

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570040

研究課題名（和文） 共生窒素固定機能を制御する宿主植物遺伝子のクローニング

研究課題名（英文） Cloning of host plant genes that control symbiotic nitrogen fixation

研究代表者

菅沼 教生（SUGANUMA NORIO）

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40179114

研究成果の概要：根粒菌は、マメ科植物に共生し空中窒素を固定する。このような根粒菌の共生窒素固定機能は、宿主植物の遺伝子によって制御されている。共生窒素固定機能を制御する宿主植物遺伝子を単離することを目指し、マメ科のモデル植物であるミヤコグサの窒素固定機能を失った Fix⁻変異体を作成し、それらの中から新規の Fix⁻変異体を選抜し、原因遺伝子のクローニングを行った。その結果、5系統の新規の Fix⁻変異体が単離された。さらに、そのうちの一つの変異体の原因遺伝子が同定された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	720,000	4,220,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：共生、根粒、窒素固定、変異体、ミヤコグサ

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は土壌細菌の一種である根粒菌と共生し、根粒と呼ばれる新たな器官を形成するとともに空中窒素を固定する。そのために、マメ科植物は化合態の窒素がなくても生育することができる。また、共生窒素固定作用は、植物では一部の例外を除きマメ科植物に限られた特殊な機能であるが、地球上に生息する生物の生育に必要な窒素源を供給するという点でも重要な生物的機能である。

マメ科植物と根粒菌の共生関係は、根粒という器官形成と窒素固定という機能発現の

大きく2つのステージに分けることができる。このうち、器官形成の機構は、この30年近くの間基本的な宿主植物と根粒菌の両者による相互作用のあり方が解明された。しかしながら、根粒が形成され、根粒菌が内部共生した後、どのようにして共生窒素固定活性が発現するかという機能発現の機構はほとんど明らかにされていない。

根粒菌の窒素固定活性は、根粒菌において窒素固定酵素であるニトロゲナーゼを含む窒素固定遺伝子群の発現が誘導されることで生ずる。ところが、根粒菌は通常単独で生

活する時には、窒素固定活性が誘導されない。植物に感染し、根粒細胞に内部共生することではじめて根粒菌の窒素固定活性が発現する。また、宿主植物から作出された共生変異体の中に、根粒は形成されるが窒素固定活性に異常がみられるFix⁻変異体が単離されている。これらのことは、内部共生した根粒菌の窒素固定活性の発現を制御する遺伝子が宿主植物に存在することを示している。このような宿主植物遺伝子を単離するために、根粒で特異的に発現する遺伝子を単離する、また、正常な根粒とFix⁻変異体の根粒で遺伝子発現を比較する研究が行われてきた。

その結果、これまでに数多くの窒素固定に関与すると予想される宿主植物遺伝子が単離されている。しかし、それら遺伝子の発現を抑制した形質転換体を作製しても、窒素固定活性に影響がみられるケースはわずかである。これは、単離された遺伝子が窒素固定活性がないために結果として発現が減少する遺伝子や機能を補完する別の遺伝子が存在するためであると考えられる。

それに対して、変異体を作製して、原因遺伝子をポジショナルクローニングで単離する方法は、多大の労力を要するが、得られる結果は説得力に富み、原因となる遺伝子を単離する上で有効である。マメ科のモデル植物であるミヤコグサでは、分子遺伝学的研究のための基盤が整備され、ポジショナルクローニングによって変異体の原因遺伝子を同定することが可能である。実際に、ミヤコグサの共生変異体を用いて、根粒形成に必須の宿主植物遺伝子が数多く単離されてきている。一方、ポジショナルクローニングによってFix⁻変異体の原因遺伝子が同定されたのは2例であり、宿主植物における窒素固定機能の発現の分子機構には、不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

共生機構を分子レベルで解明する上で、モデル植物ミヤコグサの変異体を利用したポジショナルクローニング法は強力な研究手法である。これまでにミヤコグサでは、7種類のFix⁻変異体の原因遺伝子座が同定され、2種類の遺伝子の機能が解明されている。しかし、共生窒素固定は、根粒特異的に分化した宿主植物側の共生特異的な代謝システムによって支えられているため、それに関与する宿主植物遺伝子は極めて多いと予想される。そこで、共生窒素固定に必須の宿主植物遺伝子のさらなる同定を目的に、ミヤコグサのFix⁻変異体を作成し、ラフマッピングにより新規のFix⁻変異体を選抜する。さらに、得られた新規のFix⁻変異体の表現型を解析するとともに、ファインマッピングにより原因遺

伝子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) Fix⁻変異体のスクリーニング

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の Miyakojima 系統の種子を 0.4 % ethyl methanesulphonate (EMS) で処理し、播種した。得られた M2 種子を用いて、Fix⁻変異体のスクリーニングを行った。さらに、選抜された個体から M3 種子を採取し、M3 世代においてFix⁻の表現型が遺伝した個体を変異体とした。

