

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular genetic analysis of negative regulatory gene of nodulation using the model legume plant *Lotus japonicus*
(モデルマメ科植物ミヤコグサを用いた根粒形成を負に制御する因子の分子遺伝学的解析)

氏名 西村 理恵子

マメ科植物は土壌細菌 *Rhizobium* との相互作用により、根に根粒というユニークな側成器官を形成する。根粒内部では土壌細菌が細胞内共生し、窒素固定反応を行っている。宿主植物は土壌細菌に光合成産物を与える一方で、土壌細菌からはその窒素固定産物を受け取っている。植物の成長に欠かせない窒素化合物を効率的に得ることが出来るため、根粒形成はマメ科植物において大きな利点がある。しかし、過剰な根粒形成は植物に逆に負荷を与える。野生型に比べ過剰の根粒を着生する共生変異体は、1980年代半ばにダイズから初めて単離されたが、この変異体では植物の成長が著しく阻害されていた。このことから宿主植物には根粒形成を誘導するだけでなく、根粒形成を負に制御する仕組みも備わっていることが知られるようになった。現在までに単離された根粒過剰着生変異体は 1)窒素化合物耐性、2)エチレン耐性の二つのタイプに区分されている。前者ではダイズの *nts1* やミヤコグサの *har1*、後者ではタルウマゴヤシの *sickle* がよく知られている。しかしどの変異体も原因遺伝子の単離にはいたっておらず、根粒形成を負に制御する分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。本研究では、根粒形成を負に制御する遺伝子を解明することを目的とし、モデルマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* から単離された新奇な根粒過剰着生変異体 *astray* について、表現型解析と原因遺伝子の単離を行った。

astray は、ミヤコグサ Gifu B-129 の種子に EMS 処理によって変異導入した種子の M2 世代から単離された、劣性一遺伝子座制御の変異体である。野生型の約二倍の数の根粒を着

生すること、根粒着生領域が野生型よりも広いことがこの変異体の特徴である。野生型と *astray* にミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* JRL507 を感染させて着生根粒数を日を追って調べた。その結果、*astray* は野生型より多数の根粒を着生するだけでなく、野生型よりも根粒原基の発生が早いことが分かった。根粒菌をスポット上に感染させた根を透明化して根粒原基の発生を詳細に調べたところ、野生型では感染後四日目に、変異体では感染後三日目に根粒原基発生の初期段階に当たる細胞分裂が観察された。以上の結果から、*astray* は早期根粒着生という今までに報告例のない表現型を持つことが明らかになった。次に今までに単離されている根粒過剰着生変異体との相関を調べるため、硝酸イオンと ACC(エチレン前駆体)に対する感受性を調べたところ、両化合物に対する *astray* の感受性は野生型のそれとほぼ同じであった。このことから *astray* は新奇な根粒過剰着生変異体であることも示唆された。

astray は根粒菌非感染時においても、複数の興味深い表現型を示す変異体であった。際だった特徴として、下胚軸が長い、側根の重力屈性が弱い、緑化が弱い、アントシアニン蓄積量が少ないことなどが観察された。そしてこれらの表現型はシロイヌナズナより単離されていた *hy5* 変異体の表現型と酷似するものであった。*HY5* は植物の光形態形成プログラムのスイッチを入れると考えられる bZIP 型転写因子をコードしている。更に *hy5* には側根の発生が早いという表現型も報告されている。恒常的に DNA と結合する変異型 *HY5* を野生型で過剰発現させると側根の発生が著しく抑制されたとの報告もあり、*HY5* が側根の発生を負に制御することが強く示唆されている。側根と根粒はともに後胚発生的に生ずる内生分枝器官であることを考えると、これらの知見は非常に興味深い。そこで *hy5* と *astray* の表現型の類似から、*astray* の原因遺伝子はミヤコグサにおける *HY5* の相同的な遺伝子であると予想し、その単離を試みた。

HY5 と相同性の高い遺伝子として、ダイズの *STF1*、ソラマメの *VFBZIPZF* が報告されている。そこでこの三遺伝子間で相同性の高い領域においてプライマーを作成し、Gifu B-129 の根の cDNA ライブラリに対して degenerate PCR を行った。その結果、上記の三遺伝子と非常に高い相同性を示す 966bp の遺伝子(*LjBZF*)を単離出来た。興味深いことに *LjBZF*, *STF1*, *VFBZIPZF* の N 末側には RING finger domain と acidic region がよく保存されていた。この両ドメインはマメ科植物に特長的であり、*HY5* には存在しない。

次に *LjBZF* と *astray* の表現型の連鎖を調べた。連鎖解析を行うために、Gifu B-129 と高い DNA 多型率を持つ Miyakojima MG-20 と、Gifu B-129 由来の *astray* 変異体を交配して、F2 population を作出した。*LjBZF* において Gifu B-129 と Miyakojima MG-20 間に見いだされた一塩基多型(SNP)を dCAPS 法によって検出することで、連鎖解析を行った。その結果、*astray* の表現型を示す F2 植物 43 個体において連鎖を確認出来、*LjBZF* と *astray* の表現型

が強く連鎖していることが分かった。*astray* から *LjBZF* を単離し、変異箇所を検索したところ、第二イントロンの開始部分、スプライシングアクセプターサイトと考えられる箇所に塩基置換が見つかった。RT-PCR を行ったところ、*astray* の mRNA は野生型のそれよりも第二イントロンの塩基長分だけ長いことが分かった。*astray* の *LjBZF* mRNA をタンパク質に翻訳すると第二エキソンの直後にストップコドンが入ることから、*astray* において *LjBZF* はほとんど機能していないと考えられる。

astray の原因遺伝子が *LjBZF* であることを確認するために、この遺伝子を変異体に導入して形質転換体を作成した。*LjBZF* をバイナリーベクター pBI121 に組み込み、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* C58 に導入した。形質転換はこの C58 株を用いて、胚軸感染法に従って行った。T2 世代の形質転換植物に根粒菌を感染させたところ、着生根粒数、根粒感染領域ともに、表現型は野生型に回復していることが分かった。また、下胚軸長、緑化、側根の重力屈生、アントシアニン蓄積量などの pleiotropic な表現型についても回復が見られた。このことから、*astray* の原因遺伝子は *LjBZF* であることが明らかとなった。

astray と *har1* はともに野生型よりも多数の根粒を着生し、かつその着生領域は野生型よりも広がっている。そこで両変異体の double mutant (*har1-4 astray*)を作成して、両者の遺伝学的関係を調べてみた。根粒菌を感染させた double mutant には、*har1-4* より多数の根粒が着生していた。更に double mutant では根の先端近くにまで根粒が着生しており、*har1-4* よりも根粒着生領域が広がっていることが観察された。double mutant のこの表現型について更に詳細に調べるため、野生型、*har1-4*、double mutant に根粒菌を感染させて、感染後二週目、六週目において根粒着生領域を定量的に調べた。その結果、*har1-4* と double mutant 間の比較においては、double mutant の根粒着生領域は両観測点において *har1-4* より広く、特に感染六週目において両者間の差が顕著に見られた。二重変異による影響が根粒数、根粒着生領域ともに相加的に現れたことから、*ASTRAY* と *HAR1* は独立な経路を介して根粒形成を負に制御していることが示唆された。