

# 論文内容の要旨

Isolation and characterization of a novel hypernodulation mutant, *plenty*, in *Lotus japonicus*.

(新奇のミヤコグサ根粒過剰着生変異体 *plenty* の単離と表現型解析)

吉田千枝

## 序論

マメ科植物と窒素固定細菌(根粒菌)の共生は、共生特異的器官である根粒を基盤とする。根粒内部では根粒菌が分子状窒素( $N_2$ )をアンモニウム( $NH_3$ )に還元し、窒素源として宿主植物に供給する(共生窒素固定)。マメ科植物は、共生窒素固定により、窒素源に乏しい土壌でも生育することができる。ただし、植物は、共生窒素固定のエネルギー源として、根粒に大量の糖を投入する。このため、マメ科植物には、自身の成長に適正な規模の根粒を維持する機構があると考えられている。

適正規模の根粒を保つ機構として、根粒数を制御する機構が知られている。現在、二つの制御機構が明らかにされている。一つは、「根粒形成の自己制御(auto-regulation of nodulation, 以下AON)」と呼ばれる全身的な負のフィードバック制御である。マメ科モデル植物ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)から単離された根粒過剰着生変異体 *har1* の解析から、AONの分子基盤は、地上部の HAR1 を介した長距離シグナル伝達経路と考えられている。もう一つは、エチレンによる局所的な根粒数の制御である。これは、別のマメ科モデル植物タルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)から単離された根粒過剰着生変異体 *sickle* の解析により、明らかになった。

根粒数の制御機構を基盤とする適正規模の根粒維持機構の解明において、根粒数の制御が破綻した根粒過剰着生変異体は極めて有用である。しかし、ミヤコグサでは *har1* 以外に、*klv*, *tml* という二つの変異体が単離されるにとどまっている。私は、新たな根粒過剰着生変異体の単離を目的として共生変異体のスクリーニングを行い、新奇の根粒過剰着生変異体 *plenty* を単離した。本論文では、*plenty* の表現型解析を中心に進めた研究の成果を論じる。

## I. *plenty* の単離と根粒過剰着生表現型

イオンビーム照射したミヤコグサ *Miyakojima* (MG-20) 種子から得られた  $M_2$  世代 7,017 個体から、根粒過剰着生変異体を3系統単離した。相補性検定を行ったところ、そのうち1系統が新奇の根粒過剰着生変異体であった。*plenty* と名付け、根粒過剰着生表現型を解析した。

*plenty* 変異体は、野生型の3~5倍多く根粒を形成し(図1D)、根粒形成領域も拡大していた(図1E)。一般的に、根粒数が増えると、根粒サイズは小さくなり、根粒数が減ると、根粒サイズは大きくなる。これまで知られている根粒過剰着生変異体 (*har1*, *klv*, *tml*) ではすべて、根粒数が増える一方、個々の根粒は野生型よりもずっと小さい、という報告がなされている。ところが、*plenty* では、根粒数が増えているのに、根粒が小さくなっているようにみえなかった。実際、*plenty* の根粒(図1C)は、平均サイズもサイズ分布も、野生型根粒(図1B)とまったく差がなかった(図1F, G)。したがって、*plenty* は、根粒数が増えても、根粒が小さくならないという、新奇の根粒過剰着生表現型を示している。*PLENTY* は少なくとも根粒数の制御に関与している。

野生型との接木実験により、根粒過剰着生表現型に関与する器官を特定することができる。*har1* では、地上部が関与することが明らかになっている(図2)。*plenty* と野生型とを相互に接ぎ、*plenty* の地上部と根のどちらが根粒過剰着生表現型に関与するかを解析した。その結果、根が *plenty* の接木個体のみ、根粒過剰着生表現型を示した(図1H)。このことから、根の *PLENTY* が、根粒数の制御に関わっていることがわかった。

