

博士論文要旨

応用生命工学専攻
平成18年度博士課程 進学
氏名 李 永一
指導教員名 小柳津 広志

論文題目 マメ科モデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* の根粒成熟異常変異株のスクリーニングおよび変異株を用いた根粒成熟機構に関する研究

窒素は大気中に約 78%も含まれているが、植物は直接利用することはできず、大気中の窒素は硝酸やアンモニアに変換されてから根に吸収される。マメ科植物など多くの植物種は窒素固定微生物と共生して窒素を獲得している。窒素は作物にとって重要な肥料成分の一つであり、窒素肥料を生産するには大量のエネルギーが消費されるため、植物-微生物間の共生窒素固定を有効利用し、イネや小麦など非マメ科植物に窒素固定を付与する応用技術の開発は 21 世紀の持続型農業の重要な課題になると考えられている。そのためには、根粒菌とマメ科植物などの共生窒素固定のメカニズムの解明は必要不可欠な課題である。この研究では、マメ科植物の根粒菌との共生窒素固定のメカニズムの解明を目指した。

根粒菌の生産する根粒形成のシグナル分子である Nod ファクターは、マメ科植物が根圏に放出するフラボノイドによって合成が誘導される Lipo-chito-oligosaccharides の一種であり、根粒菌が植物体に感染する初期過程において重要な役割を果たす。ここ数年間で、マメ科モデル植物であるミヤコグサ *Lotus japonicus* とタルウマゴヤシ *Medicago truncatula* の共生変異体を用いた分子遺伝学的解析により、根粒菌の共生シグナル分子受容体遺伝子のクローニングや根粒菌に対する宿主マメ科植物の初期応答に関する植物側の因子とその機能がしだいに明らかにされつつある。しかしながら、初期シグナル伝達後引き続く根粒菌の植物細胞への侵入、バクテロイドの分化、根粒の成熟・維持のメカニズムなど共生の後期過程はまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではマメ科モデル植物であるミヤコグサ *Lotus japonicus* と根粒菌 *Mesorhizobium loti* の共生系を用いてマメ科植物の根粒形成メカニズムについて、これまでにほとんど解明が進んでいない根粒菌が植物の感染細胞に感染した後の根粒の成熟・維持のメカニズムを解明することを目的として研

究を進めた。具体的には、ミヤコグサ *Lotus japonicus* 種子を突然変異誘導化合物(EMS)で処理して根粒形成に異常を示す変異株を網羅的に取得し、取得された変異の原因遺伝子で特に重要と判断されたものについて、機能を解明する実験を行った。

1. EMS 処理による *Lotus japonicus* 変異株のスクリーニング

本研究では根粒の成熟・維持に関与する遺伝子を網羅的に取得することを目指し、変異誘導化合物である EMS を用いて変異体を多数作出して、根粒の成熟・維持に異常を示す株を選抜し、これらについてマップベースクローニングおよび候補遺伝子の塩基配列解読により原因遺伝子の特定を行った。スクリーニングの結果、根粒非形成 (Nod⁻) 変異株 18 株、無効根粒形成 (Fix⁻) 変異株 30 株以上、根粒過剰着生 (Fix⁺⁺) 変異株 2 株を取得した。Nod⁻変異株について各変異株の染色体での位置と原因遺伝子の変異部位を調べるため、かずさ DNA 研究所ホームページ(<http://www.kazusa.or.jp>)に記載されている SSR マーカーを使用して rough mapping を行いさらに候補遺伝子については、塩基配列を解読して変異部位を確認した。その結果、*nup85* 変異株 2 株、*nup133* 変異株 4 株、*pollux* 変異株 6 株、*ccamk*、*symrk*、*castor*、*nin*、*nfr1*、*nfr5* などの変異株はそれぞれ 1 株ずつ取得された。

Fix⁻変異株については、30 株以上取得されたが、これらの中で生育が阻害される変異株や根粒数が野生株と比べて若干少ない変異株は研究対象から除外し、生育が良い変異株 6 株を研究対象として研究を行った。この結果、*ign1* 変異株 2 株、*sst1* 変異株 2 株、*sym7* 変異株 1 株、*sen1* 変異株 1 株が取得された。報告されている *ign1* 変異株は緑色の根粒が形成されるが、本研究で取得した *ign1* 変異株は白色の根粒が形成された。また、報告されている *sen1* 変異株は白色の根粒が形成されるが、本研究で取得した *sen1* 変異株は緑色の根粒が形成された。これまで報告されている *ign1* および *sen1* は Gifu 株由来であり、本研究では MiyakojimaMG-20 を用いた。そのため、これらの違いがエコタイプの違いによるかまたは遺伝子の変異部位による違いかは不明である。

Fix⁺⁺変異株についてマッピングと遺伝子解読により OL2168 変異株の原因遺伝子は *Har1* であると判明した。もう一つの Fix⁺⁺株 OL945 変異株は第 1 染色体の 53.7~61.4CM 付近にマップされ、この領域に根粒形成に関与する遺伝子座が報告されていないことから新規遺伝子であると判断した。

