb1-1 の転写レベルのみが NO によって誘導される (Shimoda *et al.*, 2005; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2011)。また、根粒組織での発現も LjGlb1-1 は他の組織より高い発現を示すものの、LjGlb1-2 ではその傾向は見られない。そのため、根粒菌感染時の植物の根における LjGlb1-1 及び LjGlb1-2 遺伝子の発現プロファイルにも違いがあるかもしれないがその詳細は不明である。本研究では菌接種 0 日から 6 日までの LjGlb1-1 と LjGlb1-2 の発現プロファイルについて検討した (Fig. 10A, B)。また、LjGlb1-1 を殆んど発現しない 96642 系統において LjGlb1-2 の発現プロファイルに変化がないかについても検討した (Fig. 10C)。*M. loti* を接種した根の LjGlb1-1 発現レベルは、接種 1 日から 6 日の間で減少したが、LjGlb1-2 発現レベルは影響を受けなかった。両方の遺伝子の転写物レベルは、接種していない根では一定であった。96642 系統の根での LjGLb1-2 発現レベルは変化しなかった。



**Fig. 10** *M. loti* R7Aを接種した根における*LjGlb1-1*および*LjGlb1-2*の発現解析  
 (A) WT植物の根における*LjGlb1-1*、(B) *LjGlb1-2*、および(C) 96642植物の根における*LjGlb1-2*の発現レベルを示す。値は、独立した4実験の平均±SEであり、それぞれ3回の技術的反復を行った。白グラフは接種されていない根、黒グラフは接種した根の値をそれぞれ表す。アスタリスクは、有意な遺伝子ダウンレギュレーション(相対mRNAレベル<0.5)を示す。発現レベルは、接種の日(0日目)を基準とした。

### 2-3-7 組換え LjGlb1-1 の活性評価

A102V 及び E127K 系統の根で観察された NO 量の増加が、変異タンパク質の生化学的特性の変化に起因するのかが検討した。pGEX 4T-3 プラスミドを用いて GST タグ組換えヘモグロビン (GST-LjGlb1-1, GST-ljglb1-1A102V, GST-ljglb1-1E127K) を精製し、実験に用いた。ヘモグロビンは Soret 帯と Q 帯の 2 つの吸収スペクトルにヘム特異的なピークを持ち、そのピークは、NO を硝酸イオンへと酸化する過程でヘム鉄が 2 価+O<sub>2</sub> から 3 価 (メトヘモグロビン) へ変化することで変動する。そこで、それぞれの組換えヘモグロビンに NO 供与剤を添加し、スペクトルの変化から、NO と組換えヘモグロビンの反応性を評価した。NO 供与剤添加 30 分後、GST-LjGlb1-1 ではヘム特異的なスペクトル (特に Q 帯) のピークが大きく崩れていたが、GST-ljglb1-1A102V はピークの崩れ幅が小さかった (Fig. 11)。また、GST-ljglb1-1E127K では NO 供与剤の添加の有無に関係なく、ヘム特異的なピークを殆ど示さなかった (Fig. 12)。

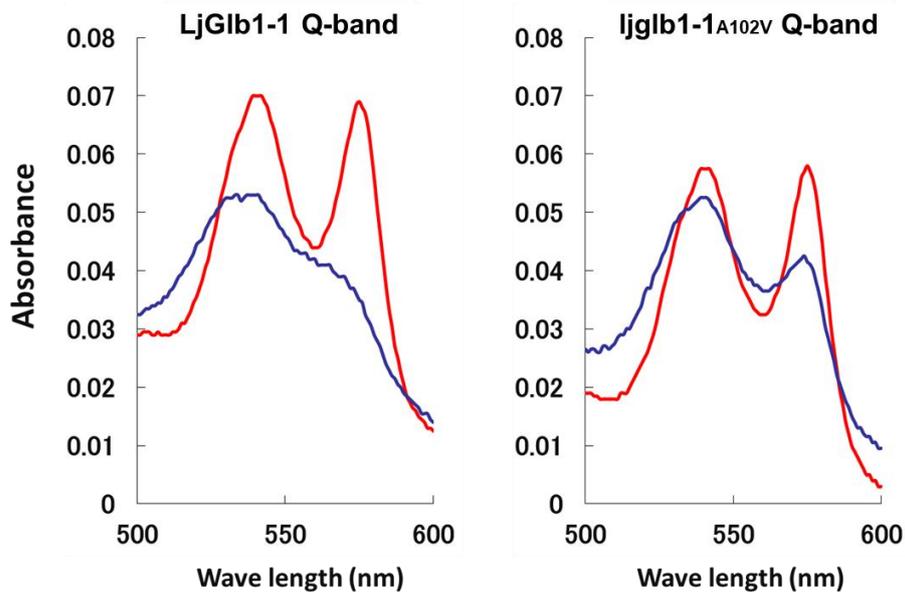


Fig. 11 NO供与剤による組換えGST-LjGlb1-1, GST-ljpglb1-1<sub>A102V</sub>の吸収スペクトルの変化  
 組換えタンパク質5  $\mu$ Mの溶液にNO供与剤 (SNAP) 5  $\mu$ Mを添加し、添加前 (赤) と添加30分後 (青) に測定したQ帯 (500~600 nm) の吸収スペクトル。

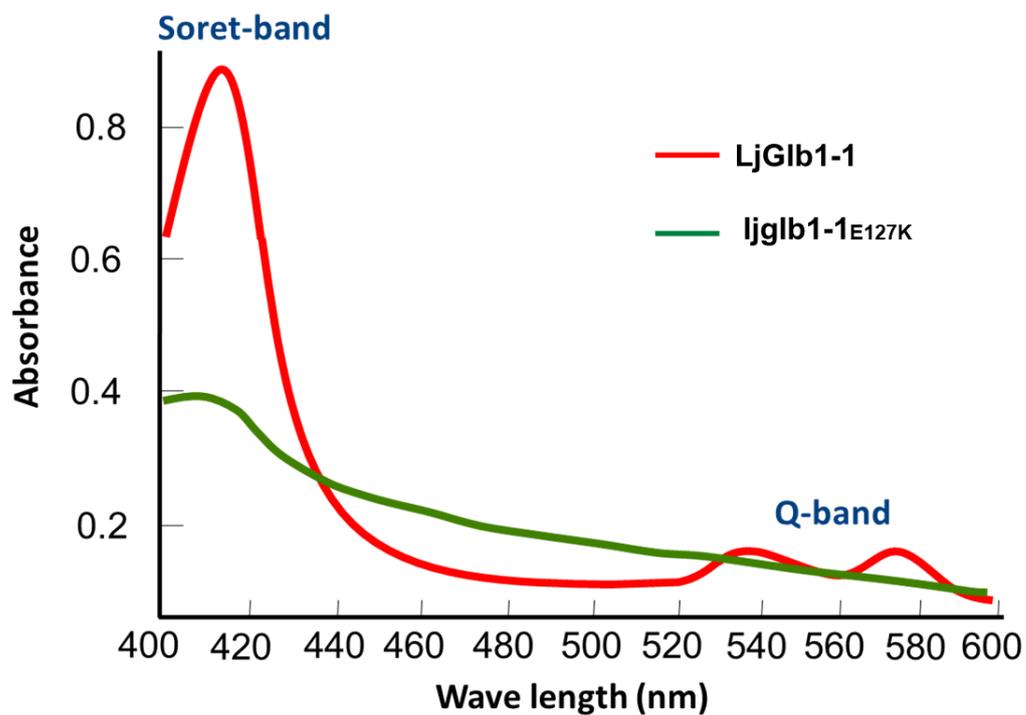
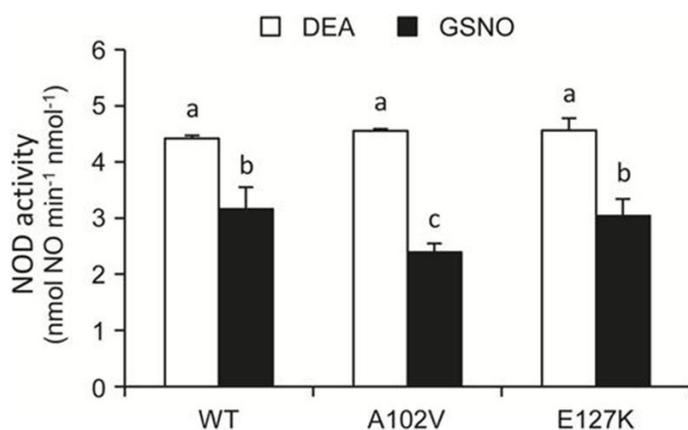
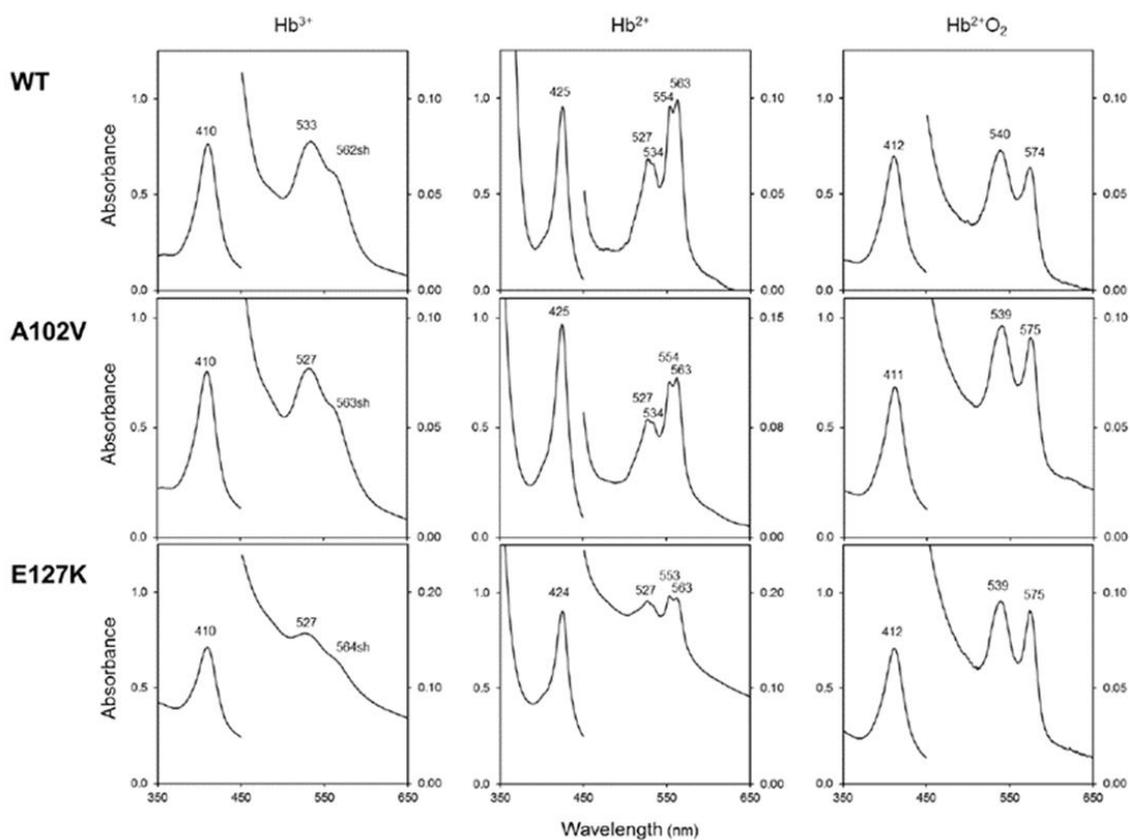


Fig. 12 組換えGST-LjGlb1-1, GST-ljpglb1-1<sub>E127K</sub>の吸収スペクトル  
 組換えGST-LjGlb1-1, GST-ljpglb1-1<sub>E127K</sub> 5 $\mu$ Mの吸収スペクトル (400 - 600nm) をそれぞれ測定し得られたスペクトル。

GST タグによる精製は、可溶性で純度が高く、生体内で産生されるタンパク質に近い状態でフォールディングされた精製物が得られる一方で、タグのサイズが巨大であることが立体構造に影響を与える可能性を含む。そこで、一塩基置換変異がヘモグロビンと NO との反応性に与える影響についてさらに詳細に調べるため、タグサイズの比較的小さい His タグを用いた組換えヘモグロビンも産生し、その活性を検討した。WT、A102V、E127K の His タグ LjGlb1-1 組換えタンパク質を、金属アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。この調製物は、90%以上の純度を有し、SDS ゲル (12.5%) 電気泳動とクマシール染色によって大腸菌フラボヘモグロビン (44kDa) の混入がないことを確認した。3つの組換えタンパク質の NO 除去 (NOD) 活性及びヘム特異的吸収スペクトルを比較した。*in vitro* での NOD 活性は、2種の NO 供与剤 (DEA, GSNO) から供与される NO の除去活性を、NO 特異的電極を用いて評価した (Fig. 13)。その結果、A102V、E127K 変異 LjGlb1-1 も WT とおおむね同様の活性を示したが、A102V 変異 LjGlb1-1 は、GSNO により供与された NO の除去活性が低下していた。ヘム特異的吸収スペクトルは Q 帯と Soret 帯のスペクトルを  $\text{Hb}^{3+}$ 、 $\text{Hb}^{2+}$ 、 $\text{Hb}^{2+}\text{O}_2$  の状態で測定した (Fig. 14)。A102V 変異 LjGlb1-1 は  $\text{Hb}^{2+}$  の状態時に Soret 帯のピークがやや低下した。E127K 変異 LjGlb1-1 は  $\text{Hb}^{3+}$ 、 $\text{Hb}^{2+}$  状態時に Soret 帯のピークが大きく変化した。



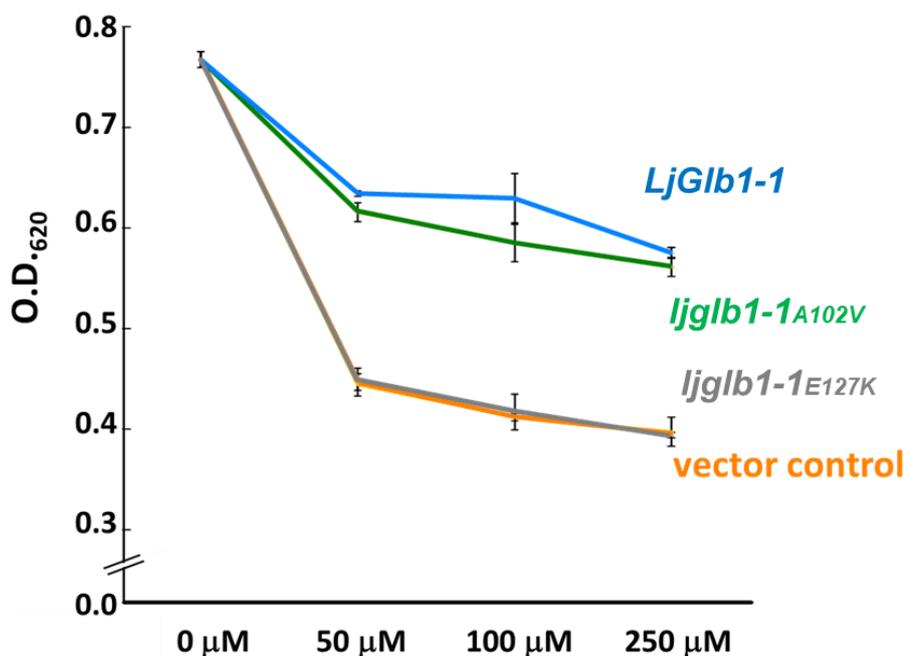
**Fig. 13** 組換えLjGlb1-1 WTおよびそのA102V・E127K変異誘導体のNOD活性  
 活性は、50 $\mu$ Mのdiethylenetriaminepentacetic acidを含む50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 中の20 $\mu$ M DEA、1mM GSNOを用いて測定した。同一の文字が記されたグラフは、Duncan's multiple range test at P=0.05に基づいて有意差がないことを示す。(± SE; n=2-3)



**Fig. 14** Hisタグ組換えLjGlb1-1のHb<sup>3+</sup>、Hb<sup>2+</sup>、Hb<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>時の吸収スペクトル  
 His-LjGlb1-1、His-ljglb1-1<sub>A102V</sub>、His-ljglb1-1<sub>E127K</sub>のそれぞれHb<sup>3+</sup>、Hb<sup>2+</sup>、Hb<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>の状態における、Soret帯とQ帯での吸収スペクトル。

### 2-3-8 LjGlb1-1 産生形質転換大腸菌の NO 耐性

class 1 Hb が NO 除去能を持つならば、ヘモグロビン産生形質転換大腸菌は NO 耐性を示す可能性が示唆された。そこで、可溶性ヘモグロビンを高効率で産生する形質転換大腸菌、*E. coli* Origami (pGEX-4T-3/LjGlb1-1, pGEX-4T-3/ljglb1-1<sub>A102V</sub>, pGEX-4T-3/ljglb1-1<sub>E127K</sub>)を用いて、それぞれの NO 耐性を検討した (Fig. 15)。M9 培地で各大腸菌を培養し、OD<sub>620</sub> の濁度を 0.2 に調整後、NO 供与剤 (SNP) を添加した。NO 供与剤は、最終濃度が 0、50、100、250  $\mu$ M になるよう準備し、さらに 10 時間培養した後の濁度 (OD<sub>620</sub>) を測定した。大腸菌の NO 耐性は、NO 供与剤添加後の濁度より評価した。ベクターコントロールの大腸菌は NO 供与剤の濃度上昇に従い、NO の細胞毒性により増殖が抑制された。しかし、LjGlb1-1 を発現する大腸菌は 250  $\mu$ M の SNP 存在下でも、一定の NO 耐性を示した。一方で ljglb1-1<sub>A102V</sub> 及び ljglb1-1<sub>E127K</sub> の産生大腸菌は LjGlb1-1 産生大腸菌と比べ NO 耐性が低く、特に ljglb1-1<sub>E127K</sub> 産生大腸菌はベクターコントロール同様の NO 感受性を示した。

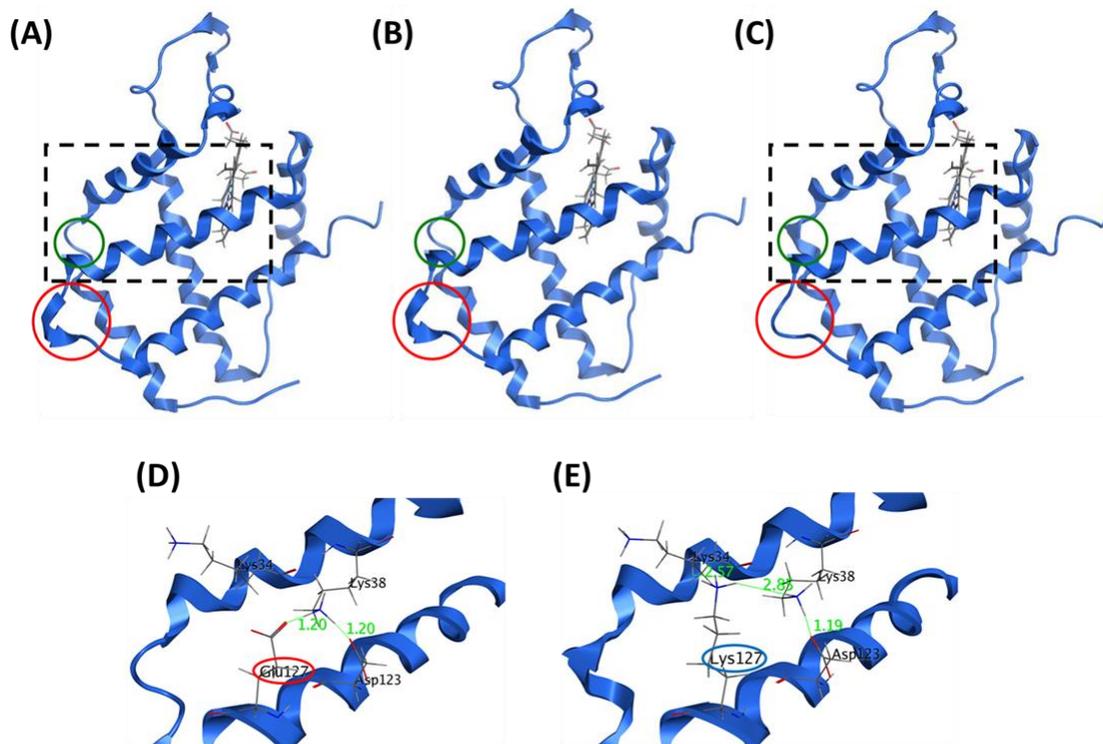


**Fig. 15** LjGlb1-1, ljpglb1-1<sub>A102V</sub>, ljpglb1-1<sub>E127K</sub> 産生形質転換大腸菌のNO存在下における増殖

M9液体培地によりOD<sub>620</sub> = 0.2まで培養し、最終濃度0, 50, 100, 250μMとなるようそれぞれNO供与剤 (SNP) を添加した。添加10時間後のOD<sub>620</sub>での濁度を測定した。