(2) バッククロス系統の作製

Fix⁻変異体と野生型の Miyakojima を交配し、後代における表現型の分離比を調べるとともに、バッククロスしたFix⁻変異体の系統を作製した。

(3) マッピングのための交配系統の作製

Fix⁻変異体と別系統の野生型の Gifu を交配し、マッピングのための交配系統を作製した。

(4) ラフマッピング

Fix⁻変異体と Gifu との交配系統の F₂ 世代において分離したFix⁻の表現型を示す個体を育成し、葉から DNA を抽出した。抽出された DNA を用いて、ミヤコグサの 6 本の染色体のそれぞれに設定された標準的な DNA マーカーにより、連鎖解析を行った。これにより、原因遺伝子の染色体におけるおおよその位置を特定し、これまでに報告されている7つのFix⁻変異体の遺伝子座と比較することで新規のFix⁻変異体を同定した。

(5) 表現型解析

新規のFix⁻変異体として同定された系統のバッククロス系統を用いて、植物体の生育、根粒着生、窒素固定活性を調べた。また、根粒の切片を作製し、光学顕微鏡で根粒の内部構造を観察した。

(6) 原因遺伝子のマッピング

新規のFix⁻変異体として同定された系統の Gifu との交配系統から得られた F₂ 劣性ホモ個体約 1,000 個体を用いて、連鎖解析を行った。さらに、かずさ DNA 研究所が提供するゲノムの塩基配列に基づき、新たな DNA マーカーを作製し、連鎖解析を行った。最終的に、DNA マーカーで挟み込んだ領域の予測される遺伝子の塩基配列を野生型と比較し、原因遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) Fix 変異体の作出

種子 5,000 粒を EMS で処理し、播種したところ、2,656 個体から M2 種子が得られた。これらの種子合計 25,390 粒を用いて、一次スクリーニングを行った。その結果、203 個体の Fix 変異体の候補が得られた。これらを育成したところ、130 個体の植物から M3 種子が得られた。そこで、これら M3 種子を用いて、さらに二次スクリーニングを行った結果、最終的に 24 系統の Fix 変異体が選抜された (図)。

選抜された変異体には、いずれも根粒の着生は認められるものの、植物体の生育は野生型に比べると著しく劣った。また、葉は薄い黄緑色で、窒素欠乏の症状が観察された。さらに、着生した根粒の多くは、小さく、白色ないし薄いピンク色を呈した。これらはいずれも Fix 変異体で特徴的に観察されることから、選抜された変異体は、窒素固定活性に異常がみられる Fix 変異体であると考えられた。

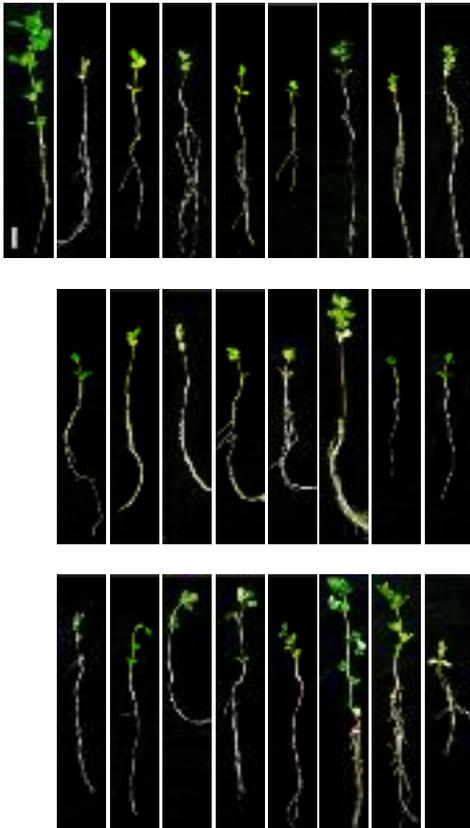


図 作出された Fix 変異体

(2) 新規の Fix 変異体の同定

選抜された Fix 変異体に Gifu を交配した個体から種子が得られた 13 系統の Fix 変異体について、原因遺伝子のラフマッピングを行った。その結果、F04、F34、F39、F42、F156 の 5 系統の Fix 変異体が、これまでに報告されている Fix 変異体の遺伝子座とは異なる領

域に原因遺伝子がマップされ、新規の Fix 変異体であると推測された。ラフマッピングを行った残りの 8 系統の Fix 変異体の中には、これまでに遺伝子座が同定された *fen1* 変異体と *sym102* 変異体と同一であると予想される系統がみられた。

これら 5 系統の Fix 変異体に Gifu を交配した個体の F₂ 世代における野生型と変異型の分離比は、いずれも 3 : 1 の分離比に適合した。したがって、F04、F34、F39、F42、F156 変異体の 5 つの系統の変異した表現型は、単一の劣性遺伝子によって支配されていると考えられた。

