

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 10 年度 博士過程進学

氏 名 柴田 哲

指導教官 小柳津 広志

論文題目 セスパニア茎粒形成において発現変化を示す遺伝子の探索と
その解析

1. 序

現在、世界人口は、急速な増加を示している。様々な予想がなされているが、Bockman や Waggonar らによれば、2050 年には 120 億人程度になり現在の 2 倍程度になると予測されている。さらに、増加する人口のおよそ 90 % は熱帯、亜熱帯地域のアジア、アフリカ、ラテンアメリカに存在している発展途上国に集中することも予測されている。そのため、世界の食糧の安定供給に深刻な問題が起こることは確実である。そこで、安定、かつ多くの食糧資源を確保することが重要となってくる。

窒素成分は作物の生育に最も強く影響し、食糧生産に非常に重要である。大気中の約 78 % を占める分子状窒素をハーバー - ボッシュ法という工業的窒素固定法の開発によって、農耕地に安価、多量、そして、安定に化学肥料として導入することが可能になり、単位面積あたりの収量を飛躍的に増加させることが可能になった。ところが、工業的窒素固定は多量のエネルギーを必要とする。そのため、石油等の化石エネルギーの枯渇が問題となっている現在、窒素

肥料の供給を莫大なエネルギーを消費する工業的窒素固定に大きく依存しているわけにはいかなくなる。

そこで、一部の生物によって行なわれている生物窒素固定が注目されている。そのなかでも、マメ科植物と根粒菌の間で営まれている共生的生物窒素固定は生物窒素固定量の約半分以上を占め、様々な研究が世界中で行われている。このマメ科植物と根粒菌の共生関係を広く栽培作物に賦与することが可能になれば、地力の減衰を抑えられると同時に地力の回復あるいは増強も可能になり、食糧生産の増大に大いに貢献すると考えられる。さらに、省エネルギーに関しても大いに貢献することになると考えられる。そこで、共生窒素固定を農業生産に有効に利用することは省資源、あるいは、環境調和型の持続的農業生産体制の確立のために必要不可欠な課題であると考えられている。そのため、植物と共生微生物である根粒菌の間で行なわれている複雑な相互作用を解明することは重要である。本研究ではまだ解明されていない部分が多く残る根粒菌感染後の根粒形成分子機構の解明のため、根粒菌感染前後において発現変化を示す新たな遺伝子群の単離を目的として研究を行った。

2. *Sesbania rostrata* の茎粒形成時に発現変化を示す遺伝子の探索

一般的にマメ科植物と根粒菌の共生によってもたらされる根粒は根の一部の表面において局所的に形成され、根粒形成部位を感染前に特定することが不可能である。そのため、根粒形成初期過程における生理、および蛋白質の変化を確認することは困難であった。本研究に用いる西アフリカ原産の *S. rostrata* は *A. caulinodans* ORS571 に感染されることによって根粒ばかりでなく茎粒も形成するという特徴を備えている。茎粒は茎に突起状態で存在し、肉眼で容易に確認できる不定根という部位に形成することが知られている。そのため、根粒菌の感染部位を感染前に特定できる利点がある。つまり、根粒菌感染前、および直後の茎粒形成が肉眼で確認できない時点での試料採取が可能になり、根粒菌感染前後において発現変化を示す遺伝子の探索に非常に有効であると考えられる。

・ differential display 法

A. caulinodans ORS571 非接種と接種後 1 日目の不定根部位から調整した total RNA を用いて differential display 法を RI とシークエンスゲルを用いて 16 種類のランダムプライマーと Oligo-dTプライマーの 3' 末端側に A, G, C を付加した 3 種類のプライマーの組み合わせで行った。その結果、*A. caulinodans* ORS571 接種後に遺伝子発現が変化すると考えられる differential displayed fragments を 71 回収した。

さらに、16種類のランダムプライマーのみを用い、non-RIでアガロースゲルによって発芽後3週間経過した植物の*A. caulinodans* ORS571非接種、接種後1, 4, 7, 14日目の不定根域および茎粒の試料から調整したtotal RNAを用いdifferential display法を行った。その結果、茎粒形成過程にともない遺伝子発現が変化すると考えられるdifferential displayed fragmentsを16回収した。