### 2-3-9 MOE を用いた立体構造予測

シロイヌナズナのクラス1ヘモグロビンであるAHB1をテンプレートとし、LjGlb1-1の立体構造をMOEにより予測した (Fig. 16)。さらに、102位のアラニンがバリンへ、127位のグルタミン酸がリシンへと置換した立体構造をそれぞれ予測し、比較した。102位のアラニンからバリンへの置換は、LjGlb1-1の立体構造に大きな変化を及ぼさないことが予測された。一方で、127位のグルタミン酸からリシンへの置換は、38位のリシン、123位のアスパラギン酸との静電的相互作用を乱し、2つのアルファヘリックスの位置関係に歪みを生じることが予測された。



**Fig. 16 MOEによる野生型および変異型LjHb1の立体構造予測**

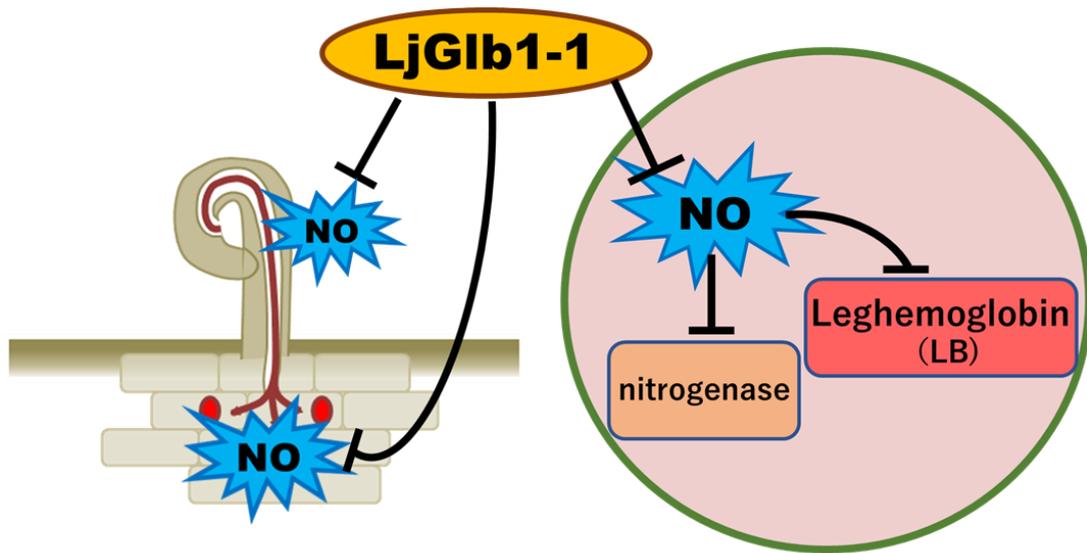
AHB1 (PDBアクセッション番号3zhw) をテンプレートとし、MOE

(Molecular operating environment, Chemical Computing Group) により

LjGlb1-1野生型および変異型の立体構造を予測した。(A), 野生型LjGlb1-1の予測立体構造; (B), *ljglb1-1*<sub>A102V</sub>の予測立体構造; (C), *ljglb1-1*<sub>E127K</sub>の予測立体構造; (D), (A)破線枠内の拡大図; (E), (C)破線枠内の拡大図。102位のアラニンからバリンへの置換は、LjGlb1-1の立体構造に大きな影響を与えないことが予測された。127位のグルタミン酸からリシンへの置換は、2つのアルファヘリックスの位置関係に歪みを生じることが予測された。

## 2-4 考察

ミヤコグサの形質転換毛状根を用いた研究は、*LjGlb1-1* の過剰発現が NO レベルを低下させ、根粒着生効率や根粒のニトロゲナーゼ活性を増強することを示した (Shimoda *et al.*, 2009)。これらの知見は、*LjGlb1-1* の欠損が、根粒形成及びニトロゲナーゼ活性を低下させることを示唆した。この仮説について検討するため、本研究では *LjGlb1-1* の 3 つの変異系統を使用した。A102V 及び E127K 系統は、ヘモグロビンの活性に影響を及ぼすと予想されるアミノ酸残基が置換した *LjGlb1-1* を発現し (Fig. 2)、96642 系統は *LjGlb1-1* をほとんど発現しない (Fig. 3)。E127K 及び 96642 系統は WT と比べ根と茎が短く、E127K 系統は生重量が低かった (Fig. 5AB)。植物の生長の差は、根粒菌との共生時だけでなく、窒素含有培地条件でも見られたことから (Table. 1)、*LjGlb1-1* の変異が根粒共生系だけでなく、植物の生長にも関与している可能性を示唆している。3 つの変異系統は、根粒数と Long IT の減少、Incipient IT の増加やアセチレン還元活性の低下など、共生表現型の変化を示した (Table. 2A)。これは、*LjGlb1-1* が根粒菌の感染と共生窒素固定の両方で機能していることを示す (Fig. 17)。また、A102V, E127K 系統の親系統であるヘテロ変異系統 (m/w) 由来の *LjGlb1-1* の野生型ホモ系統 (w/w) は、いずれの実験でも野生型と同様の表現型を示した (Table. 1, 2B)。この結果は、A102V 及び E127K 系統の表現型が、*LjGlb1-1* の変異に起因するものであることを強く支持する。



**Fig. 17 根粒共生系におけるLjGlb1-1のNO制御モデル**

LjGlb1-1は根粒菌の感染時、共生窒素固定時の両方でNO除去し、正常な共生成立に寄与している。

この第2章の結果はまた、*LjGlb1-1* 変異系統の根粒共生系への負の影響の原因が、NO調節能の欠失であることを示す。NOは根粒菌の感染から約4時間後に根に蓄積する(Shimoda *et al.*, 2005)。このNOの蓄積が、3つの変異系統の根ではより増強されたことから(Fig. 7)、*LjGlb1-1*は根粒菌感染中の内因性NOレベルを調節することで防御応答を回避するという仮説(Shimoda *et al.*, 2005)を支持した。また、内因性NOの一過的な増加は、変異系統の根粒数及び感染系数の減少によって示されるとおり、感染プロセスにも影響すると予想される。SNAPまたはSNPによる外因性NOが感染糸の伸長を阻害するという結果(Table. 3A, B)もまた、その予想を支持する。根粒内では酸化ヘモグロビンがNO除去に機能している(Herold *et al.*, 2005)ほか、NO供与剤の添加が共生窒素固定を阻害することから、*LjGlb1-1*変異系統のニトロゲナーゼ活性が低いこともまた、根粒内

NO 量が高いことに起因するものであることが示唆された。一方、A102V 及び E127K 系統の根が、WT よりも高いレベルの NO を蓄積する理由については明らかでない。2 つの組換え変異 LjGlb1-1 及び WT LjGlb1-1 は、インビトロで概ね同様の NOD 活性を示した (Fig. 13) もの、2 つの変異 LjGlb1-1 の吸収スペクトルは WT LjGlb1-1 とは異なり、NO 反応性の変化が予想された (Fig. 11, 12, 14)。また、His タグと GST タグにより精製された組換えタンパク質の吸収スペクトルには、それぞれの特徴に違いが見られ (Fig. 11, 12, 14)、植物体内でのタンパク質の安定性への影響も考えられた。生体内では、鉄-グロビンの還元剤による再生が NOD 活性を制限する (Igamberdiev and Hill, 2004; Smagghe *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2013) ことから、生体内での還元剤との反応性及びタンパク質安定性が、植物生体内での NO 除去能の違いに関与しているのかもしれない。あるいは、LjGlb1-1 が生体内で機能する際に高次構造を取っているとすれば、アミノ酸置換の変異は、高次構造を不安定にするなどの影響も考えられる。2 つの組換え変異 LjGlb1-1 及び WT LjGlb1-1 を産生する大腸菌の NO 耐性の違い (Fig. 15) や MOE による立体構造予測の結果 (Fig. 16) も、この予想と矛盾するものではない。

ミヤコグサの 2 つの class 1 Hb 遺伝子の発現解析は、LjGlb1-1 発現レベルが感染 1 日以内に減少することを示す (Fig. 10A)。これまでの研究から、LjGlb1-1 は感染 3-4 時間後に NO によって誘導されることが示されており、NO 量と LjGlb1-1 発現レベルは、感染過程で並行して変化する可能性が示されてきた (Shimoda *et al.*, 2005; Bustos-Sanmamed *et al.*,

2011)。このシナリオでは、NO 蓄積と LjGlb1-1 誘導は短時間（根粒菌感染から 3-4 時間）に制限され、その後、感染 1 日後から 6 日後の間は NO 及び LjGlb1-1 レベルの両方が低下する (Shimoda *et al.*, 2005)。これとは対照的に、LjGlb1-2 の発現は根粒菌感染の影響を受けないことから (Fig. 10)、LjGlb1-2 は、根への菌感染時の NO 応答には関与していないと結論づけることができる。

タルウマゴヤシと共生根粒菌の相互作用において、NO は共生確立の最適化に必要であり、根における NO の減少は根粒形成を阻害する (del Giudice *et al.*, 2011; Pauly *et al.*, 2011)。本研究の結果は、Shimoda ら (2005) や Nagata ら (2008) の報告と同様であり、タルウマゴヤシ根粒共生系の報告 (del Giudice *et al.*, 2011) とは異なっていた。この原因として、無限型根粒（タルウマゴヤシ）と有限型根粒（ミヤコグサ）の根粒原基の形成場所や根粒の形態形成の様式が異なる点や、植物種及び根粒菌種ごとに最適な NO 濃度の範囲が異なることが考えられた。

## 第3章：LjGlb1-1 遺伝子高発現による共生窒素固定の向上

### 3-1 緒論

一酸化窒素 (NO) は根粒内で産生されて蓄積しており、窒素固定酵素 (ニトロゲナーゼ) の直接的な阻害剤としても機能する (Trinchant and Rigaud 1982; Kato *et al.*, 2010)。また、NO 除去剤による根粒の処理は、ニトロゲナーゼ活性を増強する (Sasakura *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 2009)。生体内では、根粒中の NO 濃度は一定に保たれているが、フラボヘモグロビン (hmp)、亜硝酸還元酵素、NO 還元酵素などの NO 代謝に関与する遺伝子に変異・欠失がある根粒菌の形成した根粒や、老化根粒では、根粒内 NO 濃度を制御することが出来ず、タルウマゴヤシでは共生表現型にも異常が生じる (Sánchez *et al.*, 2010; Horchani *et al.*, 2011; Meilhoc *et al.*, 2013; Calvo-Begueria *et al.*, 2018)。これらの知見は、根粒共生系の維持に NO 濃度の恒常性が深く関与していることを示している。class 1 Hb は NO の除去活性をもつほか、植物の他の組織と比べ根粒で発現量が高いことから (Shimoda *et al.*, 2005; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2011)、自然条件下における根粒内の NO 量調節に関与していると考えられる。ミヤコグサでは、LjGlb1-1 を高発現する形質転換毛状根で、ニトロゲナーゼ活性の増加や根粒着生効率の上昇も確認されており、NO 制御の向上は窒素固定をはじめとした共生系の強化に寄与できる可能性がある。一方で NO は、植物の生理応答の様々な場面でシグナル分子としても機能するため (Neill *et al.*, 2003)、恒

常的で全身的な NO 制御の強化が根粒共生系及び植物の生理応答に及ぼす影響について、正確に予想するのは困難である。従って、形質転換植物を用いた実験データの蓄積は、農業応用の観点からも重要である。

本研究では *LjGlb1-1* を全身的に高発現する形質転換ミヤコグサを作出し、その表現型及び根粒菌との共生表現型を評価した。また、*LjGlb1-1* 高発現ミヤコグサ系統の NO 量についても検討し、共生表現型と NO 濃度を関連付けて考察した。

## 3-2 方法

### 3-2-1 *LjGlb1-1* 遺伝子高発現系統の樹立

*LjGlb1-1* 高発現系統は、日本大学の青木俊夫教授から種子集団の分譲を受けた。形質転換ミヤコグサの作出手順の概略は、次のとおりである。カリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV 35S) プロモーター及び *LjGlb1-1* の cDNA を有するバイナリーベクターを pIG121-Hm をもとに構築した (Fig. 18)。構築した CaMV 35S:: *LjGlb1-1* コンストラクトをもとにアグロバクテリウム形質転換法によって形質転換ミヤコグサを作出し、ハイグロマイシン耐性試験により選抜した (Aoki *et al.* 2002)。一次選抜された種子集団の中で、生長に異常がなく *LjGlb1-1* 遺伝子の発現量の増加が認められた植物をさらに二次選抜した。二次選抜を済ませたミヤコグサのゲノム DNA を鋳型に *LjGlb1-1* 遺伝子を PCR で増幅した。ゲノムの *LjGlb1-1* 遺伝子は約 1000bp、cDNA の *LjGlb1-1* は約 500bp であるため、アガロースゲル電気泳動により得られたバンドサイズから形質転換植物であることを確認した。さらに、二次選抜ミヤコグサの次世代についても 20 個体のバンドパターンを調べ、全ての次世代にコンストラクトが遺伝していること、すなわち、形質転換ミヤコグサがゲノム上に CaMV 35S:: *LjGlb1-1* コンストラクトをホモで保持していることを確認した。以上の手法から得られた 2 つの *LjGlb1-1* 高発現系統を Ox1、Ox2 とした。

### 3-2-2 *LjGlb1-1* 遺伝子高発現系統の *LjGlb1-1* 発現量の解析

*LjGlb1-1* の発現量はリアルタイム RT-PCR によって解析した。RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて生重量約 50mg の根粒、実生、葉からそれぞれ全 RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR は、7300 Real-Time PCR システム (Applied Biosystems) 及び One Step SYBR Prime Script RT-PCR キット (Takara, Japan) を用いて行った。 *LjGlb1-1* は 5'-CCTTTGGAGGAGAACCCCAA-3' 及び 5'-GAGCTGCTGATTCACAAGTCA-3' のプライマーセットを用いて検出し、内在性標準 *LjeIF-4A* は *Lj6g3v1382260*; 5'-TGGAAGCTTCGAAGAGATGG-3' 及び 5'-GTGCCAGATTGAGCCTGAG-3' のプライマーセットを用いて検出した。反応及びサイクル条件は One Step SYBR Prime Script RT-PCR キットの指示に従った。得られた結果は、 $\Delta\Delta Ct$  法に基づいて解析した。

### 3-2-3 植物の生育条件と根粒菌接種

種子の表面をサンドペーパーにより傷つけ、有効塩素濃度 2% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌し、蒸留水で洗浄、吸水処理後、0.5% 寒天プレートに移植した。25°C で 5 日間、暗所でインキュベートした後、実生を Fåhraeus (1.5% 寒天) 培地 (Fåhraeus, 1957) 上で生育させ、各実生に *M. loti* MAFF303099 を  $10^6$  細胞ずつ接種した。詳細は、第 2 章に記載した。

### 3-2-4 根粒形成とニトロゲナーゼ活性の測定

根粒数及びニトロゲナーゼ活性は、*M. loti*MAFF303099 接種 4 週間後に測定した。ニトロゲナーゼ活性は、アセチレン還元活性検出法 (Shimoda *et al.*, 2009) で測定した。詳細は第 2 章に記載した。

### 3-2-5 根組織内 NO の観察と放出 NO の検出

5 日齢の実生の根内の NO 産生は、Nagata ら (2008) の手法に従い、蛍光顕微鏡で観察した。実生に *M. loti*MAFF303099 を接種し、3 時間後に 20  $\mu$ M の DAF-FM DA で 1 時間処理し、蛍光観察した。対象区には、菌体懸濁液の代わりに蒸留水を使用した。放出 NO 量は Tominaga ら (2009) に従い、7  $\mu$ M の DAF-FM 溶液処理後に蛍光強度を測定し、生重量あたりの相対蛍光強度として算出した。詳細は第 2 章に記載した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 *LjGlb1-1*高発現系統の樹立

CaMV 35S::*LjGlb1-1* のコンストラクト (Fig. 18) を有する形質転換ミヤコグサの 2 系統を作出及び選抜し、Ox1、Ox2 と命名した。発芽 5 日後の芽生え及び菌接種 5 週後の根粒から全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で *LjGlb1-1* の発現量を解析した。Ox1、Ox2 の両系統は、野生型 (WT) 及び *LjGlb1-1* 低発現変異系統 (96642 系統、詳細は第 2 章に既述。) と比べ、高い *LjGlb1-1* の発現を示した。Ox2 は WT の 4~5 倍、Ox1 は Ox2 のさらに約 2 倍の発現を示した (Table. 4)。



Fig.18 CaMV 35S::*LjGlb1-1*コンストラクトの模式図

Table. 4 実生と根粒での*LjGlb1-1*発現量

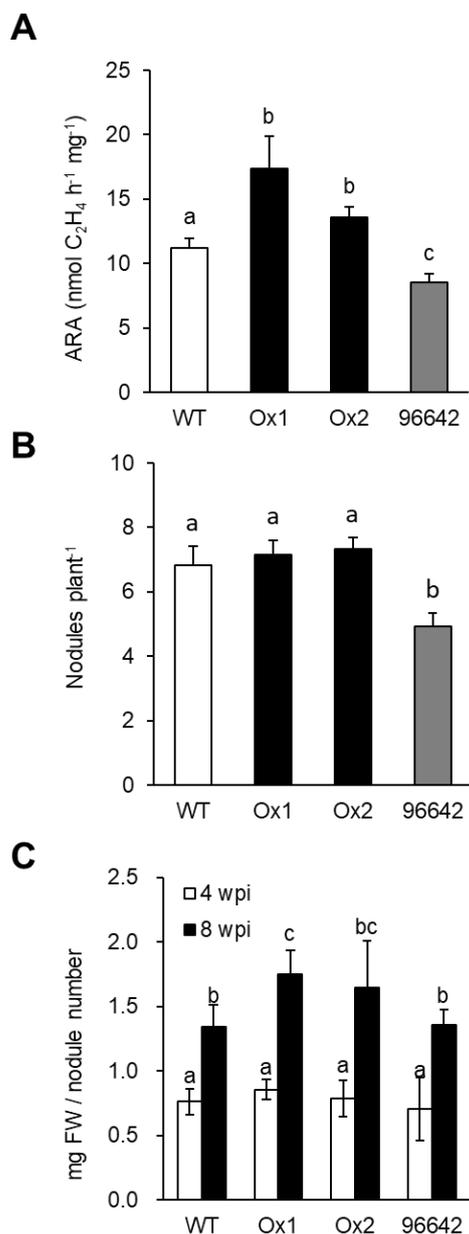
	WT	Ox1	Ox2	96642
Whole plant	1	13.17 ± 1.67	5.41 ± 0.81	0.03 ± 0.00
Nodule	1	10.39 ± 1.95	4.12 ± 0.66	0.01 ± 0.00

発芽5日後の実生 (Whole plant) と *M.loti*接種5週後の着生根粒 (Nodule) から全RNAを抽出し、*LjGlb1-1*の発現量をリアルタイムRT-PCRにより解析した。

