

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580016

研究課題名（和文） 根粒菌との共生窒素固定能が強化された新規マメ科植物の解析

研究課題名（英文） Analysis of enhanced nitrogen fixation mutant of leguminous plant

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：

70 μ M アブシジン酸を含む培地で発芽してきたミヤコグサの変異体、no12の詳細な表現型解析をおこなった。その結果、この変異体は野生型よりも有為に多くの根粒を形成し、個体当たりの窒素固定能は野生型の約2倍に達していた。次にこの変異体を野生型ミヤコグサMG20と交配し、F1世代およびF2世代の表現型を解析した。その結果、この変異の遺伝様式は不完全優勢であると考えられた。一方、同様の方法論をダイズに適用し選抜した変異系統の表現型解析をおこなった。その結果いくつかの系統において野性型と比較して有意に高い窒素固定活性を示した。これらの系統については、佐賀大学農学部の圃場で生育調査を行った。変異系統の中には野性型よりも種子の収量が高い系統もみられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：根粒，ミヤコグサ，窒素固定，ABA，変異体，表現型，ダイズ，スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

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。つまり農地への合成窒素肥料の投入が今までの人口爆発を支えてきたわけである。そして将来的にもこの人口増加の傾向は変わらず、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360億立方メートルの天然ガスを消費する計算になる。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。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、環境汚染や土壌疲弊といった深刻な問題も引き起こしている。

これに対してさまざまな取り組みが盛んにおこなわれており、その中には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も含まれている。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。そして実際に多くの精力的な研究がなされ教科書を書き換えるような知見が蓄積されつつある。しかしながらそれらの研究成果は、根粒菌感染の初期イベントや根粒数の調節に関係しているものなどが多く、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、十分に精力が注がれているとは言いがたく、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。

研究代表者は、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、野生型と比較して内生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。そしてホワイトクローバ由来のcDNAライブラリーから単離した*TrEnodDRI*遺伝子を強制的に発現させたミヤコグサでは、内生ABA濃度が上昇して根粒数が減少すること、またその形質転換体をABA合成阻害剤であるabamineで処理すると根粒数が回復することを示してきた。これらの結果を踏まえて、「野生型と比較して内生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、根粒数が増加して空気中の窒素をより多く固定できる可能性がある」という単純な発想のもと、以下の方法で変異系統の選抜を試みた。すなわちEMS (メタンスルホン酸エチル) 処理によって塩基置換を誘導したミヤコグサの次世代 (M2) の種子を、70 μM のABA (野生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、これらをミヤコグサのABA関連変異体候補とし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、N012およびN018の2系統における根粒数は野生型と比較して増加傾向にあった。そこでこれら2系統について詳細な解析をおこなったところ、両系統とも根粒菌接種後1ヶ月での

根粒数は、野生型と比較して優位に増加しており生長も旺盛であった。さらにN012に形成された根粒における窒素固定活性をアセチレン還元法で測定したところ、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、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

研究代表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、「植物個体あたりの窒素固定活性が野生型と比較して飛躍的に増大したミヤコグサ」を選抜することに成功した。そこで本研究課題では、(1) そのような植物が示す表現型が「農業上有用な形質」であるかどうかの評価、(2) 原因遺伝子の探索、(3) 旺盛な生長を示すマメ科植物の選抜方法の確立、(4) 窒素固定活性が強化されたダイズ変異体の単離および評価、の4つのサブテーマを展開することによって、窒素固定活性の強化に至る分子的基盤を理解するとともに、それを利用した応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 「農業上有用な形質」であるかどうかの評価：
アブシジン酸を用いたスクリーニングによって単離した no12 について、根粒菌を接種し窒素を含まない B&D 培地で長期間 (根粒菌接種後 98 日間) の生育調査をおこない、いくつかの収量構成要素等について解析をおこなった。その際の窒素含量測定についてはマイクロケルダール法およびインドフェノール法を組み合わせおこなった。

