

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380016

研究課題名（和文） 共生窒素固定能の強化に関する分子基盤解明とマメ科作物への応用

研究課題名（英文） Analysis of molecular basis for enhanced symbiotic nitrogen fixation and its application for leguminous crops production.

研究代表者

鈴木 章弘（SUZUKI AKIHIRO）

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：50305108

研究成果の概要（和文）：

マメ科のモデル植物ミヤコグサの突然変異体 *enfl* は、野生型よりも根粒数が多く、高い窒素固定活性を示す。本研究では、根粒数増加や窒素固定活性の増強に関する遺伝子の同定を試みた。その結果、少なくとも *TRX* 遺伝子の発現を抑制すると、根粒数が増加する傾向にあることを確認した。また、*enfl* を単離したスクリーニング法をダイズへ適用して得たダイズ変異体について窒素固定活性及び圃場での収量調査を繰り返して行い、NO.57 系統は、窒素固定活性及び収量の値が共に高いことを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Root nodule formation and nitrogen fixation activity was enhanced in *enfl* mutant of model leguminous plant *Lotus japonicus*. In this project, we showed that the number of root nodules was increased by the down-regulation of *TRX* gene expression. This result indicates that *TRX* gene is one of a gene that function as an enhancer of symbiotic nitrogen fixation. Soybean mutant line NO. 57 that were isolated by the ABA screening showed enhanced nitrogen fixation activity and also showed higher seed yields.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，作物学・雑草学

キーワード：ミヤコグサ・ダイズ・窒素固定・共生・根粒菌・遺伝子・根粒

1. 研究開始当初の背景

申請に至った背景

世界人口は1940年代から爆発的な増加を

遂げたが、これは合成窒素肥料の消費量の増加とほぼ軌を一にしている。つまり合成窒素肥料の使用が人口爆発を支えてきたわけで

ある。そして2050年には世界人口は91億人に達すると予測されており、今後も大量の化石燃料を消費する工業的窒素固定が継続されることを意味している。ダイズを例にとると、現在の全世界におけるダイズ子実生産量の維持のためには、最低でも年間360億 m^3 の天然ガス（日本の1年間の消費量の約半分）を消費する計算になる（環境年表，茅陽一監修，オーム社，2005）。さらに合成窒素肥料が投入された農地からは窒素化合物が溶出し、環境汚染などの深刻な問題も引き起こしている。こういった農業を継続することは、先進国の一員として地球の温暖化、化石資源の枯渇、大気汚染等の諸問題の解決に取り組む我が国の姿勢とは明らかに逆行する。

これに対する取り組みの1つとして、工業的窒素固定から脱却し生物的窒素循環利用農業を見据えた、マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定の調査研究が挙げられる。この類の研究では、さまざまな方法で根粒菌の宿主植物への感染から窒素固定発現までに関与している遺伝子を同定し、その機能解析を通じて共生窒素固定の仕組みを理解することに主眼がおかれている。そして実際に精力的な研究がなされ多くの知見が蓄積されつつある。しかし、それらの研究成果は根粒菌感染の初期過程に関係しているものが多く、窒素固定の発現に関するものは限られている。しかも次の段階として、それらの研究成果を上記の問題解決のために応用するという面では精力が注がれているとは言い難く、窒素固定能を強化するための取り組みもほとんど実行に移されていないのが実情である。

着想に至った経緯

申請者は、マメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いた実験から宿主植物の内生アブシジン酸（ABA）の濃度によって、根粒菌接種後に形成される根粒の数が調節されることを見いだしている。すなわち野性型と比較して内生ABA濃度が高ければ根粒数は減少し、逆に低ければ根粒数は増加する。これらの結果を踏まえて「野性型と比較して内生ABA濃度が低い系統やABA受容後のシグナル伝達系に変異を持つ系統などは、根粒数が増加して窒素をより多く固定できる可能性がある」という単純な作業仮説のもと、以下の方法で変異系統の選抜を試みた。すなわち、薬剤処理によって塩基置換を導入したミヤ

コグサの次世代（M2）の種子を、70 μM のABA（野性型ミヤコグサの種子は発芽できない濃度）を含む培地上で発芽させ、成長してきたものを選抜した。次に、これらのM3世代の種子を用いて根粒着生試験をおこなったところ、*enf1*と名付けた変異系統における根粒数は野生型と比較して有意に増加していた。さらに、この変異体における窒素固定活性を測定したところ、驚くべきことに植物体当たりの窒素固定活性は野生型と比べて3倍以上に強化されていることが明らかになった。

このような形質を持つ作物を実際の農地へ展開できれば、上述したさまざまな問題の解決に大きく貢献できると考えられるため、本研究課題を提案することとした。

2. 研究の目的

申請者はマメ科植物と根粒菌による共生窒素固定に関する研究を推進してきたが、ABAを用いた選抜方法によって「植物個体当たりの窒素固定活性が野性型と比較して飛躍的に増大したミヤコグサおよびダイズ」を単離することに成功した。しかも本プロジェクト開始までの研究において、そのミヤコグサ（*enf1*変異体）は固定した多くの窒素を効率よく成長に利用できる可能性が示されていた。そこで本研究課題では、I) ミヤコグサ *enf1* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析、II) 同様の方法で単離された高窒素固定能ダイズ変異体の評価、III) ダイズのオルソログ (*ENF1*) 遺伝子の発現抑制株の確立と解析の3つの小課題を展開した。そしてこれによって窒素固定活性の強化に至る分子基盤を理解するとともに、得られた知見を主要マメ科作物であるダイズへ適用し圃場における応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