#### 3-3-2 高発現系統の共生表現型

根粒菌 *M. loti* を接種し、窒素フリーの Fähræus 培地で栽培後、WT、Ox1、Ox2、96642 系統の共生表現型について検討した。接種 4 週後の根粒数と根粒重量とアセチレン還元活

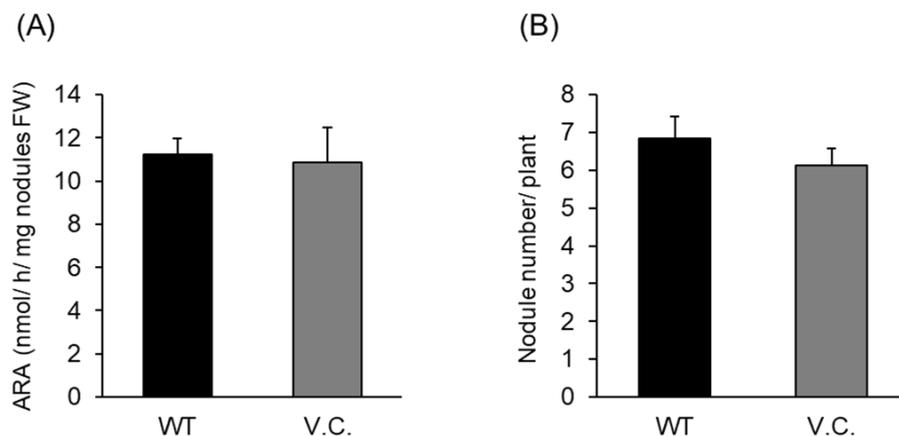
性 (ARA) を測定した結果、2 つの Ox 系統は WT と比べ、同様の根粒数・根粒重量を示したが、根粒重量当たりの ARA は有意に高かった (Fig. 19A, B, C)。



**Fig. 19 LjGlb1-1高発現系統 (Ox1, 2) の共生表現型**

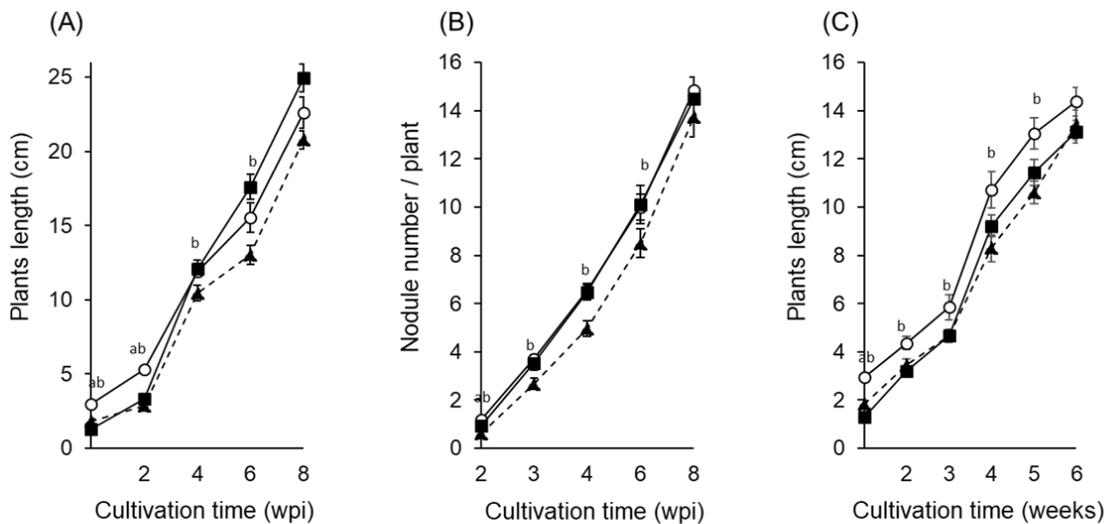
発芽5日後、実生に *M. loti* MAFF303099 を接種し、窒素を含まない Fåhræus 寒天培地で4週間生育した。(A) 窒素固定 (アセチレン還元) 活性 (ARA)、(B) 根粒着生数、(C) 根粒重量。ARA は  $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ produced min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$  として算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's t-test at  $P < 0.05$  に基づいて有意差がないことを示す。  
( $\pm$  SE;  $n = 9$ )

空ベクターによって形質転換したコントロール系統は、根粒数と ARA のどちらも WT と違いはなかった (Fig. 20)。



**Fig. 20** LjGlb1-1高発現系統 (Ox1, 2) のベクターコントロール (V.C) の共生表現型  
発芽5日後、実生に *M. loti* MAFF303099 を接種し、窒素を含まない Fåhraeus 寒天培地で4週間生育した。(A) 窒素固定 (アセチレン還元) 活性 (ARA)、(B) 根粒着生数。ARAは  $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ produced min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$  として算出した。統計的有意差は Student's t-test at  $P < 0.05$  に基づいて検定した。(±SE;  $n = 17$ )

96642 系統は、WT と比べ根粒数は少なく、根粒重量当たりの ARA も有意に低かった (Fig. 19A, B, C)。植物長と根粒数について接種8週後まで経時的に測定したところ、WT と Ox 系統の間では有意な違いは見られず、96642 系統のみ生長が遅れていた (Fig. 21A, B)。1.5 mM の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を窒素源とする Fåhraeus 培地でも生育し、植物長を経時的に測定したところ、Ox 系統と 96642 系統の生長は、どちらも WT と比べ遅れていた。植物長以外には、形態的な違いは見られなかった (Fig. 21C)。



**Fig. 21 WT、Ox1、96642系統の植物成長及び根粒数**

(A, B) 実生に *M. loti* を接種し、窒素を含まない Fåhræus 培地で生育した。  
 (C) 実生を 1.5mM の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を含有する Fåhræus 培地上で生育した。  
 Student's t-test ( $P < 0.05$ ) に基づいて、「a」は WT-Ox1 間の有意差を示し、「b」は WT-96642 間の有意差を示す。 ( $\pm$  SE;  $n = 9$ )

### 3-3-3 高発現系統の根系の NO 量

class 1 Hb は生体内で NO 濃度を調節すると考えられている (Hebelstrup *et al.*, 2013 ; Wally *et al.*, 2013)。ミヤコグサの根では、*M. loti* 接種の 4 時間後に NO 量が増加し (Nagata *et al.*, 2008)、*LjGlb1-1* 変異系統では WT と比べ、より多くの NO 量の産生・蓄積が確認されている (第 2 章)。*LjGlb1-1* の Ox 系統では NO 除去能が増加し、植物内の NO 量が減少していることが考えられたため、Ox 系統の根系の NO 濃度を細胞透過性 NO 特異的蛍光試薬 DAF-FM DA を用いて測定した。*M. loti* 接種 3 時間後に DAF-FM DA で根を 1 時間処理し、蛍光強度を共焦点顕微鏡によって観察した (Fig. 22)。

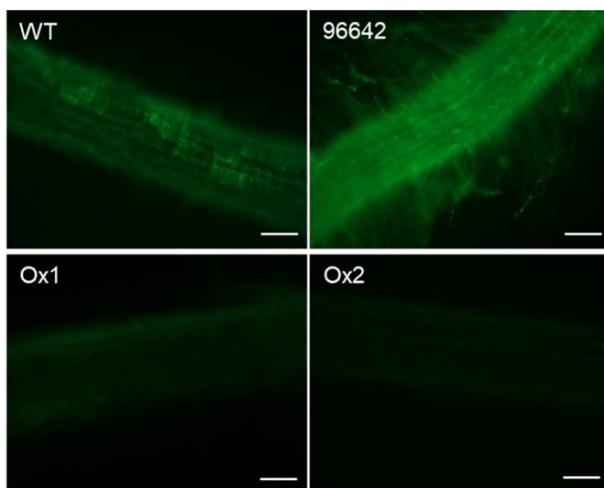


Fig. 22 *M. loti*接種4時間後の根におけるNO産生のDAF-FM DAによる  
 蛍光イメージング  
 Scale bars = 100  $\mu$ m

2つのOx系統はWTと比べ蛍光強度が低かった。また、対照として用いた96642系統はWTと比べ強い蛍光強度を示した。根からの放出NO量についても、非細胞浸透性NO特異的蛍光試薬DAF-FMを用いて測定し、根の生重量あたりの相対蛍光シグナルとして算出した (Fig. 23)。この結果も、Ox系統でWTと比べ蛍光強度が低く、根内のNO観察の結果と一致した。

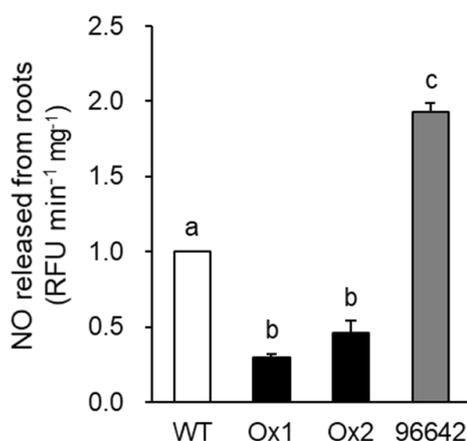


Fig. 23 根からの放出NO量  
*M. loti*接種後4時間の根から放出されたNO量をDAF-FMによって測定した。蛍光を定量し、根の生重量当たりの放出NO量を算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's t-test at  $P < 0.05$ に基づいて有意差がないことを示す。(±SE; n = 9)

### 3-4 考察

第3章では、恒常的に発現するプロモーターの制御下で class 1 Hb である LjGlb1-1 を高発現するミヤコグサの安定形質転換系統である Ox1 及び Ox2 を確立し、その共生表現型を解析した。Ox 系統では根系での NO 量が減少し、さらにニトロゲナーゼ活性が上昇した (Fig. 19A, 22, 23)。この表現型は、形質転換毛状根を用いて LjGlb1-1 を高発現した報告 (Shimoda *et al.*, 2009) と一致し、また、LjGlb1-1 の変異・低発現系統の表現型 (Fukudome *et al.*, 2016. 第2章) と対照的であった。根粒の NO 量が増加すると、ニトロゲナーゼ活性は低下し、早期老化が誘導される (Shimoda *et al.*, 2009; Cam *et al.*, 2012; Fukudome *et al.*, 2016)。これは NO がニトロゲナーゼの強力な阻害剤である (Trinchant and Rigaud 1982、Kato *et al.*, 2010) ことに加え、根粒共生系に必須であるレグヘモグロビン (Lb) の機能も阻害する (Hichri *et al.*, 2005、Sánchez *et al.*, 2010、Navascués *et al.*, 2012、Calvo-Begueria *et al.*, 2018) ことが原因であると考えられる。これらの知見は、根粒で NO レベルを低く保つことがニトロゲナーゼ活性の増強に寄与すること (Fig. 17) を支持しており、Ox1, 2 系統の表現型と一致した。さらに、ニトロゲナーゼ活性が上昇し、植物の生長及び収量が増加することが報告されている *enfl* 系統でも根粒内の NO 量が WT より低い (Tominaga *et al.*, 2009) という知見も、根粒内 NO 量の低下が共生ニトロゲナーゼ活性増加に寄与するという仮説を支持する。

一方で、Ox1, 2 系統は根粒着生数及び根粒重量の増加は示さなかった (Fig. 19)。形質転

換毛状根を用いた実験系では、同一植物個体において、*LjGlb1-1* 高発現毛状根とそうでない毛状根で比較すると、高発現毛状根で根粒数が多い(shimoda *et al.*, 2009)。これは *LjGlb1-1* による NO 除去が根粒菌の感染効率を増加させることを示唆しており、変異・低発現系統での感染系数の減少 (Fukudome *et al.*, 2016. 第 2 章) もこれを支持する。一方で、*LjGlb1-1* 高発現毛状根形成植物と非高発現毛状根形成植物の、植物体当たりの根粒着生数には差がない。これは、根の NO レベルの低下は局所的な感染の促進に働くものの、全身的な根粒数調節 (オートレギュレーション) (Kosslak and Bohloul 1984) による根粒数制御を WT と同様に受けていることを示唆する。本研究において、Ox 系統と WT で根粒着生数に差がなかったことも、根粒着生数のオートレギュレーションが Ox 系統でも WT と同様に機能していることが原因であると考えられる。

Ox1,2 系統は WT と比べて、根粒数と根粒重量に有意な差は見られなかったものの、ニトロゲナーゼ活性は高かった (Fig. 19ABC)。これは Ox 系統のニトロゲナーゼ活性の高さが根粒数や根粒重量に依存するものではなく、根粒内環境の改善による共生関係の最適(効率)化によるものである事を示唆する。

## 第4章：LjGlb1-1 遺伝子高発現による根粒老化の遅延

### 4-1 緒論

植物の様々な器官の老化に一酸化窒素 (NO) が関係していることが、これまでの研究で明らかにされている (Ya'acov *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2013; Guangwen *et al.*, 2017)。マメ科植物と根粒菌の共生器官である根粒もまた、老化に伴い NO を産生することや、NO が根粒機能の低下に関与することが知られているが、その詳細は不明なままである。マメ科のモデル植物であるタルウマゴヤシの根粒共生系では、NO 除去能をもつ根粒菌のフラボヘモグロビン (hmp) に着目し、NO 制御と根粒共生系の維持について研究されている。タルウマゴヤシ根粒菌のフラボヘモグロビン (hmp) 欠損株は、着生根粒の NO レベルが高く根粒が早期老化する。一方で、hmp 高発現株の着生根粒は NO レベルが低く、根粒老化も遅い (Cam *et al.*, 2012; Horchani *et al.*, 2011)。一方、ミヤコグサの根粒共生系では、殆ど研究例がない。タルウマゴヤシとミヤコグサの根粒は、根粒の起源となる根組織や着生した根粒の形態の違いから、無限型根粒と有限型根粒に分けられる。無限型根粒と有限型根粒では、NO の作用機序や適性濃度が異なることが示唆されている。マメ科農作物として極めて重要であるダイズが有限型根粒を着生することからも、同じく有限型根粒を着生するミヤコグサの根粒共生系で根粒老化と NO の関与について検討することは、農業生産への応用の観点からも重要である。また、根粒共生系における NO 除去機能の強化を植

物側からアプローチした例も殆んど報告されておらず、初めての知見であるといえる。

植物の老化には様々な植物ホルモンが関与していることが知られている。特に、アブシシン酸 (ABA) とエチレンは、根粒の老化に関与していることも知られている (González *et al.*, 2001; Tittabutr *et al.*, 2015)。NO は、ABA とエチレンを含む多くの植物ホルモンとクロストークすることが知られており (Asgher *et al.*, 2017)、根粒の老化にも植物ホルモンと NO のクロストークが関与している可能性がある。さらに、NO 以外にも、ABA とエチレン前駆体 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) は根粒において LjGlb1-1 を誘導することから (Bustos-Sanmamed *et al.*, 2011)、根粒での植物ホルモンと NO の相互作用には、class 1 Hb が関与する可能性も考えられる。NO と植物ホルモンのクロストーク、及び class 1 Hb との関係を明らかにすることは、根粒老化のメカニズムの詳細を明らかにすることにも貢献する。

本研究では、LjGlb1-1 の高発現 (Ox) 系統を作出・選抜し、成熟及び老齡根粒の共生表現型及び共生維持能を、老化関連遺伝子の発現及び根粒の組織学的比較等の解析手法を用いて、評価した。また、ABA、ACC や NO 供与剤の添加実験を行い、遺伝子発現の変化や感染細胞の形態の変化から、ABA、ACC、NO 及び LjGlb1-1 の根粒老化への関与について詳細に調べた。

## 4-2 方法

### 4-2-1 生物材料

ミヤコグサは、*LjGlb1-1* 高発現系統 Ox1 と Ox2 (第 3 章参照)、*LjGlb1-1* 低発現系統 96642 (第 2 章参照)、及びその野生型 (WT) を用いた。これらの高発現系統と低発現系統は、全て、野生型ミヤコグサ *L. japonicus* Gifu B-129 (Handberg and Stougaard, 1992) に由来する。共生根粒菌は *M. loti* MAFF303099 を用いた。

### 4-2-2 植物の生育条件と根粒菌接種条件

種子の表面をサンドペーパーにより傷つけ、有効塩素濃度 2% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌し、蒸留水で洗浄、吸水後、0.5% 寒天プレートに移した。25°C で 5 日間の暗所インキュベート後、実生を Fåhraeus (1.5% 寒天) 培地 (Fåhraeus, 1957) 上で生育させ、各実生に *M. loti* MAFF303099 を  $10^6$  細胞ずつ接種した。詳細は第 2 章に記載したとおりである。

### 4-2-3 NO 供与剤、NO 除去剤、植物ホルモンによる根粒の処理

根粒菌 *M. loti* 接種 4 週後の根粒を 7 mm 四方のペーパー 2 枚の間に挟み、20 mM SNAP、20 mM cPTIO、100  $\mu$ M ABA、100  $\mu$ M ACC の溶液をそれぞれ 40  $\mu$ l ずつ添加し、24 時間もしくは 72 時間処理した。72 時間処理時は、それぞれの溶液を 24 時間間隔で 20  $\mu$ l ずつ

追加で添加した。

#### 4-2-4 老齡根粒のニトロゲナーゼ活性測定

根粒菌 *M. loti* 接種 8 週間後（根粒着生 6 週後）の根粒のアセチレン還元活性（ARA）及び、SNAP、ABA、ACC、cPTIO 添加 24 時間後の ARA を Shimoda ら（2009）によるアセチレン還元活性検出法に従って測定した（第 2 章に既述）。菌接種 2 週後に着生した根粒をシャーレ上から標識し、接種 8 週後に標識されていない根粒は根から取り除いた。

#### 4-2-5 老齡根粒とホルモン処理根粒の放出 NO 量測定

根粒菌 *M. loti* 接種 6 週間後（根粒着生 4 週後）の根粒の放出 NO 量及び、ABA と ACC 添加 24 時間後の放出 NO 量を測定した。菌接種 2 週後に着生した根粒をシャーレ上から標識し、接種 6 週後に標識された根粒のみを回収した。回収した老齡根粒の放出 NO 量を、7  $\mu$ M の DAF-FM に直ちに浸し 10 分間後に測定した。DAF-FM 溶液の RFU は、e-spect2（Malcom、Japan）蛍光光度計を用いて、励起光 495 nm、蛍光 519 nm の設定で測定した。

#### 4-2-6 老齡根粒の色の評価

根粒菌 *M. loti* 接種 2 週後の着生根粒をシャーレ上から標識し、接種 6 週間後（根粒着生 4 週後）の根粒を実体顕微鏡で観察した。撮影した写真をもとに根粒色を評価した。

#### 4-2-7 根粒老化関連遺伝子の発現解析

根粒は根粒菌 *M. loti* 接種 2 週後以降、着生した根粒をシャーレ上から標識し、着生後 1~3 週までの根粒を成熟根粒、4~6 週までの根粒を老齡根粒と分類した。SNAP、ABA、ACC、cPTIO の添加実験では、添加 72 時間後の根粒を実験に用いた。RNeasy plant mini kit (Qiagen) を用いて約 50mg の成熟・老齡根粒から全 RNA を抽出した。発現は第 3 章と同様に解析した。解析した遺伝子と使用したプライマーは以下の通りであった。LjGlb1-1 : 5'-CCTTTGGAGGAGAACCCCAA-3' and 5'-GAGCTGCTGATTCACAAGTCA-3'、heat shock protein (Lj4g3v0473190) : 5'-CAGTGGGAAATTCCAGAGGA-3' and 5'-AGTGAGAACCCC ATTCTCCA-3'、osmotin precursor (Lj2g3v2017460) : 5'-GGACAGGTGCCATGATTCTT-3' and 5'-GAAAGTGCTGGTGGGATCAT-3'、cysteine protease LjCyp2 (Lj1g3v4047250) : 5'-GGAGAACAATGGGGTGAAGA-3' and 5'-GCCACACAAACCCAATACTG-3'。内部標準として LjeIF-4A (Lj6g3v1382260) : 5'-TGGAAGCTTCGAAGAGATGG-3' and 5'-GTGCCAGATTGAGCCTGAG-3'。