合計、87のdifferential displayed fragmentsを回収した。

・簡易のRT-PCR解析

回収したdifferential displayed fragmentsで再増幅可能であったものについて、クローニングし、シーケンスを行なった。決定した配列から有意義と考えられる物について、それぞれのdifferential displayed fragmentsに特異的にprimerを設計し、*A. caulinodans* ORS571非接種、接種後1, 4, 7, 14日目の不定根域および茎粒の試料を用いて簡易のRT-PCR解析を行った。その結果、合計20のdifferential displayed fragmentsが茎粒形成過程にともない遺伝子発現変化を示すことが予想された。また、本研究のcDNAの全長解析中に偶然に得られた、*S. rostrata*の茎粒由来のcDNAについても同様に解析を行ったところ16のcDNAが茎粒形成過程にともない遺伝子発現変化を示すことが予想された。

・RACE法を用いてのcDNA全長解析

茎粒形成過程にともない発現変化を示すことが予想されるcDNAについて、5'および3'-RACE法を行い、全長cDNA解析を試みた。その結果、全てのdifferential displayed fragmentsについてはないが21のcDNAについて全長解析が可能になった。他のマメ科植物で根粒形成過程に遺伝子発現が誘導されることが報告されているlipoxygenaseや窒素同化に関わり、根粒形成過程でも遺伝子発現が誘導されることが報告されているcytosolic glutamine synthetaseなどと高い相同性を示すものが含まれていた。また、現在まで根粒形成過程についての研究が報告されていない遺伝子と高い相同性を示すcDNA、さらに、ESTも含めた現在までにデータベースに登録されている遺伝子の中には有為な相同性を示す遺伝子が存在していないcDNAも単離していることが分かった。その中で、有為な相同性を示す遺伝子が存在しないSrNOD7については3種類の異なる配列が単離された。

3. 単離したcDNA群の解析

・ゲノミックサザンハイブリダイゼーション

全長解析が可能になった cDNA について、cDNA 全長をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、明らかに単一コピーの遺伝子と考えられるのは SrDD 57-3 のみであった。他の cDNA については複数のコピーが存在している可能性が高いと考えられた。

・ semiquantitative RT-PCR サザンハイブリダイゼーション

全長 cDNA 解析が可能になった 21 の cDNA について、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果から複数のコピーが存在すると考えられる cDNA が多いことが分かった。そのため、より特異性を増させるようにプライマーの一方が必ず 3'-UTR に入るように設計し直し、semiquantitative RT-PCR サザンハイブリダイゼーションを用いて解析を行った。莖粒、根粒形成過程における遺伝子発現解析は *A. caulinodans* ORS571 非接種、接種後 1, 4, 7, 14 日目の試料を用いて解析を行った。また、発現部位の器官特異性については根、莖、葉、花、つぼみ、さや、根粒、莖粒の試料を用いて解析を行った。その結果、EST も含めた現在のデータベースに登録されている遺伝子と有為な相同性を示さなかった SrNOD 7 は 3 種類の cDNA がともに莖粒、根粒形成過程で窒素固定活性が現れはじめる *A. caulinodans* ORS571 接種後 4 日目の莖粒や根粒で遺伝子発現が誘導され始めることが分かった。さらに、SrNOD 7 の 3 種類は遺伝子発現が莖粒と根粒以外では確認できなかった。そのため、SrNOD 7 は新規のノジュリン遺伝子と考えられた。また、lipoxygenase、cytosolic glutamine synthetase を含め複数の遺伝子が莖粒、根粒形成過程で遺伝子発現が誘導されることが分かった。さらに、これらの遺伝子は根粒、莖粒以外の部位でも発現していることが分り、莖粒や根粒に特異的に機能している訳ではないことが分かった。

4.まとめ

本研究によって、新規に根粒、莖粒形成過程において遺伝子発現が変化する遺伝子が複数単離されたことから *S. rostrata* が根粒形成過程において一過的に関わる遺伝子群の探索には有効であることが考えられた。ただし、本研究で単離された遺伝子群があらゆるマメ科植物の根粒形成過程にも関わっているかについては不明である。そのため、現在、マメ科植物のモデル植物になりつつあるミヤコグサやアルファルファなどで類似の遺伝子を単離し、解析していくことで、根粒形成過程に本研究で単離した遺伝子が普遍的に関わるのかも含め、新たな知見が加ることが期待される。