

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

川口 正代司

(東京大学大学院理学系研究科 助教授)

「共生ネットワークの分子基盤」

1. 研究実施の概要

マメ科植物における根粒菌との共生系は、4億年前に遡る内生菌根菌との共生系をベースに進化してきた。共生系を支える宿主因子を分子レベルで解明するためには、モデルマメ科植物を用いた分子遺伝学的解析が有効である。当グループでは日本に自生するモデルマメ科植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* を取り上げ、EMS処理や培養変異により、51系統の共生変異体を単離し、連鎖地図上へのマッピングにより23遺伝子座を明らかにしている。これらの中から、大阪大・農業生物資源研・東大グループは根粒共生のみならず菌根共生が失われた変異体 *sym71* と *sym86* から原因遺伝子の単離を試み、それぞれ *Castor* と *Pollux* という2つの遺伝子を特定することに成功した。これらは、Nod factor の受容によって誘導されるカルシウムオシレーションの発生に必須で、新規イオンチャンネルをコードしていると推測される。また大阪大グループは *sym82* 共生変異体の原因遺伝子も特定することに成功している。今後もポジショナルクローニングを継続し、植物の生存を支える菌根・根粒共生系の分子基盤を明らかにする。また、大阪府立大グループは、宿主の根より浸出し、菌根菌の菌糸の分枝を誘導する Branching factor の精製・単離を試みる一方、菌根菌が分泌する未知なる共生因子 Myc factor の検出系の構築を試みた。畜産草地研グループは、いまだ報告例のない菌根共生特異的変異体を単離することを目的とし、選抜系を確立するとともにスクリーニングを開始した。東京大グループは、遠距離シグナル伝達を介して共生バランスを安定化させる HAR1 レセプターキナーゼを中心に解析し、HAR1 と相互作用する宿主因子の候補として CLV2 様遺伝子を特定した。今後は、RNAi や Tilling による逆遺伝学的手法により共生における遺伝子機能を明らかにしていく予定である。

2. 研究実施内容

川口グループ

当グループでは、ミヤコグサより遠距離シグナル伝達により根粒菌や菌根菌との共生系を制御する宿主因子 *HARI* 遺伝子 (ロイシンリッチリピートを持つレセプター様キナーゼ) を単離することに成功している。平成15年度は *HARI* レセプターキナーゼが認識すると予

想されるリガンドの探索を試みた。HAR1と極めて高い相同性を示すシロイヌナズナの CLAVATA1 (CLV1) レセプターキナーゼはCLV2とレセプター複合体を形成し、CLV3ペプチドを受容していると考えられている。そこでHAR1のリガンド候補をCLV3様遺伝子と考え、ミヤコグサのゲノム情報から13種のCLV3様遺伝子を特定した。また、HAR1とレセプター複合体を形成すると予想されるCLV2遺伝子の機能を明らかにするために、ミヤコグサからCLV2様遺伝子を単離した。発現解析の結果、全身的に発現しているものの根粒での発現が高かった。現在、RNAiによりLjCLV2の機能解析を進めている。

早咲きのミヤコグサMiyakojima MG-20系統にHe²⁺イオンビーム処理を行いhar1超根粒着生変異体とは異なる新奇変異体distanceを単離した。興味深いことにdistanceは根粒過剰着生の形質の他に極めて遅咲きの表現型を示した。接ぎ木実験の結果から、distanceはhar1変異体同様、根の表現型はシュートの遺伝子型によって制御していることが示唆された。

秋山グループ

(1) Branching factorの精製と同定

ミヤコグサとニンジンからのBranching Factor (BF)の精製・単離を試みた。ミヤコグサを低リン酸栄養条件で水耕栽培し、得られた脂溶性根分泌物を酢酸エチル水を用いて溶媒分画したところ、活性は酢酸エチル可溶の中性物質画分のみに見られた。160Lの水耕液から調製した中性物質画分79 mgから、最終的にODS-HPLCにより25ng/disc以下で活性を示す2つの精製画分を得た。ニンジンもミヤコグサと同様に酢酸エチル可溶の中性物質画分のみで活性が見られた。250Lの水耕液から調製した中性物質画分200mgを精製し、活性ピークを一つ特定した。クロマト挙動より、ニンジンBFはミヤコグサBFより極性が高く、疎水性が低いのでミヤコグサとは異なる化合物であることが示唆された。さらにニンジンでは少なくとも2つ以上のBFが存在することが分かった。