(2) 原因遺伝子の探索：
no12 変異体はミヤコグサの MiyakojimaMG20 がバックグラウンドの変異体であるので、GifuB129 とのバッククロスをおこない、その F2 世代を用いて根粒着生試験をおこなった。その際の培地は、(1) と同様に窒素を含まない B&D 培地を用いた。そしてその結果根粒と窒素固定活性が MG20 よりも明らかに増加しているものをプールした。次にそれらからゲノミック DNA を抽出し、かずさ DNA 研究所を中心にして

整備されたミヤコグサの SSR マーカーを用いて、染色体の位置を大まかに特定するラフマッピングをおこなった。

(3) 旺盛な成長を示すマメ科植物の選抜方法の確立：

ミヤコグサの no12 変異体は、EMS 処理して得た M2 世代のバルク種子を、70 μ M ABA が入った培地で発芽させて、生き残ったものを選抜したものである。この方法が本当に窒素固定活性が増強された変異体を選抜するのに効果的であるかどうかを調べるために、スクリーニングのスケールをアップして同様の選抜をおこなった。具体的には、ナショナルバイオリソースプロジェクトで準備されたミヤコグサの EMS, M2 バルク種子、約 10,000 粒をスクリーニングした。次に選抜された ABA 耐性を示す系統群について上記 B&D 培地を用いて根粒着生試験、窒素固定活性の測定をおこなった。

(4) 窒素固定活性が強化されたダイズ変異体の単離および評価：

エックス線処理によって変異を導入したダイズの M2 バルク種子を用いて、ABA スクリーニングをおこなった。次にそこで選抜された変異体候補について、種子を収穫し、次世代およびその次の世代の種子を用いて、人工気象器内での根粒着生試験、および圃場における生育調査、収量調査をおこなった。

4. 研究成果

(1) 「農業上有用な形質」であるかどうかの評価：

no12 について、ミヤコグサ根粒菌接種後 98 日間の生育調査をおこなった。生育期間中に咲いた花の数、莢の数、結莢率、莢の長さ、莢中に含まれる種子の数については、MG20 と no12 を比較した場合に有意な差は見られなかった。しかしながら、100 粒重の生重量、100 粒重の乾燥重量および種子の乾燥重量当たりの窒素量については、no12 の方が大きな値を示し、1%水準で有意差が見られた。また、この変異体は、根粒菌を接種しない時は、MG20 よりも成長が悪いのに対して、根粒菌を接種した場合（根粒が形成されて窒素固定をおこなうようになる）は、MG20 よりも旺盛な成長を示すようになることも明らかになった。このような性質は農業上非常に有利なものであり、応用面を考えた場合にこの変異体は極めて重要な情報を提供するものと考えられる。

(2) 原因遺伝子の探索：

まず、no12 の根粒数および窒素固定活性増

加という表現型が、どのような遺伝様式に従うのかを解析した。すなわち、no12 と MG20 をバッククロスして、その F1 および F2 世代の表現型を解析した。その結果、F1 では根粒数、窒素固定活性ともに MG20 と no12 の中間型となった。F2 についても、それぞれの平均値は中間型になったため、不完全優性の可能性が示された。しかし、不完全優性と断言するためには 1:2:1 に分離することを示さなければならないため、F2 世代の 152 個体を用いてヒストグラムを用いた解析をおこなった。そして得られた実測値を用いて χ^2 乗検定をおこなったところ、根粒数、窒素固定活性の両方が 1:2:1 に当てはまるということが判明した。よって、この変異は 1 つの遺伝子の不完全優勢によることが示された。

ミヤコグサ GifuB129 と no12 とのバッククロス F2 世代を用いて、SSR マーカーを利用したラフマッピングをおこなった。プライマーにはミヤコグサの各染色体上に存在する SSR マーカー約 60 種類を用いた。鑄型としては、F2 世代の中でも根粒数が多く窒素固定活性も高かった系統から抽出したゲノミック DNA を用いた。その結果、ある染色体上の末端付近に no12 の原因遺伝子があることが明らかになった。現在遺伝子のクローニングを目指して、ファインマッピングをおこなっているところである。