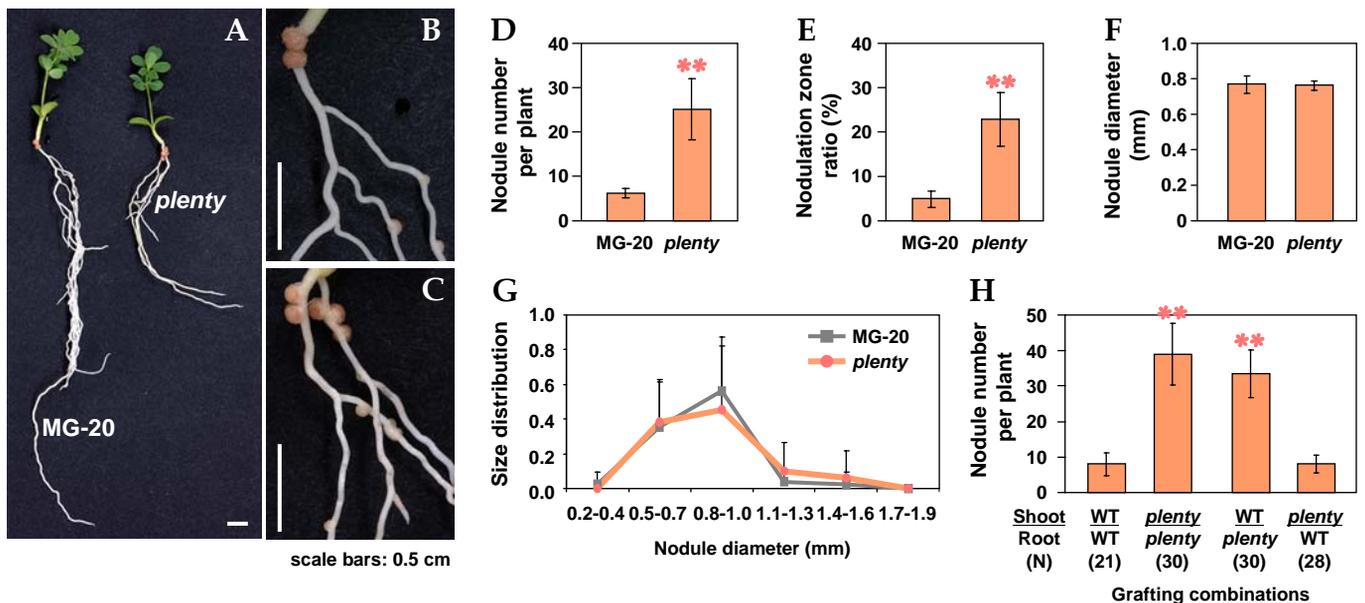


図1 *plenty* の根粒過剰着生表現型

(A-G) ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* 接種後3週間の個体の根粒数、根粒形成領域率、根粒径、および根粒サイズ分布。(A) 根粒菌接種後3週間の個体。野生型MG-20(左)と *plenty* 変異体(右)。(B, C) 根粒画像 B: MG-20, C: *plenty*。(D) 根粒数、(E) 根粒形成領域率(主根長における根粒形成領域長の割合。根粒形成領域長とは最初と最後の根粒間の長さ)、(F) 根粒径、(G) 根粒サイズ分布。(H) 野生型と *plenty* の接木植物の根粒数。接木後、根粒菌を接種し、4週間後に根粒数を計測した。値は平均値±標準偏差。H以外のN=7~8。

\*\*  $P < 0.01$  by Student's *t*-test (D, E), by Dunnett multiple comparison test (H).

## II. PLENTY のマッピング

SSRマーカーを用いた連鎖解析により、*plenty* 変異は、ミヤコグサMG-20 第2染色体長腕のTM0308 近傍に位置づけられた。*plenty* がこの領域に 約20kbの欠失部位をもつことから、この欠失領域に原因遺伝子が存在すると考えられる。ミヤコグサデータベースによると、この欠失領域に二つの遺伝子が存在する。このうちのどちらか一方、あるいは両方が*plenty* の原因遺伝子である可能性が高い。

## III. *plenty* と既知の根粒数抑制経路との関係

*PLENTY* は根粒数の制御に働く因子と考えられるので、これまでに知られている根粒数の抑制機構と*PLENTY* との関係解析した。

*har1* との接木実験で、*har1/plenty* の根粒数が相加的に増加した(図2)。このことは、*PLENTY* が、*HAR1* を介したAON経路で働く根の因子ではないことを示唆する。また、*plenty* のエチレン感受性は野生型と変わらなかった(データ示さず)。したがって、*plenty* はエチレンによる局所的抑制経路とは関係していない。*plenty* は、これまでに知られていない根粒数抑制経路の存在を示している。

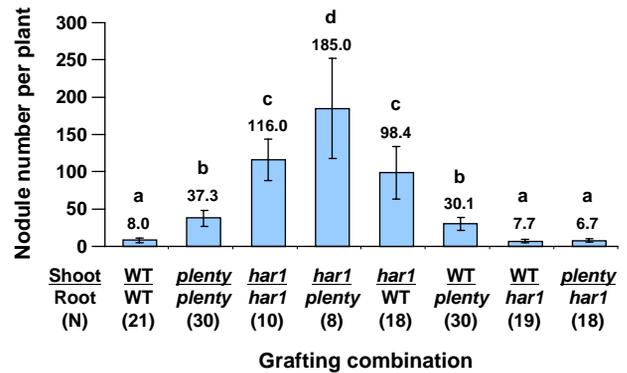


図2 *plenty* と*har1* の接木

接木個体に根粒菌を接種し、4週間後に根粒数を計測した。値は平均値±標準偏差。アルファベットは有意差を示す。

$P < 0.01$ , by Tukey-Kramer multiple comparison test.

