

れんげを用いる窒素固定のモデルシステムの構築
Establishment of a model system for nitrogen fixation using Renge-sou

代表研究者 広島大学工学部発酵工学講座 助手 藤江 誠
Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Hiroshima University.
Makoto FUJIE

ABSTRACT

Astragalus sinicus cv. Japan (Renge-sou) is one of the most important green manure in Japan and is commonly used to fertilize rice fields. In spite of its economical and ecological importance, a research on molecular mechanism of its nodulation is far retarded than other legumes such as alfalfa or soybean. We are screening novel nodulins (nodule specific genes) from *A. sinicus* to reveal its nodulation mechanism.

We adopted both the differential hybridization method and the differential display method to clone novel nodulin genes. *A. sinicus* was infected with *Rhizobium huakuii* bv. B3 and mRNAs were isolated from various organs such as nodules, uninfected roots and leaves.

By differential display screening, more than 20 nodule specifically amplified bands were obtained (AS1-32). AS1 was expressed more strongly in nodule than the other organs. AS1 had homology to dynamin, a kind of GTP-binding protein involved in endocytosis. It is possible that AS1 help the step of bacterial infection into host cell. AS32 is a nodule specific clone which seems to code a peptide similar to propeptide of nodule specific proteinase of *Alnus glutinosa*.

For differential screening, we constructed a cDNA library of a nodule and screened more than 10000 plaques. We obtained three novel nodulin cDNAs (c22, b6a, b17b). The ORF (147 a.a.) of c22 has two repeated penta-peptide sequences, and a putative signalpeptide sequence at amino terminal. We studied the localization of the c22 product by immunohistochemical technique. The product of c22 was seen along the cell wall of almost all of the infected cells. The signal was seen in immature cells which contained immature bacteroids. Therefore, the expression of c22 may be very useful as a cytological marker of symbiosis in the nodule.

研究目的

窒素は植物の3大栄養素の一つで生育に必須であるが、作物の多くは空中の窒素分子は利用できず、肥料として与える必要がある。しかし、マメ科植物は根粒菌との共生により空中の遊離の窒素分子を固定し利用できる。この窒素固定能力をイネ科の主要作物に付与できれば、その生産性は飛躍的に向上するはずである。この、究極の目的の達成のためには、まずモデル植物を用いて窒素形成の仕組みの分子機構を解明する必要がある。我々は根粒形成のモデル植物として、レンゲソウ (*Astragalus sinicus*) に着目して、研究を行っている。

本研究の目的は、まずレンゲを用いたモデル系を確立するために、(1)高解像度の光学顕微鏡観察を行い、根粒形成過程における細胞分化の指標を新たに設定し、根粒内における細胞の機能分化の進行を精確に記載すること、(2)根粒形成の分子機構の解明のために、根粒特異的に発現するレン

