根粒形成にかかわる宿主植物側遺伝子†

河 内 宏

(農業生物資源研究所)

マメ科植物根粒における共生窒素固定は宿主植物-根粒菌の複雑な相互作用のうえに成り立っている。近年、根粒菌の根粒形成 (*nod*) 遺伝子の機能解析が進み、感染と宿主認識の分子機構についての微生物側からの解析は大きく前進した(本レビュー-東の項参照)。しかし、感染・認識にかかわる植物側の因子についてわかっていることは少なく、とくに、植物側にプログラムされている感染後の根粒形成の分子機構はほとんど解明されていない。

根粒の形成に伴って植物、根粒菌の双方に特異的な遺伝子発現が認められるが、そのうち植物側にコードされる遺伝子産物は“nodulin”と総称されている。もっともよく知られている nodulin は、根粒中に大量に存在するレグヘモグロビン (Lb) のアポ蛋白で、好気生物である根粒菌に十分な酸素を供給しつつ、ニトロゲナーゼの活性発現に必要な低酸素分圧を維持するという重要な生理的役割を果たしている。多くの nodulin は、Lb と同様に根粒菌の窒素固定活性の発現の直前またはそれとほぼ同時期に誘導され、後期 nodulin と呼ばれる。これに対して、感染・根粒形成の初期に誘導されるものは初期 nodulin (以下 ENOD と表記) と呼ばれ、根粒形成と共生窒素固定能の誘導に重要な役割を持つと考えられている。本稿では、これら ENOD を中心に共生窒素固定の初期過程に関する植物側の研究の一端を紹介する。

1. 根粒の形成過程

根粒の形成過程は、マメ科植物と根粒菌の種類によって一様ではなく、またとくに初期過程については組織学的に完全に解明されているわけではないが、ダイズの場合通常、根粒菌は生長中の根毛に付着し、その変形を引

き起こす。ついで表皮直下の皮層細胞に分裂(1次分裂域)が誘導され、さらに根の内鞘(pericycle)が分裂を始め(2次分裂域)、これはやがて1次分裂域に融合して根粒原基への通導組織を形成する(図1)。これらの過程と平行して根粒菌は根毛から感染糸を形成しつつ皮層細胞に進入し、増殖して根粒細胞中に放出される。そして宿主細胞原形質膜に由来するペリバクテロイド膜によって宿主細胞質と隔離され、根粒の構造が完成した後に、特異に分化した宿主細胞=根粒細胞との緊密な代謝的相互作用⁽⁷⁾のうえに窒素固定活性を発現する。根粒菌の根毛への付着は宿主選択的な現象ではなく、根毛の変形が感染成立の最初の表現型とみなされている。いくつかの根粒非着生植物変異体の解析などから、皮層細胞の分裂誘導をむしろ最初の反応とする考えもあるが、通常の感染過程では根毛の変形がもっとも初期におこる。しかし、根毛の変形およびそれに引き続く菌の細胞内進入と、皮層細胞分裂は互いに独立した現象であり⁽⁸⁾、根粒菌の宿主特異性は皮層細胞分裂の誘導においてもっとも厳密にあらわれる。

2. ENOD 遺伝子の発現様式

図1に示すような感染・根粒形成の初期過程で、発現が誘導される ENOD の cDNA クローンを表1にまとめた。根粒形成は根の一部の表面で局所的におこるため、その初期過程での生理的な変化や、蛋白レベルでの変動をとらえることはきわめて困難で、これらのクローンはすべて形成初期の根粒 cDNA ライブラリーから差スクリーニング法によって単離された。同じ理由によってこれらの遺伝子の発現様式の解析は通常のノーザン分析では困難な場合が多く、もっぱら組織切片による *in situ* ハイブリダイゼーションが用いられている。ENOD の発現時期は個々の遺伝子によって異なり、もっとも早いものは根粒菌接種後数時間以内に発現する(PsENOD 12)。多くの ENOD は、根粒原基の形成(図1の2または3)までには誘導されるが、GmN 70 や GmN 315 の

† Host Plant Genes Involved in Root Nodule Formation.

Hiroshi KOUCHI (Department of Applied Physiology, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305)

図 1 ダイズ根粒形成の初期過程。根粒菌は根毛に付着して根毛の変形（カーリング）を引き起こし（1），ついで表皮直下の皮層細胞分裂（1次分裂組織）が始まり（2），やがて2次分裂組織（3，矢印左側）が形成され，これは根粒原基（矢印）と融合して通導組織（4，矢印）を形成する。写真4が播種・根粒菌接種後 6～7 日目に相当し，窒素固定活性は通常 12～13 日目にあらわれる。

表 1 種々のマメ科植物から単離されている主な初期 nodulin の cDNA クローン。GmENOD 40 の homolog は最近，エンドウ，アルファルファ根粒からも単離されている。