2. *Ljrdh1*(OL945)変異株と *Ljhar1*(OL2168)変異株の表現型解析および病害応答遺伝子発現解析

根粒過剰着生変異株 OL945 について経時的に根粒数を調べた結果、野生型株より約 5~10 倍多く形成された。接ぎ木実験で野生型株 MG-20 を接ぎ穂として OL945 変異株を台木として接合した時、根粒過剰着生が観察された。逆に野生型株 MG-20 を台木として OL945 変異株を接ぎ穂として接合した時は正常な根粒が形成された。このことから OL945 変異株

の根粒過剰着生は根の遺伝子型によって調節することが明らかになった。そこで、OL945 変異株の根粒過剰着生の原因遺伝子座を *Rdh*(Root determined hypernodulation)1 と命名し、変異株を *Ljrdh1* と呼ぶこととした。つぎに、窒素を十分含む土壌（クレハ培土）で *Ljrdh1* の生育を播種後 13 週間（根粒菌接種後 12 週間）にわたって調べた。この結果、播種後 13 週後の種子と豆果の乾燥重量は野生型株 MG-20 より 55.9% 重く、豆果数は 52.8% 多いという結果を得た。このことから、*Rdh1* 遺伝子が将来マメ科作物の生産量増加のために役立つ有用遺伝子である可能性が示唆された。

Ljrdh1 と *Ljhar1* について植物の病害応答が根粒の過剰着生に関係するかを調べるため、10 種類の病害応答に関連する遺伝子について発現解析を行った。根粒菌を接種しなくて Pillow system で 1 週間栽培した株を非接種のコントロールとして、根粒菌接種後 2 日目、4 日目、7 日目、14 日目のサンプルについて病害応答遺伝子の発現を解析した結果、*Ljrdh1* と *Ljhar1* の根粒過剰着生変異株は野生型株よりほぼ全ての病害応答遺伝子の発現が弱かった。このことから根粒過剰着生は根の病害応答が非常に抑制されていることがなんらかの理由で原因となっている可能性が考えられる。

3. Fix 原因遺伝子の機能に関する研究

本研究で取得した変異株について根粒細胞中で変化が起こると考え、感染細胞の根粒切片を作製し、電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、*ign1* 変異株(OL486)は野生型株と比べ、バクテロイドが壊れているのが観察され、*sst1* 変異株(OL2335)は *ign1* 変異株よりさらにバクテロイドが破壊されているのが観察され、*sen1* 変異株(OL2568)はバクテロイドが最も激しく破壊されているのが観察された。

近年、cDNA アレイを利用して根粒形成過程の早期段階での膜輸送、防御応答、生合成と細胞応答、情報伝達、細胞壁生合成、転写調節など多くの機能変化の研究が進められている。根粒形成初期には、いくつかの根粒形成機構に機能する早期 *nodulin* 遺伝子が発現される。レグヘモグロビン(Lb)のような *late nodulin* 遺伝子は根粒の発達段階において、窒素固定活性が現れる段階で発現する。

そこで、本研究では当研究室のポストクの王延旭氏が作製した根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株の LPS 合成関連遺伝子破壊株について *Nodulin* 遺伝子や病原応答遺伝子の発現に与える影響を調べた。多数の LPS 合成関連遺伝子破壊株の中で、*Ljign1* 変異株に *rfd* 欠損根粒菌株を感染した時、野生株を感染させた場合より著しく窒素固定能が高いことが分り、この原因の解明を進めた。*rfd* 欠損根粒菌株から LPS を抽出してその構造を調べた結果、S-LPS では変化が観察されなかったが、R-LPS では変化が観察された。このことから *rfd* 欠損根粒菌株の LPS はコア多糖の部分が変化している可能性が高いと考えられた。また、*Ljign1* 変異株に *rfd* 欠損根粒菌株を感染させた根粒で感染細胞を光学顕微鏡で観察した結果、感染細胞は野生型株に野生型根粒菌を感染した株と同じような正常な根粒が形成された。

遺伝子発現解析については *Ljign1* 変異株では根粒形成に関わる遺伝子の発現誘導を起さないことが判明した。また、*Ljign1* 変異株に *rfdD* 欠損根粒菌株を感染した株の根粒形成遺伝子発現解析結果から Nodullin 遺伝子の発現誘導には IGN1 の経路とは異なる別の経路が存在し、この経路は根粒菌の LPS の構造変化によって誘導が変化する経路であると考えられた。

まとめ

本研究では、次のような発見をした。

- 1) ミヤコグサ根の遺伝子型で根粒過剰着生が決定される新規過剰着生変異株 *Rdh1* を取得した。
- 2) *rdh1* 株は豆果の収量が野生型株に比べて約 50% 高い有用変異株であることが分かった。
- 3) ミヤコグサの IGN1 は根粒の機能発現のために必要とされたと考えられていたタンパク質（ノジュリン）のほとんどすべての発現誘導を関与していることを明らかとした。
- 4) マメ科植物の根粒におけるノジュリンの発現誘導に根粒菌の LPS の構造が影響することを明らかとした。
- 5) LPS の構造は根粒の感染細胞の老化の誘導に関係し、IGN1 は老化を抑制する可能性が示唆された。

これらの結果は今後、21 世紀の持続可能な農業技術開発のための重要な情報になると期待される。