#### 4-2-8 感染細胞の観察

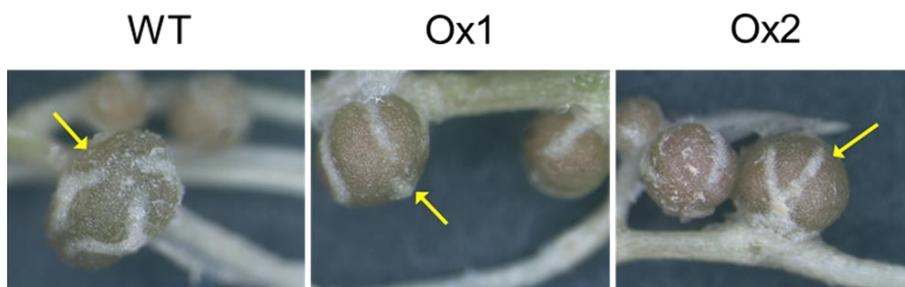
感染細胞の観察は、Hossain ら(2006) の手法に従った。根粒を、4%パラホルムアルデヒド及び 2.5%グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に浸し、4°Cで一晩固定した。固定されたサンプルを、30, 50, 70, 90, 98, 100%のエタノールで 15

分ずつ脱水し、JB4 樹脂に包埋した。マイクローム切片（厚さ  $3\mu\text{m}$ ）を 0.5% (w/v) ト  
ルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡で観察した。デンプン顆粒は、Tansengco らの方法  
(2003) に従って観察した。染色には、Periodic Acid-Schiff 染色液 (Muto Pure Chemicals,  
Japan) を使用し、光学顕微鏡で観察した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 老齡根粒の緑色化の比較

ミヤコグサ根粒は、成熟根粒はレグヘモグロビン (Lb) の色によって赤色を呈する。この Lb の赤色は根粒老化に伴い緑色化することが知られている (Lehtovaara and Perttilä 1978, Navascués *et al.* 2012)。そこで、WT、Ox 系統、96642 系統の老齡根粒 (6 wpi、4 週齢) の根粒色を比較し、根粒の老化進行度を評価した (Fig. 24)。Ox 系統の根粒は 4 週齢で WT の根粒より赤色を呈していた。一方、96642 系統の根粒は、WT と違いが見られなかった (データは掲載していない)。



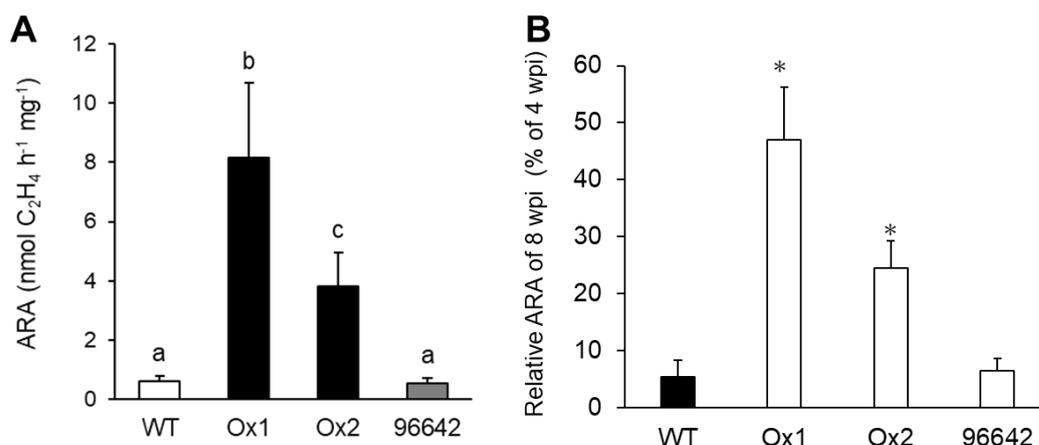
**Fig. 24 WTとLjGlb1-1高発現系統 (Ox1, 2) の根粒色**

実生に *M. loti* MAFF303099 を接種し、窒素を含まない Fåhraeus 寒天培地で 6 週間生育した。接種 2 週後に着生した根粒に印をつけ、さらに 4 週後 (根粒齢 4 週) に根粒色を比較した。

### 4-3-2 高発現系統の老齡根粒のニトロゲナーゼ活性

ミヤコグサは根粒菌接種 4~5 週後で根粒重量当たりのニトロゲナーゼ活性が最も高く、それ以降は老化に伴い活性が低下する。本研究では、根粒菌 *M. loti* 接種 8 週後の老齡根粒のニトロゲナーゼ活性 (ARA) を測定した (Fig. 25A)。Ox1 系統及び Ox2 系統の老齡根粒

は、WT より高い活性を示したのに対し、96642 系統は WT と同程度の活性を示した。また、菌接種 4 週後（成熟根粒）の ARA を 100%とした時の菌接種 8 週後（老齡根粒）の ARA の相対活性をニトロゲナーゼ活性の維持率として比較したところ（Fig. 25B）、Ox 系統は WT 及び 96642 系統と比べて維持率が高かった。WT と 96642 系統は同程度の活性維持率を示した。

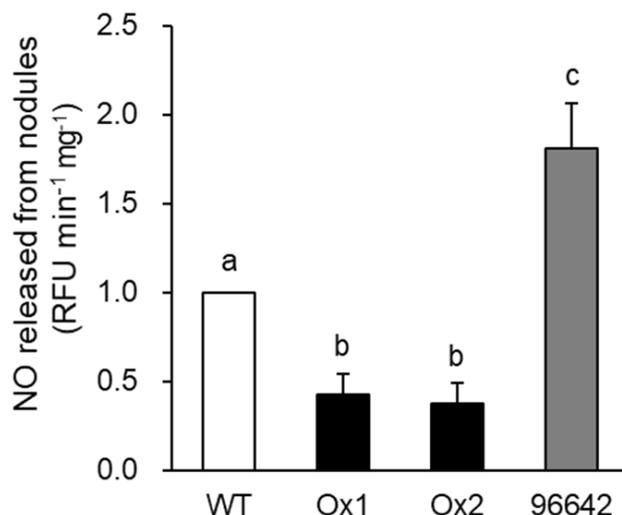


**Fig. 25** WT, LjGlb1-1高発現系統 (Ox1, 2), 96642系統の老齡根粒の窒素固定活性  
 発芽5日後、実生に *M. loti* MAFF303099を接種し、窒素を含まないFähraeus寒天培地で8週間生育した。接種2週後に着生した根粒に印をつけ、さらに6週後（根粒齡6週）の活性を測定した。(A) 老齡根粒の窒素固定（アセチレン還元）活性（ARA）、(B) 成熟根粒のARAを100%とした時の老齡根粒の活性維持率。ARAはnmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produced min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> FWとして算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's *t*-test at *P* < 0.05に基づいて有意差がないこと、アスタリスクは有意差を示す。（±SE; n = 18）

#### 4-3-3 高発現系統の老齡根粒の NO 量

根粒内の NO 量は、老化の進行に伴い増加する。Ox 系統では、根及び成熟根粒で NO レベルが低く抑えられていることが明らかとなった（第3章参照）。そこで、Ox 系統では、老齡根粒でも NO 量の増加が抑えられているのか検討した（Fig. 26）。根粒菌 *M. loti* 接種

6 週後の老齡根粒が放出する NO 量を NO 特異的蛍光試薬 DAF-FM を用いて測定したところ、Ox 系統の蛍光強度は WT と比べ有意に低く、NO レベルが低かった。96642 系統は WT より強い蛍光を示し、NO レベルが高かった。

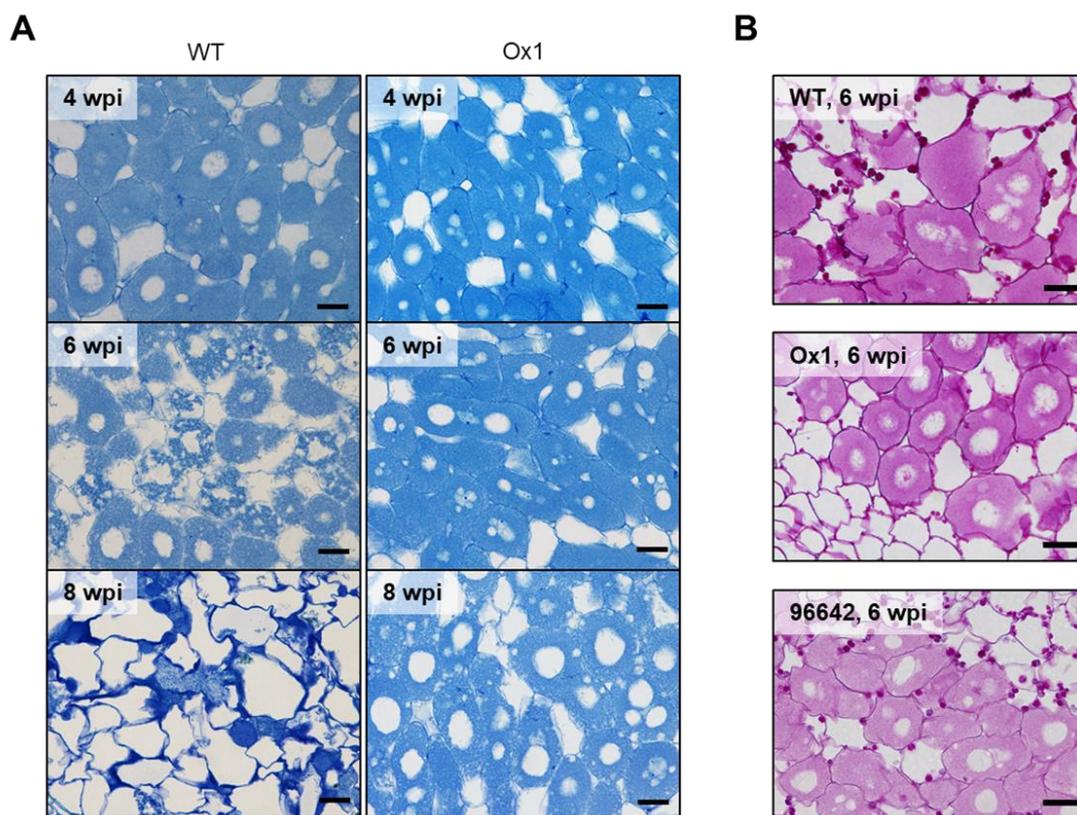


**Fig. 26 WT, LjGlb1-1高発現系統 (Ox1, 2), 96642系統の老齡根粒の放出NO量**  
 発芽5日後、実生に *M. loti* MAFF303099 を接種し、窒素を含まない Fåhræus 寒天培地で6週間生育した。接種2週後に着生した根粒に印をつけ、さらに4週後（根粒齢4週）の根粒の放出NO量を DAF-FM によって測定した。蛍光を定量し、根粒の生重量当たりの放出NO量を算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's *t*-test at  $P < 0.05$  に基づいて有意差がないこと、アスタリスクは有意差を示す。（±SE; n = 9）

#### 4-3-4 高発現系統の老齡根粒の感染細胞崩壊の遅延

トルイジンブルー及び Periodic Acid-Schiff (PAS) 試薬で根粒切片を染色し、光学顕微鏡によって感染細胞の形態を観察し、根粒老化の進行を評価した。トルイジンブルーで染色した感染細胞を観察したところ (Fig. 27A)、WT では、菌接種 4 週後の根粒で感染細胞にバクテロイドが均一に密集していた。菌接種 6 週後にはバクテロイドの凝集が見られ、菌接種 8 週後には根粒中央付近の感染細胞で崩壊が見られた。Ox 系統の感染細胞は、菌接

種 4 週後から 8 週後にかけて液胞数の増加と液胞サイズの増大が見られたものの、顕著なバクテロイドの凝集や感染細胞の崩壊は観察されなかった。PAS 染色後に感染細胞を観察したところ (Fig. 27B)、WT では、菌接種 6 週後の根粒で多数の大きなデンプン顆粒が、非感染細胞及び根粒の内皮質に蓄積していた。Ox 系統のデンプン顆粒は小さく、数も少なかった。また、96642 系統の感染細胞は WT と同様の表現型を示した。

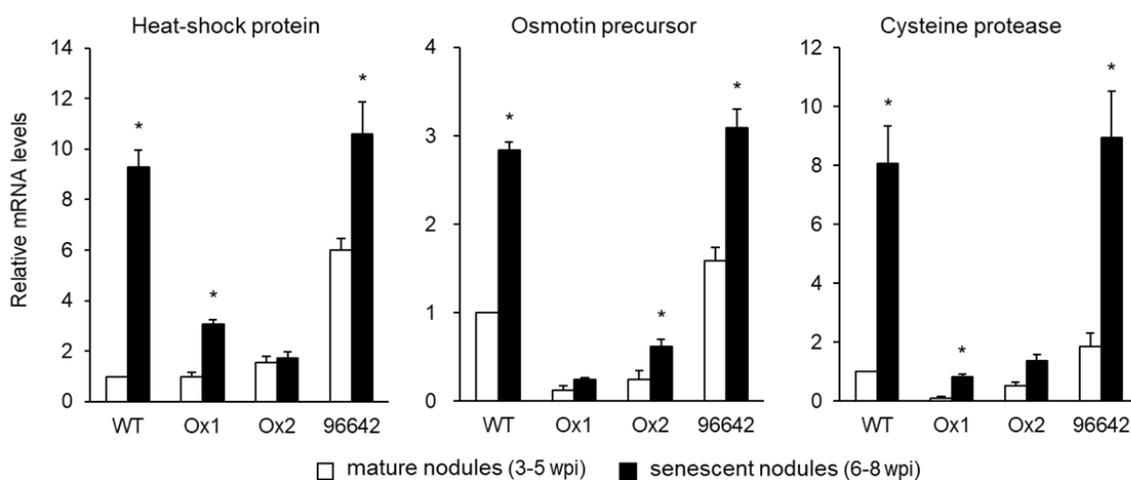


**Fig. 27** *M.loti*接種4-8週後のWTとOx1系統の感染細胞の顕微鏡観察

(A) 菌接種4, 6, 8週後の根粒切片をトルイジンブルーで染色し、感染細胞の特徴を顕微鏡観察した。(B) 菌接種6週後の根粒切片をPAS染色し、デンプン顆粒の量と局在を顕微鏡観察した。 Scale bars = 20 $\mu$ m

#### 4-3-5 高発現系統の老化関連遺伝子の発現

Ox 系統の根粒で老化が遅延していることを実証するため、根粒老化時に発現が上昇することがこれまでに報告 (Fujie *et al.*, 2009; Chungopast *et al.*, 2014) されている 3 つの遺伝子 heat shock protein (Lj4g3v0473190), osmotin precursor (Lj2g3v2017460), cysteine protease Cyp2 (Lj1g3v4047250) について発現を解析した (Fig. 28)。成熟 (3-5wpi) 及び老齢 (6-8wpi) の根粒からそれぞれ全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によって発現量を解析した。WT では、解析した 3 遺伝子は全て、成熟根粒と比べ老齢根粒で顕著に発現量が増加しており、これらの遺伝子が確かに老化の指標となることが確認された。Ox 系統は WT と比べてこれらの老化関連遺伝子の発現量が低く、また、齢の増加に伴う発現量の増加は少なかった。

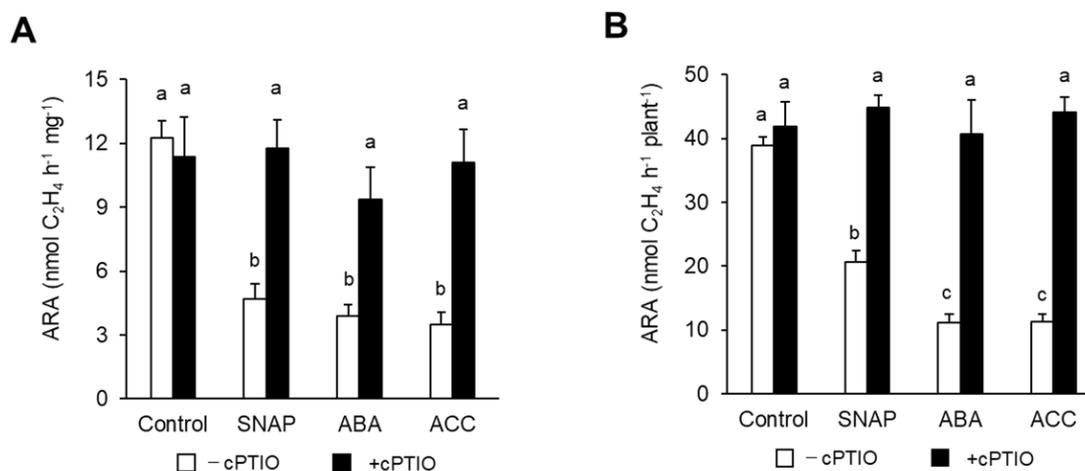


**Fig. 28 老化関連遺伝子の発現解析**

菌接種3-5週を成熟根粒、6-8週を老齢根粒とし、WTの成熟根粒の発現量を基準として比較した。グラフは3回の生物学的反復の平均±SEを示し、それぞれ3回の技術的反復を行った。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$  に基づいた有意差を示す。

#### 4-3-6 NOと植物ホルモンが根粒共生系に与える影響

NOと根粒老化の関係の詳細や、NO除去が根粒老化の遅延に寄与するメカニズムをさらに明らかにするため、NOと老化関連植物ホルモン（ABA・エチレン）とLjGlb1-1のクロストークについて検討した。NO供与剤（SNAP）、ABA、エチレン前駆体（ACC）を菌接種4週後の根粒に添加した時と、NO除去剤（cPTIO）を共添加した時の共生窒素固定に与える影響について検討した（Fig. 29）。20 mMのSNAPと100 μMのABA・ACCは全て添加24時間後にニトロゲナーゼ活性（ARA）を低下させた。また、いずれの処理による活性の低下も20 mMのcPTIOの共添加により緩和された。

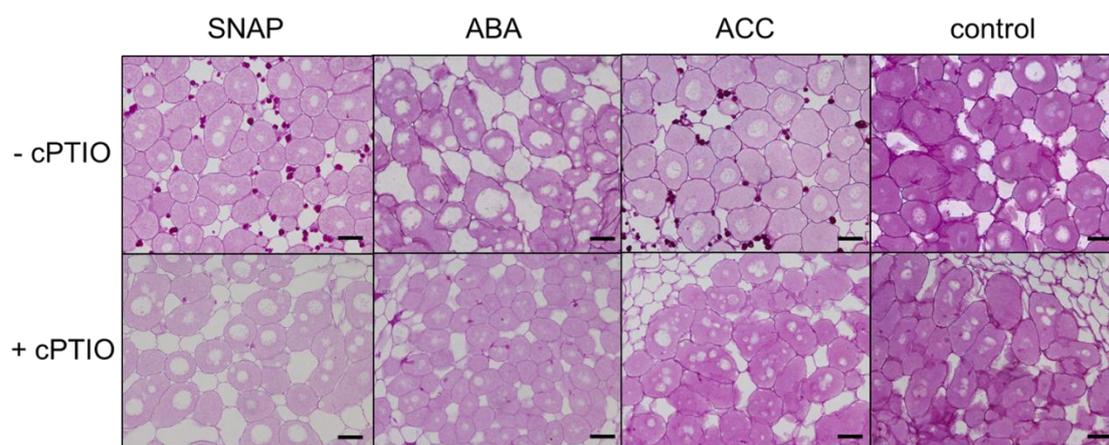


**Fig. 29 NO供与体（SNAP）と植物ホルモン（ABA、ACC）が窒素固定活性に及ぼす影響**

菌接種4週後のWT根粒をSNAP, ABA, ACCで処理、もしくはcPTIOと共処理し、24時間後のARAを測定した新鮮重量（A）根粒重量当たりのARA、（B）植物当たりのARAを示す。ARAはnmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> produced min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> FWとして算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's *t*-test at *P* < 0.05に基づいて有意差がないことを示す。（±SE; *n* = 9）