Clone	Host plant	Predicted protein	<i>In situ</i> localization of mRNA	Induction	Ref.
ENOD 2	<i>G. max</i> <i>P. sativum</i> <i>M. sativa</i>	HyPro-rich cell wall protein	Nodule parenchyma	Cytokinin, Nod factors	1, 2
GmENOD 40* (GmN36)	<i>G. max</i>		Infected root pericycle, Primary meristem, Vascular bundle pericycle	Nod factors	3, 4
GmN93	<i>G. max</i>		Bacterial-invaded (infected) cells		3
PsENOD 5	<i>P. sativum</i>	Cell wall glycoprotein	Infected cells	Nod factors	6
PsENOD 12*	<i>P. sativum</i>	HyPro-rich cell wall protein	Cells with preinfection threads, Infected cells	Nod factors	5
PsENOD 14	<i>P. sativum</i>	Metal-binding	Infected cells		6
PsENOD 3	<i>P. sativum</i>				6
GmN70	<i>G. max</i>	Trans-membrane			3
GmN315	<i>G. max</i>	Metal-binding glycoprotein	Infected cells(?)		3

* 茎でも弱く発現。

ように，根と根粒原基を連結する通常組織系の完成後（図1の4）に発現するものもある。

ENOD 2は発現量が多く，種々のマメ科根粒についてもっともよく研究されている。感染初期には ENOD 2は根粒原基周辺の柔細胞に発現し，成熟した根粒では感染細胞領域をかこむ皮層細胞に特異的に発現する^(2,9)。この遺伝子のコードする蛋白は，2ないし3個の（Hy）Proを含むペプタペチドの繰返し配列を持ち，細胞壁糖蛋白の特徴を有している。類似の繰返し配列を持つ ENOD は他にもいくつか見いだされており，そのほとんどは根粒柔細胞に特異的に発現する。しかし，エンドウの ENOD 12は感染糸または前感染糸^(5,10)を含む細胞に特異的で，感染糸形成に関与すると推定されてい

る⁽⁵⁾。最近ダイズから単離された ENOD 40（GmN 36）は，感染初期に感染部位から離れた根の内鞘細胞にまず発現し，わずかに遅れて感染部位の1次分裂域に発現する。根粒の発達に伴って，根中心柱と根粒原基を連結する通導組織にそって発現し，成熟根粒では皮層中に分布する維管束系の内鞘細胞に特異的である（図2）。これらのことから，ENOD 40は通導系の形成ないしはその機能に関与するものと推定されているが，感染初期における発現誘導が1次および2次分裂組織を準備する細胞に特異的であることから，細胞分裂誘導との関連も指摘されている。

ENOD 遺伝子の多くは，異種のマメ科植物根粒に共通して見いだされ，それらの時間的・空間的な発現様式

図 2 ダイズ感染根および根粒における GmN36 (ENOD40) mRNA の局在⁽⁸⁾. 1. 感染初期 (播種・接種後 4 日目) の根の横断面. GmN36 は感染部位の表皮直下の皮層細胞 (1 次分裂域, 右矢印), および対応する根中心柱の pericycle (左矢印) に発現する. 2. 成熟根粒 (14 日目). GmN36mRNA は根粒の parenchyma (P) 中に分布する通導組織 (維管束系, V) の pericycle (太矢印) に局在する. IC, 感染細胞.

は基本的に共通しており, それらの発現が根粒菌との相互作用によって厳密に制御されていることを示している. ENOD 遺伝子のコードする蛋白のほとんどは今のところ既知の蛋白との相同性は認められず, それぞれの機能の解明は今後の研究に待たねばならない. しかし, 発現時期・発現部位に関する知見と, 多くの ENOD 遺伝子の発現が根粒菌の細胞内共生を必要としない (後述) ことなどから, ENOD は共生の機能的な側面 (窒素固定能発現) よりむしろ, 根粒の形態形成に関連して何らかの機能を果たしている可能性が強い. 実際, エンドウマメの根粒非着生突然変異 (sym2) が, Ps ENOD12 遺伝子の変異と関連していることが示唆されている.

3. 根粒菌のシグナル物質と ENOD 発現

ある種の根粒菌変異体は感染糸を形成できず, したがって細胞内共生の能力を欠くが, このような菌によって誘導されたいわゆる “empty nodule” でも, ENOD2 は発現している⁽¹¹⁾. また, 根粒菌の Sym プラスミドを導入したアグロバクテリウム⁽¹²⁾や, オーキシン輸送阻害剤⁽¹³⁾によって誘導される “疑似根粒” でも発現が認められる. これらの事実は, ENOD2 の発現は感染初期における植物細胞表面での植物-微生物相互作用に依存しており, さらにこの相互作用は植物ホルモンの何らかの変化を介して, ENOD2 の発現を誘導するということを示唆している. 実際, ENOD2 はサイトカイニンで誘導