交配、さらに種子の形成に時間を要するため、残りの 11 系統の Fix 変異体については、ラフマッピングを完了することはできなかった。今後、これら 11 系統の中からも新規の Fix 変異体が同定されることが期待される。

(3) F04 変異体と F34 変異体の表現型

新規の Fix 変異体として同定された F04 変異体と F34 変異体では、Miyakojima との交配によりバッククロス系統が作製されたので、表現型解析を行った。

根粒菌を接種した条件では、F04 変異体の生育は、生育期間を通して抑制された。この生育抑制は、化合態の窒素を与えるとほぼ野生型と同程度まで回復したことから、F04 変異体の変異遺伝子は、共生機能に關与する遺伝子であることが示された。F04 変異体における根粒の着生数には影響はみられなかったが、形成された根粒は野生型のように時間の経過に伴って肥大することなく、小さいままであった。また、窒素固定活性は生育期間を通して低かった。

F04 変異体に形成された根粒の内部構造を光学顕微鏡で観察したところ、根粒菌が侵入した感染細胞が観察された。しかし、観察された感染細胞は、野生型とは異なり、染色される領域が細胞全体に広がらず、細胞内で凝集し塊となって観察された。また、F04 変異体の感染細胞には、液胞が観察されないという特徴がみられた。これらの特徴から、F04 変異体の原因遺伝子は、根粒菌の内部共生過程に關与する遺伝子である可能性が示唆された。

こうした F04 変異体でみられた生育抑制、正常な根粒着生数、低い窒素固定活性、化合態窒素による生育の回復は、F34 変異体でも同様に観察された。また、F34 変異体では、白色とピンク色の 2 種類の根粒が着生するという特徴がみられた。

F34 変異体に形成されたピンク色の根粒の内部構造は、正常な根粒に類似しており、明確な違いは認められなかった。それに対し、白色の根粒では、感染細胞が少なく、また、感染細胞内に染色領域の塊が観察された。

F34 変異体では、生育のステージが進行すると、ピンク色の根粒の着生数が減少し、すべて白色の根粒になった。したがって、ピンク色の根粒が白色の根粒に変化すると推測された。しかし、ピンク色の根粒と白色の根粒の内部構造は、明らかに異なり、構造上の違いからは、ピンク色の根粒が白色の根粒に変化するとは考えられなかった。このことは、F34 変異体では、2種類の遺伝子が変異している可能性を示唆している。今後、この点は明確にしていく必要がある。

(4) F04 変異体の原因遺伝子の同定

F04 変異体では、Gifuとの交配によって得られたF₂劣性ホモ個体 972 個体を用いて、原因遺伝子のマッピングを行った。さらに、ゲノムの塩基配列に基づき新たなマーカーを作製し、マッピングを行った結果、原因遺伝子を単一のTACクローンに絞り込むことができた。このTACクローンには、11個の遺伝子が予測されている。そこで、予測された遺伝子の中から原因遺伝子の候補になり得る可能性のある2つの遺伝子に絞り、塩基配列を野生型とF04 変異体で比較した。その結果、そのうちの一つの遺伝子に一塩基の変異を検出した。今後、この遺伝子に焦点をあて、相補実験、発現解析を行っていく予定である。

本研究課題では、目標とした新規のFix 変異体を少なくとも5系統作出することができた。さらに、この3年間で1つの変異体の原因遺伝子を同定することができたことは、評価できる。今後、残りのFix 変異体の原因遺伝子を同定することで、最終的な目標である共生窒素固定機能の宿主植物による発現制御の分子機構の解明を達成していきたいと考えている。

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2件)

菅沼教生、河内宏、共生窒素固定活性の発現と制御にかかわる宿主植物遺伝子、蛋白質核酸酵素、51、1038-1043、2006、査読無

明石良、川口正代司、菅沼教生、ミヤコグサのリソース整備と共生窒素固定の分子的解明、バイオサイエンスとバイオインダストリー、64、267-271、2006、査読無

[学会発表](計2件)

箱山雅生、小林麻由美、竹中希奈、菅恵理、伊藤あかり、加藤千紗、弭間和哉、矢野幸司、梅原洋佐、河内宏、菅沼教生、

新規ミヤコグサ Fix 変異体の作出、植物微生物研究会、2008、9、18、奈良女子大学

山谷紘子、箱山雅生、佐藤修正、金子貴一、柴田哲、長谷純宏、田中淳、川口正代司、菅沼教生、田畑哲之、林誠、河内宏、梅原洋佐、マメ科モデル植物ミヤコグサの窒素固定活性発現に関わる変異体Ljsym102の解析、日本植物生理学会、2009、3、21、名古屋大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅沼 教生 (SUGANUMA NORIO)

愛知教育大学・教育学部・教授

研究者番号：40179114

2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし