

ダイズ根におけるType1メタロチオネイン遺伝子の過剰発現
が根粒着生および菌根形成に及ぼす影響

千葉大学大学院 園芸学研究科

坂本 一憲

ダイズはタンパク源や健康食品として重要であるが、近年はリン酸などの肥料資源の枯渇や気候変動による栽培環境の悪化によって低肥料性でかつ環境ストレスに耐性を持つダイズの作出が緊迫の課題となっている。一方、ダイズには根粒菌とアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) が二重に共生している。ダイズから光合成産物を受け取る代わりに、根粒菌は窒素、AM 菌はリン酸や微量元素の供給を行う。また AM 菌は宿主のストレス耐性を高める働きも持つ。しかし共生時には共生菌による感染ストレスが生じ、根粒と菌根内に過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種 (ROS) が発生する (Fester and Hause, 2005)。これまで申請者らのグループではダイズの根粒・菌根共生系で発現上昇する宿主遺伝子を網羅的に解析し、Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) が二重共生系を成立させるための必須遺伝子の一つであることを明らかにしてきた (Sakamoto *et al.*, 2019)。メタロチオネインは、植物の細胞内の金属イオンの濃度調節や環境ストレス下で発生する ROS の消去・調節に関与することが報告されている (Hassinen *et al.*, 2011) が、ダイズの根粒・菌根共生系における役割は明らかになっていない。

そこで本研究では、*GmMT1* が根粒・菌根共生系で発生する ROS を消去し共生器官を酸化ストレスから保護する役割を持つという仮説を立て、*GmMT1* の役割解明について以下の実験を行った。まず実験 1 としてダイズ根における *GmMT1* 発現量と *GmAPX* 発現量との関係について検討した。引き続き実験 2 としてダイズの毛状根形質転換体を作成して *GmMT1* の発現抑制および過剰発現が共生菌の感染および毛状根における H_2O_2 含有量に及ぼす影響について検討した。

【実験 1】ダイズ根における *GmMT1* 発現と *GmAPX* 発現との関係

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) は抗酸化酵素の一つであり、 H_2O_2 によって発現誘導されることが知られている。ダイズの根粒・菌根共生系において、*GmMT1* 発現量と *GmAPX* 発現量との間における相関関係を調べることで、*GmMT1* が *GmAPX* と同様に H_2O_2 をシグナルとして発現上昇している可能性について調べた。

実験方法

供試材料としてダイズは品種エンレイ (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Enrei)、根粒菌は *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110、AM 菌は *Claroideoglossum etunicatum* を使用した。試験区として共生菌非接種区 (C 区)、根粒菌単独接種区 (R 区)、AM 菌単独接種区 (AM 区)、根粒菌・AM 菌二重接種区 (RAM 区) の 4 区を設定した。園芸学部内のガラス温室内でポット栽培を行い、6 週間後 (開花期) と 9 週間後 (莢伸長期) にダイズ根を採取した。ダイズ根の *GmMT1* 相対発現量および *GmAPX* 相対発現量を RT-リアルタイム PCR 法を用いて測定した。*GmMT1* 発現量の測定法は既に申請者らによっ

て検討され確立済みである (Ibiang *et al.*, 2018)。まず試料から total RNA を抽出した。得られた total RNA は逆転写して cDNA を合成した。既にデザインし公表している *GmMT1* を特異的に増幅するプライマーを用いてリアルタイム PCR を行ない、*GmMT1* の遺伝子発現量を求めた。内部標準遺伝子としてユビキチン遺伝子 (*GmSUB1*) の発現量を測定し、*GmMT1* の発現量を正常化した。*GmAPX1* についても特異的プライマー設計を設計し、同様の方法で相対発現量を測定した (大草ら, 2017)。

実験結果および考察

GmMT1 発現量は 6 週、9 週ともに AM 区および RAM 区で有意に高かった (Fig. 1)。また 6 週、9 週ともに *GmMT1* 発現量と *GmAPX* 発現量 (Fig. 2) との間に有意な正の相関関係が認められた (Fig. 3)。

以上の結果から、*GmMT1* は菌根形成によって発現が上昇することが示唆された。また、*GmAPX* 発現量と正の相関関係が見られたことから、*GmMT1* は H_2O_2 をシグナルとして発現上昇すると考えられた。

【実験 2】ダイズの毛状根形質転換体を用いた *GmMT1* の発現抑制および過剰発現が共生菌の感染および H_2O_2 含有量に及ぼす影響

ダイズの毛状根形質転換体において *GmMT1* の発現抑制および過剰発現を行い、根粒着生、菌根形成、 H_2O_2 含有量、抗酸化機能にどのような影響を及ぼすか明らかにすることで、*GmMT1* が感染ストレスで発生する ROS の消去に関わるという仮説を検証した。