(2) Myc factorの検出系の構築

LjCbp1プロモーターにGUS遺伝子が挿入されたミヤコグサT90形質転換体の根に、パーミキュライトを培土として試験管中で*Glomus mosseae*、*Gigaspora margarita*を接種したところ、菌根菌の感染・共生により本プロモーターが活性化されることが分かった。無リン酸改変Hornum培地を用いシャーレ中in vitroで*G. margarita*をT90の根に接種したところ、根の近傍で菌根菌の宿主認識反応である菌糸分岐が起こり、かつ菌の感染が見られる場所でGUS発現が確認できた。これはミヤコグサでは世界で初めてin vitro系での菌根菌の感染・共生を成功させた例である。

林グループ

根粒形成変異体として単離されてきたもの (nod-, hist-) には菌根菌との共生が不全であるもの (myc-)、あるいはそれには影響が及ばないもの (myc+) が存在する。菌根菌との相互作用を解析する上で、両者の比較解析は、菌根菌との共生に必要な要素を明らか

にする上で重要である。一昨年の研究内容であるhist-変異体の同定、nod-、hist-変異体のラフマッピングをふまえ、本年度はミヤコグサの3つのmyc-変異体 *sym71*、*sym82*、*sym86*の原因遺伝子を同定し、さらにいくつかのhist-変異体についての表現型解析をおこなった。

nod-、myc-変異体である *sym71* のファインマッピングの結果、原因遺伝子を特定することができ、*sym4*、*sym22* のアレルであることが判明した。原因遺伝子は新規イオンチャネルと予測され、4回膜貫通領域を保持し、また、カルシウムイオン調節領域と有意な相同性を示す構造が認められた。この遺伝子のホモログもクローニングすることができ、それは *sym86* の原因遺伝子であることが判明した。これは *sym23* のアレルであった。遺伝子をそれぞれ *CASTOR*、*POLLUX* と命名した (図1)。

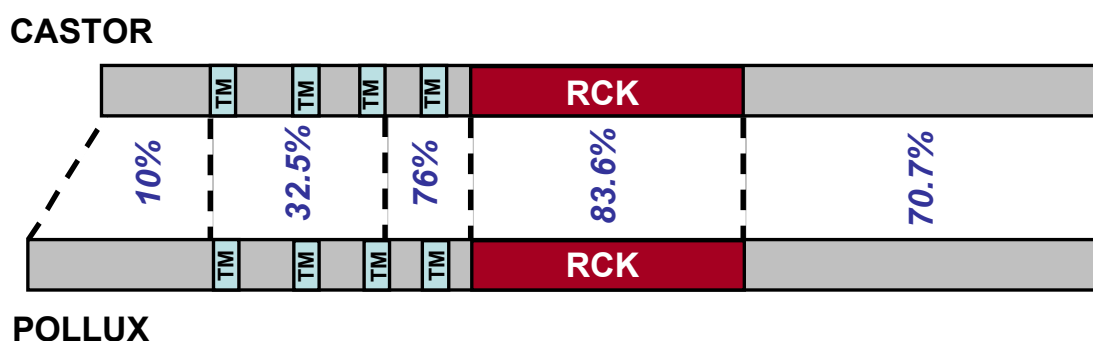


図1, 菌根菌と根粒菌の共生に必須の宿主因子 CASTOR、POLLUX

hist-、myc-変異体である *sym82* については、ファインマッピングの結果、変異箇所を特定し、原因遺伝子を明らかにした。この変異体は *sym6*、*sym30* のアレルであり、転写因子をコードする遺伝子に異状をきたしていた。

hist-、myc+変異体である *sym79* については、表現型の1つである半不稔形質に基づく解析をおこない、花粉の成熟と極性決定、花粉管の発芽と伸長に変異を示す結果、分離異常を示すことを明らかにした。

梅原グループ

共生系成立過程解明の材料に供するため、昨年度に引き続き、共生変異体の単離、戻し交配及びマッピング集団の作成とラフマッピング、連鎖地図上で近傍に位置づけられた変異体の相補性検定を行った。

培養細胞からの再生植物体由来の共生変異体候補5系統及び川口研究代表らによって単離された2系統の遺伝解析の結果、根粒を形成しないnod-2系統、有効根粒を形成できないfix-2系統、その他3系統について1劣性遺伝子支配であることが明らかとなった。また、このうちnod-とその他5系統、及び前年度遺伝解析を行ったfix-1系統について、か

