

根粒の着生制御におけるミヤコグサの β -1,3-glucanase の
機能に関する研究
(Functional analysis of a β -1,3-glucanase of *Lotus japonicus*
in the regulation of nodule formation)

2016年3月

小薄 健一

目次

概要	6
第1章：序論	
1-1 マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定	9
1-2 根粒着生の制御機構	9
第2章：根粒着生の制御機構とアブシシン酸	
2-1 序論	16
2-2 方法	18
2-2-1 生物材料	18
2-2-2 ホワイトクローバの種子殺菌及び発芽誘導	18
2-2-3 ホワイトクローバの不定根の誘導	18
2-2-4 ホワイトクローバの Split-root system への植物のセット	19
2-2-5 Split-root system での abamine 添加実験	19
2-2-6 Split-root system での ABA 添加実験	20
2-2-7 ホワイトクローバの根毛変形及び感染糸形成の観察	20
2-2-8 ミヤコグサの種子殺菌と発芽誘導	21
2-2-9 ミヤコグサの根毛変形及び感染糸形成の観察	21
2-2-10 ポットを使用したミヤコグサ不定根誘導法	22
2-2-11 滅菌プラシャーレを使用した不定根誘導法	22
2-2-12 プラントボックスを利用した Split-root system	22
2-2-13 滅菌プラシャーレを利用した Split-root system	23

2-2-14	根粒菌の調製及び接種	23
2-3	結果	
2-3-1	根毛変形・感染糸形成にアブシシン酸が与える影響	24
2-3-2	Split-root systemによるアブシシン酸と根粒着生制御機構の解析	24
2-4	考察	25

第3章：LjGlu1の発現と根粒着生制御機構の関係

3-1	序論	28
3-2	方法	31
3-2-1	生物材料	31
3-2-2	形質転換毛状根の作出および選抜	31
3-2-3	RNA抽出	31
3-2-4	DNase処理	32
3-2-5	real-time RT-PCR	33
3-3	結果	
3-3-1	LjGlu1の発現抑制が根粒着生に及ぼす影響	34
3-3-2	Split-root systemを用いたLjGlu1発現の解析	34
3-3-3	LjCLE-RS1発現時のLjGlu1の発現	34
3-3-4	har1-7変異体におけるLjGlu1の発現	35
3-4	考察	35

第4章：植物ホルモンや生物学的ストレスに対するLjGlu1の発現応答

4-1	序論	37
4-2	方法	40

4-2-1	生物材料	40
4-2-2	青枯病菌の培養	40
4-2-3	植物ホルモン及び硝酸カリウムによる <i>LjGlu1</i> 発現解析	40
4-2-4	組織における <i>LjGlu1</i> の発現・KNO ₃ による根粒の <i>LjGlu1</i> の発現量	40
4-2-5	植物病原菌による <i>LjGlu1</i> 発現	41
4-3	結果	
4-3-1	アブシシン酸・メチルジャスモン酸・エチレンによる <i>LjGlu1</i> 発現解析	42
4-3-2	サイトカイニンによる根粒着生への影響および <i>LjGlu1</i> 発現解析	42
4-3-3	硝酸カリウムによる根粒着生への影響と <i>LjGlu1</i> の発現	43
4-3-4	組織における <i>LjGlu1</i> の発現および老化との関係	44
4-3-5	植物病原菌による <i>LjGlu1</i> 発現	45
4-4	考察	45

第5章：LjGlu1の生理活性と根系における所在

5-1	序論	49
5-2	方法	51
5-2-1	生物材料	51
5-2-2	プラスミドの構築と形質転換体の作製	51
5-2-3	組換えタンパク質の精製	52
5-2-4	組換えタンパク質の定量	53
5-2-5	組換えタンパク質の endo- β -1,3-glucanase 活性の測定	53
5-2-6	根粒切片の作製	54
5-2-7	共焦点レーザー顕微鏡による形質転換毛状根の観察	54
5-2-8	標品 β -1,3-glucanases による感染糸形成及び根粒形成への影響	55

5-3	結果	
5-3-1	組換え LjGlu1 の β -1,3-glucanase 活性の有無	56
5-3-2	根と根粒における LjGlu1 の所在	56
5-3-3	β -1,3-glucanase が根粒形成や感染糸形成に及ぼす影響	57
5-4	考察	57
	第 6 章：総括	60
	謝辞	62
	参考文献	63
	図	76

概要

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、農業生産上極めて重要な共生系である。即ち、マメ科植物は、根に着生した根粒細胞内に存在する根粒菌に光合成産物を炭素源として供給し、一方、根粒内の根粒菌は、大気中の窒素ガスをアンモニアへと還元し、マメ科植物へ窒素源として供給する。しかし、過剰な根粒着生は、エネルギー消費が大きく宿主植物の生育を阻害するため、宿主植物には、根粒着生を制御する機構が存在する。本論文は、ミヤコグサの病原抵抗性遺伝子のひとつである β -1,3-glucanase 遺伝子(*LjGlu1*)に着目し、その機能を根粒着生の制御機構と関連付けながら解析したものである。

第1章は序章である。根粒菌の宿主植物への感染・侵入から根粒形成、窒素固定活性の発現と共生成立に至る過程とそこに関与するシグナル伝達系を概説した。さらに、根粒着生の制御機構について、これまでの知見を網羅して整理し、取り組むべき課題とその意義を明確にした。

第2章では、根粒着生の制御機構とアブシシン酸(ABA: Abscisic acid)の関係について検討した。根粒着生の制御機構は、根での局所的制御機構と地上部を介した全身的制御機構が存在すると考えられる。まず、ミヤコグサを材料としてスプリットルートシステムを構築し、全身的制御と局所的制御を明確に見分けることが可能な実験系であることを示した。この実験系に ABA、及び、その合成阻害剤であるアバミンを適用し、(1) ABA は、根粒菌の接種に応答して宿主植物の根組織で合成されること、(2) ABA による根粒着生阻害は根での局所的なものであり、ABA は、全身的な制御に関与するシグナル分子そのものではないことを示唆した。

第3章では、*LjGlu1* 遺伝子の発現と根粒着生制御機構の関係を検討した。内生 ABA の量が高いミヤコグサ変異体では、根粒着生が極度に抑制される。そこで、この変異体で発現が上昇している遺伝子を網羅的に調査した結果、病原抵抗性に関与する酵素である β -1,3-glucanase の遺伝子が選抜され、*LjGlu1* と名付けられた。*LjGlu1* 遺伝子が根での

根粒着生制御に関係している可能性があると考え、その発現を抑制したところ、根粒着生数が増加した。さらに、全身的な根粒着生制御との関係を探るために、根からの根粒着生シグナル (CLE ペプチド) が恒常的に合成されているミヤコグサ変異体、及び、地上部の遺伝子 (*HAR1*) の変異により全身的な根粒着生制御が機能しない変異体における *LjGlu1* 遺伝子の発現を解析した。その結果、*LjGlu1* 遺伝子の発現は、*HAR1* 遺伝子に調節されていることが判明した。しかし、地上部の *HAR1* タンパク質から根へと根粒着生抑制シグナルが伝えられても、根での ABA の量は上昇しないことを考慮すると、*LjGlu1* 遺伝子の発現は、少なくとも二つの異なる経路で調節されていると考えた。

第4章では、植物ホルモンや生物学的ストレスに対する *LjGlu1* 遺伝子の発現応答を特徴づけた。根粒形成に関与していると予想されるメチルジャスモン酸、エチレン、サイトカイニンミヤコグサに与え、*LjGlu1* の遺伝子発現を解析した。その結果、*LjGlu1* は、根粒着生に抑制的に作用するエチレンとサイトカイニンに応答して発現することが明らかとなった。窒素源は、根粒着生を強く抑制することが知られている。根粒着生が完全に抑制される濃度の硝酸態窒素を与えたミヤコグサの根では、*LjGlu1* 遺伝子が強く発現していた。また、根に青枯病菌を接種すると、*LjGlu1* 遺伝子の発現が誘導されることを見いだした。即ち、*LjGlu1* 遺伝子は、根粒着生を抑制する要因に応答して発現することが示唆された。

第5章では、*LjGlu1* タンパク質の生理活性と根系における所在を検討した。*LjGlu1* 遺伝子の塩基配列から、*LjGlu1* タンパク質は分泌性の β -1,3-glucanase と予想されていた。そこで、大腸菌を用いて *LjGlu1* 組換えタンパク質を生産し、その酵素活性を検討したところ、*LjGlu1* タンパク質は、確かに β -1,3-glucanase の活性をもつことが明らかとなった。*LjGlu1* タンパク質と蛍光タンパク質 mOrange の融合遺伝子を構築し、ミヤコグサに形質転換した。根粒菌接種7日後の根を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、根毛周辺の根粒菌に mOrange の蛍光が観察された。根粒菌接種28日後の根粒内部

を観察したところ、mOrangeの蛍光は、根粒内部の細胞間隙に観察された。これらのことから、LjGlu1タンパク質は細胞外に分泌され、根圏の根粒菌に直接作用して根粒着生を抑制することが考えられた。LjGlu1タンパク質を十分量生産することは困難であったため、市販の β -1,3-glucanaseとミヤコグサ根粒菌を混合してミヤコグサに接種し、感染効率を観察した。その結果、 β -1,3-glucanaseの添加により感染効率が低下することが判明した。さらに、根粒着生数は、無添加区より少ない傾向にあった。

第6章は研究の総括であり、根粒着生制御機構におけるLjGlu1タンパク質の機能について議論した。根粒着生を抑制する経路はいくつか存在すると予想されるが、根で機能する遺伝子のひとつが*LjGlu1*遺伝子と考えられる。LjGlu1タンパク質の具体的機能の解明は、今後の研究を待たなければならないが、本研究では、LjGlu1タンパク質が根粒菌の表層多糖に作用し、その分解産物が植物に認識されて病原応答が誘導され、その結果、根粒着生が抑制されるという経路を提案した。

第 1 章：序論

1-1 マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定

根粒菌は、マメ科植物の根に感染し、形成された根粒の細胞内に侵入する。根粒菌は根粒細胞内で、大気中の窒素分子をニトロゲナーゼによってアンモニアへ還元し、植物へ供給する。一方、植物は光合成産物を根粒菌に提供し、共生関係が成り立っている。根粒菌は次のような過程を経て共生を成立させている。宿主植物の根からフラボノイドが恒常的に分泌されており、これを根粒菌が認識すると *nod genes* の発現が誘導される。この遺伝子群には Nod ファクターとして知られているリポキトオリゴ糖 (lipo-chitooligosaccharides: LCOs) の合成に関与する一連の酵素群がコードされている。根粒菌が LCOs を合成し、菌体外に分泌すると、植物側には根毛の変形やカーリングが起こる。根毛のカーリング部の内側に捕捉された根粒菌は根毛内に侵入し、植物側に由来するといわれる感染糸を通して根毛から表皮細胞に侵入する。ほぼ同時に皮層では細胞分裂が誘導され、根粒原基が形成される。感染糸は分岐しながら皮層細胞中にネットワークを形成する。根粒菌は感染糸中で増殖し根粒原基細胞中に放出され、しばらくの間さらに増殖を続ける。根粒原基細胞中で、根粒菌はバクテロイドと呼ばれる共生に特異的な形態に分化する。根粒の構造が完成し、バクテロイドでは窒素固定が開始される。

1-2 根粒着生の制御機構

マメ科植物は共生窒素固定により、窒素栄養が乏しい土地でも旺盛に育つことができる。しかしながら、根粒が過剰に着生した植物は、窒素固定のために消費されるエネルギーが多くなりすぎるため、生長が著しく阻害される。そのため、マメ科植物には根粒

着生の全身的な制御機構 (Autoregulation of nodulation, AON) が備わっており、共生のバランスを維持している。Nutman らは、アカツメクサの根粒を切除する実験で、先に形成された根粒が後から形成される根粒着生を抑制することを示した (Nutman et al. 1952)。また、ダイズで根粒菌を時間差で感染する実験によって、感染 15 時間という早い時間で根粒着生が抑制されることが示された (Pierce and Bauer 1983)。また、ダイズで、根を 2 つに分け、それぞれの根に時間差をおいて根粒菌を感染する split-root system を用いた実験により、後から接種した根系の根粒形成の抑制効果がみられた (Kosslak and Bohlool 1984)。この実験は、根粒着生の制御は局所的だけでなく、全身的な遠距離シグナルを介した制御であること示した。1985 年、Gresshoff らによって、ダイズで根粒超着生変異体 nitrate tolerant symbiotic (nts) が単離された。ダイズは、高濃度の硝酸存在下では根粒着生が抑制される。しかし、nts 変異体は、高濃度の硝酸存在下でも根粒を形成し、また根粒着生領域 (nodulation zone) も広がっていた。nts 変異体を用いた接ぎ木実験で、nts の根に野生株の地上部を接ぐと正常な根粒形成が行われ、一方、野生株の根に nts の地上部を接ぐと根に過剰な根粒が形成された。この結果は、根粒着生の抑制因子の発生器官は地上部であることを示唆している。また、nts 変異体を用いた split-root system 実験で、菌非接種根での根粒着生の抑制が観察されなかった。これは、菌を接種した根系から菌非接種根への遠距離シグナル伝達に nts が関与していることが考えられた。以上のことから、根粒着生のフィードバック制御は、根と地上部を介した全身的な器官間コミュニケーションで成り立っており、根由来のシグナル、根由来のシグナルの受容体、地上部由来の根粒着生抑制シグナルから構成されていると考えられている。根粒菌に応答し根由来のシグナルが作られ、根から地上部に伝達され地上部の受容体によって認識される。そして、地上部からシグナルが根に伝達され、根での更なる根粒着生が抑制される。

根からのシグナル受容に関わる遺伝子として、ミヤコグサで HYPERNODULATION

ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HAR1) (Krusell et al. 2002; Nishimura et al. 2002)と KLAVER (KLV) (Oka-Kira et al. 2005), タルウマゴヤシで SUPER NUMERIC NODULES (SUNN) (Penmetsa et al. 2003; Schnabel et al. 2005), ダイズで NTS1/NODULE AUTOREGULATION RECEPTOR KINASE (NARK) (Searle et al. 2003), エンドウで SYMBIOSIS 29 (SYM29) (Krusell et al. 2002) が単離され報告されている。これらの遺伝子はロイシンリッチリピート (LRR) をもつ受容体キナーゼ (RLK) をコードしている。また, シロイヌナズナの茎頂分裂組織の未分化の細胞を負に制御している CLAVATA1 (CLV1) (Clark et al. 1997) と高い相同性をもっていることが分かっている。CLV1 は分泌性のペプチド CLAVATA3 (CLV3) をリガンドとして認識する (Ogawa et al. 2008)。成熟型の CLV3 は 12-13 アミノ酸から構成される短いペプチドであり, 前駆体 CLE ペプチドの C-末端側に保存された CLE ドメインに由来する (Ogawa et al. 2008)。このシロイヌナズナの CLV1 受容体のリガンドが分泌性の CLE ペプチドであるということから, マメ科植物の AON を司る CLV1 様受容体のリガンドも CLE ペプチドであることが推測された。ミヤコグサで CLE ドメインをもつ遺伝子の網羅的な解析がなされ, 根粒菌感染によって根で発現が高く誘導される CLE-Root Signal1 (RS1) と CLE-RS2 が単離された (Okamoto et al. 2009)。CLE-RS1, RS2 を恒常的に発現させた形質転換毛状根では HAR1 に依存して全身的に根粒着生が強く抑制された。このことから, CLE-RS1, CLE-RS2 のペプチドが HAR1 を介した AON における根由来のシグナルの有力な候補として考えられている (Okamoto et al. 2009)。また, タルウマゴヤシで MtCLE12, MtCLE 13 (Mortier et al. 2010; Saur et al. 2011), ダイズで GmRIC1, GmRIC 2 (Lim et al. 2011; Reid et al. 2011), インゲンで PvRIC1, PvRIC2 (Ferguson et al. 2014a) といった, 他のマメ科植物でも根由来のシグナル候補が次々と発見されている。

ミヤコグサの *too much love (tml)* は根粒着生の根での制御に関与する根粒超着生変異体である。*har1* 変異体の地上部と *tml* 変異体の根の接ぎ木実験で, 根粒着生数が相加的

にならないことから TML は HAR1 と遺伝的に同一経路で機能すると考えられている (Magori et al. 2009)。また、野生株の根に *tml* 変異体の根を挿入する逆 Y 字型接ぎ木実験から TML は局所的に根粒着生を抑制することが示唆された。これらの結果から、TML は AON の HAR1 の下流で、生成された地上部由来のシグナルを根で受容し伝達する因子であると考えられた (Magori et al. 2009)。後に、TML が特定のタンパク質の認識とその分解に関与する Klech リピートを含む F-box タンパク質をコードしていることが報告された。このことから TML は根粒形成に必要な因子などをターゲットとして分解している可能性が考えられるが、ターゲット因子についてはまだ不明である (Takahara et al. 2013)。ミヤコグサの *plenty* は根粒着生の根での制御に関与し、野生株と比較して根粒着生数が多くなる特徴をもつ変異体である。*plenty* 変異体の根と *har1* 変異体の地上部の接ぎ木実験で、根粒着生数が相加的になったことから、PLENTY は HAR1 を介した AON とは別の経路で根粒着生を制御していると考えられている (Yoshida et al. 2010)。

根粒着生を抑制する候補物質溶液をダイズ葉身に導入し、篩管輸送によって根部に輸送させ、根粒形成に与える影響を検定するバイオアッセイ法が2つのグループにより確立された (Yamaya and Arima 2004 ; Lin et al. 2010)。これらのバイオアッセイ法で、ダイズの茎葉部抽出液が根粒形成に与える影響が検討された。その結果、根粒過剰着生変異体からの抽出液は根粒形成に影響を与えなかったが、野生株からの抽出液は根粒過剰着生変異体の根粒の形成を抑制する効果が示された。このことから、野生株の茎葉部に根粒着生抑制物質が含まれていることが明らかになった (Yamaya and Arima 2004 ; Lin et al. 2010)。Lin らは地上部由来の根粒着生抑制物質を shoot-derived inhibitor (SDI) と表した。バイオアッセイ法を用いて SDI の検討を行った結果、SDI は RNA でもタンパク質でもない分子量 1 KDa 以下の低分子化合物である可能性を示した (Lin et al. 2010)。また、Arima らは地上部由来の根粒着生抑制物質を shoot-synthesized nodulation restricting substance(s) (SNRS) と表し、ダイズ茎葉部に異なる 2 つ以上の SNRS が存在することを示

した (Kenjo et al. 2010)。また、茎葉部に存在する 2 つの SNRS は、SNRS 候補物質として過去に提案されたサリチル酸、ジャスモン酸メチル、オーキシシン、ABA、スペルミン、スペルミジンと異なる物質であることが示唆されている (Kenjo et al. 2010)。

近年、地上部から根に伝達される地上部由来のシグナルの候補としてサイトカイニンが報告された。野生株、*har1* 変異体、*CLE-RS1,-RS2* の過剰発現体で、内生の植物ホルモン量が質量分析によって解析され、サイトカイニン合成の中間体である iPRPs が野生株と比較して *CLE* 過剰発現体で増加し、*har1* 変異体で減少することが示された。合成サイトカイニン 6-benzylaminopurine (BAP) をカットした子葉から与えるバイオアッセイ法において、野生株と *har1* 変異体では BAP 濃度依存的に根粒数の減少を示したが、*tml* 変異体では示されなかった。この結果から、TML は HAR1 の下流で機能し、サイトカイニンの根粒着生の抑制作用に必要であることが示唆された (Sasaki et al. 2014)。

根粒着生の制御には様々な植物ホルモンが関与しており、多くの研究がなされてきた。ABA を外部から与えると根粒着生や感染糸形成が抑制されることがクローバ、ミヤコグサ、タルウマゴヤシで報告されている (Suzuki et al 2004; Ding et al.2008)。活性型のジベレリンをミヤコグサの根に与えると感染糸形成と根粒形成が阻害され、ジベレリン合成阻害剤による内生ジベレリン量の低下により、これらの形成が促進されることが示された (Maekawa et al. 2009)。エチレンの投与は、エンドウでは感染糸形成に影響がないが (Lee and RaLue 1992)、タルウマゴヤシではエチレン前駆体 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) の投与により感染糸数の減少が示された。逆に、エチレン合成阻害剤である AVG を投与すると、感染糸数が増加することが示された (Oldroyd et al. 2001)。タルウマゴヤシのエチレン非感受性変異体 *sickle* では感染糸数や根粒数の顕著な増加を示すが、SUNN 変異体とは異なり、根粒数の増加は感染領域に限られていた (Penmetsa et al. 2003)。ABA、エチレン、ジベレリンは、主に根粒着生の負の制御に関係していることが報告されている。ジャスモン酸は根粒着生に関して

正と負、両方の制御の報告がある。ジャスモン酸の処理によって、Nod ファクターで誘導される初期ノジュリン遺伝子である *ENOD11* や *RIP1* の発現やカルシウムスパイクが阻害され、その結果として、根粒着生が抑制されることがタルウマゴヤシで示された (Sun et al. 2006)。メチルジャスモン酸をミヤコグサの地上部にスプレーすることで、感染糸形成や根粒形成が抑制されることが報告された (Nakagawa et al. 2006)。これらの報告は、ジャスモン酸が根粒着生を負に制御している可能性を示している。ダイズ根粒超着生変異体の葉では、ジャスモン酸の濃度が野生型より高いことが示された (Seo et al. 2007)。ダイズの根粒超着生変異体を用いたマイクロアレイ解析によって、野生型の葉では、根粒菌を接種した時にジャスモン酸合成関連遺伝子やジャスモン酸応答遺伝子の発現は低く抑制されているが、根粒超着生変異体の葉では、抑制がおこらずに内生のジャスモン酸量が高いことが考えられている。また、ジャスモン酸合成阻害剤である *n-propyl gallate* を地上部にスプレーすると、根粒超着生変異体で根粒数の有意な減少が示された (Kinkema and Gresshoff et al. 2008)。ミヤコグサでは、培地に低濃度のジャスモン酸を添加すると、有意に根粒数が増加することが報告された (Suzuki et al. 2011)。これらの報告は、ジャスモン酸が根粒着生を正に制御している可能性を示している。

ミヤコグサの *LOTUS HISTIDINE KINASE 1 (LHK1)* はサイトカイニンの受容体として機能しており、*LHK1* の機能欠失変異体は根粒発生が阻害されることから、*LHK1* は根粒形成を正に制御していることが示された (Murray et al. 2007)。一方、*LHK1* の機能獲得変異体 *spontaneous nodule formation 2 (snf2)* は、根粒菌非存在下で自発的に根粒形成を行うことが示された (Tirichine et al. 2007)。また、ミヤコグサでは、サイトカイニン投与により、根粒菌非存在下でも自発的に根粒形成を誘導できることが報告された (Heckmann et al. 2011)。これらの報告から、サイトカイニンシグナリングの活性化が根粒発生の誘導に必要であることが考えられている。アルファルファの根に *NPA* などのオーキシン輸送阻害剤を処理すると、根粒様の器官形成が起こることが報告された

(Hirsch et al. 1989)。また、オーキシシンが皮層細胞分裂時に誘導されることが報告されている(Suzaki et al. 2012)。タルウマゴヤシ根粒超着生変異体 *SUNN* では地上部から地下部へのオーキシシン輸送が増加していた(van Noorden et al. 2006)。オーキシシン輸送システムは、根粒形成や根粒数を制御するために重要であると考えられている。以上の報告より、サイトカイニンやオーキシシンは、根粒の発生や発達に大きく関係していると考えられている。

これまでの精力的な研究によって、根粒着生の制御機構に関わる因子やそれに関わる植物ホルモンの働きなど多くのことが明らかになってきた。本研究では、植物ホルモンの ABA や ABA に応答するミヤコグサの病原抵抗性遺伝子 β -1,3-glucanase (*LjGlul*) に注目し、根粒着生の制御機構との関係やその機能について検討した。

第2章：根粒着生の制御機構とアブシシン酸

2-1 序論

マメ科植物の根粒形成や根粒数の制御には、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。ABA は、種子の休眠、成熟、気孔閉鎖などに関与する植物ホルモンである。また、低温や乾燥、高塩濃度、障害刺激などの環境ストレスに対する植物側の応答反応を仲介する事が知られている。ABA はファネルシルニリン酸から直接合成される直接経路と、C40 のカロテノイドを経由して合成される間接経路で合成される。また、ミヤコグサを ABA で処理すると、LEA (late-embryogenesis-abundant)タンパク質や、乾燥応答タンパク質の一種である *RD22* 遺伝子などが誘導される (Chandler et al. 1994; Skriver et al. 1990)。ミヤコグサ、ホワイトクローバを宿主とする根粒共生系では、マメ科植物の内生 ABA レベルが根粒着生数を調節するという報告もなされている (Suzuki et al. 2004)。しかしながら、ABA が共生過程のどの段階に作用しているかは分かっていない。マメ科植物における根粒菌感染の初期段階で、マメ科植物の過剰な根粒着生が制御される。この制御は AON と呼ばれ、根粒着生数の全身的な feed back control system で、共生のバランスを維持していると考えられている (Bhuvanewari et al. 1980; Pierce and Bauer 1983; Caetano-Anolles and Bauer 1988; Ferguson et al. 2010)。AON を調べる方法として、split-root system が考案された (Kosslak and Bohlool 1984)。Split-root system とは、植物から不定根を誘導し、根を均等に 2 グループに分け、それぞれの根のグループで独立した根系を構成する方法である。すなわち split-root system の一方の根系に根粒菌を接種し、一定の時間をおいて (3 日~7 日後)、もう一方の根系に根粒菌を接種すると先に根粒菌を接種したほうの根系から根由来のシグナルが地上部に伝達され、地上部で認識されると生成した根粒着生制御シグナルが全身的に伝達され、その結果、後から根粒菌を接種した根系の根粒着生の制御に働くというものである。

本章ではクローバ, ミヤコグサを用いて ABA による根粒菌感染初期応答 (根毛変形や感染糸形成) に与える影響について検討した。また, split-root system を用いて AON に ABA が関与する可能性について検討した。

2-2 方法

2-2-1 生物材料

植物は white clover (*Trifolium repens* L.) と *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 (Kawaguchi 2000) を使用し、根粒菌はクローバ根粒菌 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S (Higashi et al. 1980)。ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株 (Kaneko et al. 2000) に緑色蛍光タンパク質を導入した *M. loti* GFP を使用した。

2-2-2 ホワイトクローバの種子殺菌及び発芽誘導

容量 50 mL のファルコンチューブに 15 mL の滅菌水を入れた後、アンチホルミン (Sodium hypochlorite solution, NaClO 10 %) 400 μ L, Tween 20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate) 15 μ L を加え、ホワイトクローバ (*Trifolium repens* L.) の種子 0.2~0.25 g を入れ、29°C で 40 min 振盪させ一次表面殺菌と吸水をさせた。上清を除き、種子が浸る程度の量の種子殺菌液 (0.2% ホルムアルデヒド溶液 500 mL, 0.1% HgCl₂ 溶液 500 mL, 99% EtOH 500 mL) を入れ、30 sec 軽く振盪しながら種子表面を殺菌した。その後、滅菌水で種子を十分に洗浄した。滅菌プラスチックシャーレに 0.7 % agar in disiled water (D.W.) プレートを作製し (20 mL×6 枚), 表面殺菌した種子を火炎滅菌した薬さじで全面に広げて播種した。シャーレは上下逆さにして 25°C 暗所で 2 日 インキュベートし、発芽させた。

2-2-3 ホワイトクローバの不定根の誘導

Hormone free MS medium に 1% agar を加え 40 mL ずつ滅菌したプラントボックスに作製した。播種後 2 日後のクローバの芽生えを子葉から胚軸長 10 mm をカミソリで切断し、地上部の乾燥を防ぐため滅菌水に入れた。先に作製した hormone free MS medium に、火炎滅菌したピンセットで穴をあけ、そこに切断した芽生えを挿した。不定根が十分に成長するまで約 30~40 日間, 25°C, 5,550 lx の光強度条件で 14h light/10 h dark の日周

条件で栽培した。

2-2-4 ホワイトクローバの Split-root system への植物のセット

プラントボックスに乾燥バーミキュライトを 120 mL ずつ入れ、加圧滅菌し、Fåhraeus medium (Fåhraeus 1957) を 80 mL 加えた。プラントボックス二個を並べビニールテープで固定した。不定根を誘導した個体の根系を均等に二分し、それぞれの根系を二個のプラントボックスのバーミキュライト上に置いた。1 セットにつき 3 個体ずつ置き、根を滅菌したバーミキュライトで覆い、Fåhraeus medium を約 80 mL 加えた。二個のプラントボックスの真ん中にもう一個のプラントボックスをフタとして逆さまに乗せ、地上部がすべてその中におさまるようにした。二分した根系はそれぞれ root A, root B とした。root A の方に予め培養し、終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した 4S 株を 10 mL 接種した。乾燥とコンタミネーションを防ぐために、プラントボックスにアルミホイルで蓋をし、25 °C, 5,550 lx の光強度条件で 14h light/10 h dark の日周条件で静置した。root A に菌を接種してから 4 日後、root B に終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した 4S 株を 10 mL 接種した。28 日間栽培した後 root A と root B の根粒数を計測した。

2-2-5 Split-root system での abamine 添加実験

プラントボックスにバーミキュライトを 120 mL ずつ入れ、加圧滅菌した。このプラントボックスに終濃度 10 μ M abamine を含む Fåhraeus medium を 80 mL ずつ加えた。一方、プラントボックスに Fåhraeus medium を 80 mL 加えたものも準備した。片方に 10 μ M abamine を含むボックス、もう片方は abamine を含まないボックスを組み合わせ、ビニールテープで固定した。コントロールは両方とも abamine を含まないボックスの組み合わせとした。この組み合わせに誘導した不定根の根系を先と同じように移植した。abamine を含まないバーミキュライトに植えた根系を root A, 10 μ M abamine を含むバー