## IV. *plenty* と硝酸による抑制機構との関係

外部の硝酸が根粒形成と根粒肥大成長を抑制することは、古くから知られている。*plenty* の根粒形成と根粒肥大成長が、外部の硝酸にตอบสนองして抑制されるか否かを解析した。

*plenty* の根粒径は、培地中の硝酸濃度に依存して野生型と同様に減少した(図3A)。感染系数と根粒原基数も、硝酸濃度が高くなるにつれて減少した(図3B)。ただし、野生型ほど劇的に減少しなかった。したがって、*plenty* は、硝酸による根粒肥大成長の抑制には完全にตอบสนองし、硝酸による根粒形成の抑制には部分的に耐性をもつ、といえる。

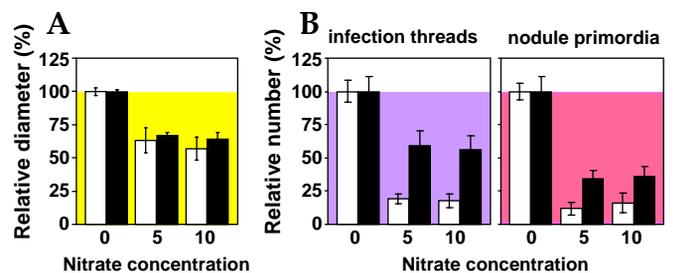


図3 硝酸に対する *plenty* の応答

異なる硝酸濃度(0, 5, 10 mM)で育てた個体の根粒径、感染系数、根粒原基数。硝酸0 mMのときの値を100とした相対値。(A) 根粒菌接種後3週間の根粒径、(B) 接種後10日の感染系数と根粒原基数。

□MG-20, ■*plenty*. N=5.

## V. plenty の根粒過剰着生表現型と成長阻害との関係

根粒菌接種後3週間の野生型と *plenty* の乾燥重量を比較すると、シュート・根ともに *plenty* では有意に減少していた。一方、*plenty* の根粒重は、野生型よりも有意に重かった(データ示さず)。*plenty* では、数多くの根粒がほとんどすべて肥大成長して窒素固定活性をもつために、根粒に大量の糖が奪われて、シュートと根の成長が阻害されている可能性があった。そこで、窒素固定活性を測定したところ、*plenty* の個体あたりの窒素固定活性は、野生型の2.5倍も大きくなっていった(表1)。その値は、*har1* および *tml* よりも、突出して高かった。*plenty* では、過剰な窒素固定活性が成長阻害の原因となっている可能性が高い。このことから、根粒数が増えたときの根粒肥大成長の抑制は、窒素固定活性の制御という点から非常に重要であることが初めて示された。

表1 根粒菌接種後3週間の個体の窒素固定活性・根粒乾重量・根粒数

	Acetylene reduction activity (pmol/min)		Nodule dry weight (mg)	Nodule number		
	per plant	per nodule dry weight mg		total	pink	white
MG-20	8.1 ± 4.5 <sup>a</sup>	15.8 ± 8.3	0.5 ± 0.1	5.8 ± 3.3 <sup>a</sup>	5.8 ± 3.3	0.0 ± 0.0
<i>plenty</i>	20.1 ± 5.2 <sup>b</sup>	15.4 ± 2.8	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	39.4 ± 6.1 <sup>b</sup>	29.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	11.0 ± 4.9
<i>har1</i>	14.9 ± 6.3 <sup>ab</sup>	12.2 ± 5.5	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	80.7 ± 28.0 <sup>c</sup>	24.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	56.3 ± 29.6 <sup>a</sup>
<i>tml</i>	12.8 ± 4.0 <sup>ab</sup>	16.8 ± 6.5	0.8 ± 0.2	71.8 ± 7.8 <sup>c</sup>	22.2 ± 4.4 <sup>a</sup>	49.6 ± 6.5 <sup>a</sup>

窒素固定をになうニトロゲナーゼは、アセチレンをエチレンに還元する活性をもつので、アセチレン還元活性を測定した。測定値は、生成されたエチレン分子量 (pmol min<sup>-1</sup>) を、植物個体あたりおよび根粒乾重量 mg あたりで示している。根粒数は、合計の他、pink: 窒素固定活性のある有効根粒数、white: 窒素固定活性のない無効根粒数を示した。数値は平均値±標準偏差。N=3~6。アルファベットは有意差を示す。

$P < 0.01$ , by Tukey-Kramer multiple comparison test.

### まとめ

*PLENTY* は、エチレンによる抑制経路とは関係していない。また、*HAR1* を介したAON経路にも関与していない。*PLENTY* は、未知の根粒数抑制経路で機能する新奇の因子である。

*plenty* 変異体では、根粒数が増加するのに、根粒肥大成長が抑制されない。これは新奇の根粒過剰着生表現型である。*plenty* にみられる成長阻害の原因は、根粒数が増加したときに根粒の肥大成長が抑制されないことによる個体全体の過剰な窒素固定活性である可能性が高い。根粒数が増加すると根粒サイズが減少する理由はよくわからなかったが、根粒数と連動して根粒サイズを調節することは、共生窒素固定を適正規模に制御するために必要な制御であり、その重要性が *plenty* 変異体によって初めて示された。