ゲソウの遺伝子群をクローニングし、高解像度の組織観察法により根粒内での機能発現を調べ、重要と思われる遺伝子を取得することである。

研究経過

(1)組織化学的な観察

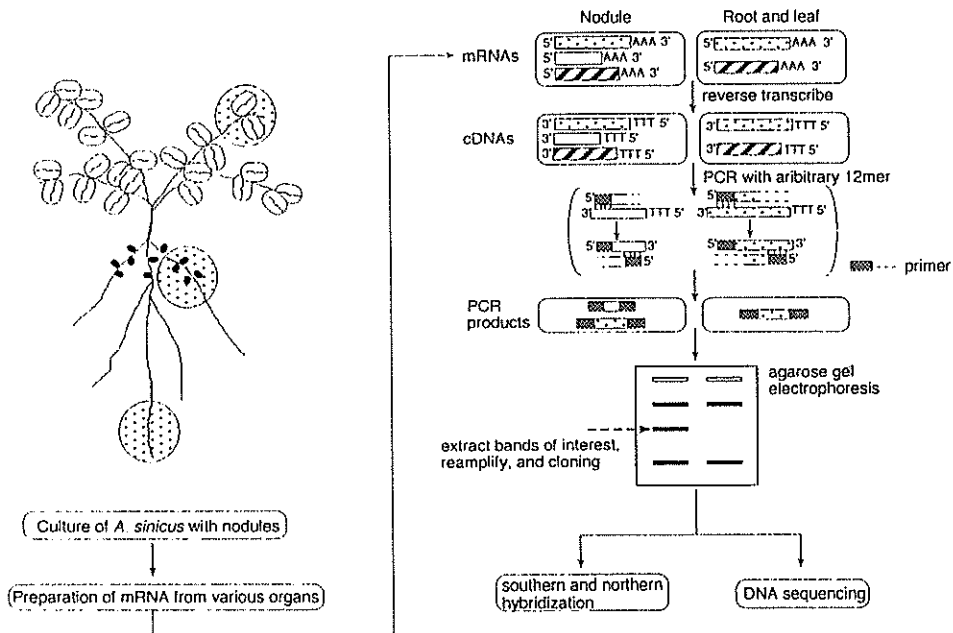
試料を樹脂に包埋する条件を検討し、高解像度の光学顕微鏡観察を可能にした。試験管内で形成させた根粒を材料に、組織化学的な観察を行い、根粒内での細胞分化の様子を明らかにした。

(2)根粒で発現する遺伝子の単離

cDNAライブラリーを始めに作成するDifferential hybridization法(DH法)、PCRを利用したDifferential Display法(DD法)によりスクリーニングを行った。Differential hybridization法で3個の新規nodulin、Differential Display法で2つの有力な候補を取得した。

図1にDifferential Display法を示す。

図 1



研究成果

(1) DD、DH 法によるクローンの取得

表 1, 2 に取得したクローンの一覧を示す。

DD法で取得したAS1はダイナミンのホモログであると考えられる。ダイナミンは動物細胞においてエンドサイトーシスに関与し、また植物細胞では細胞分裂時に機能することが判明している。今回取得したAS1は植物内の他の組織よりも根粒内で強く発現しており、根粒形成に何らかの関与が考えられる。AS32はプロテアーゼの一部であると考えられる。DH法では新規 nodulin を計 3 個取得した。そのうち、c22 はシグナルペプチドを持ち分泌型のタンパクであると考えられる。

	DNA homology point		A.A. homology point	
AS1	F14238 ¹⁾	76.1%	734	dynamin 29.7% 465
AS4	Z46539 ¹⁾	77.0%	518	Msl 34.7% 123
AS5	.. ²⁾			Yeas ORF 43.4% 175
AS6	T21793 ¹⁾	67.6%	475	.. ²⁾
AS7,8	.. ²⁾			Mel18 24.6% 105
AS9,10	YDR1	54.9%	519	Myosin 31.3% 149
	PDR10	54.7%	540	YDR1 39.2% 677
	T45934 ¹⁾	66.3%	503	
AS11	.. ²⁾			.. ²⁾
AS12	.. ²⁾			.. ²⁾
AS14	.. ²⁾			.. ²⁾
AS15	.. ²⁾			.. ²⁾
AS16	ubiquitin rpn	76.1%	687	rpn 98.1% 380
	.. ²⁾			ubiquitin 96.4% 134
AS21	.. ²⁾			.. ²⁾
AS22	aconitase	76.4%	1117	aconitase 49.7% 486
AS32	.. ²⁾			cysteine protease 46.0%

1) cDNA of *Arabidopsis thaliana* (EST) accession number
2) No significant homology