ミキュライトに植えた根系を root B とした。root A の方に予め培養し、終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した 4S 株を 10 mL 接種した。乾燥とコンタミネーションを防ぐために、プラントボックスにアルミホイルで蓋をし、25 °C、5,550 lx の光強度条件で 14h light/10 h dark の日周条件で静置した。root A に菌を接種してから 4 日後、root B に終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した 4S 株を 10 mL 接種した。28 日後に root A と root B の根粒数を計測した。

2-2-6 Split-root system での ABA 添加実験

加圧滅菌したバーミキュライトに終濃度 0.5 μ M ABA を含む Fåhraues medium を 80 mL 加えた。プラントボックスの片方に 0.5 μ M ABA を含むもの、もう片方は ABA 含まないものになるように、2 個ずつ組み合わせて固定した。コントロールとして ABA を含まない組み合わせとした。0.5 μ M ABA を含むバーミキュライトに植えた根系を root A とし、ABA を含まないバーミキュライトに植えた根系を root B とした。先に述べた条件で栽培した。split-root にしてから 7 日後、root B に 4S 株を 10 mL (1.0×10^7 cells/mL) 接種した。28 日後に root B に着生した根粒数を計測した。

2-2-7 ホワイトクローバの根毛変形及び感染糸形成の観察

0.5 μ M ABA を含む Fåhraues medium を滅菌プラシャーレ (FALCON, 60×15 mm) に 5 mL 分注した。コントロールは、0.5 μ M ABA を含まないものを準備した。播種後 2 日後のクローバの芽生えを浮かべ、終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した 4S 株を接種し、25 °C、5,550 lx の照度で 14h light/10 h dark の日周条件で培養した。菌接種 3 日後、7 日後、14 日後に根毛変形、感染糸形成を光学顕微鏡 (倍率×200) で観察した。播種 2 日後のクローバの芽生えを Fåhraues medium に浮かべてから新しく伸びた根 3 mm の領域に生じた全根毛数、変形した根毛数 (curling 数, swelling 数) を測定し

た。古い根に生じた根毛は複雑な根毛変形をしており、新しく生えた根に生じた根毛とは明らかに違う。この違いを目印とし、根毛を測定する場所を定めた。また、感染糸形成は、根に生じた根毛全体に形成された感染糸の数を計測した。curling の割合は、全根毛数に対する curling した根毛数の割合とした。swelling の割合は全根毛数に対する swelling した根毛の割合とした。

2-2-8 ミヤコグサの種子殺菌と発芽誘導

ミヤコグサは *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 を使用した。ミヤコグサの種子を 500 μL の濃硫酸を入れた 50 mL コーニングチューブにいれ、1 分間攪拌した後 10 分間静置した。その後、滅菌水で 5 回洗浄した後、20 mL の滅菌水、400 μL の次亜塩素酸ナトリウム、20 μL の Tween 20 を入れ、20 分間振盪し表面殺菌した。振盪後、発泡しなくなるまで洗浄を繰り返し、さらに 30 分間吸水させた後、0.8 % 寒天平板に播種し、23 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所の条件で、3 日間、発芽誘導させた。

2-2-9 ミヤコグサの根毛変形及び感染糸形成の観察

0.05 μM ABA を含む Fåhraues medium を滅菌シャーレ (FALCON, 60 \times 15 mm) に 5 mL ずつ分注した。コントロールは、0.05 μM ABA を含まないものを準備した。Fåhraues medium に播種 3 日後のミヤコグサの芽生えを浮かべ、終濃度 1.0×10^7 cells/mL になるように調製した *M. loti* MAFF GFP 株を接種し、25 $^{\circ}\text{C}$ 、5,550 lx の光強度条件で 14h light/10 h dark の日周条件で培養した。菌接種 3 日後、7 日後、14 日後に根毛変形を光学顕微鏡 (倍率 \times 200) で、感染糸形成を蛍光顕微鏡で観察した。播種後 3 days のミヤコグサの芽生えを Fåhraues medium に浮かべてから新しく伸びた根 3 mm の領域に生じた全根毛数、変形した根毛数 (curling 数, swelling 数) を計測した。計測場所の決定、感染糸数や根毛変形 curling, swelling の数はクローバと同様に実施した。

2-2-10 ミヤコグサのポットを使用した不定根誘導法

播種後3日目のミヤコグサの芽生えの胚軸10 mmをカミソリで切断し、その上部を、適量(約150 mL)のバーミキュライトを入れたスミロンテクノポット(SUMILON)に植えた。バーミキュライトには予め、根の成長を促すために終濃度が3 mMの KNO_3 を含むB&D培地(Broughton and Dilworth 1971)を加えた。テクノポットは隙間をサージカルテープで密閉し、根の長さが5 cm以上でスプリットルートシステムに用いることが出来るまで30~40日間、25°C、16 h light/8 h darkの日周条件で栽培した。

2-2-11 滅菌プラシャーレを使用した不定根誘導法

角2号シャーレ(NISSUI, 14×10 cm)に終濃度3 mM KNO_3 を含む1% agar B&D培地を50 mLずつ加え培地を作製した。滅菌した濾紙上(13×8 cm)で播種後3日目のミヤコグサの芽生えの胚軸をカミソリで切断し、子葉を含む胚軸部を、乾燥を防ぐため滅菌水に浮かべた。個体を先に作製した培地に9個体ずつ並べた。角シャーレをサージカルテープで密閉し、根の長さがsplit-root systemで用いることが出来るようになるまで(約30~40日間)、25°C、16 h light/8 h darkの日周条件で栽培した。

2-2-12 プラントボックスを利用した Split-root system

プラントボックス(IWAKI)にバーミキュライトを120 mLほど入れ、終濃度が0.5 mMの KNO_3 を含むB&D培地を80 mL加えて加圧滅菌した。滅菌後、2個のプラントボックスを横に並べ、ビニールテープで固定した。不定根を誘導した個体をスミロンテクノポットから取り出し、火炎滅菌したピンセットを用いて滅菌水中でバーミキュライトをきれいに取り除いた後、二分した根をそれぞれ二つのプラントボックスのバーミキュライト上に置いた。1セットにつき3個体ずつ置き、根の上に滅菌したバーミキュライト

を被せ、0.5 mM KNO₃ B&D 培地を 80 mL 加えた。2つのプラントボックスの真ん中にもう一つのプラントボックス本体をフタとして逆さまに乗せ、地上部がすべてその中におさまるようにした。二つの培地中の根をそれぞれ root A, root B とラベルし、コンタミネーションを防ぐため、装置全体をラップで覆った。

2-2-13 滅菌プラシャーレを利用した Split-root system

角1号シャーレに1.5% agar を加えた B&D 培地を 70 mL ずつ分注し、培地を固化させ表面を乾燥させた。培地中央が 2 cm 空くように培地を取り除いた。先に不定根を誘導した植物体の根系を左右の培地に静置した。左側の根を root A, 右側の根を root B と設定した。

2-2-14 根粒菌調製及び接種

YM 培地で3日間培養した培養液 1 mL を滅菌したチューブに入れ、6000 rpm, 室温で5分遠心分離した。上清を除き、滅菌水 1 mL を加えて vortex で懸濁し、6000 rpm, 室温で5分遠心分離し、これを2回繰り返した。上清を捨て、1 mL の滅菌水を加えて vortex で懸濁し、滅菌水にて10倍希釈した菌体懸濁液の吸光度を測定した。610 nm の吸光度から菌体濃度を換算して、 1×10^7 cells / mL に調製し、菌接種用の菌体懸濁液とした。agar 上で栽培した植物体には、1個体の根系につきおよそ 50 μ L または 100 μ L を接種した。プラントボックスの split-root system の植物には、一方の根系に 10 mL の菌体懸濁液を接種した。

2-3 結果

2-3-1 根毛変形・感染糸形成にアブシシン酸が与える影響

根粒菌感染初期応答に ABA が与える影響を調査した。播種 3 日後の芽生えを 0.5 μM ABA を含む Fåhraeus 培地に浮かべ、根粒菌を接種して、3 日後、7 日後、14 日後に根毛変形、感染糸形成を光学顕微鏡で観察した。その結果、ミヤコグサとクローバ共に ABA 存在下での根毛変形は、根粒菌接種 3 日後、7 日後、14 日後ともに、curling の割合より swelling の割合が高かった (Fig. 1 A, B, Fig. 2A, B)。クローバでは ABA 存在下での感染糸形成は、根粒菌接種 3 日後、7 日後で、著しく阻害され、14 日後では約 50% 抑制されていた (Fig. 1C)。ミヤコグサでは感染糸形成は、根粒菌接種 3 日後、7 日後、14 日後ともに著しく阻害された (Fig. 2C)。

2-3-2 Split-root system によるアブシシン酸と根粒着生制御機構の解析

ABA による根粒着生の調節のしくみについて、split-root system を利用し解析を行なった。不定根を誘導し、split-root system を作製した。split-root system の片方の根系 root A に ABA を添加し、7 日後にもう片方の根系 root B に根粒菌を接種して、28 日間栽培後に root B の根粒着生数を計測した (Fig. 3A)。その結果、クローバでは root A に ABA を投与した系では、無添加の系と比較して root B の根粒着生数は増加した (Fig. 3B)。ミヤコグサでは root B の根粒着生数は ABA 無添加の系と比較し、約 2 倍に増加した (Fig. 3C)。そこで次に、split-root system に ABA 合成阻害剤 (abamine) を与えて解析した。不定根を誘導して、split-root system を作製した。split-root system の root A に根粒菌を接種し、root B には 10 μM abamine を添加した。root A への菌接種後 7 日後に root B に根粒菌を接種し、28 日後に根粒着生数を計測した (Fig. 4A)。その結果、クローバでは root B に 10 μM abamine を添加した系では、abamine 無添加の系と比較して、root B の根粒着

生が約 1.5 倍に増加し、根粒着生の autoregulation は生じないことが確認された (Fig. 4B)。ミヤコグサでは、root B に 10 μ M abamine を添加した系では、AON による根粒着生の抑制が緩和されていた (Fig. 4C)。

2-4 考察

クローバ根粒菌 (4S 株) の接種に応答してクローバは、根毛変形や感染糸形成などの根毛感染初期応答が観察される。これらの宿主植物の初期応答に、ABA はどのように影響を与えるのか解析した。その結果、ABA 存在下での感染糸形成は、根粒菌接種 3 日後、7 日後で、著しく阻害され、14 日後でも約 50% 抑制されていた (Fig. 1C)。ABA 存在下での根毛変形は、根粒菌接種 3 日後、7 日後、14 日後ともに、curling の割合より swelling の割合が高くなった (Fig. 1B)。ABA が直接感染糸形成を抑制するのか、もしくは何か他のシグナルを誘導し、そのシグナルが感染糸形成を抑制するのかは分からない。ABA を投与すると根毛の curling の割合より swelling の割合が高くなることについて、SYMRK との関係が考えられる。ミヤコグサの *symrk* mutant では、swelling する根毛数は多いが、curling する根毛数が少ないことから、*SYMRK* 遺伝子は swelling から curling 形成の段階で作用していると考えられている (Stracke et al. 2002)。ABA 処理を行ったミヤコグサでは、*SYMRK* 遺伝子の発現量が減少していることが明らかになっており、ABA を加えることで *SYMRK* 遺伝子の発現が減少し、それにより根毛の curling が抑制され、結果的に根粒着生が抑えられると推測した。また、根毛は tip growth によって伸長している (Schiefelbein et al. 1993)。根毛の先端領域には根毛細胞壁成分などを含む小胞が無数に存在する。根毛伸長時には、この小胞が根毛細胞膜に融合し、小胞内成分がエキソサイトーシスによって根毛細胞壁内に分泌される。これによって根毛が伸長する。また、根毛伸長時には、エキソサイトーシスだけではなく、根毛細胞壁からのエンドサイトーシスも同時に起こっており、バランスを保っている (Sieberer et al. 2005)。根毛細胞壁か

らのエンドサイトーシスには、アクチンフィラメントが必要とされるが、エキソサイトーシスにはアクチンフィラメントは必要とされない。アクチンフィラメントが脱重合すると、エンドサイトーシスが起こらなくなり、エキソサイトーシスだけがおこりバランスが崩れ、根毛の先端が膨張する swelling がおこる。根粒菌に対する根毛 swelling もこのメカニズムによっておこると考えられる。根粒菌の Nod factor を根毛が認識すると、 Ca^{2+} の一過的な流入がおこる。この一過的な Ca^{2+} 濃度の上昇によってアクチンフィラメントの脱重合がおこり、根毛が swelling する。その後、1~2 時間以内にアクチンフィラメントは再構成し、swelling からの更なる伸長を開始する (Maekawa-Yoshikawa et al. 2009)。この再構成は、根毛内における Ca^{2+} の濃度が、適切に調節されている必要があると考えられる。 Ca^{2+} の濃度が高い状態のままだと、アクチンフィラメントは重合(再構成)しないのではないかと考えられる。シロイヌナズナの孔辺細胞では、ABA は Ca^{2+} チャンネルを活性化し、 Ca^{2+} 濃度上昇を誘導する。また、タルウマゴヤシでは、ABA は Ca^{2+} spiking を改変することが報告されている (Ding et al. 2008)。以上のことから、ABA は根毛内の Ca^{2+} 濃度に影響を与え、その結果、正常なアクチンフィラメントの再構成が行なわれず、swelling のままで停止している根毛が増えた可能性が考えられる。ABA による根粒着生の調節が全身的な現象であるかに否かについて、split-root system を利用して解析した。split-root system の root A 側に ABA を添加し、その7日後に root B に菌接種し、28 日後に root B に着生する根粒数を計測した。その結果、root A に ABA を添加した系では、無添加の系と比較して root B の根粒着生数は約 50%増加したことから ABA による根粒着生の抑制は、全身的には起こらないと考えられる。ミヤコグサで split-root system 用いた ABA の根粒着生の影響を調べた実験で、ABA の根粒着生の抑制効果は局所的に働き、全身的には起こらないことが報告されている (Biswas et al. 2009)。これらの結果と報告から、ABA による根粒着生阻害は根での局所的なものであり、ABA は、全身的な制御に関与するシグナル分子そのものではないことが考えられる。ABA

は根粒着生を抑制するだけではなく、根の伸長を抑制するなど、抑制的に作用する。root A に ABA を添加した系で root B の根粒着生数が増加したのは、root A 側で着生が抑制されているのを root B 側で補うような機能が働いた可能性が考えられたが、現段階では明確な原因は不明である。

AON に ABA が関係しているか否かを検討するために、split-root system の根系に ABA 合成の阻害剤である abamine を用いて解析した。split-root system の root A に菌接種し、root B に、10 μ M abamine を添加した。7 日後に root B に菌接種し 28 日後に根粒着生数を計測した。その結果、クローバでは AON による root B の根粒着生の抑制が起こらなかった (Fig. 4B)。ミヤコグサでは AON による root B の根粒着生の抑制が緩和されていた (Fig. 4C)。この結果から、root A への先行した菌接種によって root B の根粒着生が抑制されたのは、root B の ABA レベルが上がったためではないかと考えた。root B に abamine を添加した系では、root B の内生 ABA 合成が阻害された結果、根粒着生の抑制が緩和されたと考えられた。これらのことから、ABA による根粒着生阻害は根での局所的なものであり、ABA は全身的な制御に関与するシグナル分子そのものではないことが示唆された。また、ABA は、根粒菌の接種に応答して宿主植物の根組織で合成される可能性が考えられた。

第3章 : *LjGlu1* の発現と根粒着生制御機構の関係

3-1 序論

宿主植物にとって根粒菌との共生は有用であるが、共生の維持には多量のエネルギーを必要とするため、根粒の過剰な着生は植物自体の生育を著しく妨げることになる。そこで、マメ科植物には根粒の着生を調節し根粒数をコントロールすることで共生のバランスを保つための全身的な制御機構が備わっている。この制御機構は、AON と呼ばれる。(Bhuvanewari et al. 1980, Pierce et al. 1983, Caetano-Anolles et al. 1991, Ferguson et al. 2010)。AON は、根粒菌の感染を地上部へと伝える根由来のシグナル、根由来のシグナルの受容体、地上部から根への根粒着生の制御シグナルが主な構成要素と考えられる。根由来のシグナルは根粒菌に応答して生産され、地上部に伝達される。一方、地上部由来の制御シグナルは根に伝達され、さらなる根粒着生を制限する。(Caetano-Anolles and Gresshoff 1991, Oka-Kira and Kawaguchi 2006)。根粒菌感染に対する AON の仕組みを調べる方法として、split-root system が用いられている。二分した根系の片方に根粒菌を接種し、一定の時間を置いた後、もう一方の根系にも根粒菌を接種して栽培すると、後から菌接種した根系の根粒着生は抑制される。*Glycine max* (L.) Merr., *T. subterraneum*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus* などの様々なマメ科植物で全身的な根粒着生の制御機構が共通して働くことが split-root system を用いて示されている。(Singleton 1983, Kosslak et al. 1984, Sargent et al. 1987, George 1991, Catford et al. 2003, Suzuki et al. 2008)。

AON は、根と地上部の長距離コミュニケーションを通して働くことが示唆されている。これまでに、様々な根粒超着生変異体 (Ljhar1/Mtsunn/Pssym29/Gmnark, Pssym28 and Ljklv) が単離されている (Sagan et al. 1996, Szczyglowski et al. 1998, Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002, Penmetsa et al. 2003, Searle et al. 2003, Oka-Kira et al. 2005, Schnabel

et al. 2005, Suzaki et al. 2008, Miyazawa et al. 2010, Schnabel et al. 2010, Krusell et al. 2011)。

根粒超着生変異体と野生株を用いた接ぎ木実験により、根粒超着生の表現型は地上部の遺伝子型で決定されることが明らかになった (Delves et al. 1986, Olsson et al. 1989, Sheng et al. 1997, Wopereis et al. 2000, Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002, Penmetsa et al. 2003, Oka-Kira et al. 2005)。根粒超着生の原因であるこれらの遺伝子はロイシンリッチリピート(LRR-RLKs)をもつ受容体型キナーゼをコードしている。(Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002, Searle et al. 2003, Oka-Kira et al. 2005, Schnabel et al. 2005, Miyazawa et al. 2010)。HAR1 の塩基配列は、シロイヌナズナの CLAVATA1 と高い相同性を示す。CLAVATA1 はシロイヌナズナの茎頂の幹細胞で発現し(Clark et al., 1993), 細胞間コミュニケーションを介して茎頂や花芽の分裂組織の細胞増殖を制御することが知られている。また、CLAVATA1 は CLAVATA2 と茎長分裂組織でレセプター複合体を形成し、表層部より分泌される CLAVATA3 ペプチドを受容することも分かっている (DeYoung et al. 2001)。従って、CLAVATA1 のオーソログである HAR1 もペプチドを受容していると考えられている (Krusell et al. 2002; Nishimura et al. 2002; Searle et al. 2003)。一方、ミヤコグサの根で特異的に発現している遺伝子である、*LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2* は、*CLAVATA3* と高い相同性を持つ (Okamoto et al. 2009)。*LjCLE-RS1*, または *LjCLE-RS2* を過剰発現すると、根粒着生が全身的に抑制されることから、根由来のシグナルの有力な候補とされている (Okamoto et al. 2009)。これらのことから、AON では、根由来のシグナル *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2* が地上部の HAR1 に受容され次に地上部から根粒菌着生の抑制シグナルが根へと伝わると考えられる。しかし、抑制シグナルに関する報告や知見は少ない。

β -1,3-glucanases は PR-2 ファミリーに属する pathogenesis-related (PR) タンパク質である (Gerhard and Frederick 1999)。植物ホルモン ABA を投与したミヤコグサでは、根粒着生が抑制され、ABA 合成の特異的な阻害剤である abamine を投与した系では根粒着生が

上昇した (Suzuki et al. 2004)。クローバに潜在的に存在するウィルスのコートタンパク質 (Boccardo and Candresse 2005) をコードしている遺伝子 *TrEnodDR1* を恒常的に発現させたミヤコグサの形質転換体では、内生 ABA 量が上昇し、根粒数が劇的に減少した (Nakatsukasa-Akune et al. 2005)。この形質転換体では、いくつかの病原抵抗性遺伝子の発現上昇が示された。また、abamine の投与によって発現レベルが対照区と同程度までもどったことから、ABA 応答性の病原抵抗性遺伝子であることが考えられた (Nakatsukasa-Akune et al. 2005)。ABA 応答性の病原抵抗性遺伝子の中でミヤコグサの β -1,3-glucanase 遺伝子 (*LjGlu1*) に着目した。*LjGlu1* の発現を抑制すると、根粒数が増加する傾向が示された (Suzuki et al. 2008b)。従って、*LjGlu1* は、根粒着生の抑制に関与している可能性があり、AON における根粒着生の抑制でも機能している可能性が考えられた。本章では、*LjGlu1* の発現と AON が関係している可能性について検討した。

3-2 方法

3-2-1 生物材料

植物は *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 (Kawaguchi 2000), Miyakojima 由来の *har1-7* 変異体 (Magori et al. 2009) を使用し, 根粒菌は *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株 (Kaneko et al. 2000), CLE 遺伝子の形質転換毛状根作出には *Agrobacterium tumefaciens* C58 株 (Okamoto et al. 2008) を使用した。

3-2-2 形質転換毛状根の作出および選抜

殺菌したミヤコグサの種子を 0.8%の寒天へ播き, 暗所でインキュベートした。2 日後にアセトシリゴン (300 µg/mL)入りフェラウス寒天培地へ植物を移し, 再び暗所で 2 日間インキュベートした。その後, 植物の胚軸をカットした。リファンピシン 50 µg/mL とハイグロマイシン 50 µg/mL を含む YEP 液体培地で *Agrobacterium tumefaciens* C58 株をそれぞれ 2 日間培養したものから 1 mL を 1.5 mL 容チューブへ移し, 集菌して滅菌水に懸濁した。さらに滅菌水で 5 倍希釈した菌懸濁液を, 根をカットした植物の胚軸へ接種した。植物を暗所で 5 日間インキュベートした後, セフォタキシム 300 mg/L を含む B5 (Wako) 寒天(0.9%)培地へ植物を移し, 2 週間インキュベートして根を伸長させた。形質転換毛状根は, 実体蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光を指標として選抜した。

3-2-3 RNA 抽出

RNA 抽出には RNeasy Plant Mini Kit 50 (QIAGEN)を使用した。植物組織をそれぞれ 1 ジルコニアボール (3 mm 3 粒, 5 mm 1 粒) を入れた 1.5 mL エッペンドルフチューブに 100 mg ずつ入れ, 液体窒素で瞬間凍結した。凍結したサンプルを激しく攪拌して粉碎した。チューブに Buffer RLC 450 µL を入れ vortex して懸濁した。Buffer RLC は使用する前に, β-メルカプトエタノールを加えた (β-MeSH 10 µL / buffer RLC 1 mL)。懸濁したものを 2 mL コレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムに添加し,

14000 rpm で二分間遠心操作した。QIAshredder からの濾液の上清を、コレクションチューブ内の細胞破片ペレットを乱さないよう新しいチューブに移した。移した濾液の上清の半量のエタノール (99%) を添加し、すぐにピペッティングで混和した。沈殿も含む混和液 (約 650 μ L) を 2 mL コレクションチューブにセッティングした RNeasy スピンカラムに添加し 14000 rpm で 15 秒遠心操作し濾液を捨てた。700 μ L の Buffer RW1 を RNeasy スピンカラムに添加した。スピンカラム・メンブレン洗浄のため 14000 rpm で 15 秒遠心操作し濾液を捨てた。RNeasy スピンカラムに 500 μ L の Buffer RPE を添加しスピンカラム・メンブレン洗浄のため 14000 rpm で 15 秒遠心操作し濾液を捨てた。RNeasy スピンカラムに 500 μ L の Buffer RPE を添加しスピンカラム・メンブレン洗浄のため 14000 rpm で 2 分間遠心操作し、RNeasy スピンカラムを新しい 1.5 mL コレクションチューブにセットし RNase フリー水 50 μ L を直接スピンカラム・メンブレンに添加し 14000 rpm で 1 分遠心操作し RNA を溶出した。溶出液を RNA として利用した。

3-2-4 DNase 処理

抽出した RNA は、DNase I (Wako) 処理を行い精製した。RNA 溶液 50 μ L, 10x buffer 10 μ L, DNase I 1 μ L, RNase inhibitor 1 μ L, H₂O 38 μ L, 計 100 μ L を反応混合液としてチューブに入れ、37°C で 15 min インキュベートした後、滅菌ミリ Q 水 100 μ L を加え、フェノール/クロロホルム混合液を 200 μ L 加え 1 min 攪拌して除タンパクした。以後の操作は氷中で行った。混合液は 4°C, 14,000 rpm にて 5 min 遠心分離し (以下の遠心分離は全て 4°C で行った), 二層に分かれた液の上層を慎重に新しいチューブに移し、さらにクロロホルム 200 μ L を加え 2 min 攪拌し、14,000 rpm, 5 min 遠心分離した。上層部分を別のチューブに移し、3 M sodium acetate 3.3 μ L, Ethachinmate (NIPPON GENE) 1 μ L を加えてよく vortex し、2.5 倍量の 99% エタノール (約 500 μ L) を加えて vortex 後、14,000 rpm にて 6 min 遠心分離した。上清のエタノールを取り除き、ペレットに 70 % エタノー

ル 1 mL を加えリンスした。その後, 14,000 rpm にて 2 min 遠心分離し, 沈殿を吸い取らないようにエタノールを慎重に取り除き, 減圧デシケーターで残ったエタノールを乾燥させた。乾燥サンプルに 50 μ L の滅菌ミリ Q 水を加え溶解し, 精製 RNA とした。使用するまで -80°C で保存した。

3-2-5 real-time RT-PCR

DNase 処理した RNA (10 ng) 5 μ L, Power SYBR Green (Applied Biosystems) 12.5 μ L, Super script II (200U/ μ L; Invitrogen) 0.1 μ L, RNase inhibitor (Takara Bio) 1 μ L, Primer F (5 μ M), Primer R (5 μ M), H₂O 5.15 μ L の合計 25 μ L になるように PCR 反応液を調製した。プライマーセットは *LjGlu1* (5'-GCTGCTGCCGGGTCAGT-3' 5'-TCAATTGGCTGAAGAGATTGCA-3'), *LjeIF-4A* (5'-TGGAAGCTTCGAAGAGATGG-3' 5'-GTGCCAGATTGAGCCTGAG-3'), *LjCLE-RS1* (5'-TGCAAGTGTCGATGCTCATAGC-3' 5'-GATGTTTTGCTGAACCAAGGGATA-3') を使用した。PCR 反応は 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて, 48 °C, 30 min → 95 °C, 10 min の後, 95 °C, 15 sec → 60 °C, 1 min を 40 cycles の条件で行った。発現量の計算はサイクル比較法 (比較 Ct 法) を使用した。

3-3 結果

3-3-1 *LjGlu1* 発現抑制が根粒着生に及ぼす影響

アンチセンス法を用いた *LjGlu1* の発現抑制体が生産され、根粒着生に与える影響が解析された。その結果、*LjGlu1* の発現量はベクターコントロールと比較して、約 70% 抑制され、根粒数は増加する傾向が示された。本研究ではアンチセンス法より強力に遺伝子発現を抑制する RNAi 法を用いて *LjGlu1* の発現抑制体を生産し、根粒着生に与える影響について検討した。その結果、*LjGlu1* の発現量はベクターコントロールと比較して 90% 以上抑制され (Fig. 5A)、根粒数は約 2 倍程度の増加が示された (Fig. 5B)。

3-3-2 Split-root system を用いた *LjGlu1* 発現の解析

ミヤコグサの split root system では、AON による根粒着生の抑制は、根粒菌接種 3 日以降に開始し、5 日以降により強く誘導されることが報告されている (Suzuki et al. 2008a)。本研究では、*LjGlu1* が AON に関与している可能性について split-root system を用いて検討した。発芽 3 日目の芽生えの根を切断して不定根を誘導した。21 日後、根を二つに分けやすい個体を選抜し、split-root system を準備した。root A に根粒菌を接種し、1, 2, 3, 5, 7, 9 日後に葉・root A・root B のそれぞれの RNA を抽出した。その後、real time RT-PCR を用いて *LjGlu1* の発現量を測定したところ、菌接種 7 日後の葉で *LjGlu1* の高い発現が示された (Fig. 6A)。また、root A では菌接種 1 日後から 2 倍以上の発現上昇が示された (Fig. 6B)。root B では、菌接種 5 日以降で *LjGlu1* の高い発現が示された (Fig. 6C)。

3-3-3 *LjCLE-RS1* による *LjGlu1* の発現

ミヤコグサでは、根由来の AON シグナルの候補として、*LjCLE-RS1*, *-RS2* が同定された。*LjCLE-RS1*, *-RS2* を恒常的に発現させた形質転換体毛状根では HAR1 に依存して全身的に根粒着生が抑制されることが報告されている (Okamoto et al. 2009)。

本研究では、*LjCLE-RS1* を恒常的に発現する形質転換毛状根を作出し、*LjGlu1* の発現量を解析した。*LjCLE-RS1* を恒常的に発現する毛状根を *Agrobacterium tumefaciens* C58 による形質転換により作出した。その後、RNA を抽出し real time RT-PCR で *LjGlu1* の発現量を調べた。*LjCLE-RS1* の発現量はベクターコントロールと比較して、約 68 倍上昇しており (Fig 7A)、*LjGlu1* 発現量も約 8 倍上昇した (Fig 7B)。

3-3-4 *har1-7* 変異体による *LjGlu1* の発現

AON のシグナル伝達系では、HAR1 受容体は根由来のシグナルの受容体であると考えられており、*har1* 変異体では AON が機能していない。そこで、この HAR1 が *LjGlu1* の誘導に関与するか検討するために、根粒菌接種による *LjGlu1* の発現量を野生株と *har1* 変異体で解析した。根粒菌接種 14 日後、野生株では *LjGlu1* の発現量の上昇みられたが、*har1* 変異体ではみられなかった (Fig. 8)。