実験方法

供試材料は実験 1 と同じダイズ、根粒菌および AM 菌を用いた。ダイズの毛状根形質転換体を作製するため、アグロバクテリウム (*Agrobacterium rhizogenes* MAFF210265 国内野生株) と、pUB-GWS-GFP (発現抑制ベクター) および pUB-GW-GFP (過剰発現ベクター) を使用した。アグロバクテリウムは農研機構の農業生物資源ジーンバンク、またベクターはナショナルバイオリソースプロジェクトから入手した。試験区は、ベクターについて GWS・Empty vector 区 (EV1)、GWS・*GmMT1* 発現抑制区 (KD)、GW・Empty vector 区 (EV2) および GW・*GmMT1* 過剰発現区 (OX) の 4 試験区を設け、さらにそれぞれについて共生菌非接種系列 (C) と二重接種系列 (RAM) を設けた (合計 8 試験区)。

ダイズの毛状根形質転換体の作製は全て園芸学部内にある隔離温室内で行った。まずダイズ種子を川砂培土を充填したポットに播種した。出芽後 6~7 日後のダイズ実生の下胚軸に発現抑制ベクターまたは過剰発現ベクターを導入したアグロバクテリウムを注射

器で接種後、液肥を与え 2 週間栽培した。その後ダイズをポットから取り出し、アグロバクテリウムの接種部から毛状根が発根していることを確認した。毛状根以外の根は吸水用に少し残して切除した。別のポットに川砂を半量加えダイズを移植した。C 系列のダイズには何も接種せずに川砂をポットに充填した。RAM 系列のダイズには根粒菌と AM 菌を接種した後、川砂をポットに充填した。その後ダイズは液肥を与え 6 週間栽培を行なった後、毛状根を採取した。

まず植物体から毛状根部分を切り離した。その一部は蛍光実体顕微鏡を用いて GFP の蛍光を観察し、目的遺伝子が導入されていることを確認した。根粒が数個付いている毛状根を H_2O_2 含有量の測定用に採取した後、毛状根から根粒を除去し根粒数と根粒新鮮重を測定した。菌根形成率の測定に用いる毛状根は採取後、ホルマリン酢酸溶液に浸漬して保存した。また total RNA の抽出に用いる毛状根は液体窒素で瞬間凍結し、 $-80^{\circ}C$ で保存した。毛状根における菌根形成率は常法を用いてトリパンプルーで毛状根を染色し、Trouvelot らの方法を用いて測定した (Trouvelot *et al.*, 1986)。 *GmMT1* および *GmAPX* 相対発現量は実験 1 と同様に RT-リアルタイム PCR 法を用いて測定した。 H_2O_2 含有量は DAB 染色強度法を用いて測定した。DAB (ジアミノベンジジン) は H_2O_2 を電子受容体に用いて抗酸化酵素であるペルオキシダーゼによって酸化重合し植物組織に沈着して赤褐色を呈する。撮影した試料の写真を画像解析することで DAB の染色度合の数値化を行なった。この方法は申請者らによって開発されたものである (Ibiang *et al.*, 2017)。

実験結果および考察

RAM 系列の KD 区において *GmMT1* 発現が 71% 有意に減少し、同系列の OX 区において *GmMT1* 発現が 32% 有意に増加した (Fig. 4)。また、KD 区において根粒着生および菌根形成が阻害され、OX 区において菌根形成が促進される傾向が見られた (Fig. 5～Fig. 6)。このことから、*GmMT1* は共生菌の感染を促進する働きを持つことが推察された。RAM 系列の DAB 染色強度 (Fig. 8) を菌根形成強度の値 (M%) で除し、菌根部分当たりの DAB 染色強度 (Fig. 9) を算出したところ、KD 区で有意に高く、OX 区で有意に低かった。このことから、*GmMT1* の発現が減少すると菌根形成由来の H_2O_2 が蓄積され、*GmMT1* の発現が上昇すると菌根形成由来の H_2O_2 の消去が盛んに行われることが推察された。RAM 系列の *GmAPX* 発現量 (Fig. 10) を M% で除し、菌根部分当たりの *GmAPX* 発現量 (Fig. 11) を算出したところ、この値は KD 区で上昇し、OX 区で減少する傾向を示した。このことから、*GmAPX* の発現は菌根形成由来の H_2O_2 によって誘導されると考えられた。

【総合考察】

今回実施した二つの実験結果から、ダイズの根粒・菌根共生系において *GmMT1* は、

1) 菌根形成によって発現上昇し共生菌の感染を促進すること、2) *GmAPX*と同様に H_2O_2 によって発現誘導されていること、3) そしてダイズ根において菌根形成由来の H_2O_2 を消去する役割を持つことが示唆された (Fig. 12)。

以上のように本研究の実施によって *GmMT1* の役割が明確化された。この成果によってダイズの根粒・菌根二重共生系の成立メカニズムの一端が分子レベルで明らかにされたと考えられる。本研究の成果は、今後ダイズの二重共生系を強化するゲノム育種技術の開発を目指す研究へと発展させることができると思われる。そして将来的に二重共生系を強化した低肥料性・ストレス耐性ダイズの作出が可能になると考えられ、肥料価格の高騰や栽培環境の悪化に対応した農業技術への貢献が見込まれる。

【要約】

ダイズには、根粒菌とアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) が二重に共生している。これまで申請者らのグループではダイズの根粒・菌根共生系で発現上昇する宿主遺伝子を網羅的に解析し、Type1 メタロチオネイン遺伝子 (*GmMT1*) が二重共生系を成立させるための必須遺伝子の一つであることを明らかにしてきた。メタロチオネインは、植物の細胞内の金属イオンの濃度調節や活性酸素種 (ROS) の消去・調節に関与することが報告されているが、ダイズの根粒・菌根共生系における機能は明らかになっていない。そこで本研究では、*GmMT1* が根粒・菌根共生系で発生する ROS を消去し共生器官を酸化ストレスから保護する役割を持つという仮説を立て、*GmMT1* の役割解明について以下の実験を行った。

まず実験 1 としてダイズ根における *GmMT1* 発現量と H_2O_2 を消去する機能がすでに明らかになっている *GmAPX* 発現量との関係について検討した。その結果、両遺伝子の発現量は有意な正の相関関係を示し、*GmMT1* は *GmAPX* と同様に H_2O_2 によって発現上昇していることが考えられた。引き続き実験 2 としてダイズの毛状根形質転換体を作製して *GmMT1* の発現抑制および過剰発現が共生菌の感染および毛状根の H_2O_2 含有量に及ぼす影響について検討した。その結果、*GmMT1* の発現抑制によって毛状根の根粒着生および菌根形成が阻害され、過剰発現によって菌根形成が促進される傾向が認められた。また毛状根の菌根部分の当たりの H_2O_2 含有量は *GmMT1* の発現抑制によって有意に増大し、過剰発現によって有意に減少した。以上の実験結果から、*GmMT1* は二重共生下のダイズ根において発生する H_2O_2 を消去し、その酸化ストレスから二重共生系を保護する役割を持つことが示唆された。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝いたします。

【文献】

- Fester, T. and Hause, G. (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, **15**, 373-379.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H. and Kärenlampi (2011) Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, **13**, 225-232.
- Ibiang, Y.B., Mitsumoto, H. and Sakamoto, K. (2017) Bradyrhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi modulate manganese, iron, phosphorus, and polyphenols in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under excess zinc. *Environmental and Experimental Botany*, **137**, 1-13.
- Ibiang, Y.B. and Sakamoto, K. (2018) Synergic effect of arbuscular mycorrhizal fungi and bradyrhizobia on biomass response, element partitioning and metallothionein gene expression of soybean-host under excess soil zinc. *Rhizosphere*, **6**, 56-66.
- 大草遥・北澤悠里香・坂本一憲・園田雅俊（2017）ダイズの根粒・菌根共生系における各種抗酸化酵素遺伝子の発現とそれらの相互関係，日本土壌肥料学会講演要旨集，**63**，p. 30.
- Sakamoto, K., Ogiwara, N., Kaji, T., Sugimoto, Y., Ueno, M., Sonoda, M., Matsui, A., Ishida, J., Tanaka, M., Totoki, Y., Shinozaki, K. and Seki, M. (2019) Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *Journal of Plant Research*, **132**, 541-568.
- Trouvelot, A., Kough, J.L., and Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (ed.) Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, p.217–221. INRA, Paris.

