

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成12年度博士課程進学

氏名 金森 紀仁

指導教官 小柳津 広志

論文題目 セスバニアの茎・根粒形成解明のためのモデル実験系の確立および茎・根粒形成メカニズム解明に関する研究

本研究では、主としてセスバニアの茎・根粒形成のメカニズムの解明をめざした。また、茎・根粒形成解明のために用いたセスバニアは実験系として世界的にほとんど使用されていない植物であることから、実験手法の確立も主要研究課題とした。

セスバニアの茎・根粒内部の形態観察 —— セスバニアに形成する茎粒は新しいタイプ

マメ科植物および非マメ科植物に形成する根粒は無限型根粒、有限型根粒、アクチノリザル根粒の3タイプに分類されている。今回、有限型根粒、無限型根粒、アクチノリザル根粒、セスバニア茎粒の形態の相違を従来の顕微鏡観察に加え、3次元立体再構築法を用いて、内部組織をコンピュータ上で解析することで形態比較を行った。

セスバニアは他のマメ科植物とは異なり、根粒に加え、茎粒を形成する。茎粒は茎に形成する不定根に根粒菌が侵入したときに形成されるが、セスバニアの茎粒は共生根粒菌接種後、約3日で明らかな茎粒原基が観察される。セスバニア茎・根粒ともに外観は有限型根粒と同じ球形をして

いる。

今回の実験から、根粒の窒素固定領域は不定根由来の維管束を取り囲むようにドーナツ型の形態をしていることがわかった。この維管束を取り囲むように存在する窒素固定領域はアクチノリザル根粒と類似している。また別のサンプルを用いた場合、蹄鉄型の形態をとっていることが分かった。セสบニア茎粒に存在する窒素固定領域の形態の違いについては明らかになっていないが、おそらく根粒菌がはじめに侵入する際、不定根に形成したクラックから細胞内に入る条件によって形態が変わると推測された。

茎粒中の窒素固定領域の形態はアクチノリザル根粒と同じ不定根由来の維管束を取り囲むように発達していた。切片化した茎粒を蛍光顕微鏡により観察を行ったところ、セสบニア茎粒には窒素固定領域、不定根由来の維管束、茎粒維管束が観察され、不定根由来の維管束は窒素固定領域を貫くように伸びている。根粒の維管束は有限型根粒や無限型根粒では確認されているが、アクチノリザル根粒では確認されていない。有限型根粒に見られる木部組織の密集は確認できず、無限型根粒に見られる維管束の分岐が観察された。これらの形態の特徴をまとめると以下のようになる。

- 1) 球状の形態は有限型根粒に類似
- 2) 不定根由来の維管束はアクチノリザル根粒類似
- 3) 分裂域を持たない点は有限型に類似
- 4) 茎粒維管束が分岐している点は無限型に類似
- 5) 木部やペリサイクルの密集がない点は無限型とアクチノリザル根粒に類似

以上のことからセสบニアの根・茎粒はこれまで知られている 3 つの分類に属さない新しいタイプの根粒と判断された。

#### 4. セสบニアの根粒形成と病原菌に対する防御反応の違い

根粒形成と病原応答の相違を確かめるために病原菌応答のマーカーを作製し、発現の相違を調べた。今回、調べた *PAL*, *GLU*, *CHS* はいずれも病原菌 *B. cinerea* を接種すると発現が誘導される遺

伝子として分離されたものである。植物はこれらの遺伝子を複数保持しているため、一つの遺伝子の発現を見ているとは断定できないが、病原菌応答のマーカーとして用いることは可能である。

セสบニアに共生根粒菌 *A. caulinodans* ORS571 を接種した時、*PAL* および *CHS* は発現が誘導された。*PAL* および *CHS* は根粒菌接種後 2 時間から 1 日にかけて発現が上昇しているが、4 日、10 日後には発現が再び減少した。病原菌 *B. cinerea* を接種した場合、*GLU* の発現の上昇が確認できたが、根粒菌接種の場合、*GLU* の発現の誘導は見られなかった。*GLU* に関しては定常的な発現であり、明らかに病原菌応答と異なる反応を示したことから、病原菌と根粒菌を認識する上で重要なかもしれない。根粒共生時に発現する *GLU* の単離ができれば、病原菌への応答と根粒菌への応答の違いについてさらに詳細に解明することができると考えられる。

*S. rostrata* を用いて様々な組織からディジェネレートプライマーを用いて *GLU* を増幅させた時、今回全長を単離した *GLU* の他に 4 種類の部分塩基配列が得られた。今後、これらが根粒形成のマーカーとなりうるか解析が必要である。

今回作製したマーカーを用いて障害応答や *A. rhizogenes* に対する応答を観察した。障害を与えた根において *PAL*, *CHS* 遺伝子の発現が誘導されたのに対し、*GLU* 遺伝子の発現は一定で誘導されなかった。一方、茎においては *PAL*, *CHS* 遺伝子は定常発現なのに対し、*GLU* 遺伝子の発現は上昇した。

*A. rhizogenes* を接種すると *PAL*, *GLU* 遺伝子の発現が誘導されたが *CHS* 遺伝子の発現誘導は確認できなかった。毛状根でも同様に *PAL*, *GLU* 遺伝子は *A. rhizogenes* を接種することで発現が誘導されているが *CHS* 遺伝子の発現誘導は確認できなかった。

今回作製した病原応答のマーカーは根粒形成に加えて障害応答や *Agrobacterium rhizogenes* の感染時において病原応答と発現が異なっていた。

## 5. 茎・根粒形成メカニズム解明のための実験系の確立

今後、研究を進めていくあたり、培養細胞や将来的に得られた遺伝子を操作できる形質転換系の確立は必要不可欠である。セสบニアでいまだ確立されていない培養細胞系の確立と毛状根を

介した形質転換系の確立を目指した。

培養細胞はサイトカイニン (6-BA) 0.5 mg/l、オーキシン(2,4-D) 1.0 mg/l および 2 % ショ糖を含む MS 培地を用い、120 rpm, 30 °C の条件で得られた。今回作製した培養細胞に Nod ファクターを加えたところ、*enod40* は Nod ファクターを加えた条件で発現が確認できた。しかし、培養細胞の状態により、根粒菌未接種の条件でも *enod40* の発現が観察されたことから、根粒形成メカニズム解明のための実験系に用いる培養細胞としては問題があると判断された。

*A. rhizogenes* による毛状根形成を介した形質転換法は、根粒形成能をトランジェントアッセイにより確認できることから、有効な手段である。マメ科植物の根粒形成遺伝子を探る上で遺伝子の発現を制御できる毛状根を用いた実験系は今後重要になってくる。そこで、セスバニアの毛状根を *A. rhizogenes* 2659 を感染させることによって誘導した。GUS 遺伝子を組み込んだ形質転換セスバニアの作出も可能となり、今後の研究に利用することが可能となった。さらに、植物ホルモンフリーの MS 培地で毛状根の液体培養系を確立した。この毛状根は再分化させることなく継代培養が可能であった。今回作製した毛状根や毛状根を介した形質転換系は今後の研究に利用することが可能である。

投稿論文

Norihito, K., Hiroshi, O., and Sugiyama, J. 2003. *Plant Biotechnology* 20(2): 173-175