3-4 考察

LjGlu1-RNAi によって、根粒数がベクターコントロールの約 2 倍に増加した。この結果から、*LjGlu1* は根粒着生の制御に関与していることが示された (Fig. 5B)。AON 変異体は、根粒着生数の劇的な増加や nodulation zone が増加する特徴をもつ (Nishimura et al. 2002)。しかし、*LjGlu1-RNAi* では根粒着生数の劇的な増加や nodulation zone の増加がみられなかった。このことから *LjGlu1* は AON による根粒着生の抑制に関わるあくまで一つの構成要素であり、根粒着生を抑制する主要なレギュレーターではない可能性が考えられる。Split-root system で *LjGlu1* の発現を調べたところ、root B での *LjGlu1* の発現量は、root A に根粒菌を接種して 5 日以降に高く誘導されていた (Fig. 6C)。AON による根粒着生の抑制は、根粒菌接種 3 日以降に開始し、5 日以降でより強く誘導されることが報告されている (Suzuki et al. 2008a)。*LjGlu1* は、AON が強く誘導される時期に同調して上昇することが考えられた。また、*LjCLE-RS1* を恒常的に発現する形質転換毛状根

で、*LjGlu1* は強く誘導されていた(Fig.7A, B)。この結果から、*LjGlu1* は、*LjCLE-RS1* の下流で働くことが示唆された。根粒菌接種による *LjGlu1* の発現量を野生株と *har1* 変異体で解析したところ、野生株では *LjGlu1* 発現は誘導されたが、*har1* 変異体ではみられなかった (Fig. 8)。この結果は、*LjGlu1* が *HAR1* の下流で機能している可能性を示している。以上のことから、*LjGlu1* は AON による根粒着生の制御に関係している可能性があり、*LjCLE-RS1* や *HAR1* の下流で機能していると予想される。最近、野生株、*har1* 変異体、*LjCLE-RS1* や *LjCLE-RS2* を恒常的に発現させた形質転換体で、内生のホルモン量が質量分析によって解析された。その結果、内生の ABA 量はすべての系統で有意な差は示されなかった (Sasaki et al. 2014)。この報告から、ABA は根粒着生を抑制するが、AON による根粒着生の抑制には直接は関係していない可能性がある。以上から *LjGlu1* 遺伝子の発現は、*HAR1* の下流で根粒着生の制御シグナルの調節を受ける系と、ABA によって調節される系の 2 つの異なる系で調節される可能性が考えられた。

第4章：植物ホルモンや生物学的ストレスに対する

LjGlu1 の発現応答

4-1 序論

植物ホルモンとは、植物自身が作り出し、低濃度で自身の生理活性・情報伝達を調節する機能を有する物質で植物に普遍的に存在し、その化学的本体と生理作用とが明らかにされた物質のことである。マメ科植物と根粒菌との共生の調節に多くの植物ホルモンが関わっていることが報告されている (Ferguson et al. 2014b)。根粒着生を抑制する植物ホルモンとして、ABA, エチレン, メチルジャスモン酸が報告されている (Ding et al. 2008; Suzuki et al. 2004; Tominaga et al. 2009; Geil et al. 2001; Ferguson and Mathesius 2003, Gresshoff et al. 2009; Sun et al. 2006; Nakagawa and Kawaguchi 2006)。ミヤコグサの *LHK1* はサイトカイニンの受容体として機能しており、*LHK1* の機能欠失変異体は根粒発生が阻害されることから *LHK1* は根粒形成を正に制御していることが示された (Murray et al. 2007)。一方、*LHK1* の機能獲得変異体 *snf2* は、根粒菌非存在下で自発的に根粒形成を行うことが示された (Tirichine et al. 2007)。また、ミヤコグサでは、サイトカイニン投与により、根粒菌非存在下でも自発的に根粒形成を誘導できることが報告された (Heckmann et al. 2011)。これらの報告から、サイトカイニンシグナリングの活性化が根粒形成の誘導に必要であることが考えられている。一方、タルウマゴヤシに合成サイトカイニン (BAP) を投与すると、タルウマゴヤシの *MtCLE13* が誘導されることが報告されている。*MtCLE13* を過剰に発現する形質転換毛状根では、根粒着生が全身的に抑制されることが示された (Mortier et al. 2010)。このようにサイトカイニンは根粒形成の正の制御だけではなく、負の制御にも関わっている可能性が考えられた。窒素源によって根粒形成が阻害されることは、昔から知られていた (Rautenberg and Kuhn 1864)。高濃度の窒素による根粒形成の抑制に耐性を示すダイズの変異体として nitrogen tolerant

symbiosis1 (nts1) が単離されており、この変異体は根粒超着生を示す (Carroll et al. 1985)。また、窒素に応答する *CLE* 遺伝子もミヤコグサ (*LjCLE-RS2*) とダイズ (*Nitrate induce CLE1; NIC1*) で報告されている (Okamoto et al. 2008; Reid et al. 2011)。アンチセンス法による *LjGlu1* の発現抑制体では、根粒数や窒素固定活性が増加することが報告されている (Suzuki et al. 2008b)。*LjGlu1* の発現抑制による窒素固定活性の上昇が顕著に示されていたことから、*LjGlu1* は根粒内で強く働いていることが予想された。また、窒素固定活性は老化によって低下することが分かっている。*LjGlu1* の発現は、老化を誘導するエチレンにも応答することから、老化にも関係している可能性が考えられた。以上のことより、*LjGlu1* は窒素固定の阻害と根粒の老化に関与していることが予想された。

β -1,3-glucanase は病原関連タンパク質であり、病原菌に対する植物の防御応答として働く。植物の防御応答は先行した病原菌の感染によって全身的に防御応答が誘導され、後からの感染が抑制される全身獲得抵抗性 (Systemic Acquired Resistance, SAR) が知られている (Heil et al. 2008)。AON は根粒菌だけでなく菌根菌によっても誘導され、根粒着生および菌根共生が全身的に抑制される (Catford et al. 2003)。また、非マメ科植物であるオオムギの *split-root system* による実験で、先行した菌根菌感染が後の菌根菌感染を抑制することが報告されている (Vierheilig H et al. 2000a and 2000b)。菌根菌感染による AON のプロセスはマメ科植物および非マメ科植物で共通した分子によってコントロールされることが示唆されている (Staelin et al. 2011)。オオムギの *split-root system* による実験で、先行した菌根菌感染が後の菌根菌感染を抑制するだけでなく、植物病原菌である *Gaeumannomyces graminis* の感染も全身的に抑制することが報告されている (Khaosaad et al. 2007)。このことから菌根菌感染による AON のプロセスと植物と病原菌による全身獲得抵抗性は、一部パラレルに働いている可能性が示唆されている (Staelin et al. 2011)。

本章では、*LjGlu1* の植物ホルモンや生物学的ストレスに対する応答を調べることを目的

とした。根粒着生を抑制することが報告されている植物ホルモン (ABA, エチレン, メチルジャスモン酸) への *LjGlu1* の発現応答について解析した。また, サイトカイニン, 窒素源である硝酸カリウム, 植物の病原菌 (青枯病菌) が根粒着生に及ぼす影響, 及び, *LjGlu1* の発現応答を検討した。組織における発現の違いや老化による *LjGlu1* の発現についても解析した。

4-2 方法

4-2-1 生物材料

植物は *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 (Kawaguchi 2000) を使用し、根粒菌は *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株 (Kaneko et al. 2000), 青枯病菌は *R. solanacearum* MAFF730135 (isolated from potato stem) を使用した。

4-2-2 青枯病菌の培養

青枯病菌は peptone-sucrose liquid medium (Tsuchiya et al. 1982) で 28°C, 2 日間培養した。菌濃度調製や接種方法は根粒菌と同じ方法で行った。

4-2-3 植物ホルモン及び硝酸カリウムによる *LjGlu1* 発現解析

本章で用いた植物ホルモン及び硝酸カリウムによる *LjGlu1* 発現の解析は、同じ手順でおこなった。播種 3 日後の芽生えを、目的の濃度になるようにホルモンを添加した Fåhraes 培地で 2 週間育てた後、葉や根をサンプリングした。その後、RNA を抽出し、DNase 処理を行った後に、Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。

4-2-4 組織における *LjGlu1* の発現・KNO₃ による根粒の *LjGlu1* の発現量

播種 3 日後の芽生えを Fåhraes 培地に移し、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 株 (1×10^7 cells/mL) を接種し、28 日後と 42 日後に根、葉、根粒をサンプリングした。その後、RNA を抽出し、DNase 処理を行った後に、Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。また根粒のサンプリングは 35 日後もおこなった。根粒菌接種 28 日後まで Fåhraes 培地で育てた植物を 10 mM KNO₃ を含む Fåhraes 培地に移し、7 日後に根粒をサンプリングした。その後、RNA を抽出し、DNase 処理を行った後に、Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量や *nifH* の発現を解析した。

4-2-5 植物病原菌による *LjGlu1* 発現

播種 3 日後の芽生えを Fähräues 培地に移し, 50 μL の *Ralstonia solanacearum* MAFF730135 (1×10^7 cells/mL) を接種し, 1 日後にサンプリングした。その後, RNA を抽出し, DNase 処理を行った後に, Real-time RT-PCR によって *LjGlu1*, *CHS*, *Class 1 chitinase* の発現量を解析した。

4-3 結果

4-3-1 アブシシン酸・メチルジャスモン酸・エチレンによる *LjGlu1* 発現解析

ABA, メチルジャスモン酸 (MeJA), エチレン前駆体 (ACC) は, それぞれ根粒着生を抑制することが報告されている (Ding et al. 2008; Suzuki et al. 2004; Tominaga et al. 2009; Guinel and Geil 2002; Ferguson and Mathesius 2003, Gresshoff et al. 2009; Sun et al. 2006; Nakagawa and Kawaguchi 2006)。これらの植物ホルモンによって *LjGlu1* が誘導されるか検討した。播種 3 日目の芽生えを, それぞれ control (ホルモン無添加), 1.0 μM , 5.0 μM の濃度の ABA, MeJA, ACC を含む Fåhraues 培地で 2 週間栽培し, サンプルングを行った。その後, RNA を抽出し, Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。ABA 濃度依存的に根で *LjGlu1* の発現量が減少したが (Fig. 9A), 葉では増加することが示された (Fig. 9B)。 *LjGlu1* の発現量が, 5.0 μM ACC によって根や葉で高く上昇した (Fig. 10A, B)。一方, MeJA による *LjGlu1* の発現量に変化はみられなかった (Fig. 11A, B)。

4-3-2 サイトカニンによる根粒着生への影響および *LjGlu1* 発現解析

タルウマゴヤシに合成サイトカニン(BAP)を投与すると, タルウマゴヤシの CLE 遺伝子である *MtCLE13* が誘導されることが報告されている (Mortier et al. 2010)。ミヤコグサでも BAP 投与によって CLE 遺伝子が誘導されると仮定すれば, BAP によって根粒着生が抑制される可能性が考えられた。そこで, BAP による根粒着生への影響について検討した。播種 3 日後の芽生えを 5 nM, 10 nM, 50 nM BAP を含む Fåhraues 培地で生育し, 根粒菌接種 21 日後に根粒数を計測した。その結果, BAP 濃度依存的に根粒着生は抑制された (Fig. 12)。BAP によって CLE 遺伝子が誘導されるならば, BAP による根粒着生の抑制は全身的に起こる可能性が考えられた。そこで, split-roots system を用いて, BAP による根粒着生の抑制が全身的に起こるのか検討した。split-root system の root A 側に 50 nM の BAP を含む B&D 培地, root B 側には BAP を含まない培地に植物をセットし,

7日間生育させた。コントロールは root A と B 両方に BAP を含まない。その後、root B 側に根粒菌を接種して7日毎に28日後まで root B の根粒数を計測した。その結果、BAP による根粒着生数に有意な差はなく、根粒着生の抑制は全身的には起こらなかった (Fig. 13B)。次に BAP によって、*LjGlu1* が誘導されるか検討した。播種3日後の芽生えを control (BAP 無添加), 10 nM, 100 nM 含む Fåhraues 培地で2週間栽培し、サンプリングした。その後、RNA を抽出し、Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。その結果、BAP 無添加のコントロールと比較して、10 nM BAP で約 2.5 倍程度の *LjGlu1* 発現の上昇が示された (Fig. 14)。また、100 nM BAP ではコントロールと比較して、20 倍以上の高い *LjGlu1* 発現量が示された (Fig. 14)。

4-3-3 硝酸カリウムによる根粒着生への影響と *LjGlu1* の発現

窒素源は、根粒着生を劇的に抑制することが知られている。また、窒素源によって強く誘導される CLE 遺伝子として、*LjCLE-RS2* (Okamoto et al. 2008) がミヤコグサで、Nitrate induce CLE (NIC1) (Reid et al. 2011) がダイズで、それぞれ報告されている。*LjCLE-RS2* を恒常的に発現させた形質転換体では根粒着生が全身的に抑制されることが報告されていることから (Okamoto et al. 2008)、窒素源による根粒着生の抑制は全身적におこる可能性が考えられた。そこで、split-root system を用いて硝酸カリウム (KNO_3) による根粒着生の抑制も全身的に起こるのか検討した。Split-root system の root A 側に 10 mM KNO_3 を含む B&D 培地、root B 側には 10 mM KNO_3 を含まない培地に植物をセットし、7日間生育させた。root A と B 両方に 10 mM KNO_3 を含まない系を対照区とした。その後、root B 側に根粒菌を接種して、7日毎に28日後まで root B の根粒数を計測した。その結果、root A 側の 10 mM KNO_3 によって、root B 側での根粒着生が完全に抑制された (Fig. 15B)。窒素源による根粒着生の抑制が全身的に起こることが、ミヤコグサで示された。次に、 KNO_3 が *LjGlu1* 発現を誘導するのかを検討した。播種3日後の芽生えを、control (KNO_3 無添加), 5 mM KNO_3 , 10 mM KNO_3 を含む Fåhraues 培地で2週

間育成させ、サンプリングした。その後、RNA を抽出し、Real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。その結果、*LjGlu1* の発現量は 10 mM KNO₃ によって根で強く誘導された (Fig. 16A)。

4-3-4 組織における *LjGlu1* の発現および老化との関係

アンチセンス法による *LjGlu1* の発現抑制体では、根粒数が減少することや窒素固定活性が増加することが報告されている (Suzuki et al. 2008b)。*LjGlu1* の発現抑制による窒素固定活性の上昇が顕著に示されていたことから、*LjGlu1* は根粒内で強く働いていることが予想された。また、*LjGlu1* は老化を誘導するエチレンにも誘導されることから老化にも関係している可能性が考えられた。そこで、根、葉、根粒における *LjGlu1* の発現量を根粒菌接種 28 日後、と 42 日後 (老化) で解析した。その結果、根粒での *LjGlu1* の発現量は葉や根より低かった (Fig. 17)。老化した葉では *LjGlu1* の発現上昇がみられたが、根や根粒ではみられなかった (Fig. 17)。次に、根粒での *LjGlu1* の発現量に注目し、根粒菌接種 28 日後、35 日後、42 日後で解析した。また、窒素固定活性を強く阻害する 10 mM KNO₃ による *LjGlu1* の発現量や窒素固定に必須であるニトロゲナーゼ還元酵素の遺伝子である *nifH* の発現量についても解析した。その結果、*LjGlu1* の発現量は根粒菌接種 4 週後と比較して 35 日後、42 日後で減少した (Fig. 18A)。10 mM KNO₃ による *LjGlu1* の発現量に変化はみられなかった (Fig. 18A)。*nifH* の発現量は老化や 10 mM KNO₃ によって大きく低下した (Fig. 18B)。窒素固定活性は一酸化窒素 (NO) によって阻害されることが報告されている (Tominaga et al. 2009)。そこで、NO によって *LjGlu1* が誘導されるか検討した。播種 3 日後の芽生えを NO ドナーである Sodium nitriprusside (SNP) を含む Fåhraeus 培地で 2 週間生育させ、サンプリングした。その後、RNA を抽出し、real-time RT-PCR によって *LjGlu1* の発現量を解析した。その結果、SNP による *LjGlu1* 発現量の有意な変化は根では検出されなかった (Fig. 19)。葉では、SNP によって *LjGlu1* 発現量が減少した (Fig. 19)。

4-3-5 植物病原菌による *LjGlu1* 発現

β -1,3-glucanase は病原関連タンパク質であり、病原菌に対する植物の防御応答として働いている (Gerhard and Frederick 1999)。また、植物の防御応答は全身的に誘導されることが報告されている (Catford et al. 2003)。そこで、split-root system を用いて、root A に植物の病原菌である青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum* MAFF730135) を接種し、7日間あけ、植物の防御応答を全身的に誘導することによって、root B の根粒着生を抑制できると予想した。しかし、青枯病菌接種による root B の根粒着生の抑制はおこらなかった (Fig. 20A)。 *LjGlu1* の発現量を調べたところ、青枯病菌接種によって葉では約 3.5 倍の発現上昇が示されたが、根での発現量に変化はみられなかった (Fig. 21)。病原菌に対する防御応答は速やかに起こることから、青枯病菌を接種してから 1 日後のタイミングで *LjGlu1* の発現量を解析した。また、同時に ABA に応答する病原関連遺伝子である *Chalcone synthase* (CHS) や *Class 1 chitinase* の発現量も解析した。その結果、*LjGlu1*, *CHS*, *Class 1 chitinase* すべての遺伝子は青枯病菌接種によって根で発現が上昇した (Fig. 22A, B, C)。

4-4 考察

ABA, MeJA, ACC によって *LjGlu1* が誘導されるか検討した結果、根では、ACC によって *LjGlu1* は誘導されたが、ABA や MeJA では、誘導されなかった (Fig. 9A, 10A, 11A)。ABA による葉の *LjGlu1* は誘導された (Fig. 9B)。以前の研究により *LjGlu1* は ABA 応答性である可能性が示された (Nakatsukasa-Akune et al. 2005)。また、以前 ABA による *LjGlu1* の発現をホールプラントで調べた結果、ABA によって *LjGlu1* の上昇が示された (data not shown)。ABA による *LjGlu1* の誘導は葉でおこり、根でおこらない可能性が考えられるが、これに関しては再検討が必要である。MeJA が根粒着生の阻害を示したときの実験系は 100 μ M MeJA を地上部にスプレーするというものであった (Nakagawa

and Kawaguchi 2006)。本研究では最高で 5 μM の濃度で行っており、MeJA も培地に添加されており実験系も大きく異なる。100 μM MeJA を地上部にスプレーする実験系では、*LjGlu1* の発現が誘導されるかもしれない。しかし、JA が根粒形成を負に制御している報告は少なく、正の制御への可能性を示した報告のほうが多く存在する (Sun et al. 2006; Nakagawa and Kawaguchi 2006; Kinkema and Gresshoff 2008; Seo et al. 2007; Suzuki et al. 2011)。JA による根粒形成への影響は、植物種や濃度によって変化する可能性が考えられる。ACC は葉や根で *LjGlu1* の発現を誘導した (Fig. 10A, B)。ACC に関しては、ミヤコグサで 1 μM の濃度で根粒着生の抑制が示されていることから、根粒着生の抑制と *LjGlu1* 発現応答の関係は相関する (Nukui et al. 2000)。

エチレンは、AON とは独立した経路で根粒着生を制御している可能性が報告されており (Lohar et al. 2009)、*LjGlu1* も AON だけでなく、それ以外の制御経路にも関与している可能性が考えられた。BAP による全身的な根粒着生の抑制はみられなかったが、局所的な抑制は他の植物ホルモンと比較してより低濃度で示された (Fig. 12, 13)。最近、地上部由来の根粒着生の制御シグナルの候補が、サイトカイニンである可能性が報告された (Sasaki et al. 2014)。サイトカイニンは根由来のシグナルを受け HAR1 依存的に地上部で作られ、地上部から全身的に根に伝達されることが示唆されている (Sasaki et al. 2014)。根粒形成の開始にもサイトカイニンが必要であり、地上部で作られて、根に伝達されたサイトカイニンによって根粒形成が抑制されることを考えると、サイトカイニン濃度の少しの違いで応答が大きく変わることが想定できる。実際に、他の植物ホルモンが根粒形成に影響するのに μM オーダー必要なのに対して、サイトカイニンは nM オーダーで劇的に効果が発揮された。サイトカイニンが器官形成の制御の重要な働きをしていることが示唆された。BAP によって根で *LjGlu1* が高く誘導された (Fig. 14)。この結果は、*LjGlu1* が AON に関係している可能性を支持する。窒素源によって根粒形成が阻害されることは昔から知られていたが、意外にも詳しいメカニズムについては未だに

分かっていない (Rautenberg and Kuhn 1864)。窒素源による根粒形成の制御に関係している候補として *CLE* 遺伝子がミヤコグサ (*LjCLE-RS2*) とダイズ (*Nitrate induce CLE1; NIC1*) で報告されている (Okamoto et al. 2008; Reid et al. 2011)。*LjCLE-RS2* は全身的に根粒着生を抑制するのに対して、*NIC1* は局所的に働くことが示されている。実際に、ミヤコグサの split-root system 実験で、高濃度の硝酸カリウムは全身的に根粒着生を完全に抑制した (Fig. 15)。また、ダイズでの split-root system 実験では、窒素源は局所的にしか根粒着生を抑制しないことが報告されている (Cho and Harper 1991)。これらの結果と報告は、窒素応答の *CLE* の働きと関連することから、*CLE* は窒素源による根粒着生制御に重要であることが示唆される。最近、タルウマゴヤシの split-root system による実験で、AON による根粒形成の抑制が機能していない *SUNN* 変異体においても先行の接種から 10 日以上時間をあけることで、根粒着生の抑制を示すことが報告された。根粒原基の発達などで誘導される AON には *SUNN* を依存するが、形成された根粒内の窒素による制御には依存しない。このことから AON の制御は 1 つ以上存在し、初期の早い抑制と二次的な抑制があることが考えられている (Kassaw et al. 2015)。外部の窒素源による根粒着生の制御だけでなく、根粒内部の窒素による制御も重要であることが考えられた。無効根粒を誘導する根粒菌を接種した場合、菌接種 14 日または 21 日後から野生株と比較して根粒着生数が多くなる。興味深いことに、上記の報告に照らし合わせることでこの現象をうまく説明できる。硝酸カリウムによって *LjGlu1* 発現が誘導されたことから、窒素源による制御にも *LjGlu1* が関与している可能性が考えられた。*LjGlu1* の発現抑制体では窒素固定活性が増加することや老化を誘導するエチレンに応答することから *LjGlu1* は窒素固定の阻害と老化の誘導に関与していることが考えられた。しかし、得られた結果は予想と一致しなかった (Fig. 17, 18, 19)。Split-root system を用いて、root A への先行した青枯病菌接種によって、防御応答を誘導することによって、root B の根粒着生を抑制できると予想した。しかし、青枯病菌先行接種による root B の根粒着生

の抑制はおこらなかった (Fig. 20A)。また、*LjGlu1* の発現量を調べたところ、青枯病菌接種によって葉では約 3.5 倍の発現上昇が示されたが、根での発現量に変化はみられなかった (Fig. 21)。この結果から、青枯病菌接種による全身的な *LjGlu1* の誘導は起こらず、根粒着生にも影響しないと考えられた。Split-root system を用いて根粒菌による *LjGlu1* の発現を調べた実験で、最も *LjGlu1* が全身的に高く誘導された時間が菌接種 7 日後であったため、青枯病菌による実験系も接種 7 日後のタイミングで行った。青枯病菌接種 1 日後のタイミングでは *LjGlu1*, *CHS*, *Class 1 chitinase* すべての遺伝子は誘導された (Fig. 22A, B, C)。このことから青枯病菌による *LjGlu1* は早い段階で誘導され、根粒菌による誘導と異なることが示された (Fig. 6, 22A)。植物ホルモンであるサリチル酸は、全身獲得抵抗性で重要な役割を果たしている。サリチル酸水酸化酵素遺伝子(*NahG*)を導入することによって内生サリチル酸量が低下したミヤコグサやタルウマゴヤシでは根粒形成が促進されることが示された (Stacey et al. 2006)。根粒着生の制御に植物病原応答が関係している可能性を調べるために、サリチル酸による *LjGlu1* の発現応答など、さらに検討する必要がある。

第5章 : LjGlu1 の生理活性と根系における所在

5-1 序論

LjGlu1 のアミノ酸配列相同性検索の結果, *Sesbania rostrata* の β -1,3-glucanase と 75%, *Medicago truncatula* の β -1,3-glucanase と 73%, *Glycine max* の β -1,3-glucanase と 72%, *Glycine soja* の β -1,3-glucanase と 73%, *Cicer arietinum* と 71% と他の様々なマメ科植物の β -1,3-glucanase と高い相同性を示した。このことから, LjGlu1 は β -1,3-glucanase であることが予測された。 β -1,3-glucanase は PR タンパク質 (pathogenesis-related proteins) の 1 種であり, 真菌類に特徴的な細胞壁構成多糖の一種である β -1,3-gulcan を加水分解によって選択的に切断する (Gerhard and Frederick 1999)。LjGlu1 が β -1,3-glucanase であれば, β -1,3-gulcan を加水分解する endo- β -1,3-glucanase 活性を持つことが想定された。トマトの β -1,3-glucanase は 1 から 23 番目のアミノ残基がシグナルペプチドで, 細胞外へ分泌されることが分かっているため, LjGlu1 のアミノ酸配列とトマトの β -1,3-glucanase のアミノ酸配列を比較した。その結果, 相同性は 52% であり, トマトの β -1,3-glucanase の活性中心が LjGlu1 にも保存されていた。次に, LjGlu1 のアミノ酸配列を signalP と WOLFPSORT で解析した。その結果, LjGlu1 は 1~21 アミノ残基がシグナルペプチドで細胞外へ分泌されるという予測結果が得られた。トマトの β -1,3-glucanase のシグナルペプチドと比較すると, 約 20 アミノ残基と同じくらいの長さで, 切断される位置のアミノ酸(A と Q)が一致していた。これらの結果から, LjGlu1 は分泌性の β -1,3-glucanase である可能性が示された。LjGlu1 は根粒着生を抑制することが示されたが, マメ科植物と根粒菌共生過程のどこに作用するのか分かっていない。LjGlu1 が防御応答遺伝子として働くとすれば, 感染糸形成などの共生初期段階に作用する可能性が考えられた。本章では LjGlu1 の endo- β -1,3-glucanase 活性の有無を調べるために大腸菌にて組換え LjGlu1 を生産し endo- β -1,3-glucanase 活性の検出を試みた。また, LjGlu1 の根系における所在

を調べるために、LjGlu1-mOrange を恒常的に発現する形質転換毛状根を作出し、共焦点レーザー顕微鏡によって LjGlu1 の所在を検討した。組換え LjGlu1 を大量に得るのは難しいため、*Trichoderma* 由来の標品 β -1,3-glucanase タンパク質を使用し、 β -1,3-glucanase 活性が感染糸形成や根粒形成に及ぼす影響を調べた。

5-2 方法

5-2-1 生物材料

植物は *Lotus japonicus* Miyakojima MG-20 (Kawaguchi 2000) を使用し、根粒菌は *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株 (Kaneko et al. 2000) と赤色蛍光タンパク質遺伝子を含む *M. loti* DsRed (Maekawa et al. 2009) を使用した。形質転換毛状根作出には *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 (Offringa et al. 1986) を使用した。また、組換えタンパク質生産用の大腸菌として *Escherichia coli* Origami (Novagen) を使用した。

5-2-2 プラスミドの構築と形質転換体の作製

GST-LjGlu1 発現プラスミドを構築するために、かずさ DNA 研究所 (<http://www.kazusa.or.jp/>) から分譲を受けた *LjGlu1* の cDNA を鋳型として、*LjGlu1* の開始コドン部位に *EcoRI* サイトを付加したプライマー (5'-TTCGAAAATGACTA CTATATTGCTGCTT-3') と、終始コドン部位に *Xho I* サイトを付加したプライマー (5'-TTCCTCGAGTCAATTGAAATTGATCTGGTAC-3') を用いて、PCR (98°C- 30sec の後、98°C- 10sec, 55°C- 15sec, 68°C- 1.5 min を 20 cycles, 68°C- 10 min) で増幅した。その PCR 産物を精製し、*EcoRI* と *Xho I* の制限酵素で処理したものと、同じ制限酵素で処理した pGEX-4T-3 とを、ライゲーション反応で連結することによって、pGEX-4T-3 (GE Healthcare) のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (*GST*) 遺伝子の下流の制限酵素サイトに *LjGlu1* を挿入し、*GST-LjGlu1* 融合遺伝子の発現プラスミドを構築した。pGEX-4T-3 への *LjGlu1* の挿入を確認するために、構築した発現プラスミドを *EcoRI* と *XhoI* の制限酵素で処理して電気泳動した。その後、発現プラスミドの塩基配列を解析し、*LjGlu1* が正しい位置に挿入されている事と、変異が生じていない事を確認した。その発現プラスミドを *E. coli* Origami へ形質転換し、得られた形質転換体を *E. coli* Origami (pGEX-4T-3/*LjGlu1*) とした。ベクターコントロールは、pGEX-4T-3 を *E. coli* Origami に

形質転換した *E. coli* Origami (pGEX-4T-3)を使用した。

ミヤコグサの形質転換毛状根を作出するためのプラスミドを構築するために、*LjGlu1* の cDNA を鋳型として、インフュージョン反応用に設計したプライマーセット (5'-GTGATTACAGTCTAGATGACTACTATATTGCTGCTTTTT-3, 5'-GCCCTTGCTCACCATATTGAAATTGA TCTGGTACTTA-3') で PCR (96°C- 5 min の後, 96°C- 30sec, 49°C- 15sec, 72°C- 1.5 min を 20 cycles, 72°C- 5 min)した。次に *mOrange* を鋳型として、インフュージョン反応用に設計したプライマーセット (5'-CAGATCAATTTCAATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGAATA-3', 5'-CGATGGCGCGCCTAGCTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3') を用いて PCR(96°C- 5 min の後, 96°C- 30sec, 50°C- 15sec, 72°C- 1.5 min を 20 cycles, 72°C- 5 min)した。PCR 産物の *LjGlu1* と *mOrange* を binary vector pUB-GFP (Maekawa et al. 2008, DDBJ のアセションナンバーAB303068) と infusion 反応させ、pUB-GFP のユビキチンプロモーターの下流に *LjGlu1-mOrange* を挿入したプラスミドを構築した。pUB-GFP への *LjGlu1* と *mOrange* の挿入を確認するために、構築したプラスミドを *EcoRV* で処理して電気泳動した。その後、プラスミドの塩基配列を解析し、*LjGlu1* と *mOrange* が正しい位置に挿入されている事と、変異が生じていない事を確認した。そのプラスミドを *A. rhizogenes* LBA1334 へ形質転換し、得られた形質転換体を *A. rhizogenes* (pUB-GFP/*LjGlu1-mOrange*) とした。ベクターコントロールは、*A. rhizogenes* (pUB-GFP/*mOrange*)を使用した。