表1 DD方法で取得したクローン

Clone	Group	Expression	homologous gene
a18	60	nodule specific	leghemoglobin
d29	1	nodule specific	leghemoglobin
b16	1	nodule specific	ENOD2
c8	1	nodule enhanced	asparagine synthetase
b4b	7	nodule specific	ENOD3/14
b8b	1	nodule specific	ENOD3/14
c2217	1	nodule specific	ENOD3/14
b6b	5	nodule enhanced	ascorbate peroxidase
c22	1	nodule specific	novel
b6a	1	nodule specific	novel
b17b	1	nodule specific	novel

表2 DH法で取得したクローン

(2) 組織化学的な解析

Differential hybridization で取得した新規 nodulin のうちc22の組織・細胞内での局在を、高解像度の組織観察方法で検討した。その結果、c22は根粒菌が宿主細胞内に侵入すると直ちに発現を開始し、細胞壁に沿って存在することが判明した。

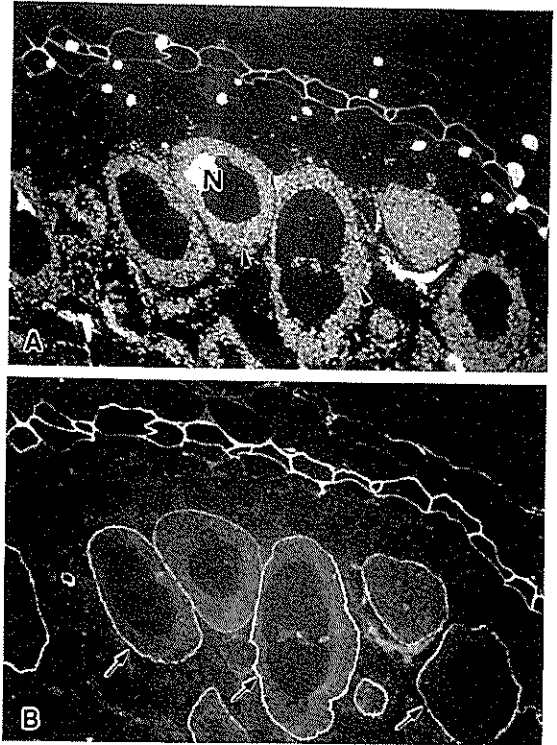


図 2。根粒先端部の抗c22抗体での染色。

上側は、DAPIによるDNAの染色、下側は抗c22による染色。(N) ; 細胞核、矢頭は根粒菌。

今後の課題と発展

(1) AS1 (ダイナミン様タンパク) の解析

エンドサイトーシスに関与していると考えられる、ダイナミン様のタンパク質 (AS1) は、根粒菌が宿主細胞内に進入する際の、ペリバクテロイド形成に機能する

ことが考えられ、非常に興味深い。そこで、AS1に対する抗体を作成し、免疫電顕法で根粒菌感染時の局在を調べ、その機能を推察する。また、現在の予備的な実験により、シロイヌナズナにおいてAS1のホモログが存在することが確かめられている。そこで、シロイヌナズナのAS1ホモログを取得し、AS1の根粒以外での機能を調べていく。

(2) C22の発現の解析

免疫組織化学的な手法により、宿主細胞が根粒菌と共生を開始するとその直後にc22のタンパク質の遺伝子発現が見られることがわかった。C22は宿主細胞内への根粒菌感染のマーカーとして有用であると考えられる。c22のプロモーター領域を取得し、その上流域を解析することで、根粒菌が細胞に侵入した直後の諸反応を解明可能である。

(3) AS32(プロテアーゼ様タンパク質)の解析

根粒関連遺伝子としてプロテアーゼが取得された例は、マメ科植物では例がなく、非常に興味深い。プロテアーゼは、植物細胞内での、根粒菌の過剰増殖の抑制等に働くことが考えられる。AS32の全長を取得し、その根粒内での機能を調べていく。

(4) 新規遺伝子のスクリーニング

現在までのスクリーニング方法で、新規nodulin(根粒関連遺伝子)が取得できることが確認できた。今後、さらにこのスクリーニングを継続し、新規nodulinを取得する。

発表論文リスト

なし