(3) 旺盛な成長を示すマメ科植物の選抜方法の確立：

ナショナルバイオリソースプロジェクトで準備されたミヤコグサの EMS M2 バルク種子を 70 μ M ABA 入りの培地で発芽させて、生き残ったものを選抜した。約 10,000 個体を選抜して 1 次スクリーニングでは 100 個体を選抜した。それらすべてに対して B&D 培地を用いた根粒着生試験をおこなった。その結果、いくつかの系統では、MG20 と比較して根粒数が増加している傾向にあった。次に根粒数が増加していた系統について、アセチレン還元法による窒素固定活性を測定したところ、4 系統で有意に窒素固定活性の上昇が見られた。つまり、これら 4 系統については、no12 と同様に根粒数が多く窒素固定活性も高いということになる。よって ABA を用いたスクリーニング方法で窒素固定活性が強化された変異系統を選抜することが可能であると考えられた。現在、得られた 4 つの系統について遺伝様式を確認しているところである。

(4) 窒素固定活性が強化されたダイズ変異体の単離および評価：

ダイズ品種「Bay」にエックス線照射するこ

とによって準備した約 3,000 粒のダイズ種子を、100 μ M ABA 入りの培地で発芽させ、生き残ったものを選抜した。初年度は、それらを圃場に植えて、次世代種子を取ることに集中した。2 年目は得られた M3 世代種子を用いて、人工気象器内での根粒着生試験及び圃場へ展開しての収量調査をおこなった。その結果、人工気象器内で Bay と比較して明らかに高い窒素固定活性を示す系統が見つかった。またそういった系統の中には、根粒数に関しても Bay よりも有意に増加したのが見いだされた。圃場による収量調査では、Bay よりも有意に種子数、種子中共に大きな値を示した系統が存在した。全体的に見た場合は、残念ながら窒素固定活性と収量の間に高い相関があるという結果にはならなかったが、人工気象器における試験で高窒素固定活性を示したものの中には、圃場試験における収量が多かったものも存在した。次年度からは、窒素固定活性が高く根粒数が多いものを中心に、圃場試験および人工気象器内での根粒着生試験を継続しておこなう必要がある。

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 6 件)

- ① Yoshikazu Shimoda, Fuyuko Shimoda-Sasakura, Ken-ichi Kucho 等 Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. The Plant Journal vol. 57, 254-263 (2009) 査読有
- ② Maki Nagata, Ei-ichi Murakami, Yoshikazu Shimoda 等 Expression of a Class 1 Hemoglobin Gene and Production of Nitric Oxide in Response to Symbiotic and Pathogenic Bacteria in *Lotus japonicus*. Molecular Plant-Microbe Interactions vol. 21, 1175-1183 (2008) 査読有
- ③ Akihiro Suzuki, Kenji Yamashita, Mami Ishihara 等 Enhanced symbiotic nitrogen fixation by *Lotus japonicus* containing an antisense β -1,3-glucanase gene. Plant Biotechnology vol. 25, 357-360 (2008) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Ei-ichi Murakami, Maki Nagata, Ken-ichi Kucho 等 Expression of defense genes of *Lotus japonicus* in symbiosis with *Mesorhizobium loti*. 第 8 回ヨーロッパ窒素固定会議 2008 年 8 月, ベルギー
- ② Akihiro Suzuki, Akiyoshi Tominaga, Ayaka 等 Characterization of enf (enhanced nitrogen fixation) mutants of *Lotus japonicus*. 第 8 回ヨーロッパ窒素固定会議 2008 年 8 月, ベルギー

一

③ Akiyoshi Tominaga, Ayaka Yamauchi, Toyoaki Anai 等 Isolation and characterization of enhanced nitrogen fixation mutants of leguminous plants. 第 5 回国際作物学会 2008 年 8 月, 韓国

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当無し

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

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し