5-2-3 組換えタンパク質の精製

発現誘導した *E. coli* Origami (pGEX-4T-3/*LjGlu1*)の培養液全量を 50 mL 遠心チューブに移し、10,000 × g 10 min 4°Cで遠心して菌体を回収した。その後、2 mL の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)に菌体を懸濁し、超音波破砕機 (三井電気精機株式会社, UX-050)で菌体を破砕した。菌体破砕液を 1.5 mL 容チューブへ 1 mL ずつ分注し、12,000 × g 10

min 4°Cで遠心して上清を回収し、粗精製物とした。

Glutathione sepharose 4B beads (Protenova) の容器をよく振って、中の溶液を再懸濁した。250 μ L の Glutathione sepharose 4B beads をチューブに移し、500 \times g で 5 min 遠心した後、上清を除いた。その後、1000 μ L の binding buffer (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄)で3回リンスした。リンスした beads に粗精製物を加え、室温で 30 min インキュベートした。500 \times g で 5 min 遠心後、上清を捨てた。beads を 1000 μ L の binding buffer で3回リンスした。125 μ L の elution buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0)を加え、室温で 10 min インキュベートした後、500 \times g で 5 min 遠心して、上清を回収した。再び 125 μ L の elution buffer を加えて、計3回抽出操作した。

Elution buffer で抽出した組換えタンパク質溶液を Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター (MILLIPORE)に加え、12000 \times g 30 min 遠心し、濃縮した。この操作を繰り返し行い、組換えタンパク質溶液全量を濃縮した。GST-LjGlu1 組換えタンパク質の精製を確認するために濃縮したタンパク質溶液 1 μ L を SDS-PAGE で解析した。

発現誘導後の *E. coli* BL21 (pGEX-4T-3)も、*E. coli* Origami (pGEX-4T-3/LjGlu1)と同様の操作をして GST 組換えタンパク質を精製した。

5-2-4 組換えタンパク質の定量

濃縮したタンパク質は、マイクロ吸光蛍光光度計(マルコム, e-spect)で 280 nm の吸収を測定した。

5-2-5 組換えタンパク質の endo- β -1,3-glucanase 活性の測定

組換えタンパク質の endo- β -1,3-glucanase 活性の測定は、1,3-BETA-GLUCAZYME TABLETS (MEGAZYME) を使用した。このタブレットは、色素標識した β -グルカンカ

ら構成されており、水に水和するが不溶性である。しかし、endo- β -1,3-glucanase による加水分解で、色素標識した水溶性の糖鎖の断片が生じる。この遊離した色素断片を 590 nm の吸収で検出することで、酵素活性を測定する事ができる。濃縮した組換えタンパク質溶液を 200 mM 酢酸ナトリウム buffer (pH 4.22) で希釈し、140 μ g/mL, 70 μ g/mL, 14 μ g/mL の GST-LjGlu1 組換えタンパク質溶液を 1 mL ずつ調製した。この溶液を 30°C で 5 min インキュベートした後に、活性測定用のタブレットを加えて室温で 1 日反応させた。反応後の溶液を Amicon ULTRAFREE-MC 遠心式ろ過フィルター (MILLIPORE) で遠心ろ過し、590 nm の吸光度を測定した。コントロールとして GST 組換えタンパク質を使用して、同様に活性を測定した。

5-2-6 根粒切片の作製

根粒着生している植物の根をハサミで切除し、ガラスシャーレに移した。5% 寒天培地を注ぎ、氷上で 30 分以上インキュベートして固定した。マイクロスライサー DTK-1000 (堂阪イーエム)を使用して 50 μ m の厚さで切片を作製した。

5-2-7 共焦点レーザー顕微鏡による形質転換毛状根の観察

形質転換毛状根に Fåhraeus 培地上で根粒菌を接種し、7 日後に共焦点レーザー顕微鏡 A1Si-90i (Nikon) を使用して観察した。mOrange の励起波長は 542 nm で蛍光波長は 562 nm であり、青、緑、赤など一般的な蛍光を観察する方法とは異なるため、マニュアルで設定を行った。スペクトルディテクター (SD) からマニュアルモードを選択し、レーザーを 543.5 nm を使用し、mOrange の蛍光波長 562 nm を含むように取得する波長帯域を 540 nm ~650 nm に設定した。レーザーを直接検出してしまうチャンネルを Binning/Skip のチャンネルスキップによって検出しないように設定した。1stDM は BS20/80 または 405/488/543/640 に設定した。透過光の画像も取得するために Transmitted

Detector を追加した。レーザーを照射し、良いイメージになるまでレーザー強度、感度 (HV)、ピンホールを最適な値に調節した。サンプルの蛍光強度が弱いときには Scan setting から Scan Speed を下げて観察を行った。画像を取得するときには Scan setting から Average (Count 8 または 16) をかけ、鮮明な画像を得られるようにした。画像ファイルは観察を行った条件がすべて確認できる ND2 ファイル形式で保存した。Spectral Unmixing Setting から Element に mOrange を追加し、Unmixing を行うことで、設定した波長帯域 540 nm~650 nm のイメージがすべて重なっている画像から mOrange だけの画像を分離した。画像は NIS-Elements software (Nikon) を使用した。

5-2-8 標品 β -1,3-glucanases による感染糸形成及び根粒形成への影響

標品 endo- β -1,3-glucanase (derived from *Trichoderma*; Megazyme, Wicklow, Ireland) は塩析のため硫酸アンモニウムが含まれており、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit 3 K (Merck KGaA) を使用し、硫酸アンモニウムを取り除いた。その後 β -1,3-glucanase は 100 mU/ mL になるように水で希釈した。播種 3 日後の野生株と *har1-7* 変異体に 50 μ L の *M. loti* DsRed (1×10^7 cells/ mL) と 50 μ L の β -1,3-glucanase (100 mU/ mL) を混合接種し、1 週間育てた。1 週間生育している間に 50 μ L の β -1,3-glucanase (100 mU /mL) を 2 日おきに 2 回接種した。菌接種 7 日後に蛍光顕微鏡で、感染糸数および皮層まで発達して伸びている感染糸数をカウントした。根粒形成については、混合接種後、50 μ L の β -1,3-glucanase (100 mU/mL) を 4 日おきに接種した。菌接種後 7 日ごとに 28 日後まで根粒数を計測した。コントロールは水を使用した。

5-3 結果

5-3-1 組換え LjGlu1 の β -1,3-glucanase 活性の有無

LjGlu1 は β -1,3-glucanases 遺伝子と予測されたが、その遺伝子産物に β -1,3-glucanases 活性があるかどうかは未検討であった。そこで、大腸菌にて組換え LjGlu1 を生産して β -1,3-Glucanases 活性の検出を試みた。1,3-BETA-GLUCAZYME TABLET を使用して、組換えタンパク質の endo- β -1,3-glucanase 活性を測定した結果、GST-LjGlu1 組換えタンパク質は濃依存的に endo- β -1,3-glucanase 活性を示した(Fig. 23)。一方、GST では、活性が検出されなかった (Fig. 23)。*Trichoderma* 由来の標品 β -1,3-glucanases の活性は 20 U/mg protein であり、LjGlu1 の酵素活性量は 0.1 mU/mg protein と非常に低かった (data not shown)。

5-3-2 根と根粒における LjGlu1 の所在

ミヤコグサの根の組織での LjGlu1 の遺伝子産物の所在部位を検討するために、ユビキチンプロモーターの下流に LjGlu1 cDNA と蛍光タンパク質 mOrange の融合遺伝子を挿入したプラスミド(pUB-GFP/LjGlu1-mOrange) を構築し、そのプラスミドを導入した *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 をミヤコグサに接種し、LjGlu1-mOrange を恒常的に発現する形質転換毛状根を得た。形質転換毛状根を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、LjGlu1-mOrange の形質転換毛状根では根の組織の細胞間隙に蛍光シグナルが検出された (Fig. 24A)。mOrange の形質転換毛状根では核と細胞質で蛍光シグナルが検出された (Fig. 24B)。根粒菌接種と非接種での LjGlu1 の所在に変化はみられなかった (Fig. 24A, B)。根粒菌接種 7 日後の LjGlu1-mOrange の形質転換毛状根では、根毛周辺の根粒菌のコロニーと LjGlu1-mOrange の所在部位が重なってる様子が観察された (Fig. 24C)。対照的に、根粒菌を接種していない形質転換毛状根では、LjGlu1-mOrange は根毛内部に所在していた (Fig. 24C)。このことから LjGlu1 タンパク質は根の組織から外へ分泌され菌に直接作用している可能性が示唆された。次に、根粒菌接種 28 日後

の根粒内の LjGlu1-mOrange の所在を観察したところ、根粒内の細胞間隙に所在していた (Fig. 25B, C)。signalP と WOLFPSORT1 などの予測ソフトで LjGlu1 を調べた結果、LjGlu1 はシグナルペプチドを有し、細胞外に分泌される分泌性の β -1,3-glucanases である可能性が高いことが示された。この予測と観察された所在パターンは一致した。

5-3-3 β -1,3-glucanase が根粒形成や感染糸形成に及ぼす影響

感染糸形成は、根粒菌の宿主植物への侵入に必要な重要なステップである。そこで、*Trichoderma* 由来の標品 β -1,3-glucanase タンパク質が感染糸数に及ぼす影響について検討した。播種 3 日後の芽生えに、赤色蛍光タンパク質でラベルした *M. loti* (DsRed) と標品 β -1,3-glucanase の混合接種を行った。混合接種 7 日後に蛍光顕微鏡で観察し、感染糸の数をカウントした。その結果、野生株と *har1* 変異体ともに感染糸数は有意に減少した (Fig. 26A)。標品 β -1,3-glucanase 処理なしの条件では、野生株と *har1* 変異体の感染糸数に有意差はなかった (Fig. 26A)。根の皮層まで発達している感染糸数を根全体の感染糸数で割った値を感染成功率とした。野生株と比較して *har1* 変異体では感染成功率が高かった (Fig. 26B)。また、標品 β -1,3-glucanase 処理した *har1* 変異体で感染成功率は減少した (Fig. 26B)。次に、標品 β -1,3-glucanase 処理による根粒着生数への影響について検討した。播種 3 日後の芽生えに、赤色蛍光タンパク質でラベルした *M. loti* (DsRed) と標品 β -1,3-glucanase の混合接種を行った後、7 日毎に 28 日後まで根粒数を計測した。その結果、標品 β -1,3-glucanase 処理によって根粒数の減少傾向が示された (Fig. 26C)。

5-4 考察

組換え LjGlu1 の β -1,3-glucanase 活性の有無を検討したところ、非常に低い活性ではあるが endo- β -1,3-glucanase 活性をもつことが示された (Fig. 23)。活性が低い理由として、精製・濃縮した GST-LjGlu1 組換えタンパク質は不純物も含んでいる可能性があり、不純物が組換え LjGlu1 の酵素活性を阻害している可能性が考えられた。また、組換え

LjGlu1 は GST との融合タンパク質の状態にあるため、本来の活性の強さではなかった可能性が考えられる。

mOrange 及び LjGlu1-mOrange を恒常的に発現する形質転換毛状根を作出し、形質転換毛状根を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、mOrange の形質転換毛状根では核と細胞質で蛍光シグナルが検出された (Fig. 24B)。一般的に、蛍光タンパク質のみを植物細胞で発現させると核と細胞質に局在することが分かっており (Yamaguchi et al. 2005), この報告と一致する。LjGlu1-mOrange の形質転換毛状根では根の組織の細胞間隙に蛍光シグナルが検出された (Fig. 24A)。分泌性のタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質は、細胞外へ分泌され細胞間隙に局在することが報告されている (Hirai et al. 2010)。LjGlu1-mOrange の形質転換毛状根では、根毛周辺の根粒菌のコロニーから高い蛍光シグナルがみられたのに対して、mOrange の形質転換毛状根ではみられなかった (Fig. 24C, D)。これら観察された結果と予測ソフトの結果との一致から、LjGlu1 は分泌性の β -1,3-glucanase である可能性が高いことが示唆された。また、LjGlu1 は根組織から分泌され菌に直接作用している可能性が考えられた。*Trichoderma* 由来の β -1,3-glucanases の投与によって、感染糸形成や感染糸の発達が阻害されていた。また、根粒数も減少傾向が示された。この結果から、 β -1,3-glucanase によって根粒菌の感染が阻害され、その結果、根粒数の減少につながったことが示唆された。しかしながら、 β -1,3-glucanase がどのように感染糸形成を阻害するのか不明である。組換え LjGlu1 や *Trichoderma* 由来の β -1,3-glucanase は根粒菌に抗菌活性を示さないことから、LjGlu1 の感染糸形成の抑制は抗菌活性によるものではないことが分かっている。カビなどの真菌類は細胞壁構成成分に多くの β -1,3-glucan を含んでおり、 β -1,3-glucanase によって菌糸の細胞壁が溶解し、菌の生育が阻害される。このように LjGlu1 が作用する基質が分かれば、作用メカニズムについても明らかになることが予想される。表層多糖 exopolysaccharide (EPS) は根粒菌に普遍的に存在しており、EPS に変異をもつ根粒菌の研

究から、EPS は感染糸形成の開始や感染糸の発達に必要であることが報告されている (Cheng and Walker 1998; Kelly et al. 2013; Laus et al. 2004; Pellock et al. 2000; Stuurman et al. 2000)。また、最近の論文から *M. loti* R7A 株の EPS には β -1,3 結合があることが報告されている (Kawaharada et al. 2015)。*M. loti* R7A の変異体は低分子の EPS を生産することが予想されており、それが感染糸の発達阻害やサイズの小さい無効根粒を誘導することが報告されている (Kelly et al. 2013)。もし、LjGlu1 が EPS を切断し、低分子の EPS が生産されるとすれば、それがエリシターとなって植物の病原応答を誘導し、感染糸の発達が阻害される可能性があることが予想された (Fig. 28)。LjGlu1 の機能を明らかにするために、共生における LjGlu1 の基質の同定など更なる研究が必要である。

第 6 章 総括

本研究では、植物ホルモンの ABA や ABA に応答するミヤコグサの病原抵抗性遺伝子 β -1,3-glucanase (*LjGlu1*) に注目し、根粒着生の制御機構との関係やその機能について検討した。ABA は、共生の初期応答である根毛変形(curling)の抑制や感染糸形成を阻害することが示された(Fig. 1, 2)。Split-root system を用いた解析により、ABA による根粒着生阻害は根での局所的なものであり、ABA は全身的な制御に関与するシグナル分子そのものではないことや、根粒菌の接種に応答して宿主植物の根組織で合成される可能性が考えられた (Fig. 3, 4)。 *LjGlu1*-RNAi による *LjGlu1* の発現抑制は根粒数を増加させること (Fig. 5)、AON による根粒着生の抑制シグナルが伝達される時期は根での *LjGlu1* の発現が上昇すること (Fig. 6)、 *LjCLE-RS1* の過剰発現により *LjGlu1* の発現が誘導されること (Fig. 7)、根粒菌による *LjGlu1* 発現誘導が *har1* 変異体ではおこらないこと (Fig. 8) から、 *LjGlu1* は AON による根粒着生の制御に関係している可能性があり、 *LjCLE-RS1* や *HAR1* の下流で機能している可能性が示唆された。また、地上部の *HAR1* から根への根粒着生抑制シグナルが伝達されても、根での ABA 量は上昇しないことから(Sasaki et al. 2014)、 *LjGlu1* 遺伝子の発現は、 *HAR1* の下流で根粒着生の制御シグナルの調節を受ける系と、ABA によって調節される 2 つの異なる系で調節される可能性が考えられた。 *LjGlu1* の発現は、根粒着生の抑制に関係するエチレン (Fig. 10)、サイトカイニン (Fig. 14)、硝酸カリウム(Fig. 16)、植物病原菌の接種 (Fig. 22) などに応答することが示された。サイトカイニンは AON の地上部由来の根粒着生制御シグナルの候補であることから (Sasaki et al. 2014)、 *LjGlu1* が AON に関わっている可能性を支持する。また、エチレンは、AON とは独立した経路で根粒着生の制御に関わっている可能性が考えられていることから (Lohar et al. 2009)、 *LjGlu1* は AON 以外の根粒着生を制御する経路にも関係していることが考えられた。組換え *LjGlu1* は endo- β -1,3-glucanase 活性を持つことが示された (Fig. 23)。signalP と WOLFPSORT1 などのソフトによる予測や *LjGlu1*-mOrange

を恒常的に発現する形質転換毛状根での LjGlu1 の所在の観察から、LjGlu1 は分泌性の β -1,3-glucanase であることが示された (Fig. 24, 25)。Trichoderma 由来の β -1,3-glucanase の接種は感染糸の形成や発達を抑制し、その結果、根粒数が減少する可能性が示された (Fig. 26)。根粒菌の EPS は、感染糸形成の開始や感染糸の発達に必要であるという報告 (Cheng and Walker 1998; Kelly et al. 2013; Laus et al. 2004; Pellock et al. 2000; Stuurman et al. 2000), M. loti R7A 株の EPS には β -1,3 結合があるという報告 (Kawaharada et al. 2015), 低分子化された EPS が植物の病原応答を誘導し、感染糸の発達が阻害されるという考察 (Kelly et al. 2013)。を考慮すると、LjGlu1 が EPS を基質として切断すれば、低分子の EPS が生産され、それがエリシターとして植物の病原応答を誘導し、感染糸の発達が阻害される可能性が予想される。以上、これまでの知見に本研究の結果を統合すると、LjGlu1 は AON による根粒着生の制御に関係している可能性があり、LjCLE-RS1 や HARI の下流でサイトカニンなどの地上部由来の制御シグナルを受けて根で誘導され、機能することが考えられる。また、ABA やエチレンなど、AON と独立した根粒着生の制御経路にも応答して機能することも考えられる。LjGlu1 は、根組織から分泌され、根の周囲に存在する根粒菌の表層多糖 (EPS) に作用する。LjGlu1 の endo- β -1,3-glucanase 活性により生産された低分子の EPS が宿主植物にエリシターとして認識され植物病原応答が誘導される。その結果、根粒菌感染 (感染糸形成や感染糸の発達) が阻害されることにより、根粒着生が抑制されるというモデルを考えた (Fig. 27, 28)。LjGlu1 の機能を明らかにするためには、LjGlu1 の基質の同定、EPS およびその分解産物による植物防御応答の誘導の確認、さらには、防御応答と根粒着生制御機能との関係などを検討する必要がある。

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，阿部 美紀子 名誉教授，九町 健一 准教授，佐賀大学農学部 鈴木 章弘 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，鹿児島大学同上の塔筋 弘章 准教授，濱田 季之 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に用いた，*har1-7* 変異体と *LjCLE-RS1* の過剰発現コンストラクトを提供してくださった基礎生物学研究所の川口 正代司 教授に感謝申し上げます。

本研究における議論，検討にあたり，御教示並びに御激励を賜りました，鹿児島大学名誉教授 東 四郎 博士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みなさまに感謝申し上げます。

参考文献

- Bhuvaneswari TV, Turgeon BG, Bauer WD** (1980) Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum*: I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.* 66:1027–31
- Biswas B, Chan PK, Gresshoff PM** (2009) A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol Plant* 2:487-499
- Boccardo G, Candresse T** (2005) Complete sequence of the RNA2 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. *J Arch Virol* 150:403–405
- Broughton WJ, Dilworth MJ** (1971) Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125: 1075–1080
- Caetano-Anolles G, Bauer WD** (1988) Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Planta* 175:546–557
- Caetano-Anolles G, Gresshoff PM** (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol* 45:345–382
- Carroll BJ, McNeil, DL and Gresshoff, PM** (1985) A Supernodulation and Nitrate-Tolerant Symbiotic (nts) Soybean Mutant. *Plant Physiol* 78:34-40
- Catford JG , Staehelin C, Lerat S, Piché Y, Vierheilig H** (2003) Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *J Exp Bot* 54:1481-1487
- Chandler P.M. and Robertson M** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 113-141
- Cheng HP, Walker GC** (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of

- infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 180:5183–5191
- Cho MJ, Harper JE** (1991) Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation in split-root systems of wild-type and nodulation-mutant soybean plants. Plant Physiol 95:1106-1112
- Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM** (1993) CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. Development 119:397-418
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. Cell 89:575-585
- Delves AC, Mathews A, Day DA, Carter AS, Carroll BJ, and Gresshoff PM** (1986) Regulation of the soybean-*Rhizobium* nodule symbiosis by shoot and root factors. Plant Physiol 82:588–590
- DeYoung BJ, Clark SE** (2001) Signaling through the CLAVATA1 receptor complex. Plant Mol Biol 46:505-513
- Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM and Oldroyd GE** (2008) Abscisic acid coordinates Nod Factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Cell 20:2681-2695.
- Fåhraeus GM** (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. J Gen Microbiol 16:374–381
- Ferguson BJ, Mathesius U** (2003) Signaling interactions during nodule development. J Plant Growth Regul 22:47-72
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. J Integr Plant Biol 52:61–76

- Ferguson BJ, Li D, Hastwell AH, Reid DE, Li Y, Jackson SA, Gresshoff PM** (2014a) The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnol J* 12:1085-1097
- Ferguson BJ, Mathesius U** (2014b) Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *J Chem Ecol* 40:770-790
- Geil RD , Peterson LR, Guinel FC** (2001) Morphological alterations of pea (*Pisum sativum cv. Sparkle*) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* 11:137-143
- George ML, Robert FM** (1991) Autoregulatory response of *Phaseolus vulgaris L.* to symbiotic mutants of *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli*. *Appl Environ Microbiol* 57:2687-2692
- Gerhard LM, Frederick M Jr** (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*, 3rd edn. Boca Raton, Florida, pp 49–76
- Gresshoff PM, Lohar D, Chan PK, Biswas B, Jiang Q, Reid D, Ferguson BJ, Stacey G** (2009) Genetic analysis of ethylene regulation of legume nodulation. *Plant Signal Behav* 4:818-823
- Heckmann AB, Sandal N, Bek AS, Madsen LH, Jurkiewicz A, Nielsen MW, Tirichine L and Stougaard J** (2011) Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1385-1395
- Heil M, Ton J** (2008) Long-distance signaling in plant defence. *Trends Plant Sci* 13:264-272
- Higashi S, Abe M** (1980) Promotion of infection thread formation by substances from *Rhizobium*. *Appl Environ Microbiol* 39:297-301

- Hirai T, Sato M, Toyooka K, Sun HJ, Yano M, Ezura H** (2010) Miraculin, a taste-modifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. *J Plant Physiol* 167:209-2015
- Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG and Bisseling T** (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1244-1248
- 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 S, 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 Res* 7:331–338
- Kassaw T, Bridges Jr. W, Frugoli J** (2015) Multiple Autoregulation of Nodulation (AON) Signals Identified through Split Root Analysis of *Medicago truncatula sunn* and *rdn1* Mutants. *Plants* 4:209-224
- Kawaguchi M** (2000) *Lotus japonicus* ‘Miyakojima’ MG-20: An early flowering accession suitable for indoor handling. *J Plant Res* 113:507–509.
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjulster CT, Gysel K, Muszyński A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J** (2015) Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523:308-12
- Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N, Carlson RW, Stougaard J, Ronson CW** (2013) Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 319–29
- Kenjo T, Yamaya H, Arima Y** (2010) Shoot-synthesized nodulation-restricting substances of

wild-type soybean present in two different highperformance liquid chromatography peaks of the ethanol-soluble medium-polarity fraction. *Soil Sci Plant Nutr* 56: 399-406

Khaosaad T, Garcia-Garrido JM, Steinkellner S, Vierheilig H (2007) Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol Biochem* 39:727-34

Kinkema M and Gresshoff PM (2008) Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1337-1348

Kosslak RM, Bohlool BB (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

Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N, Stougaard J (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420: 422–426

Krusell L, Sato N, Fukuhara I, et al. (2011) The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation. *The Plant Journal* 65:861-871

Kumagai H, Kouchi H (2003) Gene silencing by expression of hairpin RNA in *Lotus japonicus* roots and root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 663–668.

Laus MC, Logman TJ, Van Brussel AA, Carlson RW, Azadi P, Gao MY, Kijne JW (2004) Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J Bacteriol* 186:6617–25

Lee KH and LaRue TA (1992) Exogenous Ethylene Inhibits Nodulation of *Pisum sativum* L. cv *Sparkle*. *Plant Physiol* 100:1759-1763

Lin YH, Ferguson BJ, Kereszt A, Gresshoff PM (2010) Suppression of hypernodulation in soybean by a leaf-extracted, NARK- and Nod factor-dependent, low molecular mass

fraction. *New Phytol* 185:1074-1086

Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM (2009) Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann Bot* 104:277–285

Maekawa T, Kusakabe M, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, Murooka Y, Hayashi M (2008) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* 21:375–382

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 J* 58:183–194

Maekawa-Yoshikawa M, Murooka Y (2009) Root hair deformation of symbiosis-deficient mutants of *Lotus japonicus* by application of Nod factor from *Mesorhizobium loti*. *Microbes Environ* 24:128-134

Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, Umehara Y, Kouchi H, Hase Y, Tanaka A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M (2009) Too much love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* 22:259-268

Miyazawa H, Oka-Kira E, Sato N, Takahashi H, Wu GJ, Sato S, Hayashi M, Betsuyaku S, Nakazono M, Tabata S, Harada K, Sawa S, Fukuda H, Kawaguchi M (2010) The receptor-like kinase KLAVIER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development* 137:4317–4325

Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'Haeseleer K, Holsters M, Goormachtig S (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol.* 135:222-237

- Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L and Szczyglowski K** (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315:101-104
- Nakagawa T and Kawaguchi M** (2006) Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Cell Physiol* 47:176-180.
- Nakatsukasa-Akune M, Yamashita K, Shimoda Y, Uchiumi T, Abe M, Aoki T, Kamizawa A, Ayabe S, Higashi S, Suzuki A** (2005) Suppression of root nodule formation by artificial expression of the *TrEnodDRI* (coat protein of *white clover cryptic virus 1*) gene in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* 18:1069–1080
- Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420:426–429
- Nukui N , Ezura H, Yuhashi K, Yasuta T, Minamisawa K** (2000) Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Cell Physiol* 41:893-897
- Nutman, PS** (1952) Physiological studies on nodule formation. III. Experiments on the excision of root-tips and nodules. *Ann Bot* 16: 79-101
- Offringa IA, Melchers LS, Regensburg-Tuink AJG, Costantino P, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ** (1986) Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing *aux* mutants by genes from the TR-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6935-6939
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y** (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319:294
- Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, Haga T, Hayashi M, Harada K, Sato S, Tabata S,**

- Shikazono N, Tanaka A, Watanabe Y, Fukuhara I, Nagata T, Kawaguchi M** (2005) klavier (*klv*), a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J* 44:505-515
- Oka-Kira E, Kawaguchi M** (2006) Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr Opin Plant Biol* 9:496–502
- Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M** (2009) Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol* 50: 67–77
- Oldroyd GE, Engstrom EM and Long SR** (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 13:1835-1849
- Olsson JE, Nakao P, Bohlool BB, Gresshoff PM** (1989) Lack of systemic suppression of nodulation in split root systems of supernodulating soybean (*Glycine max [L.] Merr.*) mutants. *Plant Physiology* 90:1347–1352.
- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC** (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* 182:4310–8
- Penmetta RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR** (2003) Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131:998-1008
- Pierce M, Bauer WD** (1983) A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. *Plant Physiol* 73:286–290
- Rautenberg F and Kuhn G** (1864) Vegetationsversuche im Sommer 1863. *Landw. Vers.-Sta.* 6:355-359
- Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM** (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol Plant Microbe Interact* 24:606-618

- Sagan M, Duc G** (1996) Sym28 and Sym29, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum L.*). *Symbiosis* 20:229-245
- Sargent L, Huang SZ, Rolfe BG, Djordjevic MA** (1987) Split-Root Assays Using *Trifolium subterraneum* Show that Rhizobium Infection Induces a Systemic Response That Can Inhibit Nodulation of Another Invasive Rhizobium Strain. *Appl Environ Microbiol* 53:1611-1619
- Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M** (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* 5: 4983
- Saur IM, Oakes M, Djordjevic MA, Imin N** (2011) Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 190: 865 874
- Schiefelbein J, Galway M, Masucci J, Ford S** (1993) Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 103:979-85
- Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G, Frugoli J** (2005) The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a *CLVI*-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol* 58:809-822
- Schnabel E, Mukherjee A, Smith L, Kassaw T, Long S, Frugoli J** (2010) The *lss* supernodulation mutant of *Medicago truncatula* reduces expression of the *SUNN* gene. *Plant Physiology* 154:1390–1402
- Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM** (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a *CLAVATA1*-like receptor kinase. *Science* 299:109-122
- Seo HS, Li J, Lee SY, Yu JW, Kim KH, Lee SH, Lee IJ, Paek NC** (2007) The hypernodulating *nts* mutation induces Jasmonate synthetic pathway in soybean leaves. *Mol*

Cells 24:185-193

Sheng C, Harper JE (1997) Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. *Plant Physiology* 113:825-831

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 J* 57: 254–263

Sieberer BJ, Ketelaar T, Esseling JJ, Emons AM (2005) Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol* 167:711-719

Skriver, K. and Mundy, J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* 2: 503-512

Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ (2006) Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 141:1473-1481

Staelin C, Xie ZP, Illana A, Vierheilig H (2011) Long-distance transport of signals during symbiosis: are nodule formation and mycorrhization autoregulated in a similar way? *Plant Signal Behav* 6: 372-377

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417:959-962

Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HR, Wijfjes AH, Bloemberg G, Spaik HP (2000) Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1163–9

- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G and Harris JM** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* 46:961-970
- Suzaki T, Yoshida A, Hirano HY** (2008) Functional diversification of CLAVATA3-related CLE proteins in meristem maintenance in rice. *Plant Cell* 20:2049-2058
- Suzaki T, Yano K, Ito M, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M** (2012) Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development* 139:3997-4006
- Suzuki A, Akune M, Kogiso M, Imagama Y, Osuki K, Uchiumi T, Higashi S, Han SY, Yoshida S, Asami T, Abe M** (2004) Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* 45:914–922
- Suzuki A, Hara H, Kinoue T, Mikiko A, Uchiumi T, Kucho K, Higashi S, Hirsch AM, Arima S** (2008a) Split-root study of autoregulation of nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *J Plant Res* 121:245–249
- Suzuki A, Yamashita K, Ishihara M, Nakahara K, Abe M, Kucho K, Uchiumi T, Higashi S, Arima S** (2008b) Enhanced symbiotic nitrogen fixation by *Lotus japonicus* containing an antisense β -1,3-glucanase gene. *Plant Biotechnol* 25:357–360
- Suzuki A, Suriyagoda L, Shigeyama T, Tominaga A, Sasaki M, Hiratsuka Y, Yoshinaga A, Arima S, Agarie S, Sakai T, Inada S, Jikumaru Y, Kamiya Y, Uchiumi T, Abe M, Hashiguchi M, Akashi R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Hirsch AM** (2011) *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16837-16842.
- Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B,**

- Dazzo FB, de Bruijn FJ** (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 684 – 697.
- Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T, Kawaguchi M** (2013) TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant Cell Physiol* 54:433–447
- Tominaga A , Nagata M, Futsuki K, Abe H, Uchiumi T, Abe M, Kucho K, Hashiguchi M, Akashi R, Hirsch AM, Arima S, Suzuki A** (2009) Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant enhanced nitrogen fixation1 of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 151:1965-1976
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, Radutoiu S, Albrektsen AS, SatoS, Asamizu E, Tabata S and Stougaard J** (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315:104-107
- Tsuchiya K, Mew, T W Wakimoto S** (1983) Bacteriological and Pathological Characteristics of Wild Types and Induced Mutants of *Xanthomonas campestris pv. oryzae*. *Phytopathology* 72:43-46
- van Noorden GE, Ross JJ, Reid JB, Rolfe BG and Mathesius U** (2006) Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula super numeric nodules* mutant. *Plant Physiol* 140:1494-1506.
- Vierheilig H, Garcia-Garrido JM, Wyss U, Piche Y** (2000a) Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol Biochem* 32:589-95.
- Vierheilig H, Maier W, Wyss U, Samson J, Strack D, Piche Y** (2000b) Cyclohexenone derivative and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic

suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *J Plant Physiol* 157:593-9

Wopereis J, Pajuelo E, Dazzo FB, Jiang Q, Gresshoff PM, de Bruijn FJ, Stougaard J,

Szczyglowski K (2000) Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *The Plant Journal* 23:97-114

Yoshida C, Funayama-Noguchi S, Kawaguchi M (2010) plenty, a novel hypernodulation mutant in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 51:1425-1435

Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M, Yamamoto Y, Osawa H, Ahn SJ, Matsumoto H

(2005) Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant Cell Physiol* 46:812-816

Yamaya H and Arima Y (2004) Establishment of a method enabling continuous liquid-introduction into apoplast of soybean-plantlet leaf, and its application to elucidating supernodulating-trait of NOD1-3. *Jan J Soil Sci Plant Nutr* 75: 685-691

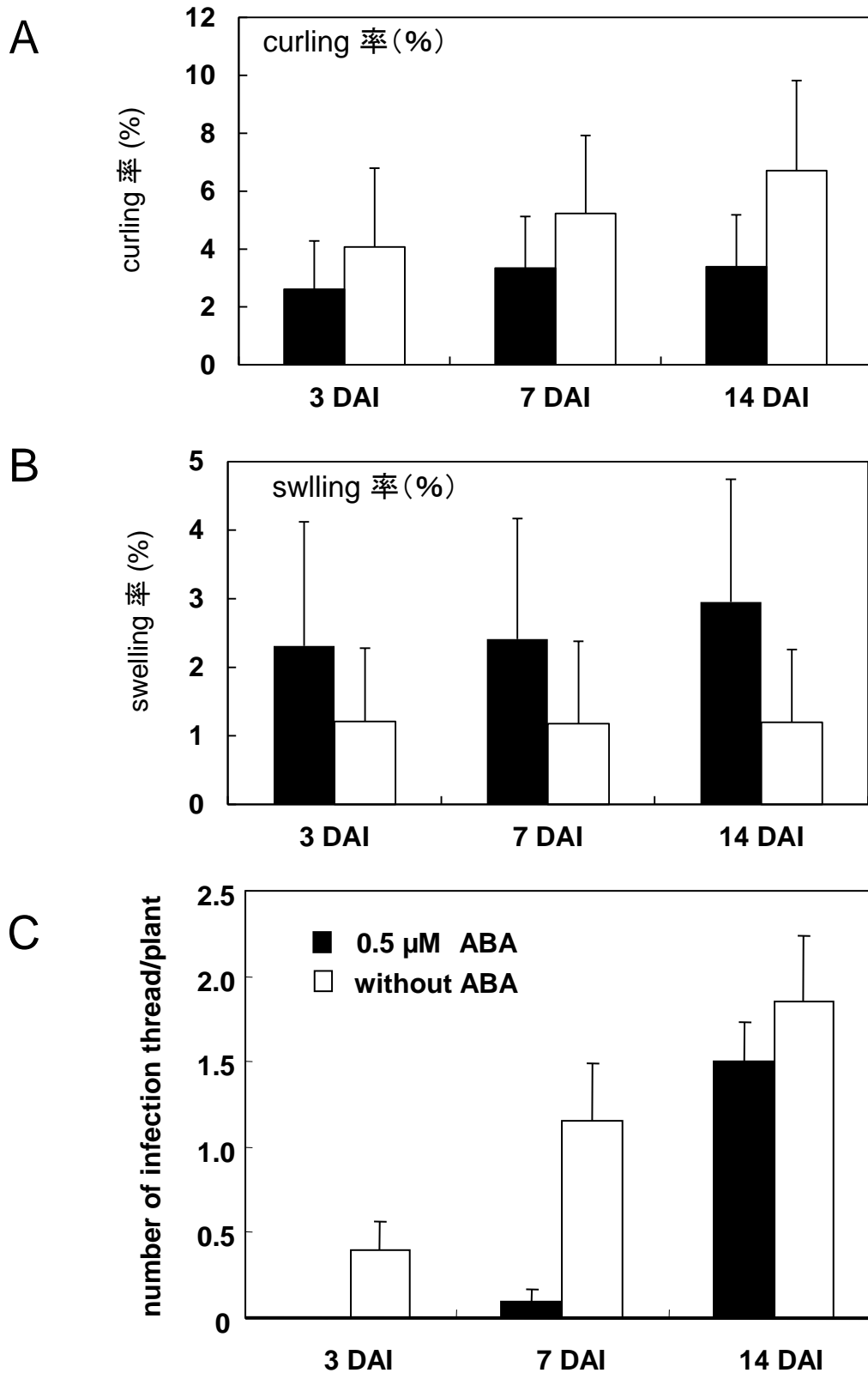


Fig. 1 クローバにおけるABAによる根毛変形と感染系数への影響

ABAによる根毛変形、感染系数に及ぼす影響について根粒菌接種3日後、7日後、14日後で計測した。(Days after inoculation: DAI) A curlingしている根毛変形の割合 B swellingしている根毛変形の割合 C 感染系数を示す。■ 0.5 μM ABA添加 □ ABA添加なし error barsは標準誤差を示す。

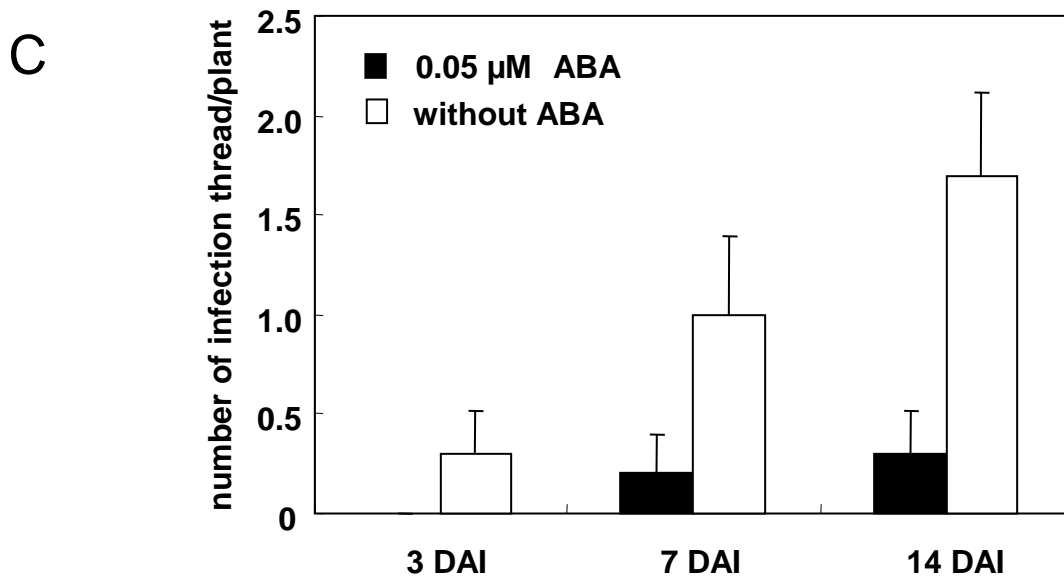
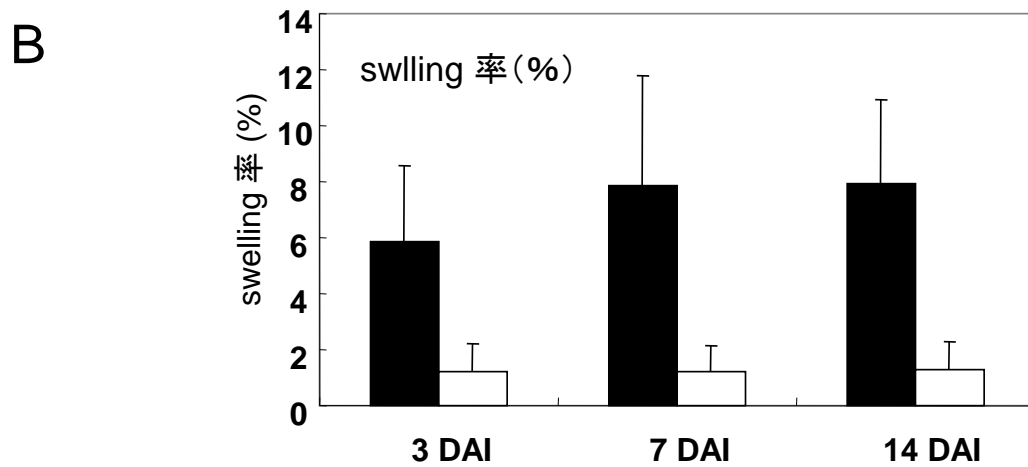
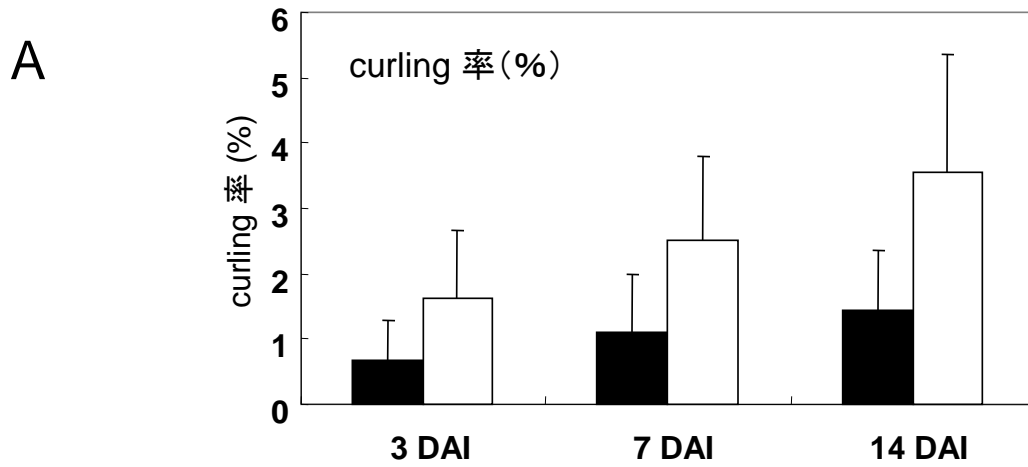


Fig. 2 ミヤコグサにおけるABAによる根毛変形と感染系数への影響

ABAによる根毛変形、感染系数に及ぼす影響について根粒菌接種3日後、7日後、14日後で計測した。(Days after inoculation: DAI) A curlingしている根毛変形の割合 B swellingしている根毛変形の割合 C 感染系数を示す。■ 0.05 μ M ABA添加 □ ABA添加なし error barsは標準誤差を示す。

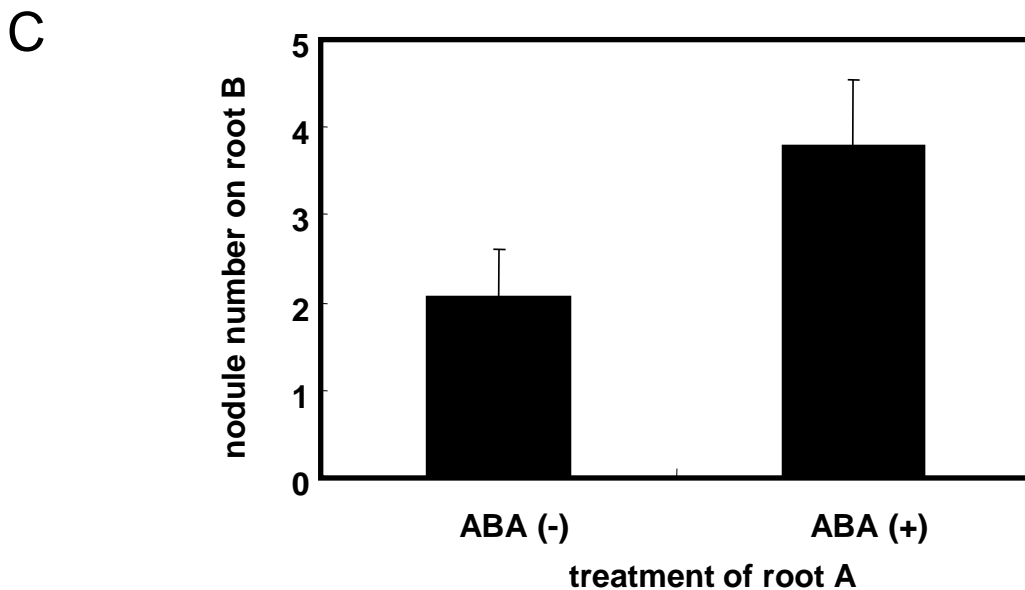
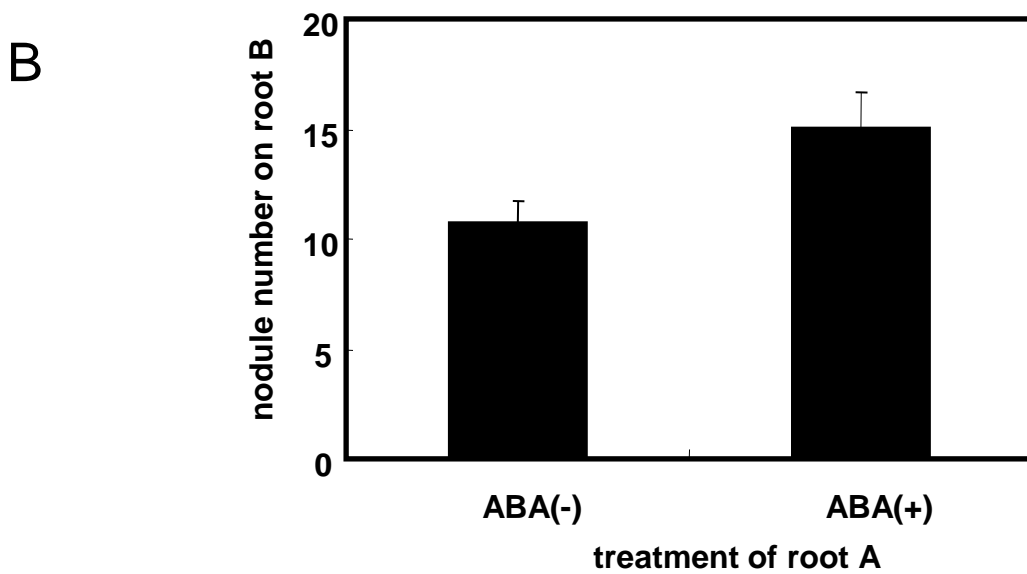
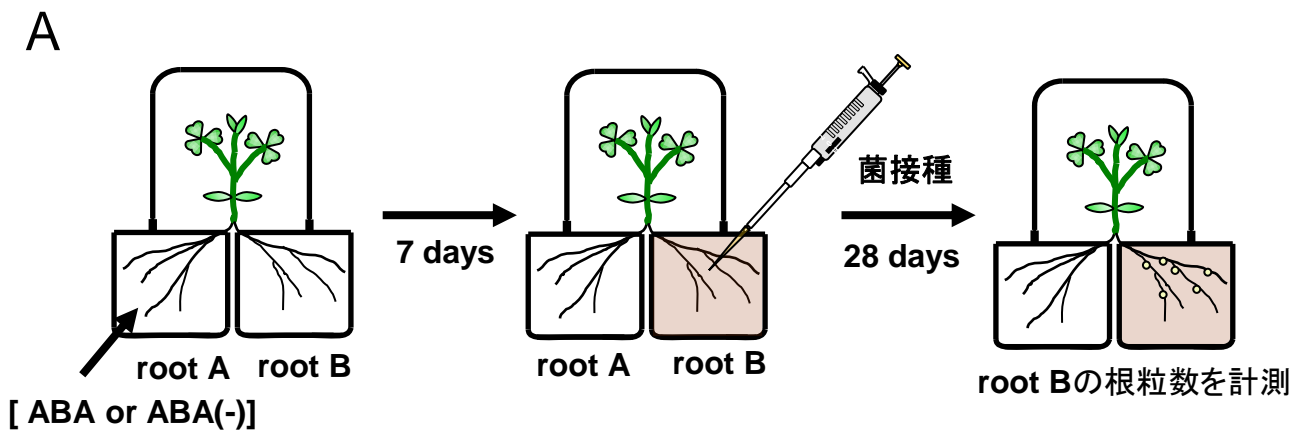


Fig. 3 split-root systemによるABAの全身的な根粒着生数への影響

Split-root systemのroot AのABAがroot Bの根粒着生数に及ぼす影響について根粒菌接種28日後に計測した。A 実験過程の概略図 B クローバでroot AにABA添加あり、なしによるroot Bの根粒着生数 C ミヤコグサでroot AにABA添加あり、なしによるroot Bの根粒着生数 error barsは標準誤差を示す。

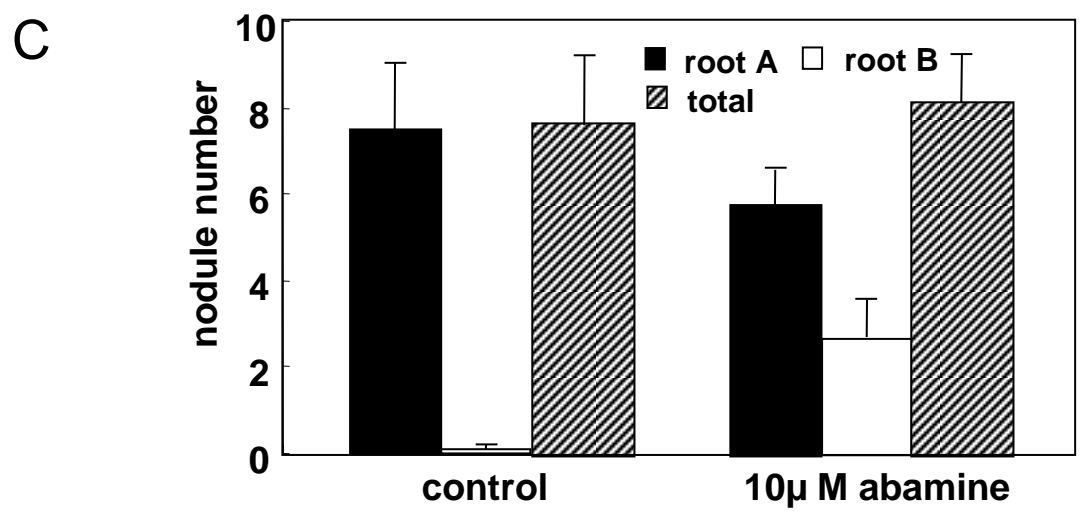
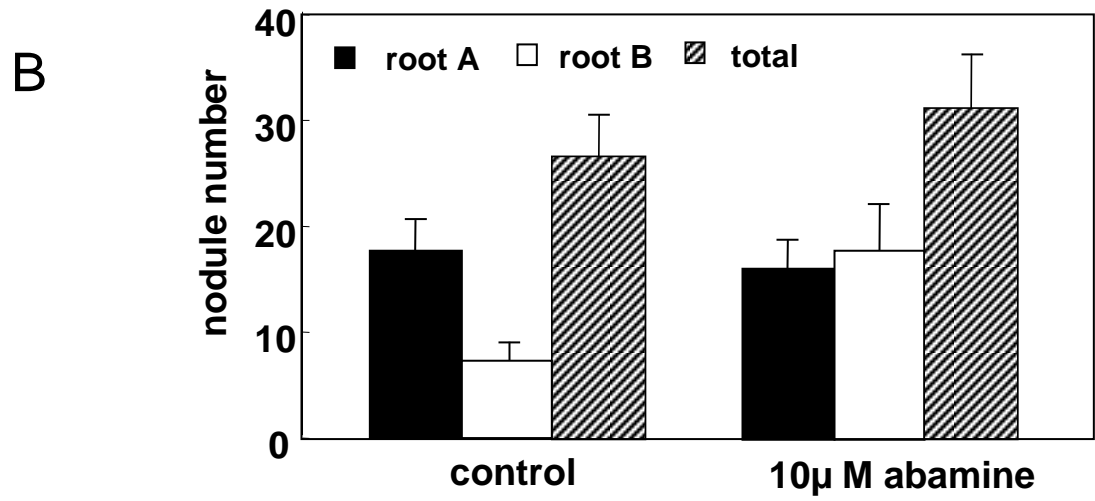
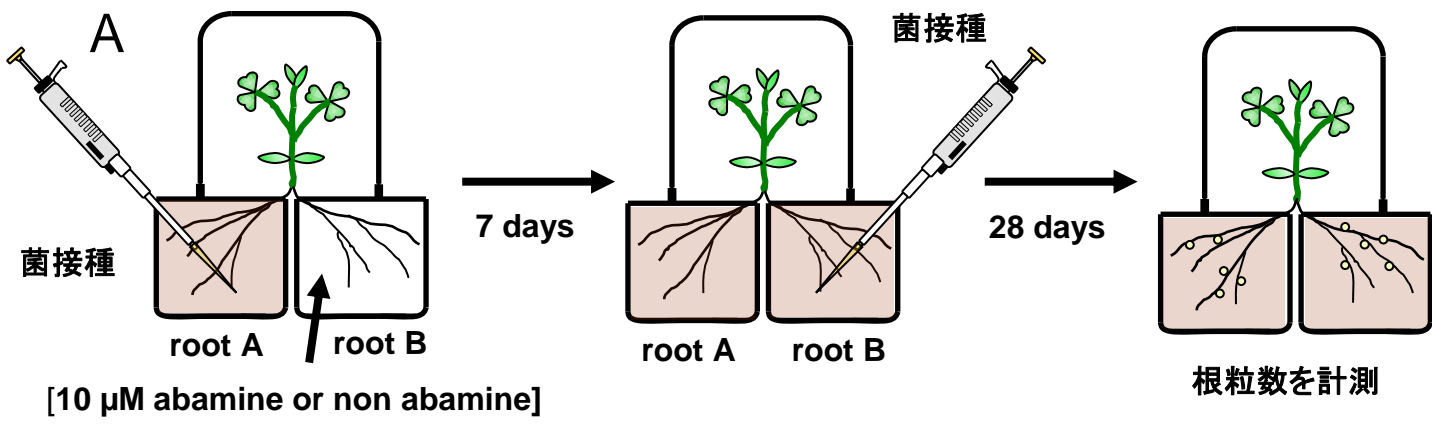


Fig. 4 split-root systemによるABAと根粒着生の制御機構の解析

Split-root systemのroot Bのabamineがroot Bの根粒着生の抑制に及ぼす影響について根粒菌接種28日後に計測した。A 実験過程の概略図 B クローバでroot Bにabamine添加によるAONへの影響 C ミヤコグサでroot Bにabamine添加によるAONへの影響 ■ root Aの根粒数 □ root Bの根粒数 ▨ totalの根粒数 error barsは標準誤差を示す。

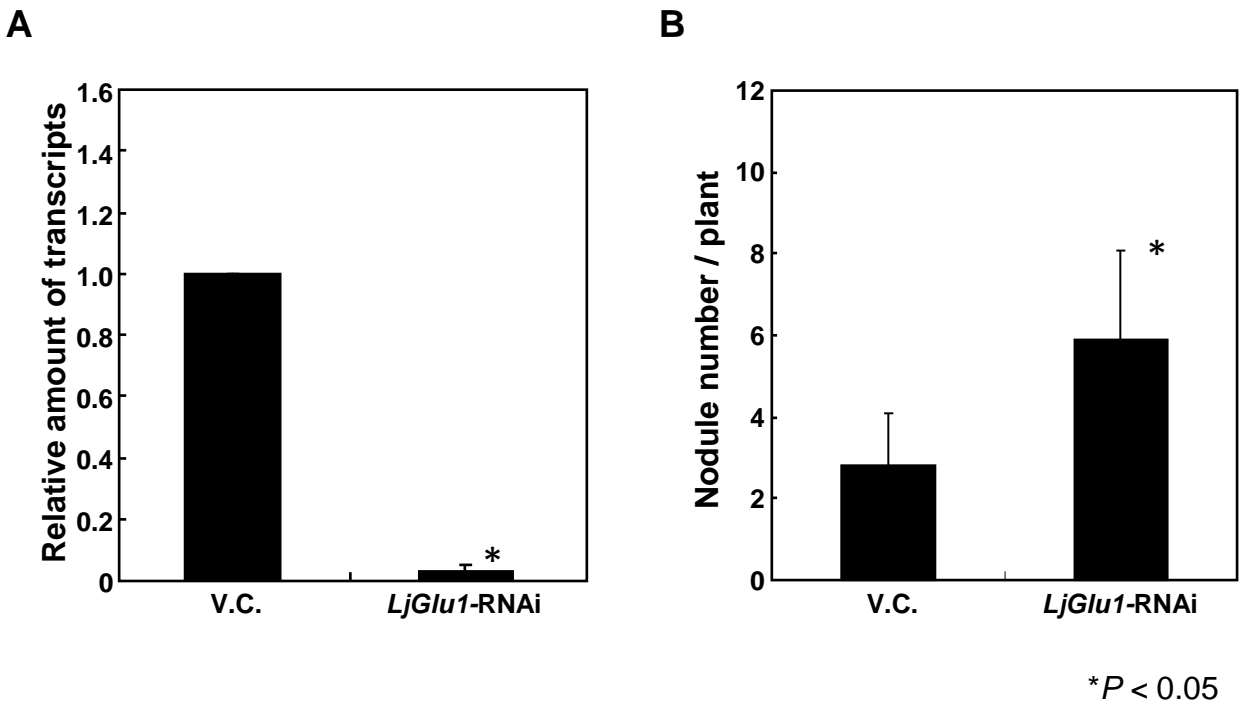


Fig. 5 RNAiによるLjGlu1の発現抑制と根粒着生数

LjGlu1-RNAi発現抑制体における根粒菌接種28日後の根粒着生数や*LjGlu1*の発現量を示す。
 A 根粒菌接種4週間後の*LjGlu1*の発現量。vector control (V.C.) 植物を1としたときの相対的な発現量を示す。 B 根粒菌接種4週間後の根粒着生数 error barsは標準誤差を示す。