I) ミヤコグサ *enf1* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析

SSR マーカーなどを用いて染色体歩行によるマップベースクローニング等をおこない、原因遺伝子の同定を試みた。次に、窒素固定活性の強化に関与すると思われる遺伝子の発現抑制体を作成して、形成された根粒数との相関関係を調査した。

II) 高窒素固定能ダイズ変異体の評価

ABAを用いたスクリーニング法によって約50系統の変異体候補が選抜された。そこでそ

れらを用いた根粒着生試験をおこない野生型ダイズと比較して窒素固定活性が有意に高くなっているかどうかを調査した。またそれぞれの変異系統を自殖して得た種子を用いて圃場における収量調査をおこなった。以上によって高窒素固定能ダイズ変異体の圃場での応用の可能性を評価した。

III): ダイズのオルソログ (*ENFI*) 遺伝子の発現抑制株の確立と解析

ミヤコグサの *ENFI* 遺伝子またはその下流で機能していると考えられる遺伝子について、tilling 法によってダイズオルソログ遺伝子の発現を抑制した個体の作出を試みた。

4. 研究成果

I): ミヤコグサ *enf1* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析

公開されているミヤコグサのSSRマーカー情報を利用して *enf1* 突然変異体と野性型ミヤコグサ Miyakojima MG20 から作出した BCF2 (back cross F2) 世代の植物を用いたラフマッピングをおこない、*ENFI* 遺伝子が座しているところと予想される染色体を特定した。この変異体の表現型は不完全優勢であることが分かっており、通常のマップベースクローニングによる遺伝子の同定には困難が予想されたため、次のステップとして次世代シーケンサーを用いて *enf1* 変異体及びBCF2の中で表現型が野生型を示した個体についてゲノムの全塩基配列を決定した。そして前者の変異箇所から後者のそれを減じることで、*ENFI* 遺伝子の候補を絞り込んだ。また、ミヤコグサのマイクロアレイを用いた解析から、*enf1* 変異体において発現が劇的に減少している *TRX* 遺伝子を見出した。また、*TRX* 遺伝子の発現は根粒数と負の相関を示すことが明らかとなった。つまり *TRX* 遺伝子は、原因遺伝子またはその下流で働いている遺伝子であると推察された。

次に、それらの遺伝子について、RNAi法によって毛状根の系を利用して、発現抑制体を作成し、形成された毛状根に根粒菌を接種して、形成された根粒数をカウントした。その結果、*TRX* 遺伝子に関しては、根粒数が増加の傾向にあった。以上のことは、*TRX* 遺伝子が窒素固定活性増強遺伝子である可能性を示唆している。

II): 高窒素固定能ダイズ変異体の評価

ABAを用いたスクリーニング法によって選抜したABA低感受性変異体について、その後代について、窒素固定活性および圃場における収量性を調査した。その結果、NO. 33およびNO. 57に関しては、少なくとも自殖M7世代まで窒素固定活性が高い表現型を維持していることを確認できた。また、佐賀大学圃場においておこなった収量調査では、NO. 10, 26およびNO. 57の系統が個体当たりの種子生産が多いことを確認した。したがってこれらの系統は、窒素固定活性が高いことで、種子生産量が高くなっているものと考察された。

III): ダイズのオルソログ (*ENFI*) 遺伝子の発現抑制株の確立と解析

ENFI の下流で働く *TRX* 遺伝子について、ダイズのオルソログ遺伝子に変異が入ったものの選抜をダイズのミュータントライブラリーに対してtilling法によっておこなった。その結果ダイズ *TRX* 遺伝子に変異が導入された系統を取得することができた。しかしその系統ではイントロンに変異が導入されており、エクソン部分へ変異が導入されたものに関しては単離できなかった。これに関しては、今後もライブラリーが追加される度にスクリーニングをおこなっていく予定である。また、*enf1* の原因遺伝子の可能性が考えられる *HDA* 遺伝子に関しては、現在もtilling法によるスクリーニングを継続しておこなっている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Tominaga A., Gondo T., Akashi R., Zheng S., Arima S. and Suzuki A. Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* 125 395-406 2012. 査読有
DOI 10.1007/s10265-011-0459-1
- ② Tominaga A., Nagata M., Futsuki K., Abe H., Uchiumi T., Abe M., Kucho K., Hashiguchi M., Akashi R., Hirsch A., Arima S. and Suzuki A. Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the ABA low-sensitive

mutant *enf1* (enhanced nitrogen fixation 1) of *Lotus japonicus*.
Plant Physiology 151, 1965 - 1976,
2009. 査読有
doi: [http:// dx. doi. org/ 10.1104/ pp. 109. 142638](http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.142638)

[学会発表] (計 16 件)

- ① Tominaga A., Arima S., Suzuki A. et al. Molecular mechanism of improved symbiotic phenotype in ABA low-sensitive mutant *enf1* of *Lotus japonicus*. 第2回アジア窒素固定会議, プーケット (タイ), 2012年10月28日
- ② Osuki K., Suzuki A. et al. Expression of *b-1,3-glucanase* gene in autoregulation of nodulation. 第2回アジア窒素固定会議, プーケット (タイ), 2012年10月28日

[図書] (計 2 件)

- ① 鈴木章弘, 他, 作物学用語事典, 農文協, 遺伝子(1): 分子遺伝学の基礎と応用, P208-209
遺伝子(3): 遺伝子導入とGMO P212-213, 2010年1月

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~azuki/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 章弘 (SUZUKI AKIHIRO)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号: 50305108

(2) 研究分担者

有馬 進 (ARIMA SUSUMU)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号: 90140954

(3) 連携研究者

()

研究者番号: