

根粒は根粒菌と植物との相互作用により、植物の根に誘導される共生的窒素固定器官である。宿主植物は根粒菌に光合成産物を与える一方で、根粒菌からはその窒素固定産物を受け取っている。根粒共生系のメカニズムを理解するためには、まずその共生システムの構築に必要とされる遺伝子を把握することが必要である。過去の根粒共生系の解析は、主に根粒菌側の共生遺伝子群についてなされ、機能解析は顕著な進展を見せた。しかし、それらと対をなす宿主植物側の根粒形成を制御する遺伝子群については実体がほとんど不明である。根粒形成時に特異的に発現する遺伝子は *nodulin* と呼ばれ多数単離されてはいるが、機能の不明なものが多い。申請者、西村理恵子君は根粒形成を負に制御する遺伝子の同定を目的として、ミヤコグサ *Lotus japonicus* より単離された新奇根粒過剰着生変異体 *astray* の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。*astray* の根粒着生数は野生型の約二倍で、過去に報告された根粒過剰着生表現型とは区別される特徴も示した。根粒着生領域が野生型より広いこともその特徴の一つとして観察された。更に、*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っていた。窒素化合物とエチレンは根粒形成を抑制することが知られており、過去に報告された根粒過剰着生変異体はいずれかの化合物に対して耐性であると報告されているが、*astray* は両化合物に対して感受性を示した。以上の結果から *astray* は過去に報告された根粒過剰着生変異体とは異なる、新奇な根粒過剰着生変異体であることが示唆された。

*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の *hy5* 変異体の表現型と酷似するものであった。側根と根粒は類似した発生様式をたどり、*hy5* は側根形成が早い変異体としても報告されている。しかし *astray* の変異は側根形成には影響を及ぼしていなかった。

*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。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* と相同性の高いダイズの *STF1*、ソラマメの *VFBZIPZF* の塩基配列に基づ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、*HY5* 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有的であり、*HY5* には存在しない。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、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した。*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。T2 世代の形質転換植物に根粒菌を感染させたところ、symbiotic phenotype、nonsymbiotic phenotype ともに回復が見られた。よって、*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* の遺伝学的関係を調べるため、二重変異体を作成して表現型の解析を行った。その結果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。

以上のように、申請者は根粒形成を負に制御する宿主植物の遺伝子を初めて同定し、共生遺伝子のネットワークより構築される根粒共生系のメカニズムの一端を分子レベルで明らかにした。この研究によって、根粒形成を負に制御する機構の新たな側面に光を当てることが期待される。さらに、西村君はこの研究の過程で、遺伝学、分子生物学の手法、及び科学的な方法論を広く習得した。よって、申請者西村理恵子君は博士 (学術) の学位を授与されるに値する。