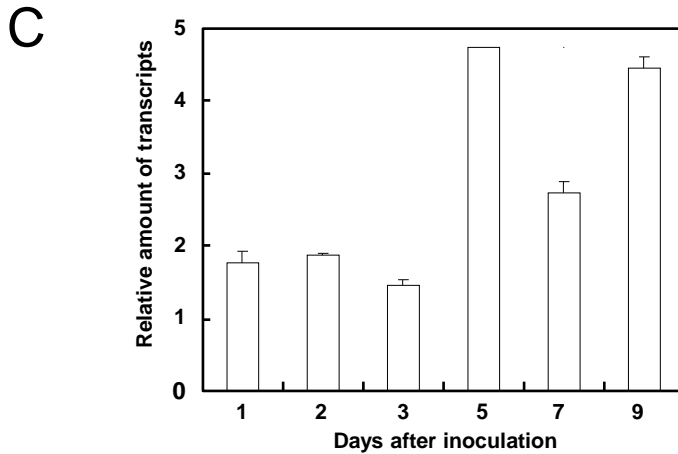
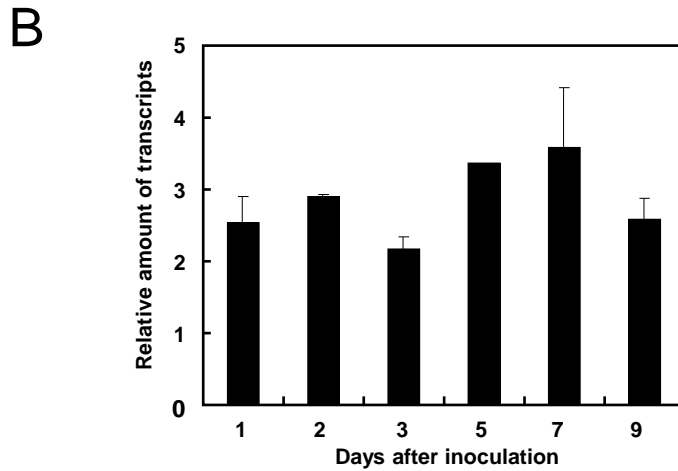
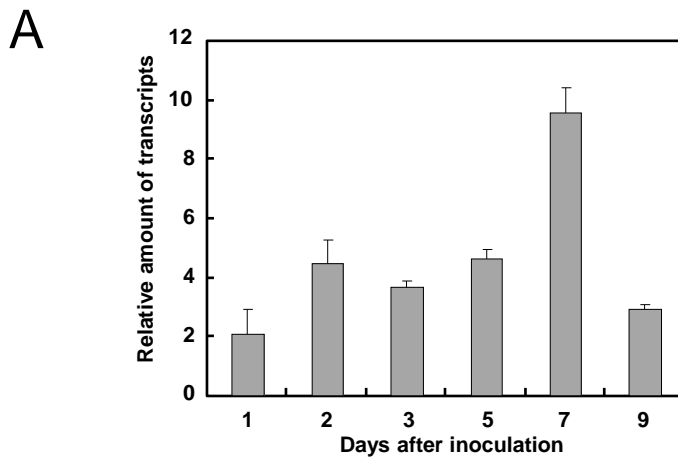


Fig. 6 Split-root systemを用いた*LjGlu1*発現の解析

Split-root systemのroot Aに根粒菌接種し、1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 日後の*LjGlu1*の発現量を示す。A 葉の*LjGlu1*の発現量 B root Aの*LjGlu1*の発現量 C root Bの*LjGlu1*の発現量。根粒菌接種なしを1としたときの相対的な*LjGlu1*の発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

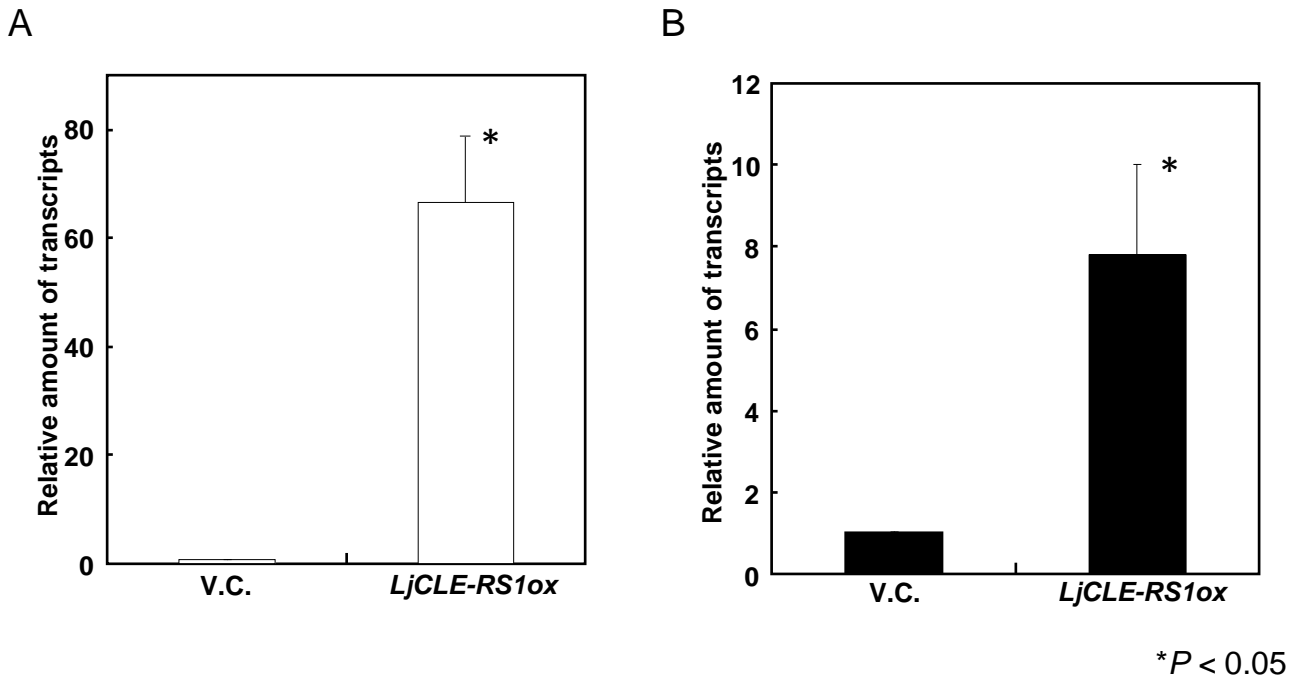


Fig. 7 *LjCLE-RS1*による*LjGlu1*の発現

*LjCLE-RS1*を恒常的に発現する形質転換毛状根における*LjGlu1*の発現量を示す。
 A *LjCLE-RS1*の発現量 B *LjGlu1*の発現量。vector control (V.C.) 植物を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

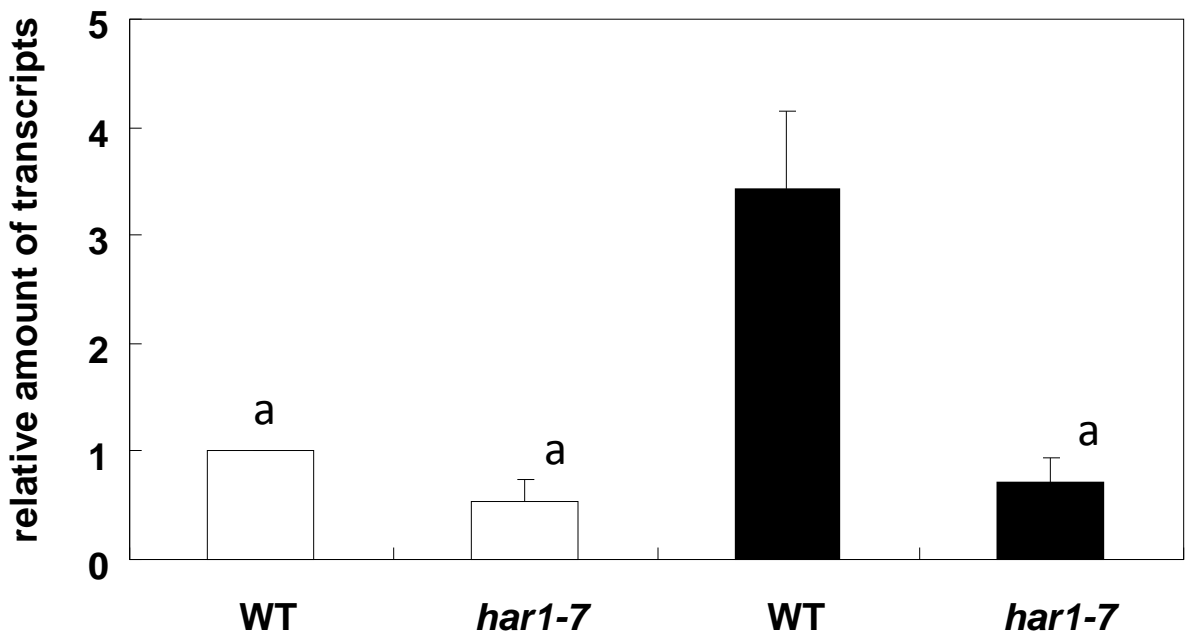


Fig. 8 *har1-7*変異体によるLjGlu1の発現

根粒菌接種14日後の野生株WTと*har1*変異体のLjGlu1の発現量を示す。
□ 根粒菌接種なしのLjGlu1の発現量 ■ 根粒菌接種14日後のLjGlu1の発現量
根粒菌接種なしの野生株の発現量を1としたときの相対的な発現量を示す。
error barsは標準誤差を示す。

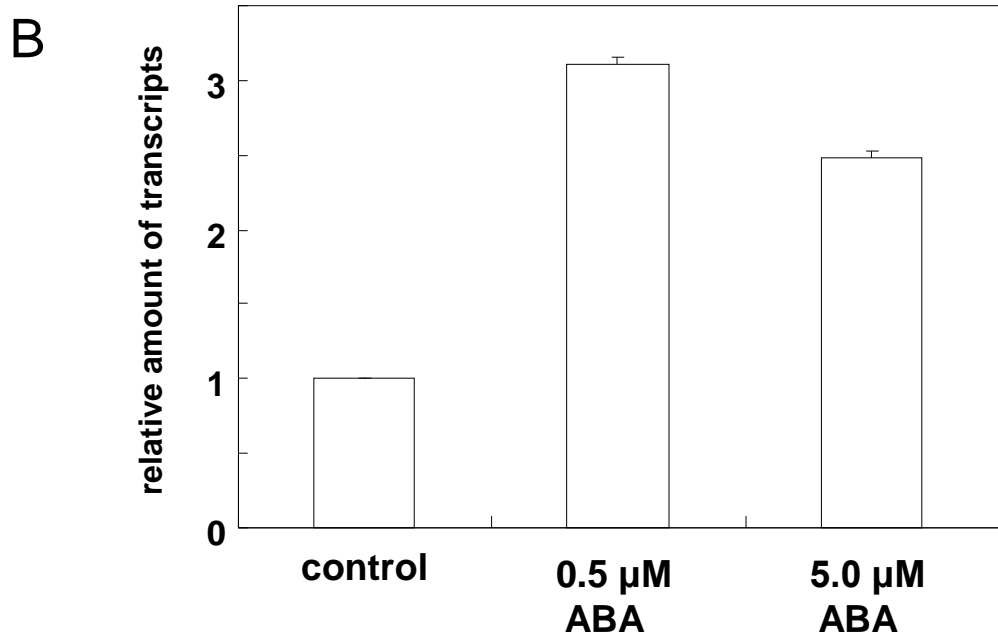
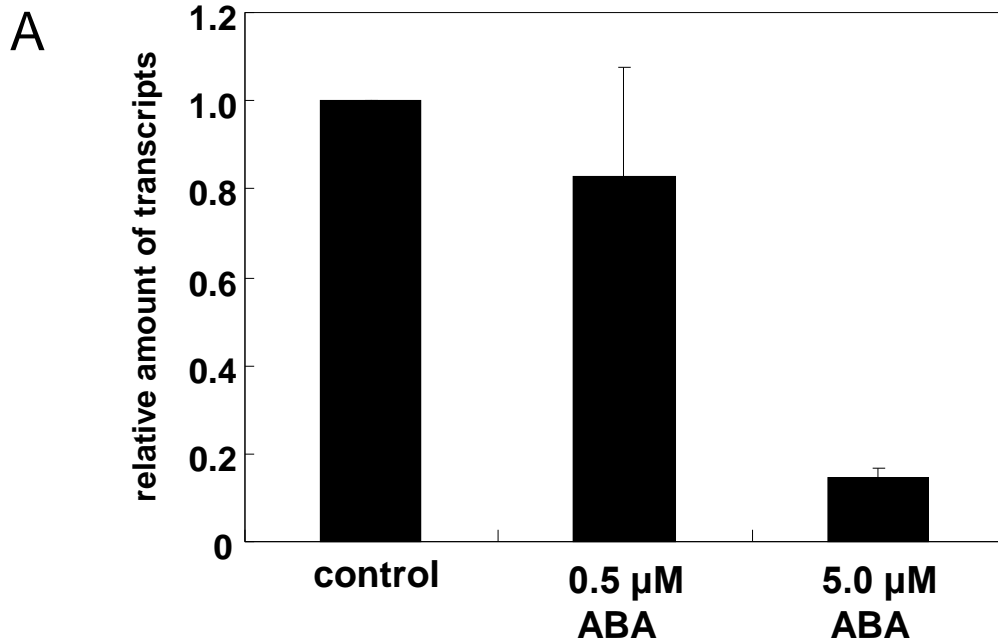


Fig. 9 アブシシン酸 (ABA) による*LjGlu1*の発現

control (ABA 添加なし), 0.5 μ M, 5.0 μ MのABAを含む培地で2週間育成させた植物の*LjGlu1*の発現量を示す。A 根の*LjGlu1*の発現量 B 葉の*LjGlu1*の発現量 control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

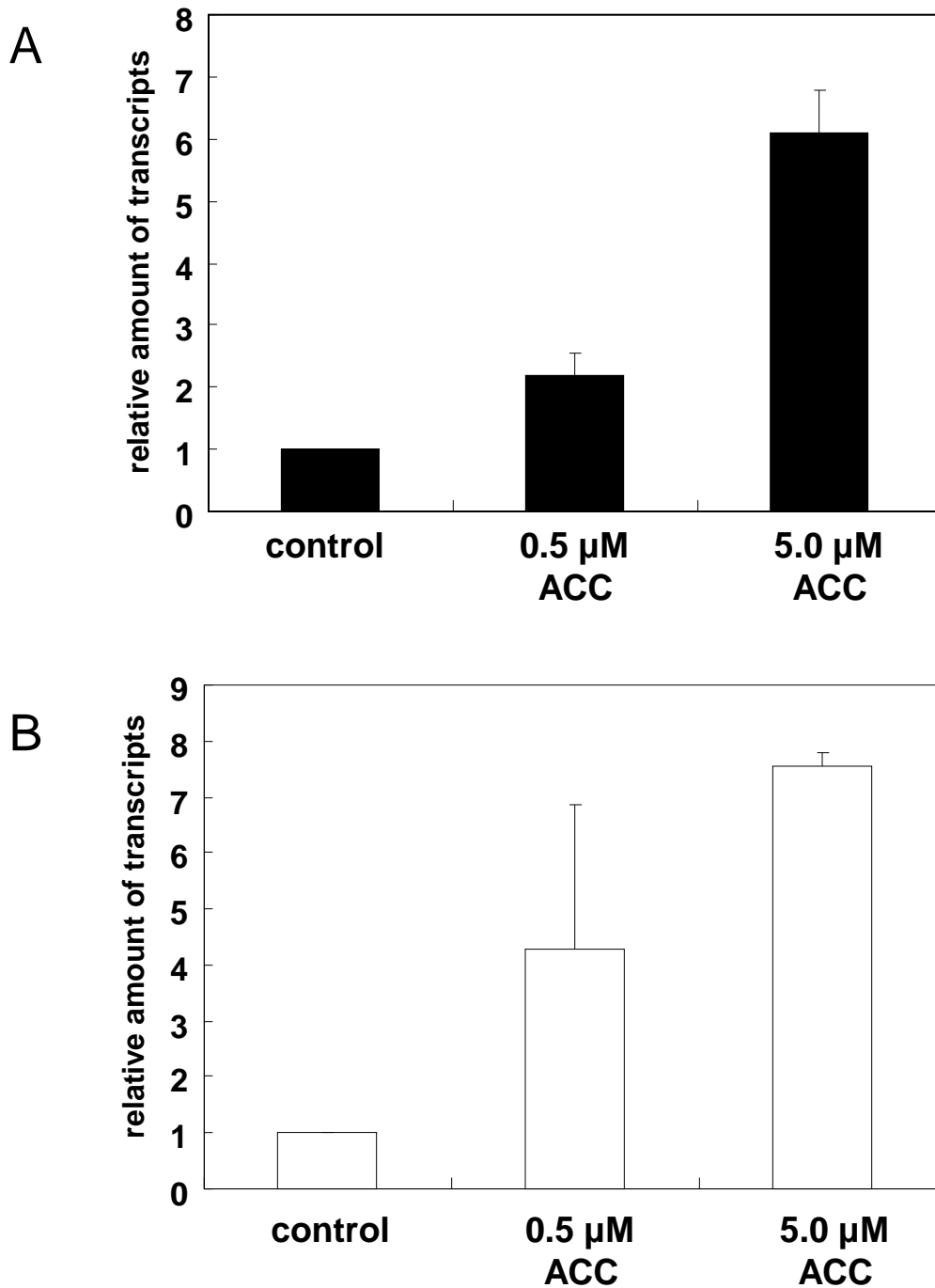


Fig. 10 エチレン前駆体 (ACC) による*LjGlu1*の発現

control (ACC 添加なし), 0.5 μM , 5.0 μM のACCを含む培地で2週間育成させた植物の*LjGlu1*の発現量を示す。A 根の*LjGlu1*の発現量 B 葉の*LjGlu1*の発現量 control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

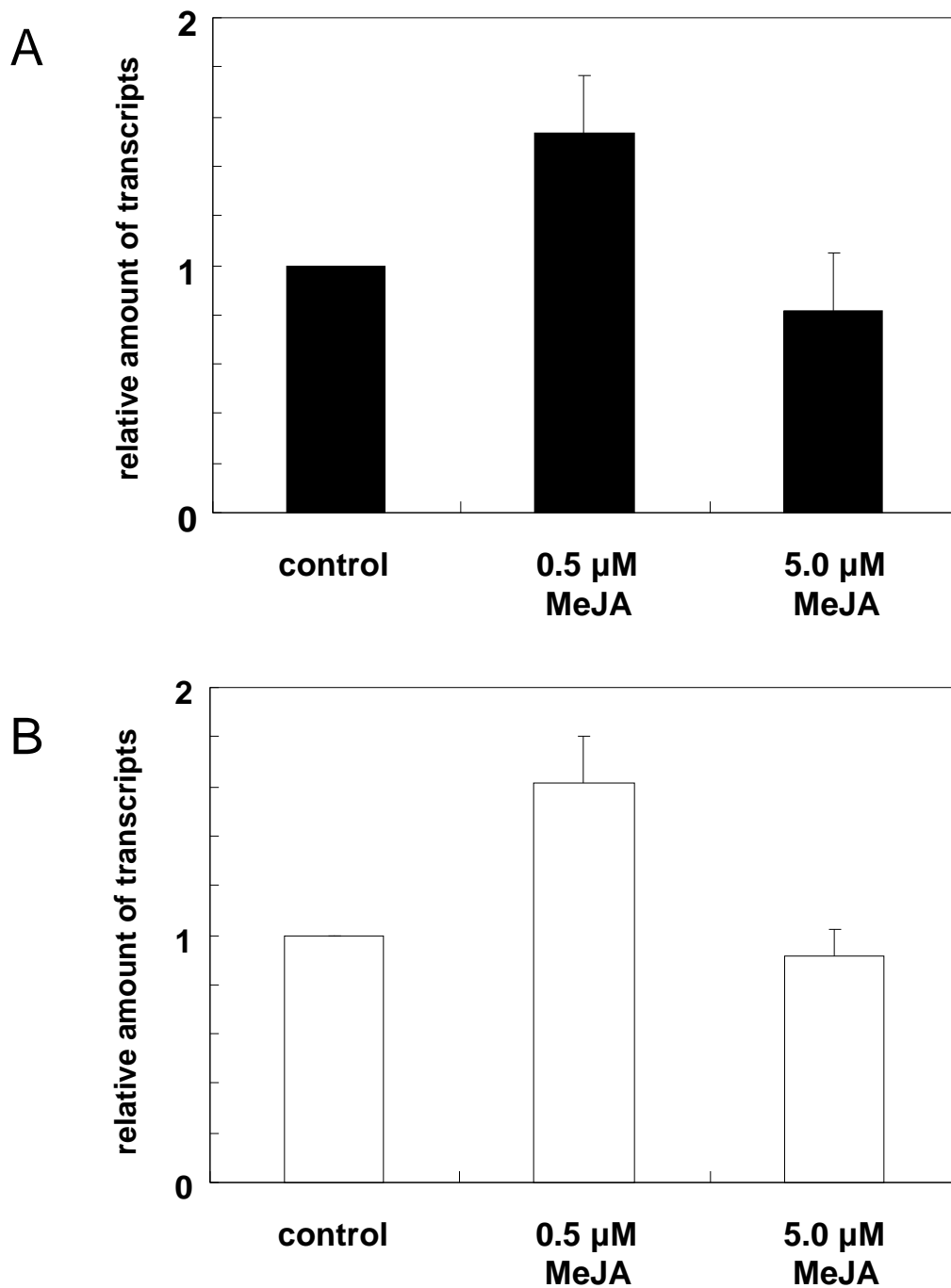


Fig. 11 メチルジャスモン酸 (MeJA) による*LjGlu1*の発現

control (MeJA 添加なし), 0.5 μM , 5.0 μM のMeJAを含む培地で2週間育成させた植物の*LjGlu1*の発現量を示す。A 根の*LjGlu1*の発現量 B 葉の*LjGlu1*の発現量 control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

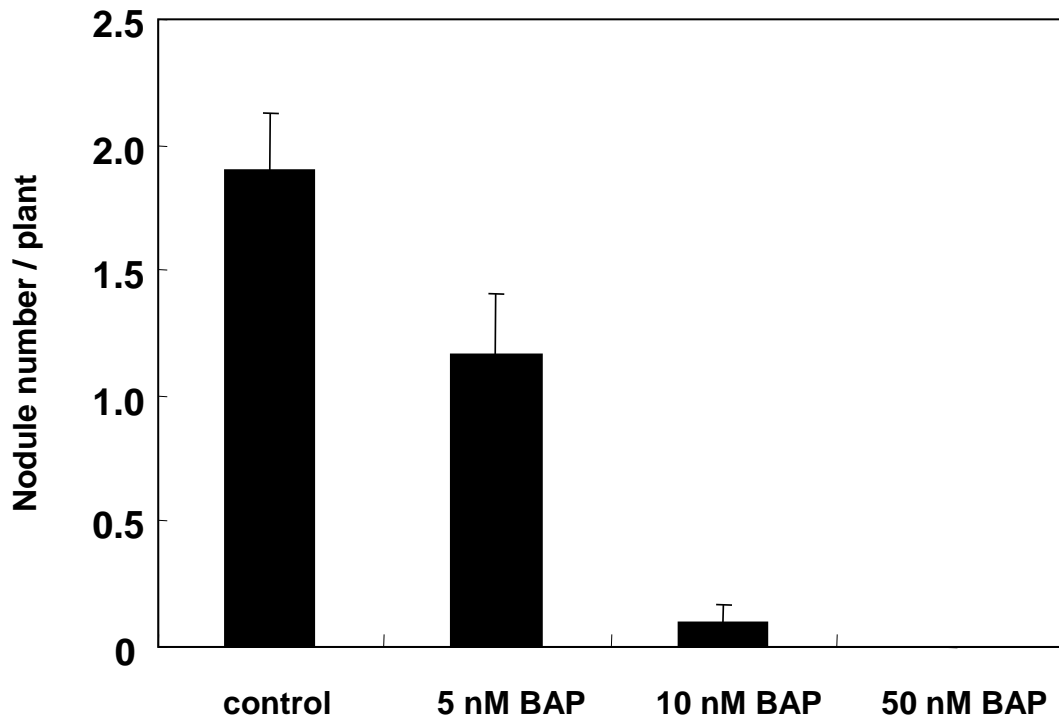


Fig. 12 合成サイトカイニン (BAP) の根粒着生への影響

control (BAP 添加なし), 5 nM, 10 nM, 50 nMのBAPを含む培地で生育させた植物の根粒菌接種21日後の根粒着生数を示す。error barsは標準誤差を示す。

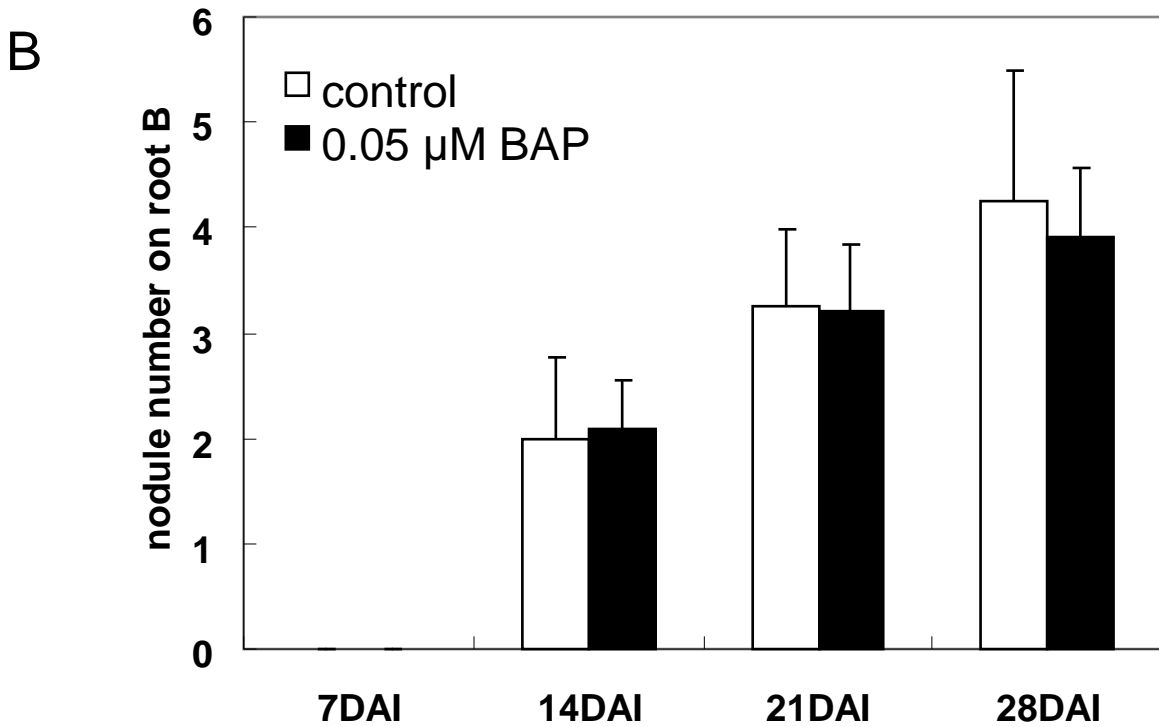
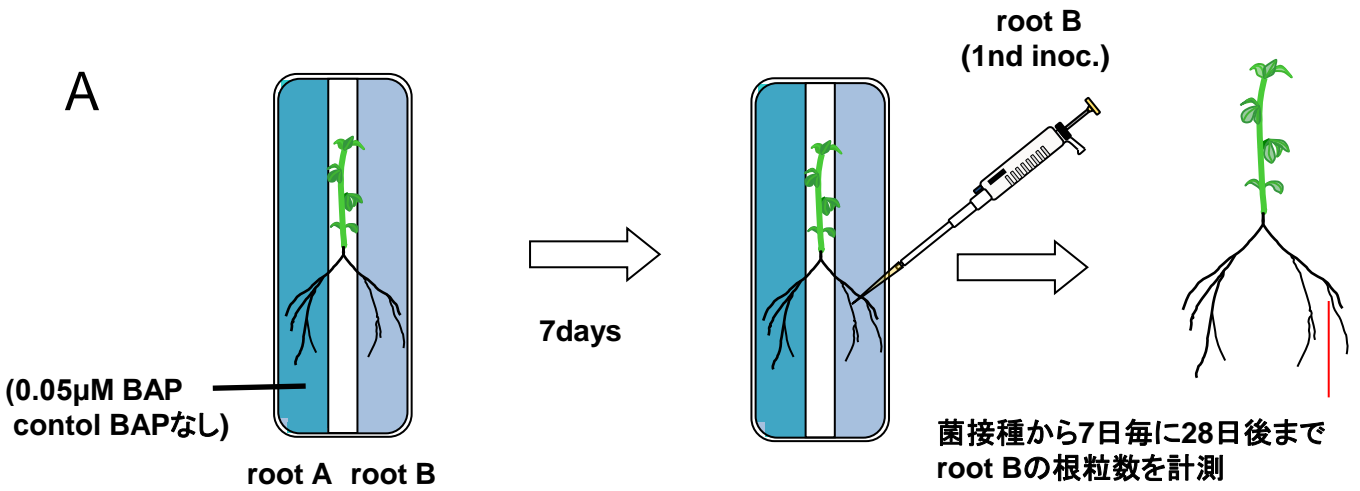


Fig. 13 Split-root systemを用いたBAPの根粒着生への影響

Split-root systemのroot AのBAPによる、root Bの根粒着生数への影響を根粒菌種7日毎に28日後まで計測した。(Days after inoculation: DAI) A 実験過程の概略図 B root Bの根粒着生数 □ root AにBAP添加なし ■ root Aに0.05 μ M BAP 添加 error barsは標準誤差を示す。