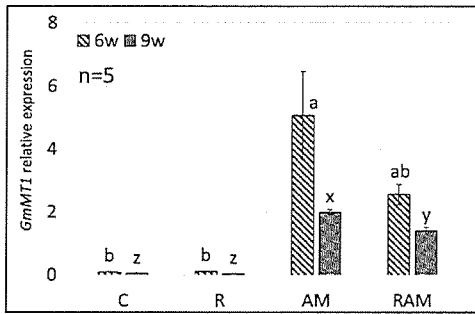


Fig. 1 *GmMT1* 相対発現量

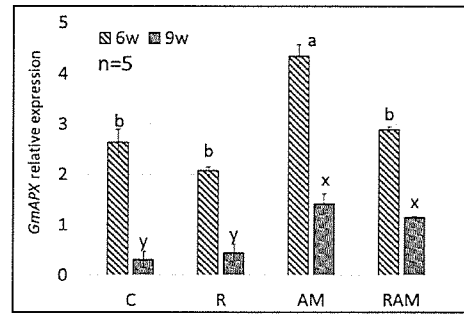


Fig. 2 *GmAPX* 相対発現量

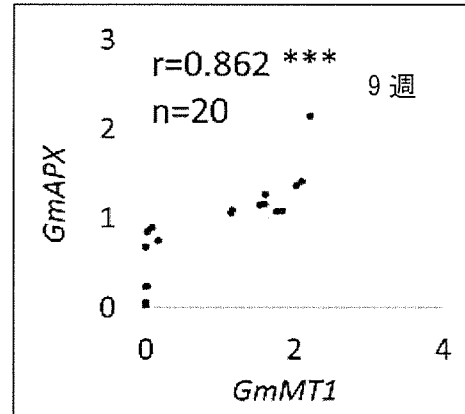
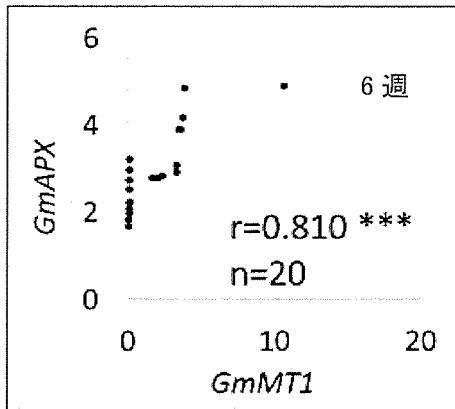


Fig. 3 *GmMT1* 発現量と *GmAPX* 発現量の相関関係

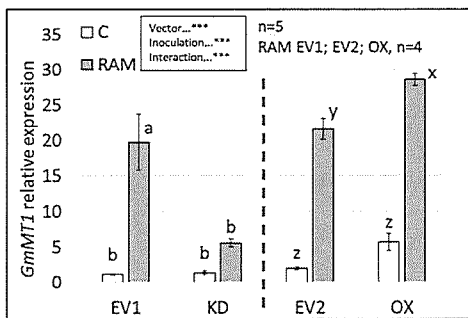


Fig. 4 毛状根の *GmMT1* 相対発現量

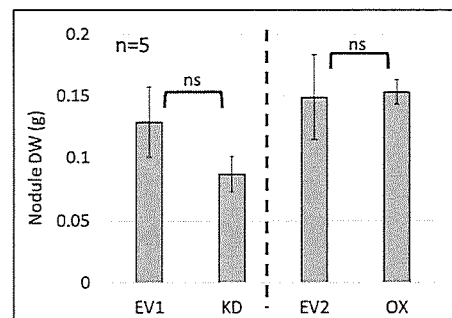


Fig. 5 根粒乾物重

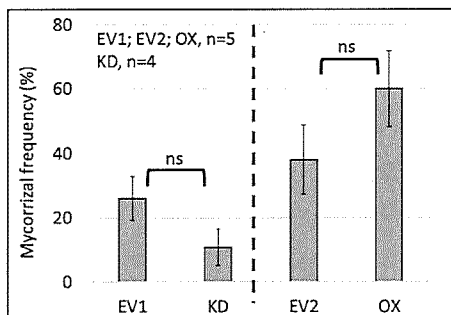


Fig. 6 菌根形成頻度 (F%)

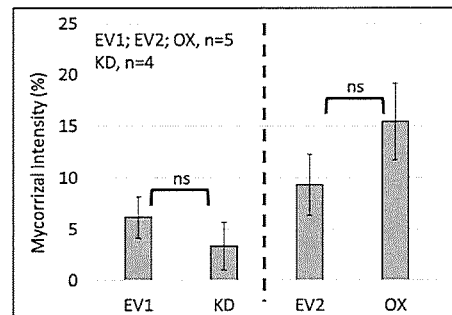


Fig. 7 菌根形成強度 (M%)