根粒重量当たりの ARA も植物体当たりの ARA も同様の傾向を示した (Fig. 29A, B)。

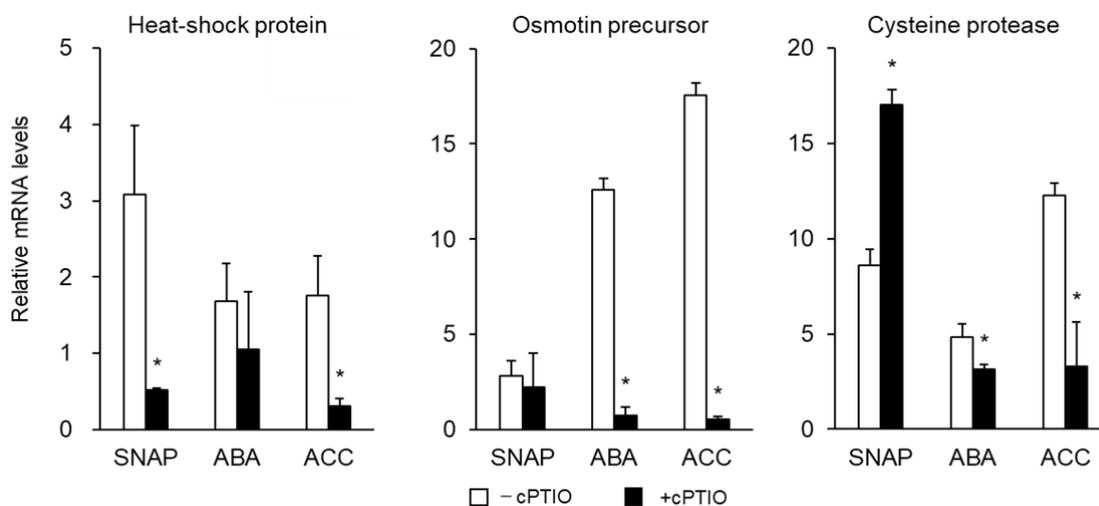
NO と植物ホルモンが感染細胞の形態に与える影響は SNAP、ABA、ACC を添加して 72 時間後に感染細胞を観察・検討した (Fig. 30)。SNAP と ACC の添加は、デンプン顆粒の増加・増大を誘導した。ABA の添加は、液胞の増加・増大を誘導した。また、いずれの老化根粒様の感染細胞の変化も cPTIO の共添加により緩和されたが、ACC と cPTIO の共添加は液胞数の増加を誘導した。



**Fig. 30** NO 供与体 (SNAP) と植物ホルモン (ABA, ACC) で処理した根粒感染細胞の顕微鏡観察  
菌接種4週後の根粒を、それぞれの試薬を単独もしくは cPTIO と共に 72 時間処理し、切片 PAS 染色  
した。Scale bars = 20 $\mu$ m

NO と植物ホルモンが根粒老化関連遺伝子の発現に与える影響についても、SNAP、ABA、ACC を添加して 72 時間後に検討した (Fig. 31)。SNAP、ABA、ACC の添加は根粒の老化関連遺伝子 heat shock protein、osmotin precursor、cysteine protease Cyp2 のほとんどの発現を誘導した。heat shock protein は SNAP によって最も高く発現誘導され、osmotin precursor と cysteine protease Cyp2 は ACC によって最も高く発現誘導された。SNAP、ABA、ACC による老化関連遺伝子発現誘導のほとんどは cPTIO の共添加によって緩和さ

れた。SNAP による LjCyp2 の発現誘導のみ、cPTIO 共添加によりさらに強く発現が誘導されたが、その原因は不明である。

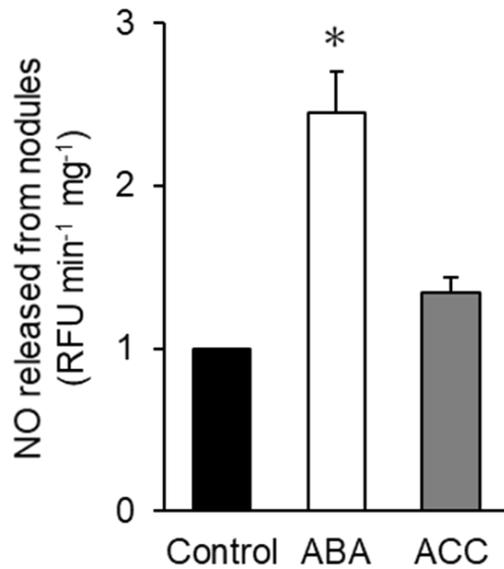


**Fig. 31 NO供与体 (SNAP) と植物ホルモン (ABA、ACC) が老化関連遺伝子の発現に及ぼす影響**

菌接種4週後のWT根粒をSNAP, ABA, ACCで処理、もしくはcPTIOと共処理し、72時間後に老化関連遺伝子の発現解析を行った。蒸留水で処理した根粒の発現量を基準とした。グラフは3回の生物学的反復の平均±SEを示し、それぞれ3回の技術的反復を行った。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。

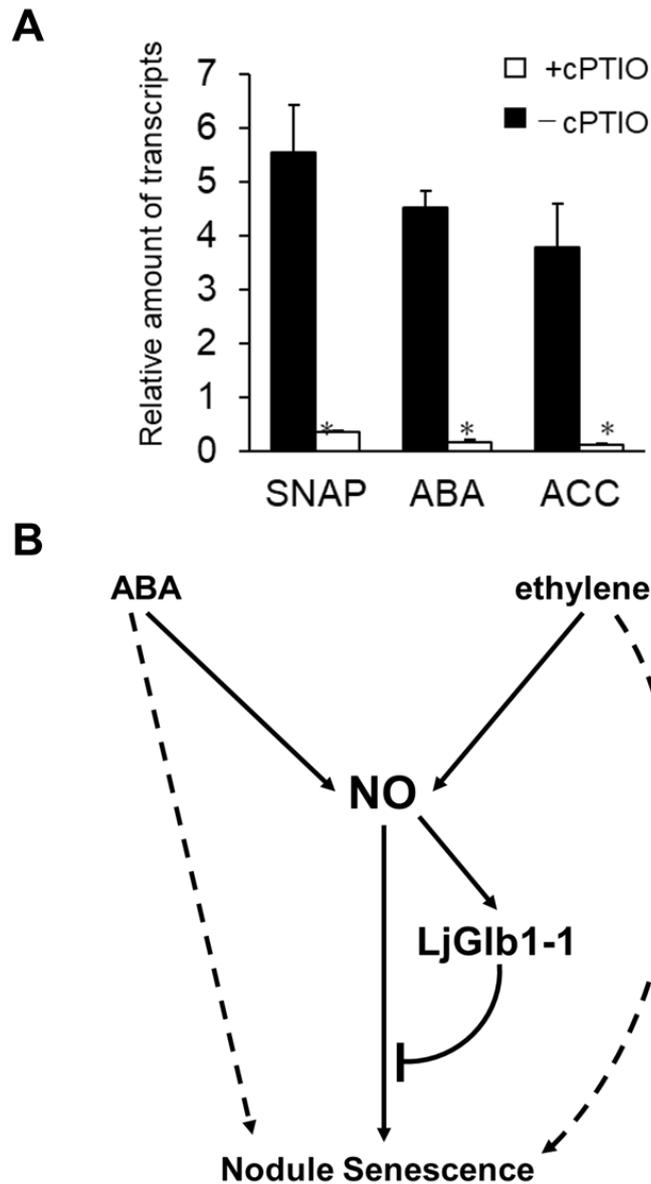
#### 4-3-7 植物ホルモンによるNOとLjGlb1-1遺伝子の誘導

ABA及びACCの根粒への添加が、SNAPの添加と同様に根粒機能の低下や老化様の表現型を示すことや、それらの表現型がcPTIOにより緩和されることから、ABAとACCのNO誘導能について検討した (Fig. 32)。ABAまたはACCを根粒に添加して24時間後の放出NO量をDAF-FMを用いて測定した。その結果、ABAの添加は有意に放出NO量の増加を誘導した。一方、ACCの添加は、放出NO量を増加させる傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。



**Fig. 32 植物ホルモン (ABA, ACC) が根粒NO量に及ぼす影響**  
*M. loti*接種4週後の根粒をABAとACCで処理し、24時間後の根粒の放出NO量をDAF-FMによって測定した。蛍光を定量し、根粒の生重量当たりの放出NO量を算出した。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。 ( $\pm$ SE;  $n = 9$ )

さらに、根粒でのABAとACCによるLjGlb1-1の誘導がNOを介している可能性について検討するため、SNAP、ABA、ACCの単独添加時とcPTIO共添加時でのLjGlb1-1の発現量を解析した (Fig. 33)。根粒を各試薬で処理して24時間後に全RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRによって発現を解析した結果、SNAP、ABA、ACCの全てが、LjGlb1-1の発現を誘導し、また、cPTIOの共添加はその発現誘導を緩和した。この結果は、これまでの知見を支持するものであった。



**Fig. 33 NOおよび植物ホルモンによる根粒でのLjGlb1-1の誘導**

(A) 菌接種4週後のWT根粒をSNAP, ABA, ACCで処理、もしくはcPTIOと共処理し、24時間後にLjGlb1-1の発現解析を行った。蒸留水で処理した根粒の発現量を基準とした。グラフは3回の生物学的反復の平均±SEを示し、それぞれ3回の技術的反復を行った。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。

(B) 植物ホルモン, NO, LjGlb1-1の根粒老化におけるクロストークの予想図

#### 4-4 考察

本章の前半では、LjGlb1-1 の恒常的な高発現形質転換植物系統 (Ox 系統) を用いて、NO 制御の強化が根粒老化の遅延に寄与するか否かを検討した。Ox 系統の根粒菌接種 6 週後の根粒は、WT と比べ緑色化が遅延して赤色を維持していた (Fig. 24)。根粒の色調は、根粒組織内部のレグヘモグロビン (Lb) の色に依存している。Lb は NO によってヘムがニトロ化されることで、赤色から緑色に変化することが知られており、老齡根粒の緑色化も Lb のヘムの分解やニトロ化によるものであると考えられている (Lehtovaara and Perttila 1978; Navascués *et al.*, 2012)。Ox 系統では老齡根粒でも NO レベルは低いため (Fig. 26)、老齡に伴う Lb のヘムのニトロ化及び分解が WT と比べ遅延した可能性がある。Ox 系統では菌接種 4 週後の成熟根粒だけでなく、老齡根粒のニトロゲナーゼ活性も WT より高かった (Fig. 25A)。また、老齡根粒の活性維持率も WT より高い値を示した (Fig. 25B)。これは、NO 除去能の強化が、成熟根粒時の活性強化だけでなく、共生系の恒常性に寄与することで、ニトロゲナーゼ活性を長期にわたって維持することに貢献することを示唆する。NO 制御強化が共生の長期維持に関与することを明確に示すために、老齡根粒の感染細胞を観察し、形態学的に評価した。WT の菌接種 6 週後及び 8 週後の老齡根粒は、バクテロイドの凝集及び感染細胞の崩壊等、根粒の老化を示す表現型 (Hossain *et al.*, 2006) を示した (Fig. 27A)。一方、Ox 系統では、接種 8 週後に液胞の増加や増大が見られたものの、顕著なバクテロイドの凝集及び感染細胞の崩壊は見られなかった (Fig. 27A)。さらに、WT

は菌接種 6 週後に大型かつ多量のデンプン顆粒を蓄積していたものの、Ox 系統では殆んど見られなかった (Fig. 27B)。宿主植物は光合成産物を共生根粒菌に供給し、共生根粒菌は、それを炭素源として共生窒素固定に利用する。多量のデンプン顆粒の蓄積は、根粒機能の低下、あるいは、ニトロゲナーゼ活性の低下により、宿主植物から供給される炭素源の消費量が低下したためであると考えられる。すなわち、これらの観察結果はすべて、Ox 系統では根粒の老化が遅延していたことを示す。また、根粒の老化関連遺伝子の発現も、Ox 系統で WT や 96642 系統より低く維持された (Fig. 28)。結論として、LjGlb1-1 の高発現による NO 除去能の強化は、根粒共生系を維持し、根粒の寿命を延ばすことを示している。

本章の後半では、NO 制御と根粒老化の関連についての詳細を明らかにすることを目的とし、植物ホルモンと関連付けて考察した。ミヤコグサの根粒共生系に負の影響や老化を誘導することが報告される 2 つの植物ホルモンである ABA とエチレン (Ligero *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2004; Lohar *et al.*, 2009) が、根粒老化へ及ぼす影響、さらには NO との関係について検討した。ABA とエチレン前駆体である ACC は、NO 供与剤である SNAP と同様にニトロゲナーゼ活性を低下させ、3 つの老化関連遺伝子の発現を誘導した (Fig. 29AB, 31)。これらの効果は、NO 除去剤である cPTIO の共添加によって緩和された。また ABA と ACC は、老化根粒に見られる液胞数の増加や大きさの増大及び、デンプン顆粒の蓄積を成熟根粒の感染細胞に誘導した (Fig. 30)。感染細胞におけるこれらの変化も、cPTIO の

共添加によって抑制された。これらの結果に基づいて、ABA と ACC による根粒老化の誘導は、NO レベルの増加を介していることが示唆された。しかし、SNAP と cPTIO の共添加は LjCyp2 の発現を増強し、ABA は根粒組織にデンプン顆粒の蓄積を誘導せず、SNAP、ABA、ACC によって誘導される老化関連遺伝子の発現パターンもそれぞれ異なっていたことから、NO、ABA、エチレンが誘導する老化プロセスは、その全てが共通した経路ではないことを示唆している。代謝及び細胞レベルでの根粒老化プロセスの複雑さを考慮すると (Dupont *et al.*, 2012)、NO が介在するシグナル伝達経路は、ABA とエチレンの根粒老化誘導機構の 1 つとして存在し、異なる機構と並行して老化に関与している可能性も考えられる。

本章の結果は、*LjGlb1-1* 遺伝子の高発現は、根粒内部の NO レベルの低下によって根粒老化を遅延させ、共生ニトロゲナーゼ活性の持続期間（根粒の寿命）を延長できる可能性を示している (Fukudome *et al.*, 2019)。また、植物ホルモンである ABA とエチレンが、ニトロゲナーゼ活性を低下させたり、老化関連遺伝子の発現を誘導したり、あるいは感染細胞の老化を惹起する活性があることを明らかにした。また、ABA とエチレンによって誘導された老化を示す表現型は、NO 除去剤によって緩和された。これは、植物ホルモンによる根粒老化の誘導機構には、NO 量の増加が一つの要因として関与していることを示している。

## 第 5 章： *class 1 Hb* 遺伝子高発現による根粒共生系への 冠水耐性の付与

### 5-1 緒論

一酸化窒素 (NO) は、様々な環境ストレスや生物ストレスに応答して、植物体内で産生される。乾燥ストレス時に産生される NO は、気孔を閉鎖させ、植物体外への水分の流出を防ぐ。低温ストレスを与える前に葉を傷つけて NO を誘導すると、全身的な低温耐性を示すことも知られている。このように、NO がストレス応答のシグナル分子として機能する知見はあるものの、その詳細な作用機序については殆んど不明である。また、NO はシグナル分子として機能する反面、その反応性の高さから細胞毒性を持ち、多量の発生は細胞死を引き起こす。*class 1 Hb* の発現は、低温、低酸素、高浸透圧などの NO 産生を誘発するストレスに応答して誘導される (Igamberdiev and Hill 2004; Shimoda *et al.*, 2005; Bustos-Sanmamed *et al.*, 2010)。*class 1 Hb* の過剰発現は、シロイヌナズナ (Hunt *et al.*, 2002)、アルファルファ (Dordas *et al.*, 2003)、トウモロコシ (Mira *et al.*, 2016) で植物内 NO 量を低下させることで、低酸素ストレスに対する耐性を付与する。また、その *class 1 Hb* (AtGlb1、At2g16060) を欠失したシロイヌナズナの突然変異系統は、病原体の感染に対して感受性が高い (Mur *et al.*, 2012)。植物内 NO 量の調節は、ストレス耐性・感受性に関与していることに加え、*class 1 Hb* による NO 制御能の強化が、ストレス耐性に貢献す

ることが近年報告され始めている (Hunt *et al.*, 2002; Dordas *et al.*, 2003; Mira *et al.*, 2016)。一方、マメ科植物と根粒菌の根粒共生系については、class 1 Hb による NO 制御能の強化が共生能向上に寄与することが判明したものの、ストレス耐性への関与についてはこれまで検討されていない。

本研究では、class 1 Hb (LjGlb1-1) 高発現ミヤコグサを用いて、NO 制御能の強化が根粒共生系の冠水 (低酸素) ストレス耐性に及ぼす影響について検討した。冠水ストレスは、マメ科農作物の生産現場での被害が大きく、根系が低酸素条件になることで根粒共生系に直接的なダメージが生じる。本研究では、ミヤコグサの LjGlb1-1 が、根粒共生系の成立に関与していることを明らかにした。LjGlb1-1 遺伝子の発現は、低酸素ストレスによっても誘導されることが分かっており、低酸素ストレス条件下における共生系の維持にも関与している可能性がある。また、他の植物の class 1 Hb に関する報告を考慮すると、LjGlb1-1 だけでなく、NO 除去能を持つ class 1 Hb は、普遍的に低酸素ストレス耐性に寄与できる可能性が高い。そこで、本研究では LjGlb1-1 のみならず、アクチノリザル植物に属するヤシャブシの class 1 Hb である AfHb1 を発現する形質転換ミヤコグサ系統を確立し、その表現型解析も試みた。ヤシャブシは、フランキア属の放線菌と共生窒素固定を行うことが知られており、AfHb1 はその根粒で発現が高い。また、AfHb1 は、NO と相互作用することが *in vitro* で確認されている。そのため、アクチノリザル植物-フランキア根粒共生系でも、マメ科植物と同様に class 1 Hb による NO の制御が根粒共生に関与していると示唆されて

いる (Sasakura *et al.*, 2006)。本研究は、マメ科のモデル植物であるミヤコグサに LjGlb1-1 と AfHb1 を高発現させ、根粒共生系のストレス耐性について検討することで、NO 制御能の強化がマメ科植物の根粒共生ストレス耐性に及ぼす影響について解明できるだけでなく、アクチノリザル植物-フランキア根粒共生系のストレス耐性についての知見を得ることも期待できる。

## 5-2 方法

### 5-2-1 生物材料

ミヤコグサは、*LjGlb1-1* 高発現系統 Ox1 (第 3 章参照)、*LjGlb1-1* 低発現系統 96642 (第 2 章参照)、AfHb1 発現系統 Afx1 及び野生型 (WT) として *L. japonicus* Gifu B-129 を用いた。Ox1、96642、Afx1 は全て、野生型ミヤコグサ *L. japonicus* Gifu B-129 (Handberg and Stougaard, 1992) に由来する。共生根粒菌は *M. loti* MAFF303099 を用いた。

### 5-2-2 *AfHb1* 遺伝子発現系統の確立

AfHb1 発現系統は、日本大学の青木俊夫教授から種子集団の提供を受けた。カリフラワーモザイクウイルス 35S (CaMV 35S) プロモーター及び AfHb1 の cDNA を有するバイナリーベクターを pIG121-Hm をもとに構築した。構築した CaMV 35S:: AfHb1 コンストラクトをもとにアグロバクテリウム形質転換法によって形質転換ミヤコグサを作出し、ハイグロマイシン耐性試験により選抜した (Aoki *et al.*, 2002)。一次選抜された種子集団の中で、生長に異常がなく、*AfHb1* 遺伝子の発現が認められた植物をさらに二次選抜した。二次選抜ミヤコグサのゲノム DNA を鋳型として *AfHb1* 遺伝子を PCR で増幅し、アガロースゲル電気泳動により得られた *AfHb1* の cDNA のバンド (500bp) から形質転換植物であることを確認した。更に、二次選抜ミヤコグサの次世代についても 20 個体のバンドパターンを調べ、全ての次世代個体がコンストラクトを保持していること、すなわち、