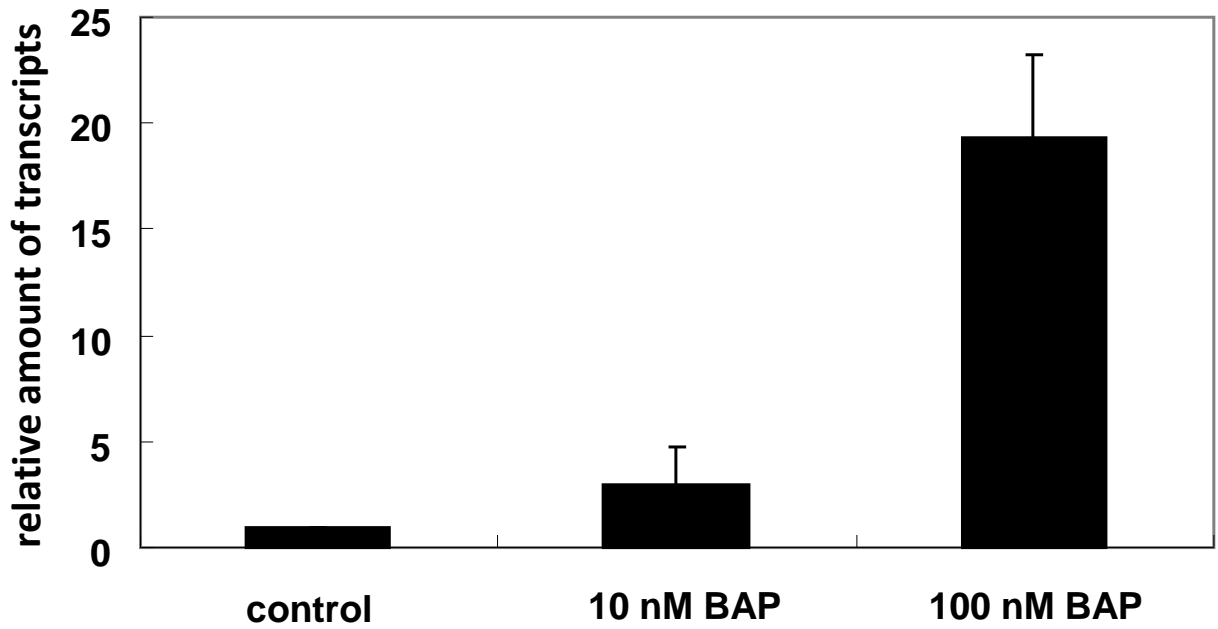


Fig. 14 BAPによる*LjGlu1*の発現

control (BAP 添加なし), 10 nM, 100 nMのBAPを含む培地で2週間育成させた植物の根の*LjGlu1*の発現量を示す。control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

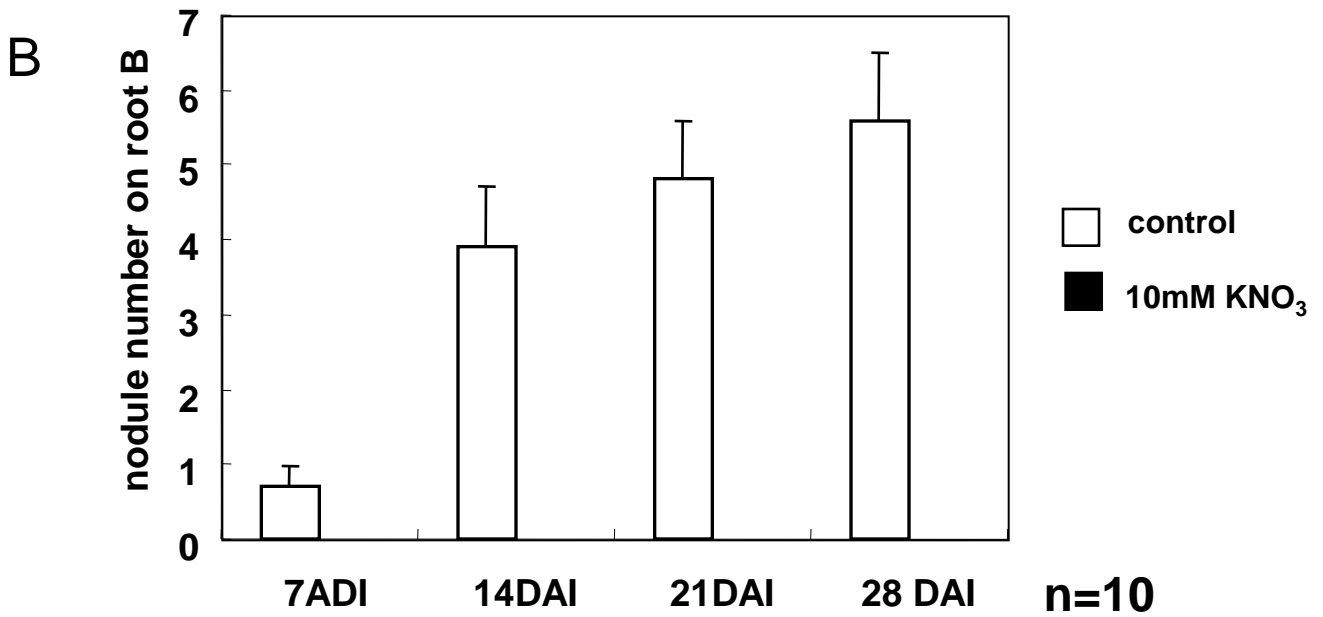
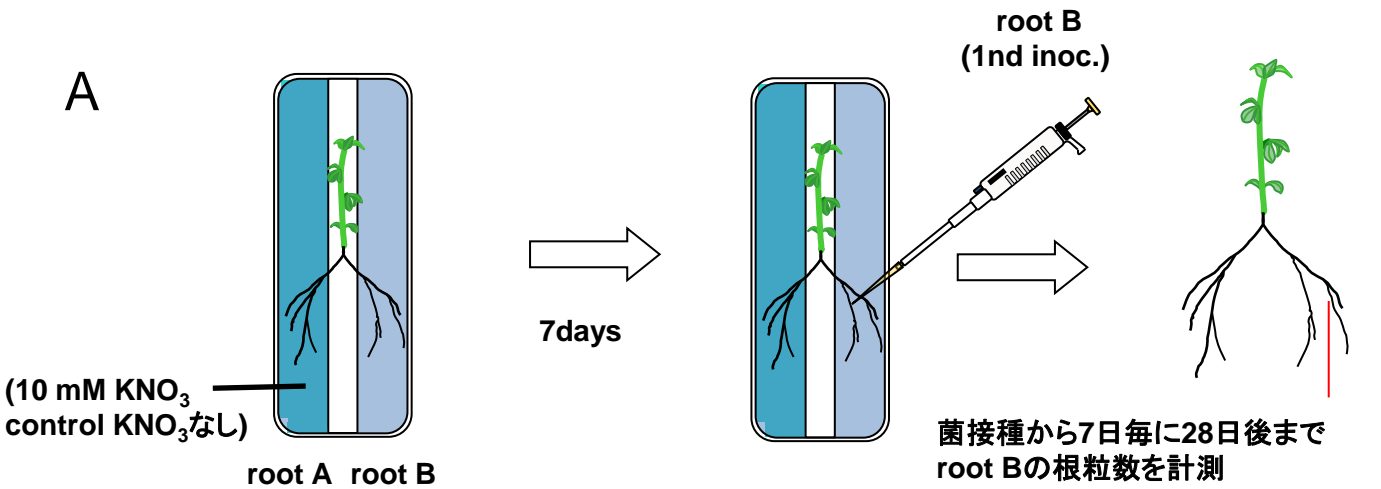
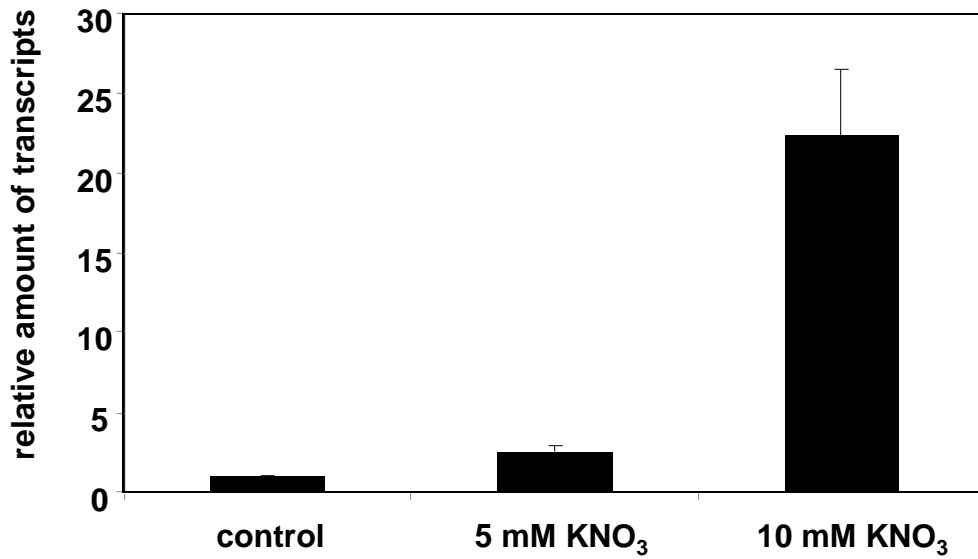


Fig. 15 Split-root systemを用いた硝酸カリウム (KNO_3) の根粒着生への影響

Split-root systemのroot Aの硝酸カリウムによる、root Bの根粒着生数への影響を根粒菌種7日毎に28日後まで計測した。(Days after inoculation: DAI) A 実験過程の概略図 B root Bの根粒着生数 □ root Aに KNO_3 添加なし ■ root Aに10mM KNO_3 添加 error barsは標準誤差を示す。

A



B

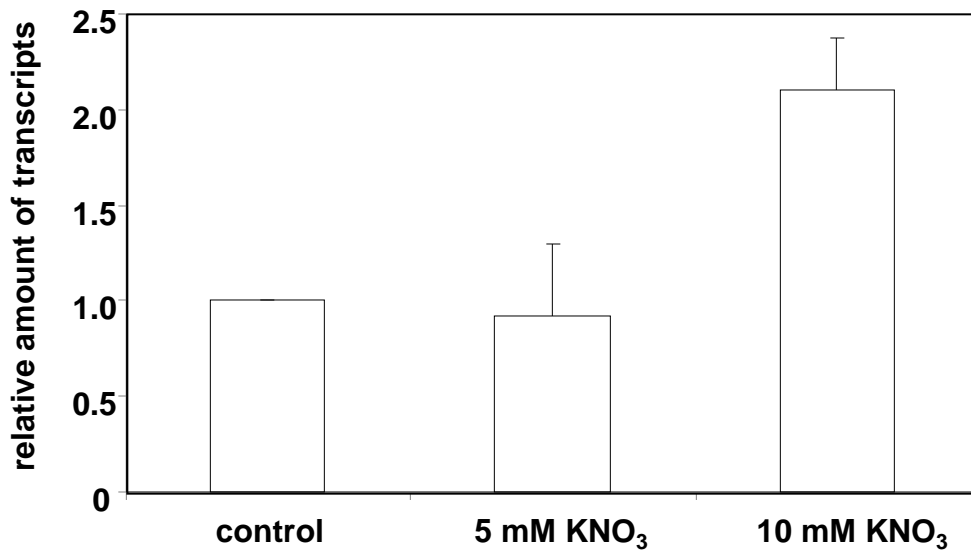


Fig. 16 硝酸カリウムによる*LjGlu1*の発現

control (KNO₃ 添加なし), 5 mM, 10 mMのKNO₃を含む培地で2週間育成させた植物の*LjGlu1*の発現量を示す。A 根の*LjGlu1*の発現量 B 葉の*LjGlu1*の発現量 control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

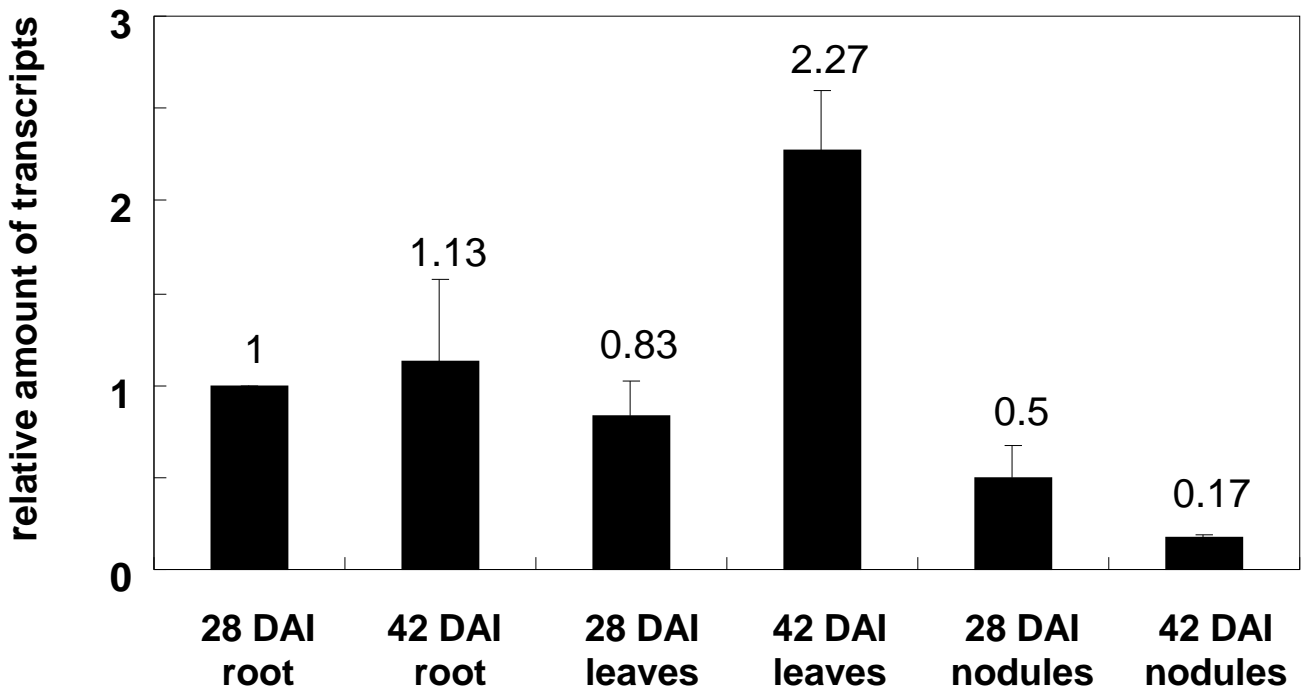
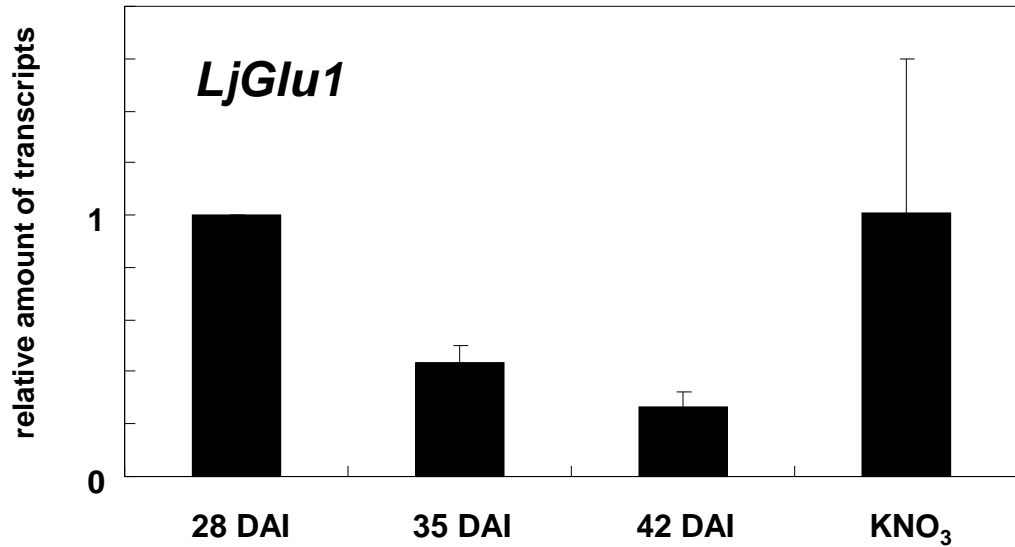


Fig. 17 組織における*LjGlu1*の発現

根粒菌接種28日後, 42日後(老化)の根, 葉, 根粒における*LjGlu1*の発現量を示す。(Days after inoculation: DAI)。根粒菌接種28日後の根の発現量を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

A



B

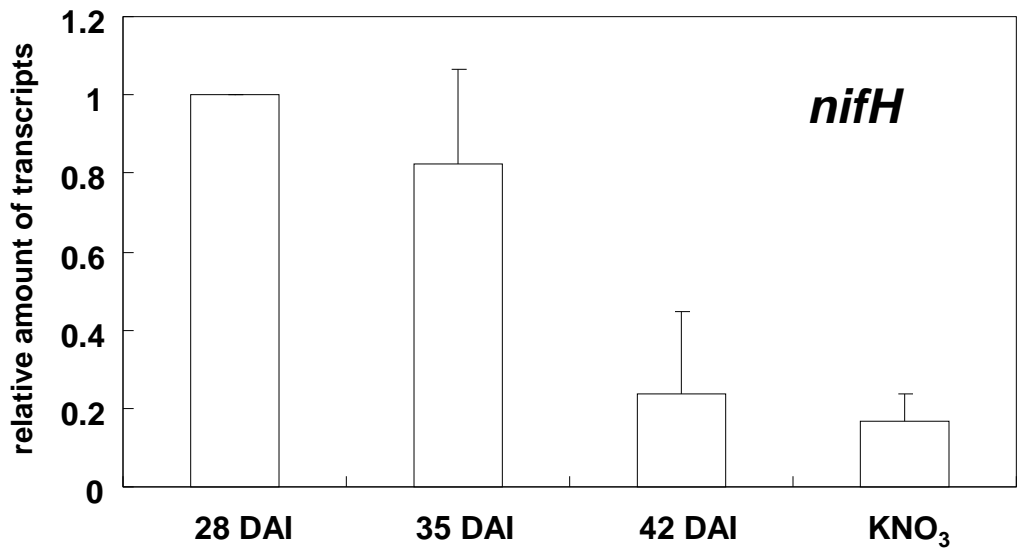
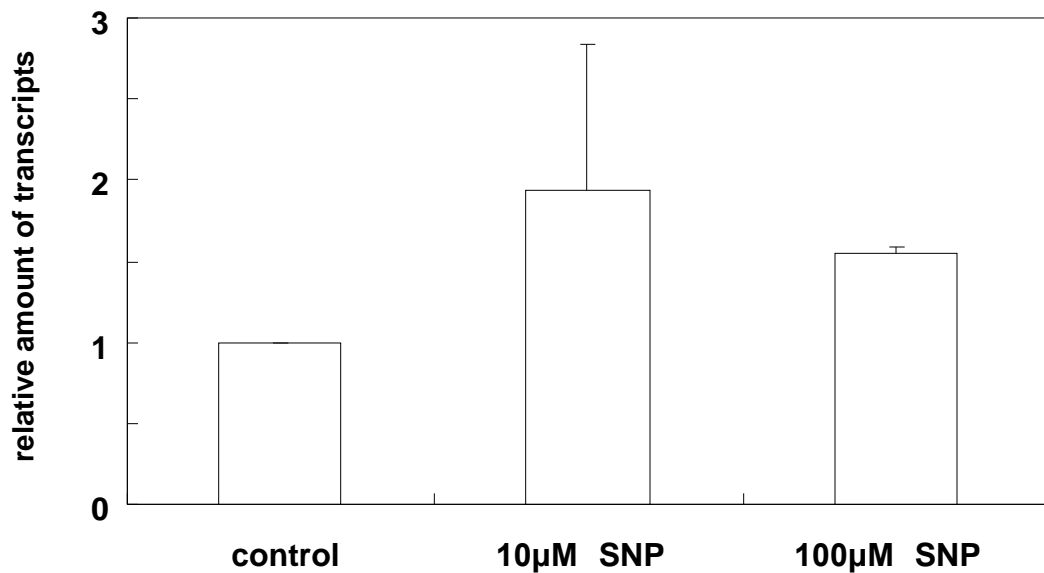


Fig. 18 老化による根粒での*LjGlu1*や*nifH*の発現量への影響

根粒菌接種28日後, 35日後, 42日後の根粒での*LjGlu1*や*nifH*の発現量と10 mM KNO₃添加による発現量を示す。(Days after inoculation: DAI) A *LjGlu1*の発現量 B *nifH*の発現量 根粒菌接種28日後の根粒の発現量を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

A



B

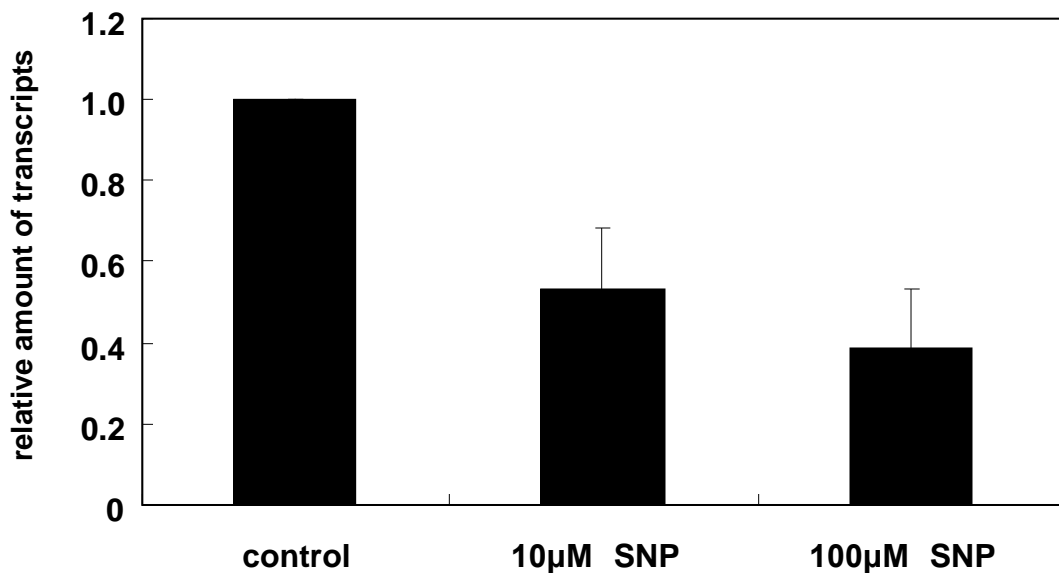


Fig. 19 Sodium nitriprusside (SNP) による*LjGlu1*の発現

control (SNP 添加なし), 10 µM, 100 µMのSNPを含む培地で2週間育成させた植物の*LjGlu1*の発現量を示す。A 根の*LjGlu1*の発現量 B 葉の*LjGlu1*の発現量 control を1としたときの相対的な発現量を示す。error barsは標準誤差を示す。

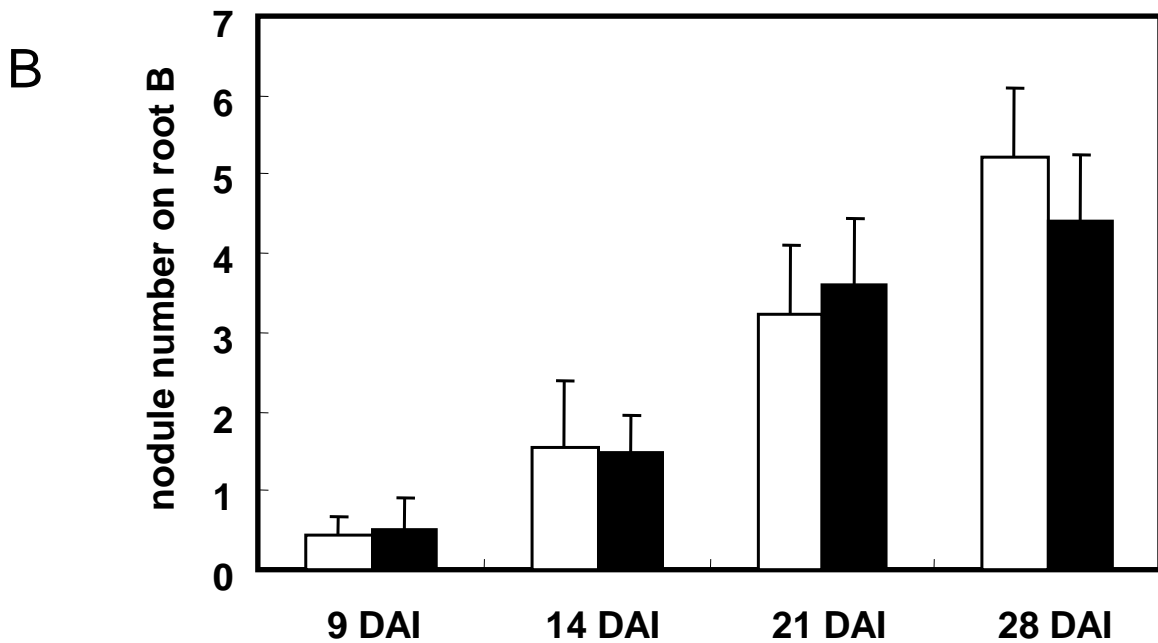
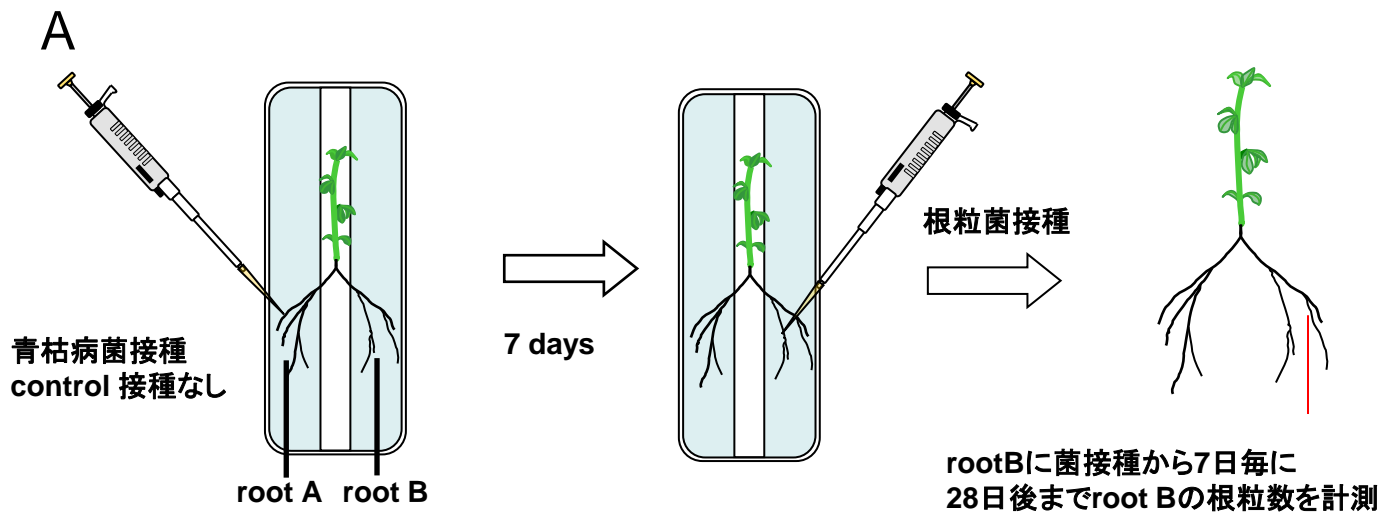


Fig. 20 Split-root systemを用いた青枯病菌による根粒着生への影響

Split-root systemのroot Aに青枯病菌を接種し、root Bの根粒着生数への影響を根粒菌種7日毎に28日後まで計測した。(Days after inoculation: DAI) A 実験過程の概略図 B root Bの根粒着生数 □ root Aに青枯病菌を接種 ■ root Aに青枯病菌接種なし error barsは標準誤差を示す。

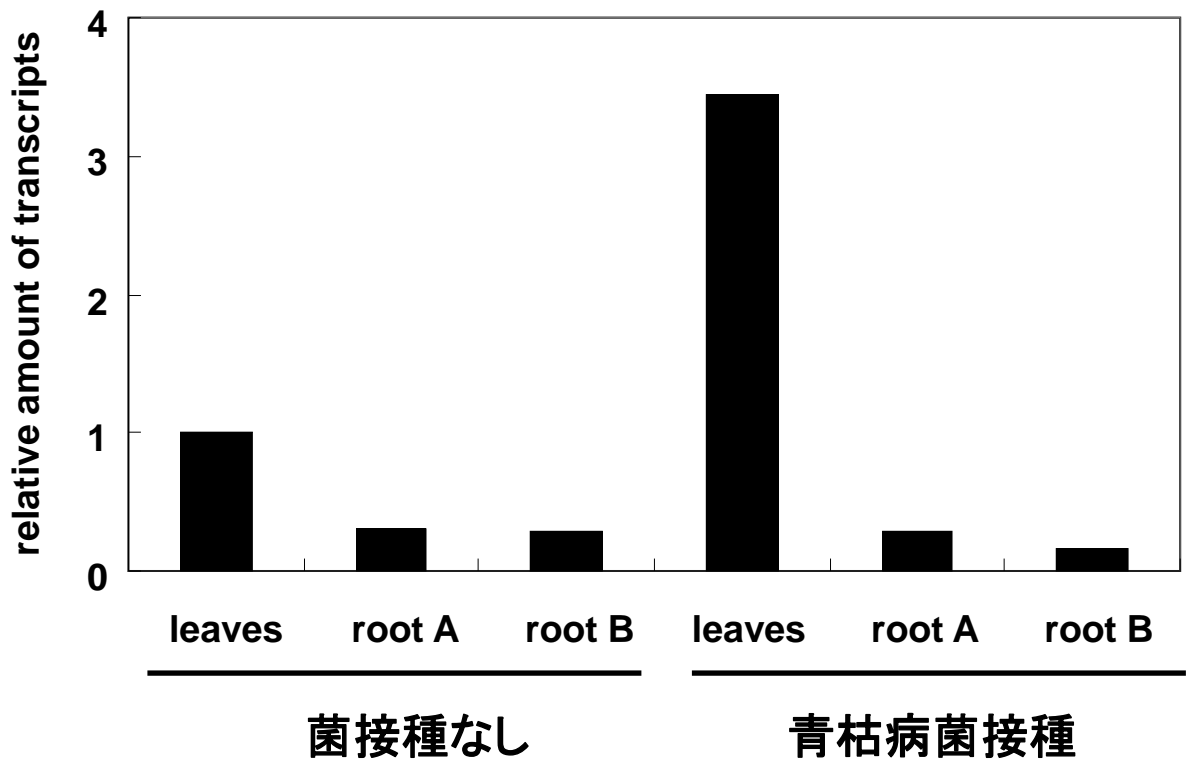


Fig. 21 Split-root systemを用いた青枯病菌による*LjGlu1*の発現

Split-root systemのroot Aに青枯病菌を接種したときのroot A, root B, 葉での*LjGlu1*の発現量を示す。菌接種なしの葉の発現量を1としたときの相対的な発現量を示す。