ずさDNA研作成の連鎖地図上へ位置付けた。相補性検定の結果、第1染色体下流末端領域に位置するG472-21、G532-21、G716-21、G862-4-10とM89-27が*sym71*と同一遺伝子座であること、第5染色体中流に位置づけられたG85-21、G90-23、G101-22、G106-21、第5染色体下流域に位置づけられたG629-21とG814-24がそれぞれ同一遺伝子座であることが明らかとなった。*sym71*と同座の変異体のうち、G472-21、G716-21の原因遺伝子領域には20kb以上と推定される欠失が生じており、大阪大を中心としたグループによる*sym71*の原因遺伝子のポジショナルクローニングに有用な情報を提供した。上記、変異系統のうち、新規変異体であると判断されたfix-系統M202-24に関し、原因遺伝子の単離同定をめざし、高精度マッピングを行った。その結果、原因遺伝子は第4染色体中流域のDNAマーカーTM161とTM173間0.8cMの領域に位置づけられた。

大友グループ

(1) 菌根菌非感染変異株 (Myc-) の選抜

農業生物資源研において組織再生培養個体法によって作製されたミヤコグサの変異株集団を菌根菌の存在下で栽培し、それらの根を染色・観察して菌根菌が感染できない変異株を選抜した。菌根菌は均質のものを大量に調達する必要があることから、*Glomus intraradices*の胞子を購入して用いた。植物の栽培には改変Hornum液肥を添加したバーミキュライトを用い、植物培養試験管に1個体ずつ移植したサンプルを、明：14時間25℃、暗：8時間22℃の条件下、グロスチャンバー内で栽培した。移植5週間後に組織包埋カセットを利用した染色法により菌根菌の感染を確認した。15年度中に177ライン・2330種子を播種し、発芽した1639株を移植、生育した1424株について菌根菌共生の有無を確認した。種子の平均発芽率は70%、移植後の生残率は86%であった。その結果37株の候補株を得た。この中には生育が弱く検定が出来なかった株も含まれており、実際有望なのは数株と考えている。

(2) 根粒菌共生変異株の菌根共生に関する表現型解析

他のグループで得られた根粒菌非共生変異株を菌根菌接種した培土で栽培し、それらの根を染色・観察して菌根菌感染に関する表現型を解析した。その結果、新たに7株を根粒共生と共に菌根共生も失われた変異株と結論した。

3. 研究実施体制

川口グループ

- ① 川口正代司 (東京大学大学院理学系研究科、助教授)
- ② ・共生バランスを維持するHAR1レセプター様キナーゼの生化学的解析
・根とシュートの遠距離シグナル伝達に関わる因子の探索

秋山グループ

- ① 秋山 康紀 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科、助手)
- ② ・Branching factorの精製と同定

- ・Myc factorの検出系の構築

林グループ

- ① 林 誠（大阪大学大学院工学研究科、助手）
- ② ・共生変異体での根粒菌に対する感染過程の詳細な解析
・変異体の連鎖地図へのマッピングおよび原因遺伝子のポジショナルクローニング

梅原グループ

- ① 梅原 洋佐（農業生物資源研究所窒素固定研究チーム、主任研究官）
- ② ・共生変異体の単離と戻し交配による変異体系統の確立
・共生変異体の原因遺伝子の連鎖地図へのマッピング

大友グループ

- ① 大友 量（畜産草地研究所土壌生態研究室、主任研究官）
- ② ・菌根菌非感染変異株（Myc⁻）の選抜
・根粒菌共生変異株の菌根共生に関する表現型解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Tansengco, M.L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshikawa, M., Takagi, S., Kawaguchi, M., Hayashi, M. and Murooka, Y.: Pollen development and tube growth are affected in the symbiotic mutant of *Lotus japonicus*, *crinkle*. *Plant Cell Physiol.* 45: 511-520 (2004)
- Suganuma, N., Nakamura, Y., Yamamoto, M., Ohta, T., Koiwa, H., Akao, S. and Kawaguchi, M.: The *Lotus japonicus Sen1* gene controls rhizobial differentiation into nitrogen-fixing bacteroids in nodules. *Mol. Genet. Genomics* 269: 312-320 (2003).

（2）特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：2件）