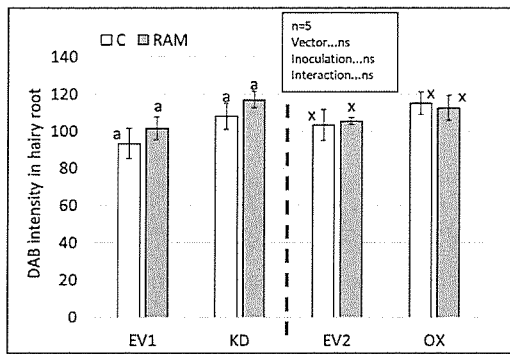


Fig. 8 毛状根の DAB 染色強度

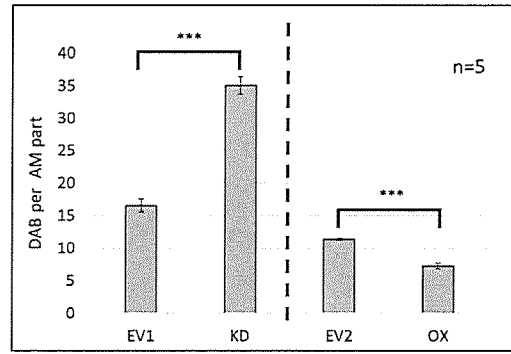


Fig. 9 菌根部分当たりの DAB 染色強度

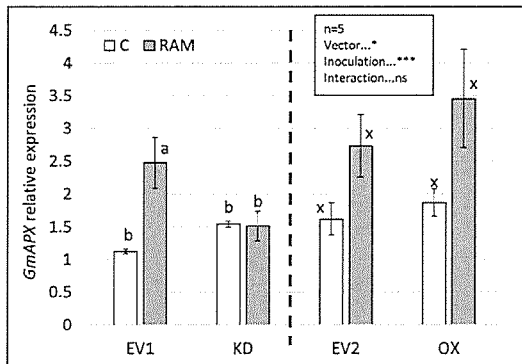


Fig. 10 毛状根の *GmAPX* 相対発現量

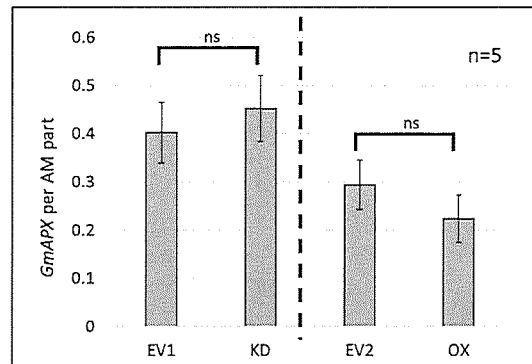


Fig. 11 菌根部分当たりの *GmAPX* 発現量

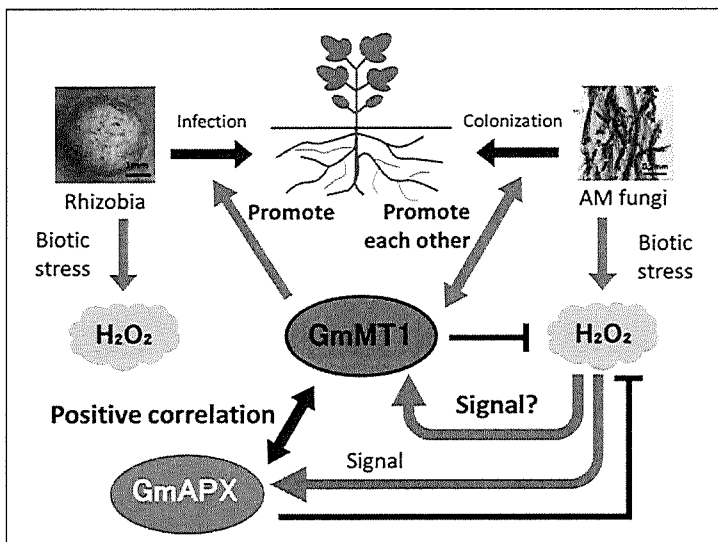


Fig. 12 ダイズの根粒・菌根共生系において推定される *GmMT1* の機能と様々な因子との関係

エラーバーは標準誤差を示す。

二元分散分析およびスチュー

デントの *t* 検定において、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ で有意差が検出されたことを示し、nsは $P = 0.05$ で有意差が検出されなかったことを示す。

同一英文字は、Tukey-Kramer 検定 ($P = 0.05$) において有意差が検出されなかったことを示す。

ピアソンの相関検定において、***は $P < 0.001$ で有意な相関関係が検出されたことを示し、nsは $P = 0.05$ で有意差が検出されなかったことを示す。