されることがわかっている⁽¹⁴⁾. さらに最近, こうした感染初期の相互作用にかかわる根粒菌のシグナル物質 (Nod factors) が単離され, 構造が決定された^(15,16). これは 3~5 個のアシルグルコサミンを骨格とするオリゴサッカライドで, ごく低濃度で対応する宿主植物に根毛の変形だけでなく, 根粒原基の形成を誘導し, さらにアルファルファではほぼ完全な根粒を形成することができる. Nod factor (およびその前駆体) は, このように根粒の形態形成の引き金となるが, 同時に植物に病原感染の際におけるような防御反応を引き起こすことなく, 根粒という特異な器官形成を通じて細胞内共生にむかうことを方向づけるシグナル物質と考えられる. 現在までに, これら Nod factor を対応する宿主植物根に投与することによって, ENOD2 をはじめいくつかの ENOD 遺伝子が誘導されることがわかっている. エンドウの ENOD5 と ENOD12 は, それぞれまったく異なった発現部位を示すが, これらは異なった側鎖の構造をもつ Nod factor によって誘導される. Nod factor を検知する植物側のレセプターは, 表皮細胞または皮層細胞の表面に存在すると考えられ, ENOD 遺伝子の誘導に至るまでには複雑なカスケードが介在すると思われる. 今後, レセプターの同定をはじめとして, Nod factor の作用点が明らかにできれば, 根粒菌の感染から ENOD 遺伝子の発現に至るシグナル伝達機構の解明の道が開かれるだろう. いくつかの ENOD 遺伝子は, 当面, Nod factor の作用機構解析のためのよいマーカー遺伝子である.

Nod factor のみによって, あるいは共生能を欠く変異菌によって形成された疑似根粒は, 感染細胞に相当する大きな細胞と非感染細胞に相当する小さな, 澱粉粒を多く含む細胞, およびそれらを囲む柔組織を持ち, 真正の根粒とはほぼ同様な組織形態を示すことから, 根粒の形態形成のプログラムは大部分 (またはすべて), Nod factor によってオンされると考えられている. しかし, このような根粒での後期 nodulin の発現は報告されておらず, 機能的な共生の実現のために, 植物細胞内に進入したバクテリアと宿主細胞の間で未知のシグナル交換が存在する可能性が高い⁽¹⁷⁾. たとえば, 感染初期における ENOD40 の発現は Nod factor のみによって誘導されることができるが, 成熟根粒における通導系内鞘での発現 (図2) は, 共生能を欠く変異菌によって形成された根粒では誘導されない⁽⁴⁾. このことは, ENOD40 の部位特異的な発現がそれぞれ異なったメカニズムによって

制御されていることを示すだけでなく、成熟根粒の通導系での発現がバクテリアの細胞内共生に依存することを強く示唆している。

4. 皮層細胞分裂の誘導機構

根粒形成は例外なく皮層細胞の分裂によって開始し、内鞘細胞の分裂による側根形成とは明確に区別される。Nod factor による宿主選択は、根毛の変形などの初期の表現型よりもむしろ、皮層細胞分裂の誘導においてもっとも厳密に行われている、したがって、Nod factor から皮層細胞分裂に至るシグナル伝達経路の解明は、根粒形成にかかわる植物-微生物相互作用を理解するために不可欠である。生長点以外の根の皮層細胞は分裂していないが、それらは細胞周期の G1 (または G0)、あるいは G2 で停止しており、根粒原基の形成に至る細胞分裂は G2 期にある細胞に誘導されるらしい^(4,18)。高等植物における細胞分裂の制御機構はほとんど不明だが、酵母や動物での研究によって、G2 からM期への移行においては、蛋白質リン酸化酵素 p34^{cdc2}、これとダイマーを形成して酵素活性の発現に必要なサイクリン (cdc13)、および p34^{cdc2} を脱リン酸化して活性型にかえる cdc25 が中心的な役割を持つことがわかっており、こうした基本的な制御メカニズムはすべての真核細胞に普遍的であるとみなされている⁽¹⁹⁾。とくにサイクリンは細胞周期に連動して発現量が大きく変動し、その転写レベルでの調節は分裂開始にきわめて重要な役割を果たすと考えられている。最近、発達中のダイズ根粒からサイクリンの cDNA が単離され、それが動物のサイクリンと同様の機能を持つことが示された⁽²⁰⁾。ダイズ根粒では分裂生長は根粒形成の初期に限られており、窒素固定活性の発現後はもっぱら細胞肥大によって生長するが、サイクリン遺伝子は、活発に分裂中の若い根粒で強く発現する。ダイズ根粒では少なくとも4種の異なるサイクリンが存在するが、それらはいずれも根粒だけでなく、根端や茎頂などの分裂組織で同等に発現している⁽²¹⁾。一方、cdc2 遺伝子も各種の植物から単離されており、それらは動物のそれと同様に酵母の cdc2 変異を相補できる⁽²²⁾。ダイズからは3種の互いに構造の異なる cdc2 が単離されたが、そのうちの1つは他の分裂組織と比較して形成途中の根粒でとくに強く発現しており、cdc2 の発現には組織特異性があるようである⁽²¹⁾。

Nod factor は、おそらく植物ホルモンバランスの局所的な変化を介して⁽²³⁾、あるいはそれと協同的に、サイ

クリンまたは cdc25 の一方または両方の機能発現に関与し、それによって皮層細胞分裂が開始するという考えは非常にありそうなことに思える。これら細胞周期関連遺伝子を細胞分裂開始の分子マーカーとして、Nod factor による皮層細胞分裂の誘導機構が解明されていくことが期待される。これはまた、ENOD 遺伝子の機能と誘導機構の解明とあいまって、微生物エリシターによる特異な器官形成というユニークな生物現象の解析を通じて、植物における形態形成の分子機構の理解のために貴重な知見をもたらすと考えられる。

- (1) H. J. Franssen, D. V. Thompson, K. Idler, R. Kormelink, A. V. Kammen, and T. Bisseling: *Plant Mol. Biol.*, **14**, 103–106 (1989).
- (2) C. Van de Wiel, B. Scheres, H. Franssen, M.-J. Van Lierop, A. Van Lammeren, A. V. Kammen, and T. Bisseling: *EMBO J.*, **9**, 1–7 (1990).
- (3) H. Kouchi and S. Hata: *Mol. Gen. Genet.*, in press.
- (4) W.-C. Yang, P. Katinakis, P. Hendriks, A. Smolders, F. de Vries, J. Spe, A. V. Kammen, T. Bisseling, and H. Franssen: *Plant J.*, in press.
- (5) B. Scheres, C. Van de Wiel, A. Zalensky, B. Horvath, H. Spink, H. Van Eck, F. Zwartkruis, A.-M. Wolters, T. Gloudemans, A. V. Kammen, and T. Bisseling: *Cell*, **60**, 281–294 (1990).
- (6) B. Scheres, F. Van Engelen, E. Van der Nap, C. Van de Wiel, A. V. Kammen, and T. Bisseling: *Plant Cell*, **2**, 687–700 (1990).
- (7) S. Tajima and H. Kouchi: in “Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives,” ed. by P. M. Gresshoff, L. Evans Roth, G. Stacey, and W. P. Newton, 1990, pp. 309–314.
- (8) B. G. Rolfe and P. M. Gresshoff: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 297–319 (1988).
- (9) H. Kouchi, M. Tsukamoto, and S. Tajima: *J. Plant Physiol.*, **135**, 608–617 (1989).
- (10) A. A. N. Van Brussel, R. Bakhuizen, P. C. Van Spronsen, H. P. Spink, T. Tak, B. J. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne: *Science*, **257**, 70–72 (1992).
- (11) C. Van de Wiel, J. H. Norris, B. Bechenek, R. Dickstein, T. Bisseling, and A. M. Hirsch: *Plant Cell*, **2**, 1009–1017 (1990).
- (12) A. M. Hirsch, D. Drake, T. W. Jacobs, and

- S. R. Long : *J. Bacteriol.*, **161**, 223—230 (1985).
- (13) A. M. Hirsch, T. V. Bhuvaneswari, J. G. Torrey, and T. Bisseling : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1244—1248 (1989).
- (14) C. Dehio and F. J. de Bruijn : *Plant J.*, **2**, 117—128 (1992).
- (15) G. Truchet, P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, J.-C. Prome, and J. Denarie : *Nature*, **351**, 670—673 (1991).
- (16) H. P. Spaink, D. M. Sheeley, A. A. M. Van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. Lugtenberg : *Nature*, **354**, 125—130 (1992).
- (17) F. de Billy, D. G. Baker, P. Gallusci, and G. Truchet : *Plant J.*, **1**, 27—35 (1991).
- (18) D. P. S. Verm : *Plant Cell*, **4**, 373—382 (1992).
- (19) T. Jacobs : *Dev. Biol.*, **153**, 1—1815 (1992).
- (20) S. Hata, H. Kouchi, I. Suzuka, and T. Ishii : *EMBO J.*, **10**, 2681—2688 (1991).
- (21) H. Kouchi : unpublished results.
- (22) J. Hashimoto, T. Hirabayashi, Y. Hayano, S. Hata, Y. Ohashi, I. Suzuka, T. Utsugi, A. ToE, and Y. Kikuchi : *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 10—16 (1992).
- (23) G. Stacey, P. M. Gresshoff, and N. T. Keen : *Plant Cell*, **4**, 1173—1179 (1992).
-