形質転換ミヤコグサがゲノム上に CaMV 35S:: AfHb1 コンストラクトをホモで保持していることを確認して Afx1 系統とした。

### 5-2-3 植物の生育条件と冠水処理

種子の表面をサンドペーパーにより傷つけ、有効塩素濃度 2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌し、滅菌蒸留水で 2 回洗浄し吸水処理後、0.5%寒天プレートに移植した。25°C で 5 日間の暗所インキュベート後、栄養寒天培地に実生を移植した。シャーレを用いた無菌実験系では、実生を Fåhraeus 寒天培地(Fåhraeus, 1957)上で生育させ、各実生に *M. loti* MAFF303099 を  $10^6$  細胞ずつ接種した。ビニールポット ( $\phi 9$  cm) を用いた開放系の実験系では、実生を Fåhraeus 液体培地を吸収させたバーミキュライト (S サイズ) 上で生育し、*M. loti* MAFF303099 を植物 1 個体にあたり  $10^7$  細胞ずつ接種した。いずれの実験系でも、菌接種 4 週間後から 1 週間、根と茎の境界部から 1 cm の高さまで水に浸漬した状態とし、冠水処理とした。

### 5-2-4 ニトロゲナーゼ活性の測定

根粒数及び窒素固定 (ニトロゲナーゼ) 活性は、*M. loti* MAFF303099 接種 4 週間後から 1 週間の冠水処理を施した後で測定した。コントロール (無処理区) は、根粒菌接種 5 週間後に測定した。ニトロゲナーゼ活性は、Shimoda ら (2009) に従い、アセチレン還元法で

測定した。詳細は、第 2 章に記載した。

#### 5-2-5 感染細胞の観察

感染細胞の観察は、Hossain ら (2006) の手法に従った。冠水処理後、4%パラホルムアルデヒド及び 2.5%グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で根粒を 4°Cで一晩固定し、エタノールで脱水後に JB4 樹脂に包埋した。ミクロトームで作成した切片 (厚さ 3  $\mu\text{m}$ ) を Periodic Acid-Schiff 染色液によって染色し光学顕微鏡で観察した。詳細は、第 4 章に記載した。

#### 5-2-6 NO 量の測定

冠水処理 1 週後の根内の NO 産生は、20  $\mu\text{M}$  の DAF-FM DA で 1 時間処理後、蛍光顕微鏡にて観察した。冠水処理した根粒からの放出 NO 量は、7  $\mu\text{M}$  の DAF-FM 溶液処理後に蛍光強度を測定し、生重量あたりの相対蛍光強度として算出した。詳細は、第 2 章に記載した。

#### 5-2-7 クロロフィル量の測定

植物から葉を 5 枚採取し、葉の重量を測定した。Porra らの方法 (1989) に従ってクロロフィルを抽出し、663.8 nm と 646.8 nm の吸収を測定した。測定値を以下の式に代入し、

クロロフィル a (Chl a)、クロロフィル b (Chl b)、クロロフィル a+b (Chls a + b) を算出した。

$$\text{Chl a} = 12.00 \times A_{663.8} - 3.11 \times A_{646.8}$$

$$\text{Chl b} = 20.78 \times A_{646.8} - 4.88 \times A_{663.8}$$

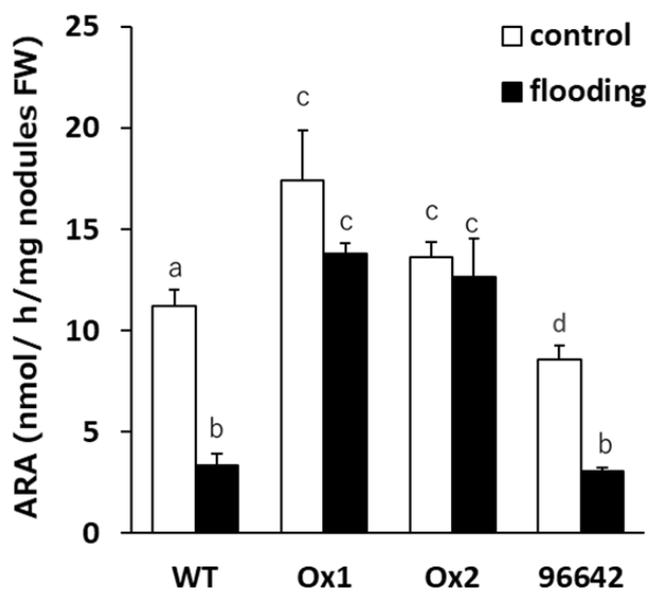
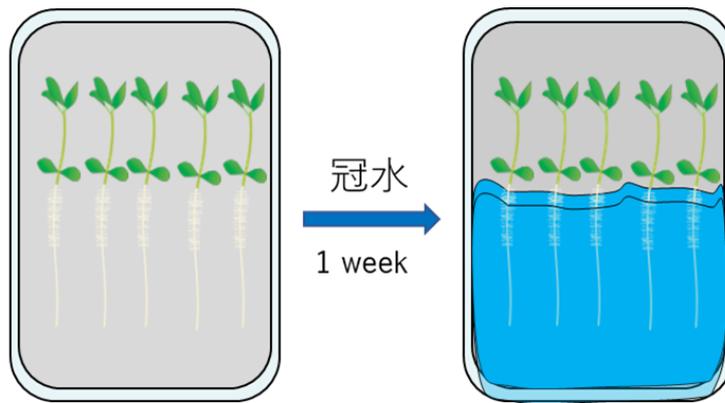
$$\text{Chls a + b} = 17.67 \times A_{646.8} + 7.12 \times A_{663.8}$$

吸光度測定後、葉の重量当たりのクロロフィル含有量を算出した。冠水処理後の植物と無処理の植物体でクロロフィル量を測定し、各系統で冠水によるクロロフィル減少量を比較した。

## 5-3 結果

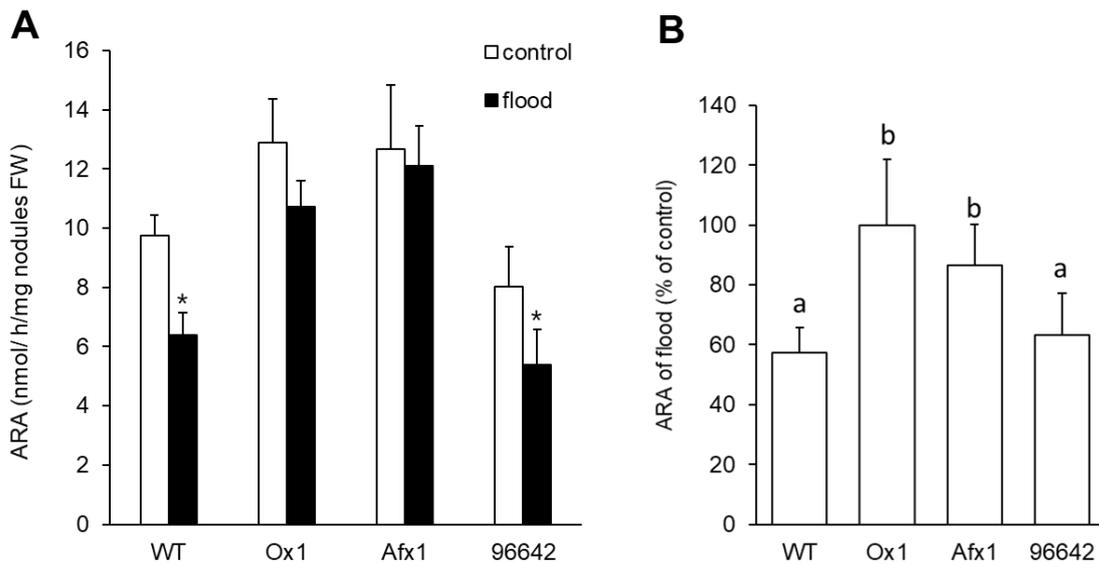
### 5-3-1 冠水処理後のニトロゲナーゼ活性

冠水は、根系に低酸素ストレスをもたらす。マメ科の農作物であるダイズでは、冠水により共生窒素固定能が低下することも知られている。そこで、はじめに WT、Ox1、Afx1、96642 系統のミヤコグサを用いて、冠水処理後のニトロゲナーゼ活性について検討した (Fig. 34, 35)。根粒菌 *M. loti* 接種 4 週間後から 1 週間、根系を冠水し、根粒のニトロゲナーゼ活性 (ARA) を測定した。経時的な観察が容易なシャーレと寒天培地を用いた実験系 (Fig. 34) と、より土壌条件に近いバーミキュライトを用いた実験系 (Fig. 35A, B) でそれぞれ検討したが、いずれの実験系でも同様の結果が得られた。WT と 96642 系統は、1 週間の冠水により有意に ARA が低下した。一方、*LjGlb1-1* 高発現 (Ox) 系統及び AfHb1 発現系統では、冠水処理後も活性が維持されていた。寒天培地とバーミキュライト培地の実験系で冠水がニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響を比較すると、バーミキュライトの実験系の方が、活性の低下がより緩やかだった。



**Fig. 34** WT, *LjGlb1-1*高発現系統 (Ox1, 2), 96642系統の冠水処理後の窒素固定活性 (寒天培地条件)

発芽5日後、実生に*M. loti* MAFF303099を接種し、窒素を含まないFåhraeus寒天培地で4週間生育した。その後1週間根圏を冠水し、窒素固定 (アセチレン還元) 活性 (ARA) を測定した。ARAは $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ produced min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$ として算出した。同一の文字が記されたグラフは、Student's t-test at  $P < 0.05$ に基づいて有意差がないこと、アスタリスクは有意差を示す。 ( $\pm \text{SE}$ ;  $n = 18$ )



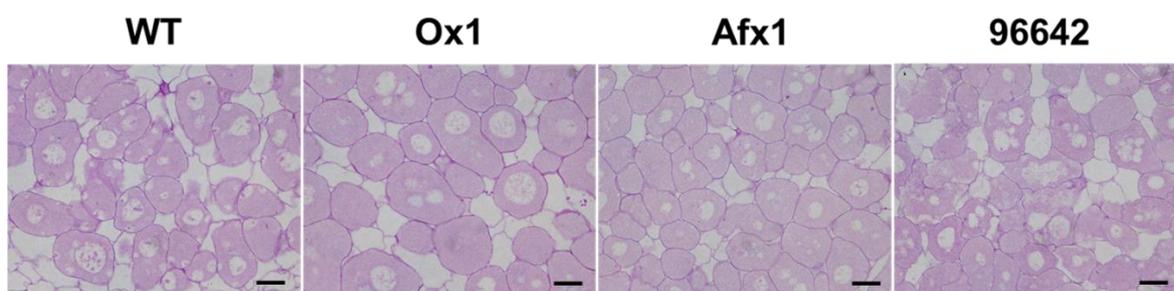
**Fig. 35** WT, Ox1, AfHb1発現系統(Afx1), 96642系統の冠水処理後の窒素固定活性 (バーミキュライト培地条件)

発芽5日後、実生に*M. loti* MAFF303099を接種し、窒素を含まないFåhræus液体培地を吸収させたバーミキュライトで4週間生育した。その後1週間根圏を冠水し、窒素固定(アセチレン還元)活性(ARA)を測定した。(A)冠水処理時と非冠水処理時のARA (B)非冠水処理時のARAを100%とした時の冠水処理時の活性維持率。ARAは $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ produced min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$ として算出した。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。(±SE;  $n = 12$ )

### 5-3-2 冠水処理後の感染細胞

冠水処理によりニトロゲナーゼ活性が低下したことから、老化による活性の低下と同様に、感染細胞に形態的变化が生じている可能性が考えられた。そこで、冠水処理後の根粒細胞を光学顕微鏡にて観察した (Fig. 36)。植物をバーミキュライトで栽培し、根粒菌 *M.*

*loti* 接種 4 週後から 1 週間、根系を冠水し、根粒の感染細胞の様子を観察した。根粒を樹脂に包埋して作成した切片を PAS 染色し、感染細胞及びデンプン顆粒を観察した。WT では、液胞の増加・増大の他に、液胞内部に多量の凝集物が見られた。また、細胞間隙に局在する細菌も観察された。一方、Ox 系統及び AfHb1 発現系統では、冠水による感染細胞の大きな変化は見られなかった。96642 系統は WT と同様の表現型を示した。また、いずれの系統でもデンプン顆粒の増加は見られず、特に WT では、デンプン顆粒は殆んど観察されなかった。

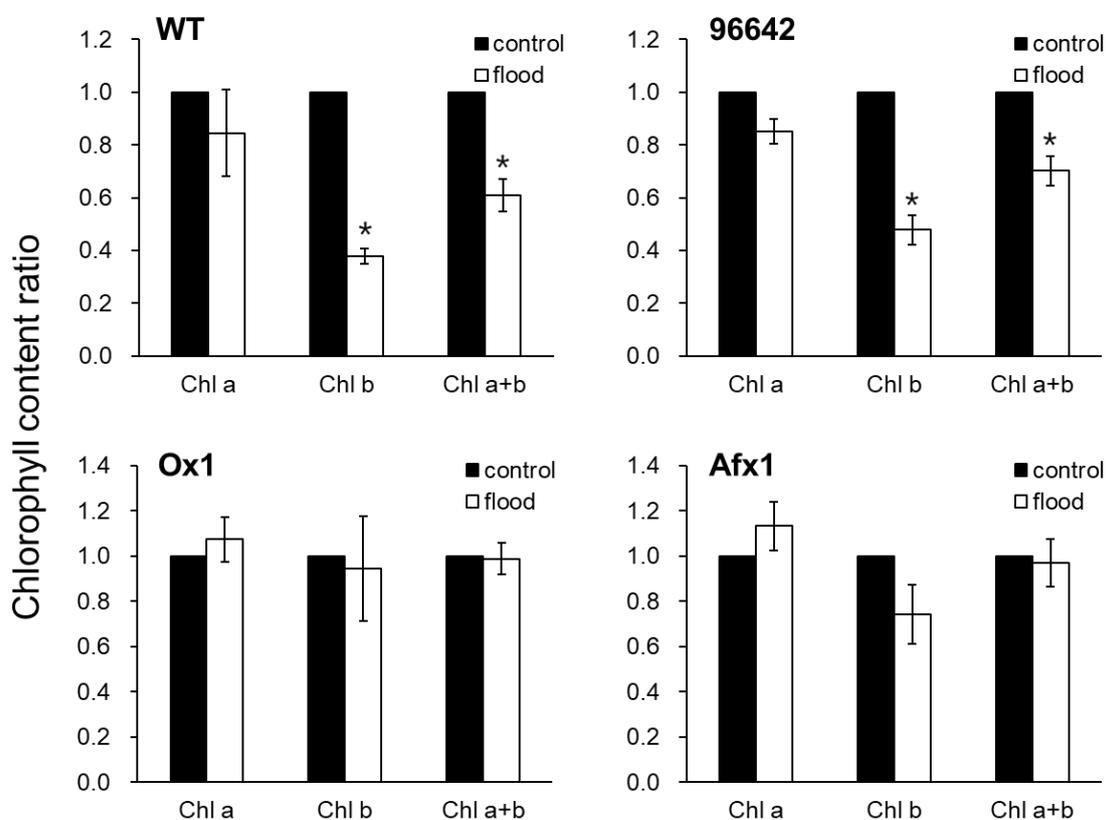


**Fig. 36 冠水処理後の感染細胞の顕微鏡観察**  
菌接種4週後の根圏を1週間冠水処理し、その後根粒切片PAS染色した。 Scale bars = 20μm

### 5-3-3 冠水処理が地上部に及ぼす影響

冠水処理が根粒共生系に及ぼす影響は、地上部が受けたダメージを介している可能性があるのかどうか検討した。共生窒素固定は、光合成産物が、宿主植物から共生根粒菌に供給されることで成り立つ。そこで、冠水ストレスが光合成に及ぼす影響を、葉のクロロフィル含有量を指標として検討した。WT と 96642 系統では、クロロフィル a 及び b の含有量は、冠水処理によって減少した。特に、クロロフィル b の含有量は顕著に減少した。一

方、Ox1、Afx1 系統は、冠水後もクロロフィル含有量に有意な変化はなかった。



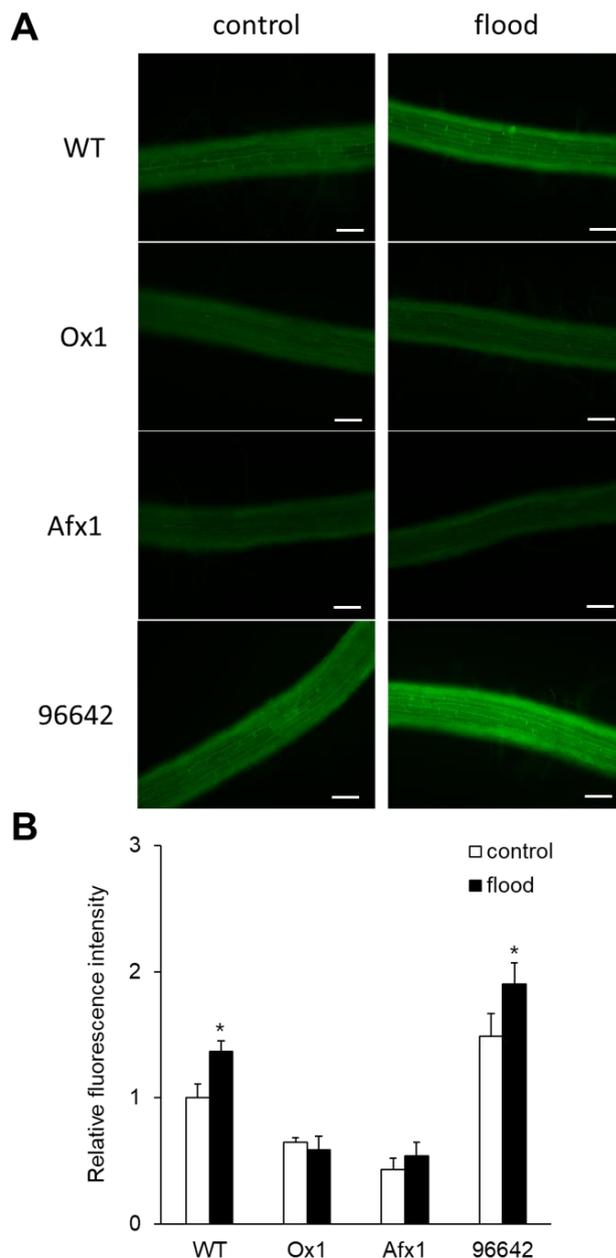
**Fig. 37 冠水処理によるクロロフィル含有量の変化**

*M.loti*接種4週後の根圏を1週間冠水し、葉のクロロフィル含有量を測定した。DMF（ジメチルホルムアミド）に溶出したクロロフィルの吸光度を測定し、葉の重量当たりのクロロフィル含有量を算出した。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。（ $\pm$ SE;  $n = 9$ ）