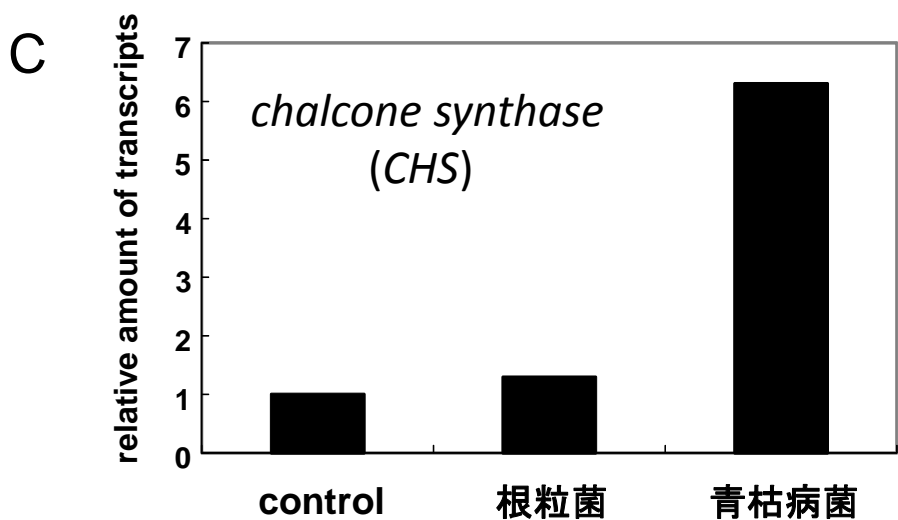
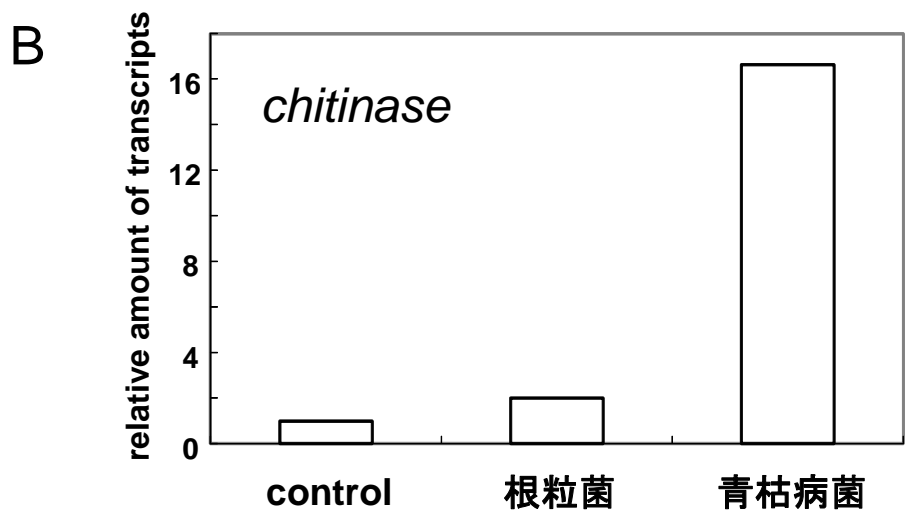
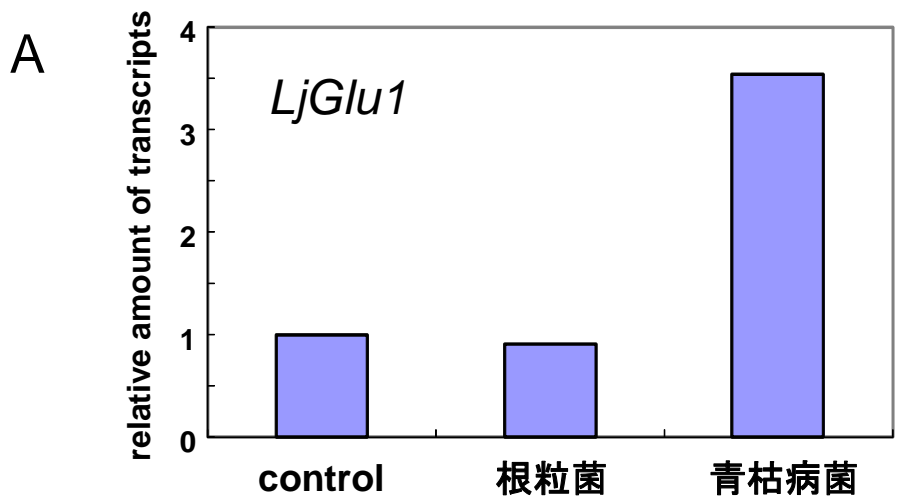


Fig. 22 青枯病菌による*LjGlu1*, *Chalcone synthase* (CHS), *Class 1 chitinase*の発現

青枯病菌や根粒菌接種1日後の根の*LjGlu1*, *Chalcone synthase* (CHS), *Class 1 chitinase*の発現量を示す。A *LjGlu1*の発現量 B *Class 1 chitinase*の発現量 C *Chalcone synthase* (CHS)の発現量 菌接種なしを1としたときの相対的な発現量を示す。

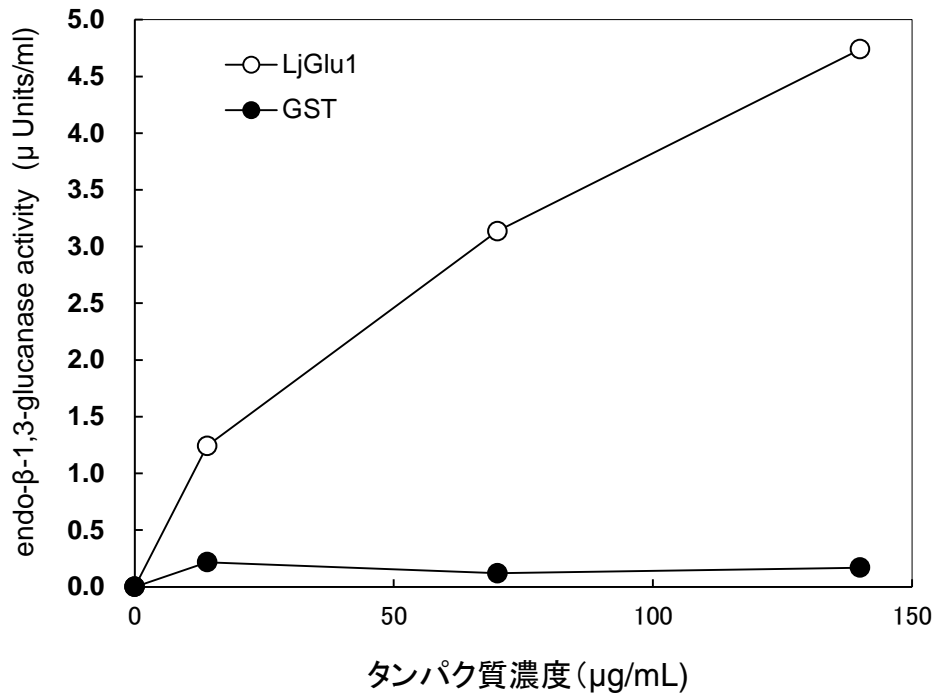


Fig. 23 組換えLjGlu1のβ-1,3-glucanase活性

精製されたGST-LjGlu1組換えタンパク質のβ-1,3-glucanase活性を示す。

● GSTのβ-1,3-glucanase活性量 ○ GST-LjGlu1のβ-1,3-glucanase活性量
値は *Trichoderma* 由来のβ-1,3-glucanaseから得られた検量線を使用して変換した。

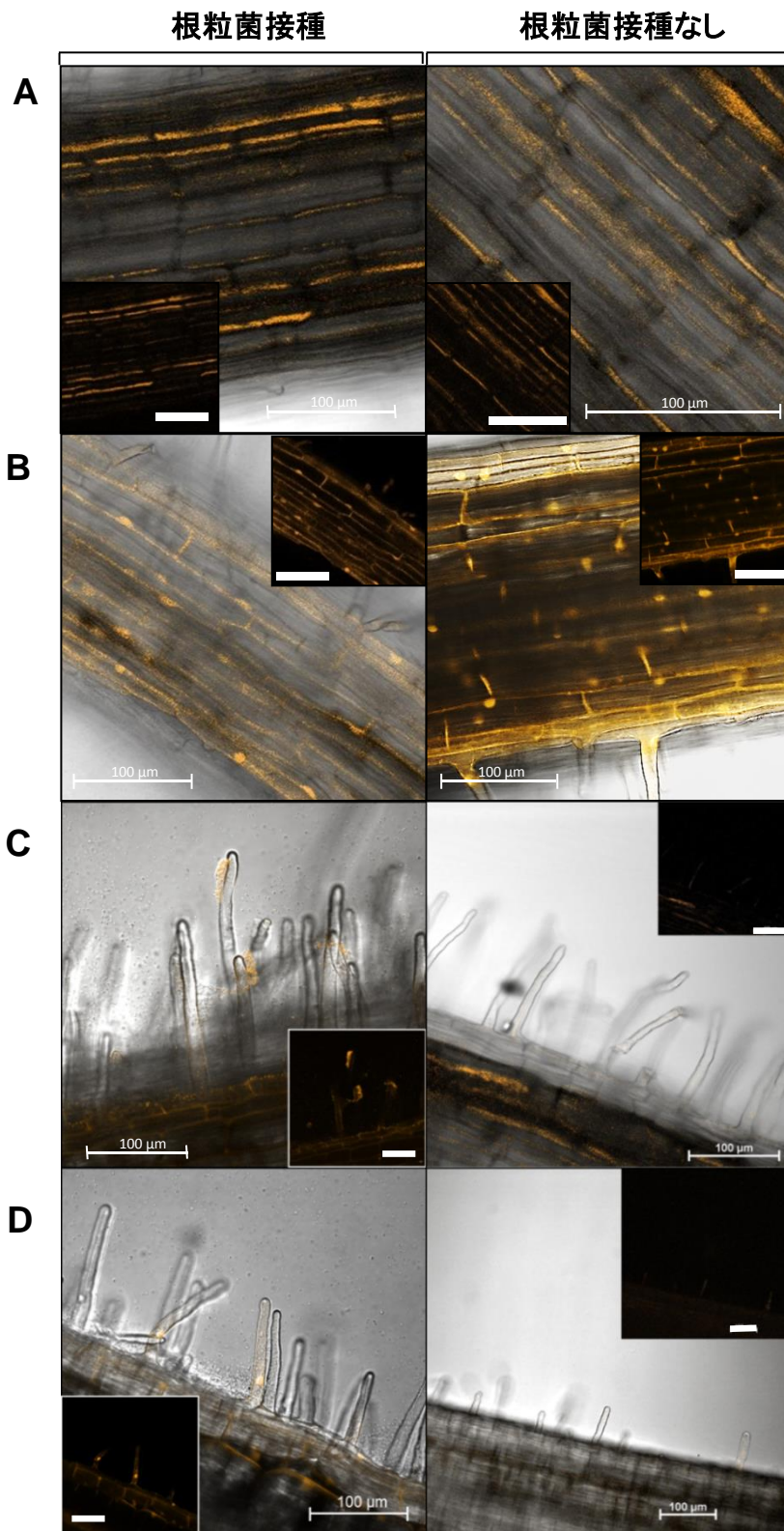


Fig. 24 根でのLjGlu1の所在

LjGlu1-mOrangeやmOrangeを恒常的に発現する形質転換毛状根におけるLjGlu1の所在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。左のカラム 根粒菌接種あり 右のカラム 根粒菌接種なし 挿入カラム 蛍光画像
 A LjGlu1-mOrange形質転換毛状根におけるLjGlu1の所在 B mOrange形質転換毛状根におけるLjGlu1の所在 C LjGlu1-mOrange形質転換毛状根の根毛の拡大図 D mOrange形質転換毛状根の根毛の拡大図
 スケールバー 100 μm

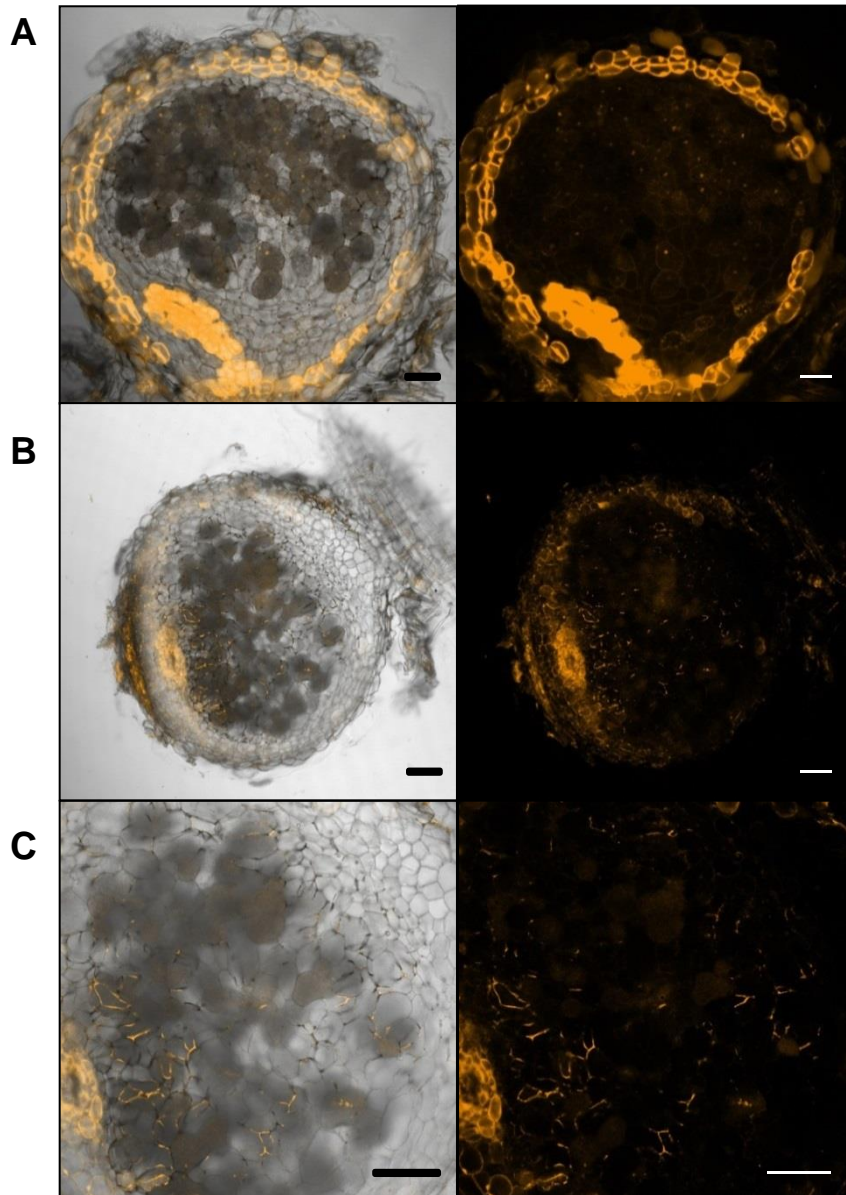


Fig. 25 根粒内のLjGlu1の所在

LjGlu1-mOrangeやmOrangeを恒常的に発現する形質転換毛状根に根粒菌を接種し28日後の根粒内のLjGlu1の所在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。左のカラム merged 画像 右のカラム 蛍光画像 A mOrange形質転換毛状根に着生した根粒内のLjGlu1の所在 B LjGlu1-mOrange形質転換毛状根に着生した根粒内のLjGlu1の所在 C Bの拡大図 スケールバー 100 μ m

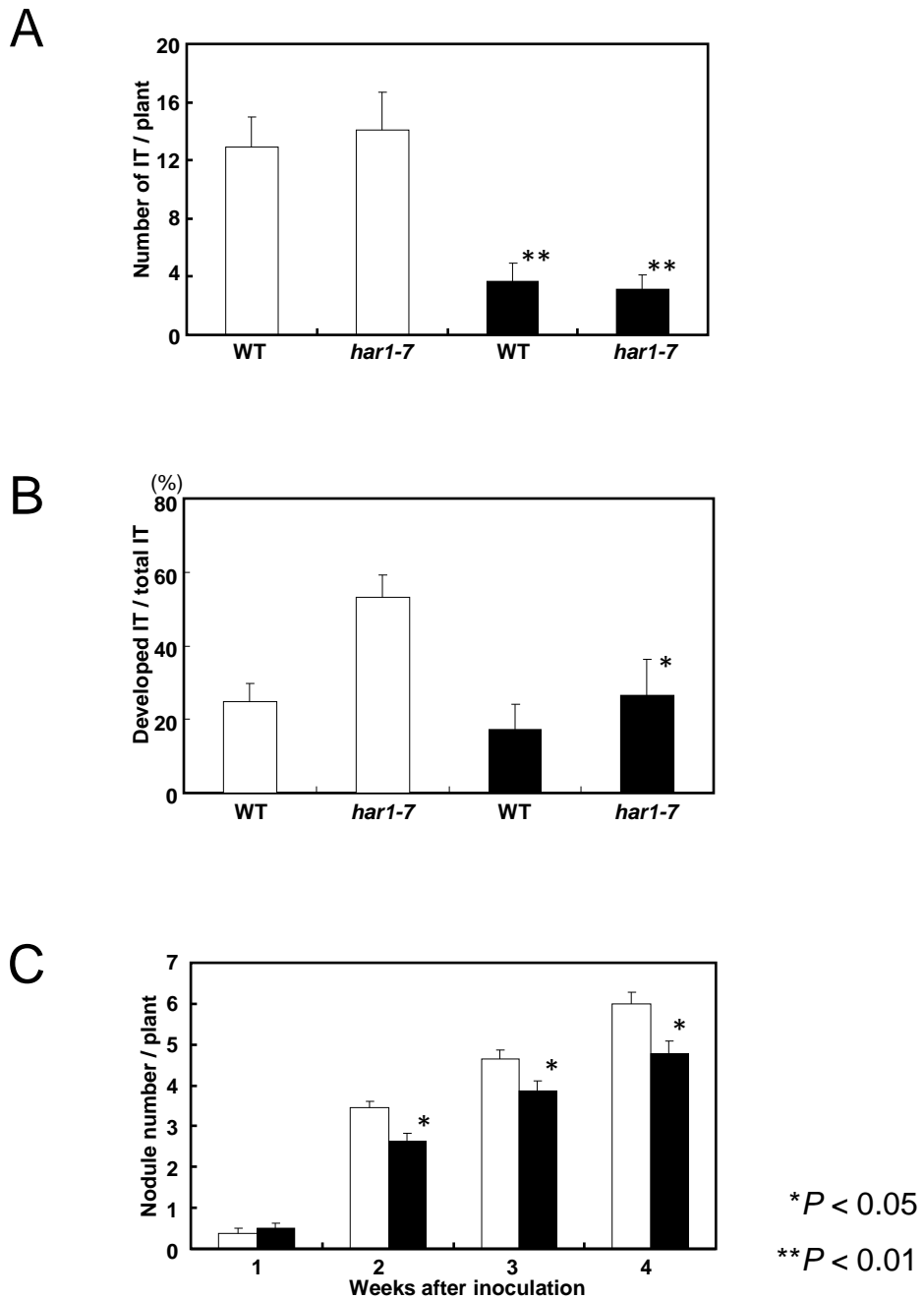


Fig. 26 β-1,3-glucanaseが根粒着生や感染糸形成に及ぼす影響

野生株WTとhar1-7変異体の感染糸数及び根粒着生数にTrichoderma由来の標品β-1,3-glucanaseが及ぼす影響について検討した。A 根粒菌接種7日後の感染糸数 B 根粒菌接種7日後の感染成功率 C 野生株の根粒着生数。□ 水接種(コントロール) ■ 標品β-1,3-glucanase接種 error barsは標準誤差を示す。

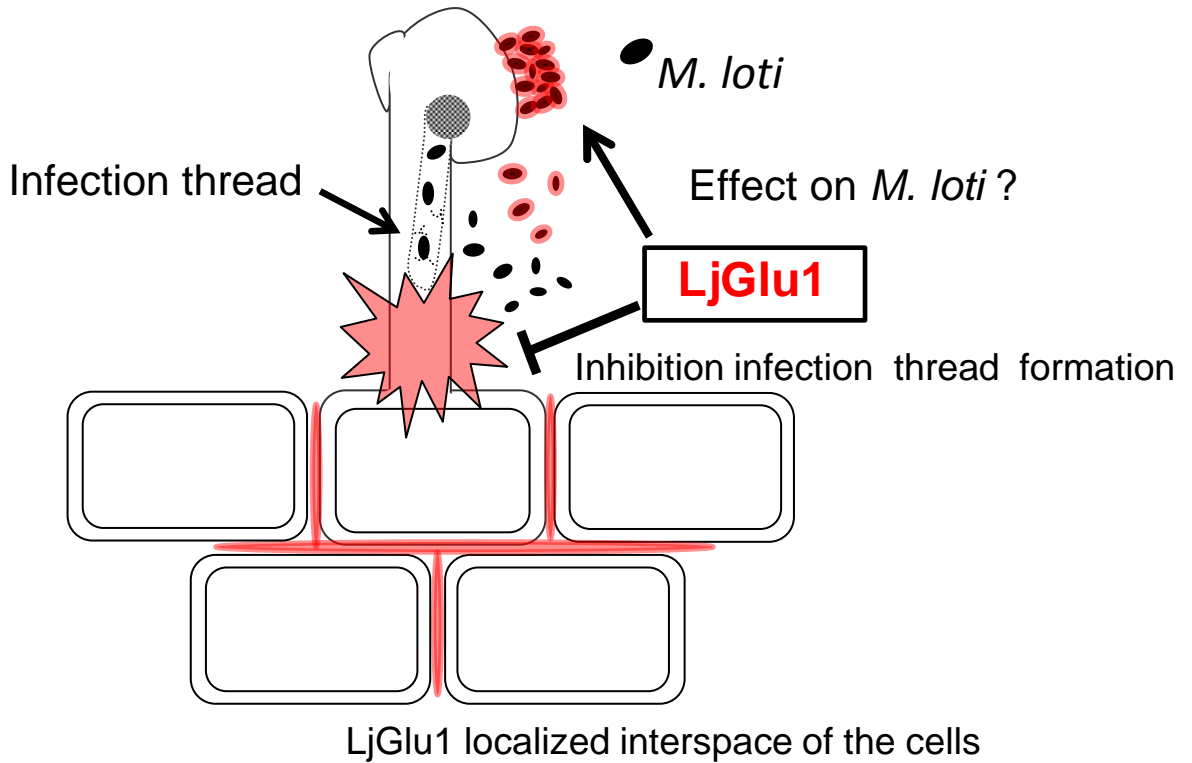
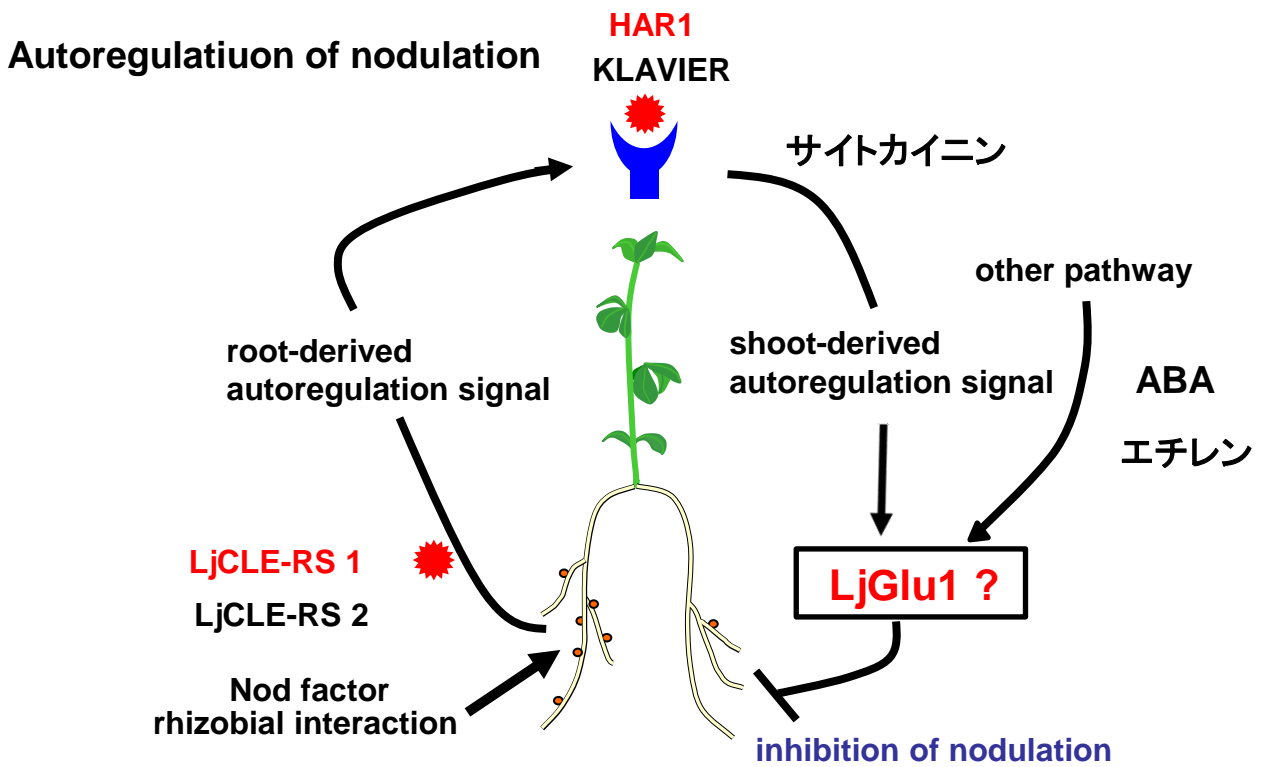


Fig. 27 LjGlu1の作用経路

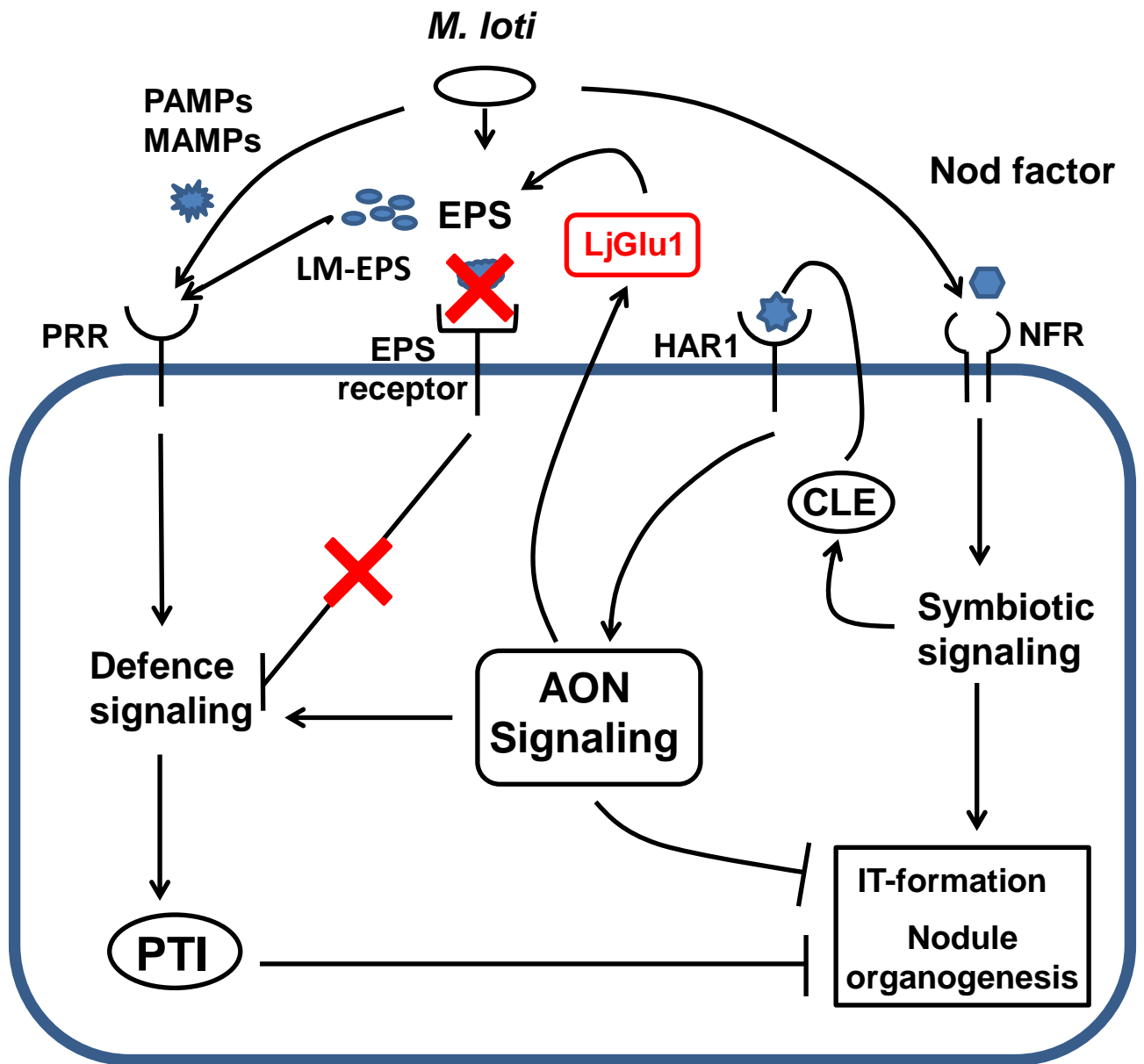


Fig. 28 LjGlu1の作用経路

PAMPs/MAMPs: Pathogen- or Microbe-associated molecular patterns

PRR: Plant pattern recognition receptors

PTI: Pathogen-triggered immunity

NFR: Nod factor receptors

LM-EPS: Low molecular- exopolysaccharide

IT-formation: Infection thread formation

(Kelly et al. 2013; Clive Ronson et al., in 2nd APMNF)を改変