#### 5-3-4 冠水処理後の根及び根粒の NO レベル

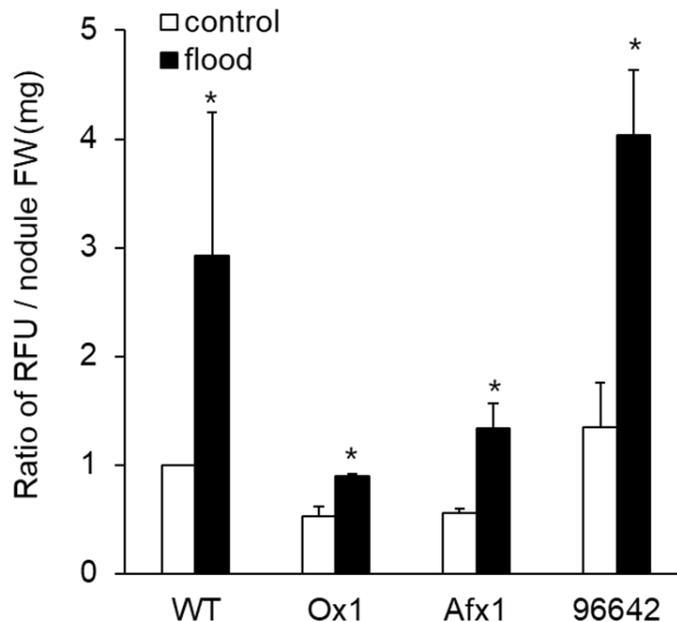
冠水等の低酸素ストレスは、NO の発生や class 1 Hb の発現を誘導することから、class 1 Hb 高発現系統（Ox1、Afx1）における冠水耐性は、NO 制御能の強化に起因すると考えられた。そこで、冠水処理後の NO 量を根と根粒で測定した。根の NO 量は、細胞浸透性 NO 特異的蛍光試薬 DAF-FM DA を用いて検出した（Fig. 38A, B）。WT では、冠水により

根の NO 量の上昇が見られた。一方、Ox 系統及び AfHb1 発現系統は、コントロール条件と冠水条件のどちらの条件でも、WT より NO 量が低いレベルで維持されていた。96642 系統は WT と同様に、冠水により NO 量が上昇した。



**Fig. 38** WT, Ox1, AfHb1発現系統(Afx1), 96642系統の冠水処理による根のNO量変化 *M.loti*接種4週後の根圏を1週間冠水し、(A) 根内NO量をDAF-FM DAによって蛍光イメージングし、(B) 蛍光写真をもとにimage Jによって蛍光量をグラフ化した。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。(±SE; n = 40)

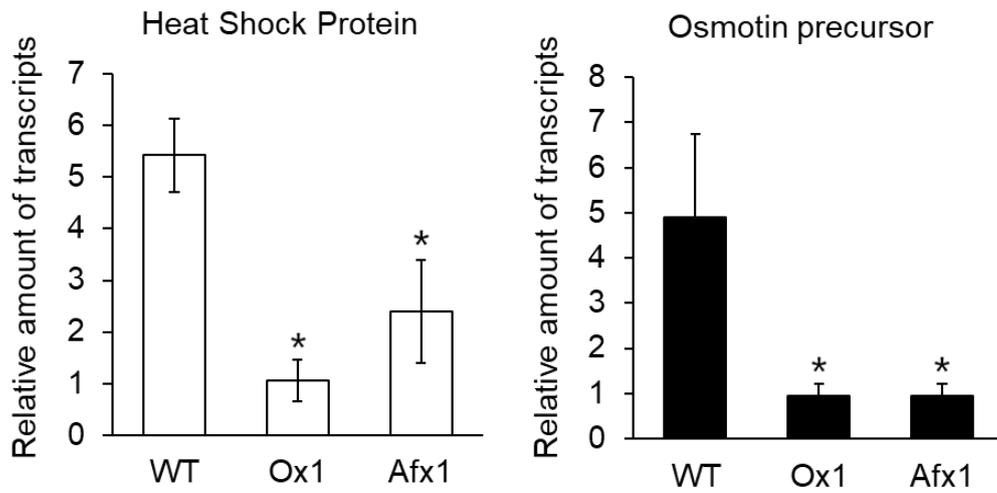
根粒の NO 量は、非細胞浸透性 NO 特異的蛍光試薬 DAF-FM を用いて放出 NO 量として比較した (Fig. 39)。いずれの系統も冠水処理により NO 量が増加していたが、冠水による NO 量増加後も、Ox 系統と AfHb1 系統では、WT より低いレベルに維持されていた。



**Fig. 39** WT, Ox1, AfHb1発現系統(Afx1), 96642系統の冠水処理による根粒のNO量変化  
*M.loti*接種4週後の根圏を1週間冠水し、根粒からの放出NO量をDAF-FMによって測定し、根粒生重量当たりの放出NO量を算出した。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。(±SE;  $n = 12$ )

### 5-3-5 冠水処理後の根粒の老化関連遺伝子の発現

冠水後のニトロゲナーゼ活性の低下が、根粒の早期老化である可能性について検討するため、2つの老化関連遺伝子 heat shock protein (Lj4g3v0473190)と osmotin precursor (Lj2g3v2017460)の発現を解析し。無処理と冠水処理後の根粒からそれぞれ全RNAを抽出し、リアルタイム RT-PCRによって発現量を解析した (Fig. 40)。heat shock protein と osmotin precursor のどちらも、冠水による発現レベルの上昇が見られた。



**Fig. 40 冠水処理後の老化関連遺伝子の発現解析**

菌接種4週後の根圏を1週間冠水し、老化関連遺伝子の発現解析を行った。Control（非冠水根粒）の発現量を基準として比較した。グラフは3回の生物学的反復の平均±SEを示し、それぞれ3回の技術的反復を行った。アスタリスクはStudent's *t*-test at  $P < 0.05$ に基づいた有意差を示す。

#### 5-4 考察

冠水は根系に低酸素ストレスを生じることで、植物の生長を阻害する (Marcio *et al.*, 2010)。低酸素ストレスは植物に一酸化窒素 (NO) を発生させることや、class 1 Hb の発現を誘導することも報告されている (Dordas *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2002; Igamberdiev *et al.*, 2004)。さらに、いくつかの植物では class 1 Hb を高発現させ植物内 NO 量を減少させることで低酸素ストレス耐性を獲得した例や、冠水に強いダイズ品種では冠水感受性のダイズより class 1 Hb の発現が高いことも報告されており (Hunt *et al.*, 2002; Dordas *et al.*, 2003; Mira *et al.*, 2016)、植物の低酸素ストレスに対する応答には NO - class 1 Hb の相互作用が深く関与していると考えられる。根粒共生系においても、NO - class 1 Hb の相互作用が関与していることや、LjGlb1-1 の高発現による NO 制御能の強化が、共生系の強化に寄与することを明らかにした。しかし、class 1 Hb が環境ストレス条件下で根粒共生系に関与するのか否かは不明なままであった。

本章では、LjGlb1-1 (ミヤコグサの class 1 Hb) と AfHb1 (ヤシャブシの class 1 Hb) を高発現し、NO 制御能が強化されたミヤコグサを用いて、根粒共生系の冠水 (低酸素ストレス) 耐性について検討した。ミヤコグサは冠水に強く、1 週間の冠水によって枯れる個体はなかったものの、WT ではニトログナーゼ活性 (ARA) が低下した。LjGlb1-1 と AfHb1 の class 1 Hb 高発現系統は、ARA の有意な低下を示さず、class 1 Hb の高発現が冠水耐性に寄与することが明らかとなった (Fig. 34, 35)。これら 2 つの class 1 Hb 高発現系統は、

冠水処理後も根及び根粒で NO レベルを低く保っていたことから (Fig. 38AB, 39)、低酸素ストレス条件下での ARA 低下には NO が関与しており、NO 除去能の強化が低酸素ストレス耐性に寄与したと考えられる。NO を介した根粒機能の低下であれば、根粒内では老化と同様の現象 (早期老化) が生じているのではないかと予想されたため、冠水後の老化関連遺伝子の発現量について検討した。予想通り、冠水後の野生型と 96642 系統の根粒では老化関連遺伝子の発現上昇が見られ、2 つの class 1 Hb 高発現系統では老化関連遺伝子の発現上昇が抑制された (Fig. 40)。また、PAS 染色による感染細胞の観察では、冠水後、野生型と 96642 系統の根粒では液胞の増加増大等の老化根粒様の表現型が見られたものの、2 つの class 1 Hb 高発現系統では感染細胞の変化も緩和されていた (Fig. 36)。一方、野生型と 96642 系統はニトロゲナーゼ活性が低下しているにも関わらず、長期栽培による老化根粒とは異なり、デンプン顆粒の蓄積が見られなかった。この原因として、冠水時に宿主植物の光合成活性が低下しているか、もしくは光合成産物を根粒に供給出来なくなっている可能性が考えられた。葉でのクロロフィル含有量が野生型と 96642 系統で冠水処理によって減少したこと、2 つの class 1 Hb 高発現系統でクロロフィル含有量の減少が緩和されたこともこの可能性を支持する。NO 除去能の強化は、地上部でのストレス緩和によってもまた、根粒共生系の維持に関与しているのかもしれない。

結論として、低酸素ストレス時の ARA の低下は NO を介しており、時間経過に伴う根粒の老化と同様に老化関連遺伝子の発現を伴うことが明らかとなった。また同時に、冠水

ストレスはクロロフィル含有量の減少にも関与していたことから、時間経過に伴う根粒の老化とは異なるプロセスも存在する可能性が示唆された。この可能性はまた、多様なプロセスによる共生系の崩壊に NO が関与していること、NO 制御の強化が多角的な根粒共生系の崩壊を抑制・遅延できる可能性も示した。低酸素ストレスの他にも、低温、高温、乾燥、日照不足など、多くのストレスが NO シグナルと関与していることから、class 1 Hb 高発現系統の根粒共生系が、それらのストレスに耐性を示すか否かも大変興味深い。

## 第6章：総括

LjGlb1-1 の変異・低発現系統は、感染糸の形成や伸長が阻害され、根粒数も減少し、ニトロゲナーゼ活性も低かった (Table. 2A)。これらの変異・低発現系統では、植物内 NO 量が WT より増加していたことから (Fig. 7, 9)、LjGlb1-1 による NO 制御能の低下が、共生表現型の異常の要因であると考えられる。NO 供与剤である SNAP または SNP の添加が、変異・低発現系統と同様に感染糸の発達を抑制し、NO 除去剤である cPTIO の同時添加がそれらの表現型を緩和すること (Table. 3AB) や、NO 供与剤及び除去剤が共生窒素固定に及ぼす影響 (Nagata *et al.*, 2008; Shimoda *et al.*, 2005; Sasakura *et al.*, 2006) も、この予想を支持する。NO は共生根粒菌の感染過程で一過的に発生し、その後減少する。NO は病原菌の感染時に病原応答として発生することが知られており、根粒菌感染時の NO 発生も病原応答に類似したものであると考えられる。また、感染した菌が共生根粒菌であることを認識すると、宿主植物は class 1 Hb により NO を除去することで防御応答を回避し、共生成立のプログラムの進行を促していると考えられる。しかしながら、タルウマゴヤシ根粒共生系では、根粒菌による過剰な NO 除去が植物への感染を遅延させることから、NO が適正な感染に必要であると報告されている (del Giudice *et al.*, 2011)。ミヤコグサとタルウマゴヤシの間の相違には、いくつかの原因が予想される。無限型根粒 (タルウマゴヤシ) と有限型根粒 (ミヤコグサ) の根粒の形態形成の違いや、植物種及び根粒菌種ごとの最適

NO 濃度の違い、根全体での NO 除去と感染系での局所的な NO 除去などの違いが、この異なる二つの共生系に見られる相違の原因かもしれない。LjGlb1-1 の変異・低発現は根粒数の減少を誘導した (Table. 2A) もの、*LjGlb1-1* 高発現系統の根粒着生数は増加しなかった (Fig. 19B)。これは、根の NO レベルの低下は局所的な感染の促進に働くもの (Shimoda *et al.*, 2009)、全身的な根粒数調節 (オートレギュレーション) (Kosslak and Bohlool 1984) による根粒着生数の制御を WT と同様に受けているためであると考えられる。変異・低発現系統の根粒内部の NO 量は高く、ニトロゲナーゼ活性は低かった (Fig. 7, 9; Table. 2A)。反対に、高発現系統の根粒 NO 量は低く、ニトロゲナーゼ活性は上昇した (Fig. 19A, 22, 23)。これらの結果は、class 1 Hb の NO 制御が、根粒形成後も共生窒素固定に関与していることを示す。本研究は、ミヤコグサと根粒菌の共生において、少なくとも、根粒菌の感染から成熟根粒の共生窒素固定能の発現の段階にかけて、class 1 Hb (*LjGlb1-1*) の NO 制御が貢献していることを解明した (Fig. 17)。さらに、*LjGlb1-1* 高発現系統における成熟根粒でニトロゲナーゼ活性が増加したことは、以上の結論を支持するのみならず、NO 除去能の強化が、さらなる共生ニトロゲナーゼ活性の向上に寄与する可能性を示している。NO は防御応答のシグナル分子であるものの、いくつかの class 1 Hb 過剰発現植物で病原菌抵抗性が高くなることや、class 1 Hb 変異植物の病原菌抵抗性が低下することが報告されている。これは、class 1 Hb による NO 制御が、NO 産生そのものを阻害するのではなく、シグナル伝達にとっては余剰な NO を迅速に除去し、効率的な防

御応答に貢献している可能性が示唆される。同様に、class 1 Hb 高発現植物では、根粒共生系に必要とされる NO によるシグナルを阻害せず、一方では過剰な NO を除去することで効率的な共生系の確率・維持に寄与しているのかもしれない。

マメ科植物-根粒菌の共生器官である根粒は、その器官・組織の老化に伴い NO を産生することが知られている (Ya'acov *et al.*, 1998; Cam *et al.*, 2012)。NO はその他植物器官の老化に関与していることや (Ya'acov *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2013; Guangwen *et al.*, 2017)、窒素固定酵素の阻害剤として機能することから (Trinchant and Rigaud 1982、Kato *et al.*, 2010)、根粒の老化にも関与している可能性がある。また、class 1 Hb は NO 除去能を持つことから (Shimoda *et al.*, 2009)、*LjGlb1-1* 高発現による NO 除去能の強化は、根粒老化の遅延に貢献する可能性が期待できる。本研究は、WT 及び *LjGlb1-1* 高発現系統の老齢根粒の表現型から、NO の根粒老化への関与の詳細と、NO 除去能の強化が根粒老化遅延に貢献するか否かを検討した。ミヤコグサの根粒共生系では、根粒菌の感染後 3~4 週で成熟根粒を形成し、共生窒素固定能を十分に発揮する。老齢 (菌感染 6~8 週後) の根粒はニトロゲナーゼ活性が低下し、根粒共生が破綻していく。一般に、時間経過に伴い根粒機能が低下していくことを根粒の老化と呼び、老化の表現型が見られる根粒は老化根粒と呼称される。しかし、「根粒の老化」や「老化根粒」については知見が少なく、定義も定まっていないのが実情である。そこで本研究では、老齢根粒の老化の進行を、根粒外観、ニトロゲナーゼ活性、感染細胞の形態、老化関連遺伝子の発現など、多角的な検討結果から評価した。

また、老齡根粒の NO 量から、老化進行度と根粒 NO 量を関連付けて議論した。 *LjGlb1-1* 高発現 (Ox) 系統の老齡根粒は WT と比べ、老化に伴う根粒色の変化やニトロゲナーゼ活性の低下、感染細胞の崩壊、老化関連遺伝子の発現上昇のどの表現型も、遅延もしくは緩和していた (Fig. 24, 25, 27, 28)。これらの結果から、 *LjGlb1-1* の老齡根粒では、根粒の老化の進行が遅延していると考えられる。また、Ox 系統では、老齡根粒においても NO 量が低い (Fig. 26) ことから、根粒機能の維持や根粒老化の遅延は、 *LjGlb1-1* の高発現による NO の制御能力の強化に起因するものであることが示唆された。

アブシシン酸 (ABA) とエチレンは根粒老化に関与することが報告されている植物ホルモンで、植物生理において NO とクロストークしていることも分かっている。また、ABA 及びエチレンは、根粒で *LjGlb1-1* の発現を誘導することも報告されている (Bustos-Sanmamed *et al.*, 2011)。そこで、根粒の老化過程で ABA とエチレンが、NO 及び *LjGlb1-1* とクロストークしている可能性について検討した。ABA とエチレン前駆体である ACC は、SNAP と同様にニトロゲナーゼ活性を低下させ (Fig. 29)、3 つの老化関連遺伝子の発現を誘導した (Fig. 31)。ABA と ACC によるこれらの効果は、NO 除去剤である cPTIO によって緩和された。また ABA と ACC は共に、老化根粒に見られる感染細胞内の液胞数の増加や大きさの増大及び、デンプン顆粒の蓄積を成熟根粒の感染細胞に誘導した (Fig. 30, 29)。感染細胞におけるこれらの変化も、cPTIO によって緩和された。これらの結果は、ABA と ACC が根粒老化を誘導し、その過程で NO レベルの増加を介していることを示唆

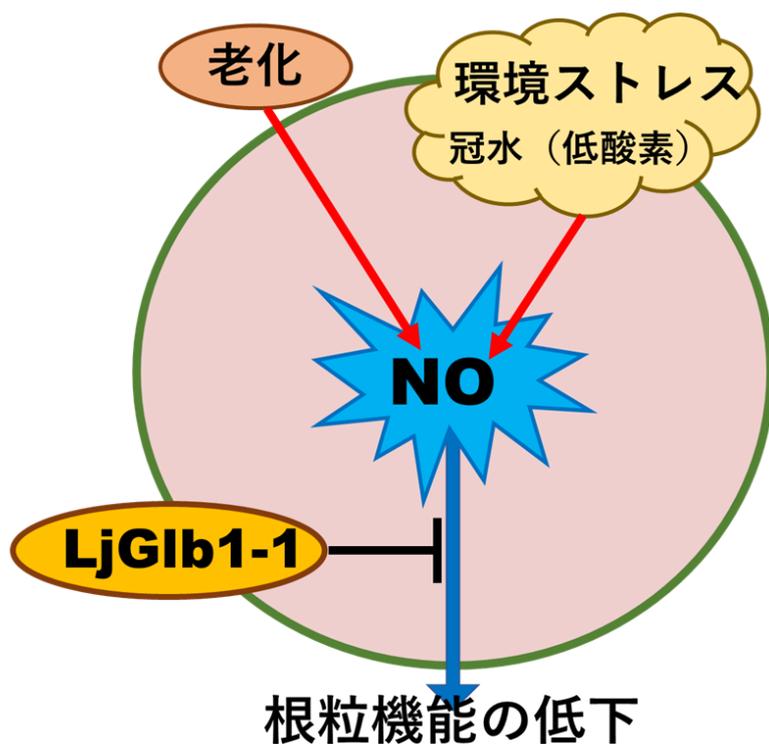
する。しかし、ABA と ACC に誘導されたいくつかの表現型（例えば、「ABA によって誘導された heat shock protein の発現」、「ACC によって誘導された感染細胞の変化」）は、cPTIO によって緩和されなかったことや、ABA、ACC、SNAP がそれぞれ異なる表現型（例えば、「老化関連遺伝子の発現誘導」、「デンプン顆粒や液胞の増加・増大」）を誘導したことから、NO、ABA、エチレンが誘導する老化プロセスは、その全てが共通した経路ではないと予想される。根粒老化プロセスは複雑であり (Dupont *et al.*, 2012)、1つの経路のみで制御されているとは考え難い。NO シグナルを介した根粒の老化は複数存在する老化経路の1つであり、LjGlb1-1 による NO の除去はその経路の一部の進行を緩和することで、根粒老化の遅延に貢献していると考えられる (Fig. 33B)。

NO は様々な環境ストレスや生物ストレスに応答して植物体内で産生され、ストレス応答のシグナル分子として機能するという知見はあるものの、その詳細な作用機序については不明である (Dordas *et al.*, 2003; Mohd *et al.*, 2017)。また、NO はシグナル分子として重要な機能を発揮する反面、その反応性の高さから細胞毒性を持ち、多量の発生は細胞傷害あるいは細胞死をもたらすため、その状況に応じた緻密なコントロールが必要な分子でもある。class 1 Hb の過剰発現は、シロイヌナズナ (Hunt *et al.*, 2002)、アルファルファ (Dordas *et al.*, 2003)、トウモロコシ (Mira *et al.*, 2016) で植物内 NO 量を低下させることで、低酸素ストレスに対する耐性を付与することから、低酸素ストレス条件下では、NO 除去は耐性付与に貢献すると予想される。マメ科植物と根粒菌の根粒共生系では、class 1

Hb による NO 制御能の強化が共生能向上に寄与することが判明した。しかしながら、根粒共生系は冠水等の低酸素ストレスによって崩壊することは知られているものの、NO 制御の強化によって耐性が付与できるか否かは未検討であった。本研究では、*LjGlb1-1* 高発現系統及びヤシャブシ class 1 Hb(AfHb1)発現系統を用いて、class 1 Hb による NO 制御の強化がミヤコグサ根粒共生系における冠水耐性に寄与するか否かを検討した。2 つの class 1 Hb 高発現系統はどちらも、1 週間の冠水を原因とするニトロゲナーゼ活性の低下が緩和しており、冠水耐性を示した (Fig. 34, 35)。冠水処理後も根及び根粒で NO レベルが低いことから (Fig. 38AB, 39)、老化ストレス時と同様に NO 除去能の強化が根粒機能維持に寄与したと考えられた。また、冠水処理後に野生型と比べ老化関連遺伝子の発現上昇が見られないことから、環境ストレスを原因とする根粒の早期老化が遅延していると考えられた。

トウモロコシでは、class 1 Hb の高発現系統が冠水時に地上部や葉でのストレス緩和を示すことが報告されており、class 1 Hb 高発現による冠水耐性の付与は根系のみならず、地上部での生理応答にも関与している可能性がある。WT で冠水時にニトロゲナーゼ活性が低下している (Fig. 34, 35) にも関わらず、デンプン顆粒が蓄積しないこと (Fig. 36) もこの可能性を支持する。さらに、冠水処理による葉でのクロロフィル含有量の低下が、class 1 Hb 高発現により抑制されていたことも、NO 除去が冠水による地上部のストレス緩和に寄与していることを示唆している。これらの知見は、冠水処理時の根粒機能の低下に NO が介在していること、時間経過に伴う根粒老化と冠水による早期老化には、共通する表現

型と異なる表現型の両方が存在することを明らかにした。またこのことは、老化と環境ストレスで根粒機能が低下するプロセスの差異に関わらず、NO を介する根粒機能の低下が、NO 除去能の強化により緩和できる可能性も示唆している (Fig. 41)。



**Fig. 41 LjGlb1-1による根粒共生系の強化**  
LjGlb1-1のNO制御は、老化や冠水（低酸素ストレス）等のNOを介する根粒機能の低下を緩和し、根粒共生系を維持する。

マメ科農作物の生産現場では、根粒の老化や根系の冠水による根粒共生系の崩壊及びニトロゲナーゼ活性の低下が、品質低下や減収につながり、経済的に大きな問題となっている。この問題の解決には、ニトロゲナーゼ活性の寿命が長く環境ストレスに強い根粒共生系の開発が重要な課題である。NO は老化や冠水によって植物組織内に発生するガス状分子で、ニトロゲナーゼ活性低下の主要要因の一つである。本研究はマメ科モデル植物のミ

ヤコグサを材料として、class 1 Hb の NO 除去能が根粒共生成立に必要であることに加え、老化遅延や冠水耐性に寄与することを明らかにした。植物の class 1 Hb は、農業の生産現場が抱える大きな問題の解決にも貢献できる可能性を持つ重要な遺伝子素材である。マメ科植物に限らず、様々な植物へも導入し、それらの特性を把握することは、新たな品種の開発に向けての基盤的な知見を与えてくれるものと考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行と取りまとめにあたり、ご指導を賜った鹿児島大学 学術研究院 理工学域理学系の内海 俊樹 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査において、数々の御助言と御指導賜りました、鹿児島大学同上の伊東 祐二 教授、九町 健一 准教授、濱田 季之 准教授に厚く御礼申し上げます。

論文執筆にあたり、数々の御助言と御指導賜り、*LjGlb1-1* 低発現系統も提供して下さった、スペイン 科学研究高等会議 アウラ デイ研究所の Manuel Becana 教授に感謝申し上げます。

本研究に用いた *LjGlb1-1* 高発現系統と AfHb1 発現系統を提供して下さった日本大学の青木 俊夫 教授に感謝申し上げます。

本研究の議論、検討にあたり、御教示並びに御激励賜りました、鹿児島大学 東 四郎 名誉教授、阿部 美紀子 名誉教授に深謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御助力いただきました研究室の皆様に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Akiyoshi Tominaga, Maki Nagata, Koichi Futsuki, Hidetoshi Abe, Toshiki Uchiumi, Mikiko Abe, Ken-ichi Kucho, Masatsugu Hashiguchi, Ryo Akashi, Ann M. Hirsch, Susumu Arima, Akihiro Suzuki. (2009).** Enhanced Nodulation and Nitrogen Fixation in the Abscisic Acid Low-Sensitive Mutant enhanced nitrogen fixation<sup>1</sup> of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.109.142638>
- Asai S, Yoshioka H. 2009.** Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 619-629.
- Aoki, T., Kamizawa, A. and Ayabe, S. (2002)** Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Rep.* **21**: 238-243.
- Appleby, C.A. (1984)** Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443-478.
- Bárbara Nova-Franco, Luis P. Íñiguez, Oswaldo Valdés-López, Xochitl Alvarado-Affantranger, Alfonso Leija, Sara I. Fuentes, Mario Ramírez, Sujay Paul, José L. Reyes, Lourdes Girard and Georgina Hernández. 2015.** The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the Common Bean-Rhizobium etli Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology* **168**(1), 273-291.
- Baudouin E, Hancock JT. 2014.** Nitric oxide signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, **4**: doi: 10.3389/fpls.2013.00553.
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A. 2006.** Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula* - *Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular Plant-*

*Microbe Interactions* **19**, 970-975.

**Bustos-Sanmamed, P., Tovar-Méndez, A., Crespi, M., Sato, S., Tabata, S. and Becana, M.** (2011) Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. *New Phytol.* **189**: 765-776.

**Calvo-Begueria, L., Rubio, M.C., Martínez, J.I., Pérez-Rontomé, C., Delgado, M.J., Bedmar, E.J., et al.** (2018) Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *J. Exp. Bot.* **69**: 3703-3714.

**Carlos Garcfa-Mata and Lorenzo Lamattina.** (2002). Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant Physiol*, vol. 128

**Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, D., Meilhoc, E. and Bruand, C.** (2012) Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol.* **196**: 548-560.

**C R Anderson, E O Jensen, D J LLewellyn, E S Dennis, and W J Peacock.** (1996). A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. *PNAS* June 11, 1996 **93** (12) 5682-5687.

**Csaba Seregélyes, Balázs Barna, Jacek Hennig, Dorota Konopka, Taras P Pasternak, Noémi Lukács, Attila Fehér, Gábor V Horváth, Dénes Dudits.** 2003. Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. *Plant Science*. Vol 165, Issue 3, Pages 541-550.

**Csaba Seregélyes, Abir U Igamberdiev, Anna Maassen, Jacek Hennig, Dénes Dudits, Robert D Hill.** 2004. NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *FEBS Letters*.

Vol571, Issue1-3 Pages 61-66.

- del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A. 2011.** Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* **191**: 405-417.
- Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C. 1998.** Nitric oxide functions as a signal plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill R.D. 2003.** Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant Journal* **35**: 763-770.
- Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El Msehli, S., Hopkins, J., Hérouart, D. et al. (2012)** The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence. In *Senescence*. Edited by Nagata, T. pp. 137-168. InTech Europe, Croatia.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. 1998.** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**: 10328-10333.
- Elhiti, M., Hebelstrup. K.H., Wang, A., Li, C., Cui, Y., Hill, R.D. et al. (2013)** Function of type-2 Arabidopsis hemoglobin in the auxin-mediated formation of embryogenic cells during morphogenesis. *Plant J.* **74**: 946-958.
- Eloísa Pajuelo, Jens Stougaard. (2005).** Lotus japonicus's a model system. Lotus japonicus Handbook pp 3-24.
- Fåhraes G.M. 1957.** The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**: 374–381.
- Fang Liu, Fang-Qing Guo. (2013).** Nitric Oxide Deficiency Accelerates Chlorophyll Breakdown and Stability Loss of Thylakoid Membranes during Dark-Induced Leaf

Senescence in Arabidopsis. PLOS one.

**Faouzi Horchani, Marianne Prévot, Alexandre Boscari, Edouard Evangelisti, Eliane Meilhoc, Claude Bruand, Philippe Raymond, Eric Boncompagni, Samira Aschi-Smiti, Alain Puppo, Renaud Brouquisse. (2011).** Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *Plant Physiology*, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.166140>.

**Fujie, M., Shintaku, H., Maeno, H., Kajihara, R., Usami, S. and Yamada, T. (2009)** Molecular cytological analysis of cysteine proteinases from nodules of *Lotus japonicus*. *Cytologia* 74: 343-354.

**Fukai E, Soyano T, Umehara Y, Nakayama S, Hirakawa H, Tabata S, Sato S, Hayashi M. 2012.** Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant Journal* 69: 720-730.

**Fukudome, M., Calvo-Begueria, L., Kado, T., Osuki, K., Rubio, M.C., Murakami, E., et al. (2016)** Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*-*Mesorhizobium loti* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 67: 5275-5283.

**Fukudome Mitsutaka, Watanabe Eri, Osuki Ken-ichi, Imaizumi Ryujiro, Aoki Toshio, Becana Manuel, Uchiumi Toshiki. (2019).** Stably-Transformed *Lotus japonicus* Plants Overexpressing Phytoglobin LjGlb1-1 Show Decreased Nitric Oxide Levels in Roots and Nodules as well as Delayed Nodule Senescence. *Plant Cell Physiology*, DOI: [10.1093/pcp/pcy245](https://doi.org/10.1093/pcp/pcy245).

**González, E.M., Gálvez, L. and Arrese-Igor, C. (2001)** Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J. Exp. Bot.* 52: 285-293.

- Guangwen Lu, Joes A Casaretto, Shan Ying, Kashif Mahmood, Fang Liu, Yong-Mei Bi, Steven J Rothstein. (2017).** Overexpression of OsGATA12 regulates chlorophyll content, delays plant senescence and improves rice yield under high density planting. *Plant Mol Biol*, 94: 215-227.
- He Y, Tang R-H, Hao Y, Steven RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, et al. 2004.** Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**: 1968-1971.
- Hebelstrup KH, Jensen HO. 2008.** Expression of NO scavenging hemoglobin is involved in the timing of bolting in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **227**: 917-927.
- Hebelstrup KH, Shah JK, Igamberdiev AU. 2013.** The role of nitric oxide and hemoglobin in plant development and morphogenesis. *Physiologia Plantarum* **148**: 457-469.
- Helene Vigeolas, Daniela Hühn, Peter Geigenberger. 2011.** Nonsymbiotic Hemoglobin-2 Leads to an Elevated Energy State and to a Combined Increase in Polyunsaturated Fatty Acids and Total Oil Content When Overexpressed in Developing Seeds of Transgenic *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology*. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.166462>
- Herold S, Puppo A. 2005.** Oxyleghaemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxyxynitrite: a possible role in functioning nodules? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**: 935–945.
- Hichri, I., Boscari, A., Castella, C., Rovere, M., Puppo, A. and Brouquisse, R. (2015)** Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* **66**: 2877-2887.
- Hill RD. 2012.** Non-symbiotic haemoglobins-What's happening beyond nitric oxide scavenging? *AoB PLANTS* **2012**: pls004; doi:10.1093/aobpla/pls004.
- Hossain MS, Umehara Y, Kouchi H. 2006.** 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* : MPMI 19, 780–8.

**Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES. 2002.**

Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 17197-17202.

**Igamberdiev, A.U. and Hill, R.D. (2004)** Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation

to hypoxia: An alternative to classic fermentation pathways. *J. Exp. Bot.* 55: 2473-2482.

**Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa**

**K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. 2000.** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research* 7: 331-338.

**Kato, K., Kanahama, K. and Kanayama, Y. (2010)** Involvement of nitric oxide in the

inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *J. Plant Physiol.* 167: 238-241.

**Kosslak, R.M. and Bohlool, B.B. (1984)** Suppression of nodule development of one side of

a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol.* 75: 125-130.

**Kurt Handberg, Jens Stougaard. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The plant journal*, Volume2, Issue4, Pages 487-496.

**Lehtovaara, P. and Perttilä, U. (1978)** Bile-pigment formation from different

leghemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation. *Biochem. J.* 176: 359-

364.

**Ligero, F., Caba, J.M., Lluch, C. and Olivares, J. (1991)** Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* 97: 1221-1225.

**Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G. and Gresshoff, P.M. (2009)** Ethylene insensitivity conferred by the *Arabidopsis Etr1-1* receptor gene alters the nodulation response of transgenic *Lotus japonicus*. *Ann. Bot.* 104: 277-285.

**Maekawa T, Maekawa-Yoshikawa M, Takeda N, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y, Hayashi M. 2009.** Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* 58: 183-194.

**Malolepszy, A., Mun, T., Sandal, N., Gupta, V., Dubin, M., Urbański, D., et al. (2016)** The *LORE1* insertion mutant resource. *Plant J.* 88: 306-317.

**Marcio Rocha, Francesco Licausi, Wagner L. Araújo, Adriano Nunes-Nesi, Ladislav Sodek, Alisdair R. Fernie, Joost T. Van Dongen. (2010).** Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, vol. 152, 1501-1513.

**Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C. 2010.** The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 748-759.

**Mira, M., Hill, R.D. and Stasolla, C. (2016)** Regulation of programmed cell death by phytooglobins. *J. Exp. Bot.* 67: 5901-5908.

**Mohd Asgher Tasir S. PerAsim Masood Mehar Fatma Luciano Freschi Francisco J. Corpas, Nafees A. Khan. (2017).** Nitric oxide signaling and its crosstalk with other plant growth regulators in plant responses to abiotic stress. *Environmental Science and*

Pollution Research, Volume 24, Issue 3, pp 2273–2285.

**Mur LAJ, Santosa IE, Laarhoven LJJ, Holton NJ, Harren FJM, Smith AR. 2005.** Laser photoacoustic detection allows *in planta* detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiology* **138**: 1247-1258.

**Nagata M, Murakami E, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. 2008.** Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 175-1183.

**Navascués, J., Pérez-Rontomé, C., Gay, M., Marcos, M., Yang, F., Walker, A.F., et al. (2012)** Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 2660-2665.

**Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. 2003.** Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* **159**: 11-35.

**Olson J, Foley E, Rogge C, Tsai A, Doyle M, Lemon, D. 2004.** NO scavenging and the hypersensitive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radical Biology and Medicine* **36**: 685–897.

**Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolaas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvaldi MK. 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* **15**: 531-535.

**Pauly N, Ferrari C, Andrio E, Marino D, Piardi S, Brouquisse R, Baudouin E, Puppò A. 2011.** MtNOA1/RIF1 modulates *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* nodule

- development without affecting its nitric oxide content. *Journal of Experimental Botany* **62**: 939-948.
- Perazzoli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M. 2004.** *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785–2794.
- Perry J, Brachmann A, Welham T, Binder A, Charpentier M, Groth M, Haage K, Markmann K, Wang TL, Parniske M. 2009.** TILLING in *Lotus japonicus* identified large allelic series for symbiosis genes and revealed a bias in functionally defective ethyl methanesulfonate alleles toward glycine replacements. *Plant Physiology* **151**: 1281–1291.
- Qu ZL, Zhong NQ, Wang HY, Chen AP, Jian GL, Xia GX. 2006.** Ectopic expression of the cotton non-symbiotic hemoglobin gene *GhHbd1* triggers defense responses and increases disease tolerance in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1058-1068.
- Ryan Sturms, Alan A. DiSpirito, and Mark S. Hargrove. (2011).** Plant and Cyanobacterial Hemoglobins Reduce Nitrite to Nitric Oxide under Anoxic Conditions. *Biochemistry*, 50 (19), pp 3873–3878.
- Sáenz-Rivera J, Sarath G, Arredondo-Peter R. 2004.** Modeling the tertiary structure of a maize (*Zea mays* ssp. *mays*) non-symbiotic hemoglobin. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 891-897.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., et al. (2010)** Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 702-711.
- Sanz-Luque, E., Ocaña-Calahorro, F., de Montaigu, A., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, Á., Galván, A., et al. (2015)** THB1, a truncated hemoglobin, modulates nitric oxide levels

and nitrate reductase activity. *Plant J.* 81: 467-479.

**Sasakura F, Uchiumi T, Shimoda Y, Suzuki A, Takenouchi K, Higashi S, Abe M. 2006.**

A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 441-450.

**Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi**

**T. 2005.** Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* 46: 99-107.

**Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M,**

**Higashi S, Uchiumi T. 2009.** Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Journal* 57: 254-263.

**Smagghe, B.J., Trent III, J.T. and Hargrove, M.S. (2008)** NO dioxygenase activity in

hemoglobins is ubiquitous *in vitro*, but limited by reduction *in vivo*. *PlosOne* 3: e2039.

**Smagghe BJ, Hoy JA, Percifield R, Kundu S, Hargrove MS, Sarath G, Hilbert JL, Watts,**

**RA, Dennis ES, Peacock WJ, Dewilde S, Moens L, Blouin GC, Olson JS, Appleby CA. 2009.** Correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobins. *Biopolymers* 91: 1083-1096.

**Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M, Imagama, Y., Osuki, K., Uchiumi, T., et al. (2004)**

Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol.* 45: 914-922.

**Takahiro Joudoi, Yudai Shichiri, Nobuto Kamizono, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa,**

**Jun Yoshitake, Naotaka Yamada, Sumio Iwai. (2013).** Nitrated Cyclic GMP Modulates Guard Cell Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, vol 25: 558-571.

**Tansengco ML, Hayashi M, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y. 2003.**

crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant physiology* 131, 1054–1063.

**Tittabutr P, Sripakdi S, Boonkerd N, Tanthanuch W, Minamisawa K, Teaumroong N. 2015.** Possible role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity of *Sinorhizobium* sp. BL3 on symbiosis with mung bean and determinate nodule senescence. *Microbes and Environments* 30, 310–320.

**Toshiki Uchiumi, Yoshikazu Shimoda, Tomoko Tsuruta, Yumi Mukoyoshi, Akihiro Suzuki, Keishi Senoo, Shusei Sato, Tomohiko Kato, Satoshi Tabata, Shiro Higashi, Mikiko Abe. 2002.** Expression of Symbiotic and Nonsymbiotic Globin Genes Responding to Microsymbionts on *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, Volume 43, Issue 11, Pages 1351–1358.

**Trevaskis B, Watts RA, Andersson CR, Llewellyn DJ, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES, Peacock WJ. 1997.** Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: The evolutionary origins of leghemoglobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 12230-12234.

**Trinchant J-C, Rigaud J. 1982.** Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1385-1388.

**Urbański DF, Malolepszy A, Stougaard J, Andersen SU. 2012.** Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* 69: 731-741.

**Vieweg, M.F., Hohnjec, N. and Küster, H. (2005)** Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* 220: 757-766.

- Wally OSD, Mira MM, Hill RD, Stasolla C.** Hemoglobin regulation of plant embryogenesis and plant pathogen interaction. *Plant Signaling & Behavior* **4**: e25264. doi: 10.4161/psb.25264.
- Wang X, Hargrove MS. 2013.** Nitric Oxide in Plants: The Roles of Ascorbate and Hemoglobin. *PLoS ONE* **8(12)**: e82611. Doi:10.1371/journal.pone.0082611.
- Watts RA, Hunt PW, Hvitved NA, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES. 2001.** A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 10119-10124.
- Wendehenne D, Durner J, Klessing DF. 2004.** Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Current Opinion of Plant Biology* **7**:449-455.
- Ya'acov Y Leshem, Ron B Wills, Vivian-Va Ku. (1998).** Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO)-as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem*, **36** (11), 825-833.
- Yan Z, Hossain Md S, Wang J, Valdés-López O, Liang Y, Libault M, Qiu L, Stacey G. 2013.** miR172 regulates soybean nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 1371-1377.