

「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

陸上植物と微生物の最も普遍的な共生は、アーバスキュラー菌根菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) との共生である。菌根菌は子嚢菌や接合菌とは別のcladeを形成する大型の胞子をつける菌で、根の皮層組織に樹枝状体 (arbuscule) を形成し光合成産物を受け取る一方、土壤中より吸収したリン酸やミネラルをホストに提供することによって共生を成立させている。菌根共生のルーツは古く、植物が陸上に進出した4億年前とされ、コケとシダの形質をあわせ持つアグラオフィトンの根化石に樹枝状体様のものが報告されている。興味あることに、菌根菌は相互作用する生物に広く見られる宿主特異性をほとんど失っており、そのため菌糸を介して異種植物を繋ぎ、超生命体とも呼ぶべき連携体を形成する。

近年、マメ科植物に共生する根粒菌が分泌するNod factor (リポキチンオリゴサッカライド) の受容系が破綻した植物の共生変異体Nod⁻の中の約半数は、菌根菌との共生系も破綻しているMyc⁻変異体であることがわかってきた。逆に根粒が過剰に着生するミヤコグサの*har1*根粒過剰着生変異体では、菌根菌の感染率も高くなっていた。これらの事実は、根粒菌共生と菌根菌共生を支える植物側の遺伝的基盤に少なからぬ共通性があることを示唆しており、根粒共生系は4億年前に遡る菌根共生系の遺伝的背景を基盤として進化してきたことがわかってきた。当研究グループでは、根粒共生系と菌根共生系の分子メカニズムを明らかにするために、2つのアプローチを試みている。一つは、日本に自生するモデルマメ科植物を用いた分子遺伝学的手法であり、根粒共生と菌根共生の両者の破綻した共生変異体から、共生に必須の原因遺伝子を特定し、遺伝子機能解析を行うという試みである。もう一つは、宿主と菌根菌の共生相互作用認識物質を特定するというものである。前者は、東京大、大阪大、農業生物資源研、畜産草地研のグループがEMS処理、培養変異、イオンビーム照射より単離された共生変異体を用いて研究を進め、後者に関しては、大阪府立大グループが、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や菌根菌が分泌する未知なる共生因子Myc factorの精製・同定を進めている。また、畜産草地研と東京大のグループは、菌根共生に特化した宿主因子を解明すべく、いまだ報告例のない菌根共生特異的なミヤコグサ変異体の単離を試みている。

2. 研究実施内容

川口グループ

当グループでは、モデルマメ科植物ミヤコグサを用いた分子遺伝学的解析を精力的に進めている。今までに根とシュートを介した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HAR1受容体型キナーゼを単離することに成功している。平成16年度はHAR1レセプターキナーゼのリガンド候補として、ミヤコグサよりCLV3様ペプチド遺伝子を単離し、遺伝子機能を探るためアンチセンスRNA法を行った。また、また、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*klavier*の詳細な表現型解析を行った。接ぎ木実験の結果から、*klavier*は*har*同様、根粒過剰着生はシュート由来の抑制の欠損によることが示された。その他、*klavier*は葉脈に異常を示し導管が分断するなどの維管束異常、茎の帯化、花器官数の増加等が観察された。*klavier*の最も興味ある点は、最も早咲きのミヤコグサMiyakojima MG-20由来なのにもかかわらず極めて遅咲きという点で、葉から根粒形成を負に、花成を正に制御する遠距離シグナル因子の欠損であれば興味深い。当初、*klavier*に観察されるこれら多面的な形質は、イオンビーム照射に伴うゲノムの大規模欠失が懸念されたが、ポジショナルクローニングとゲノム解析により1遺伝子内の小規模なゲノム欠失の可能性が示唆された。

秋山グループ

(1) Branching factor (BF) の精製と同定

9,920Lの水耕液より調製した酢酸エチル可溶性物質画分11gからミヤコグサBFを約8 μ g単離した。この単離品を用いて水耕液からの回収、カラム精製など諸条件についてさらに検討を行った。その結果、水耕液を活性炭に連続的に循環吸着させることで、BFを選択的かつ多量に水耕液から回収できることが分かった。本法により、20Lの水耕液を3日間循環吸着して得られた酢酸エチル可溶性物質画分から2ステップのカラム精製で18 μ gのBFを単離できる系が構築できた。EI-MS, ¹H-NMR, UVなどのスペクトル解析からBFは5-deoxy-strigolと推定された。本物質は根寄生雑草の種子発芽刺激物質strigolの合成誘導体として報告されている既知物質であった。2-メチルシクロヘキサノンから10段階の反応より合成した合成品について、天然品とスペクトルデータおよびHPLCでの保持時間の比較を行ったところ、すべて一致したのでBFを5-deoxy-strigolと同定した。根寄生雑草の種子発芽刺激物質はストリゴラクトンと総称されるセスキテルペンで、これまでに天然から5つ単離されている。5-deoxy-strigolが天然から単離されたのはこれが初めてである。5-deoxy-strigolと天然ストリゴラクトンsorgolactone, strigol, そして合成アナログGR24はすべてngからpgレベルで菌糸分岐を誘導した。以上のことから、菌根菌の宿主認識シグナル物質BFは、根寄生雑草の種子発芽刺激物質としてすでに単離されていたストリゴラクトンであることが明らかになった。

(2) Myc factor (MF) の精製と同定

ミヤコグサ根における菌根・根粒共生特異的遺伝子プロモーターである *LjCbp1* プロモーターの活性化度を指標としたペーパーディスクアッセイ法を構築し、AM菌 *Gigaspora margarita* から調製した各種抽出物について試験した。その結果、胞子のメタノール抽出物にプロモーター活性化物質、すなわちMFが含まれていることが明らかになった。

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須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。

$hist^-$ 、 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*、*sym300* 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、イオンビーム照射等の処理により作出した変異系統に対し、窒素固定能欠失を指標に共生変異体候補を選抜した。前年度までに選抜した変異体候補に関して、後代で表現型が再現したものに関しては、系統確立のため戻し交配を行うと共に、マッピング用集団を作出してラフマッピングを行い、新規の変異体を探索した。連鎖地図上の近傍に落ちた変異体同士については、交配による相補性検定を行ない同一遺伝子座かどうか判定した。また、戻し交配により得られた後代系統の根粒菌に対する応答の表現型、菌根共生の表現型を調べた。昨年度、高精度マッピングを開始した fix^- 変異体 M00202-24 (*Ljsym105*) に関し、原因遺伝子同定に向け、ポジショナルクローニングを試みた。

川口研究代表らの作出したEMS処理由来fix⁻変異系統に関し、マッピングと交配による相補性検定を行った結果、fix9とs88が*sen1*と、fix13とs89が*sym81*と同座であることが明らかとなった。また、イオンビーム照射系統については、1600系統について根粒形成不全変異体のスクリーニングを行った。そのうち900系統から、これまでにnod⁻4系統（うち3系統はmyc⁻）、fix⁻11系統を単離し、fix⁻2系統についてはラフマッピングを終了した。fix⁻変異体*Ljsym105*(M00202-24)に関して、表現型解析を行ったところ、アセチレン還元活性は野生型の半分ほどあるが、接種後2週間の根粒内で一部の細胞については崩壊が始まっているということが明らかとなった。現在、原因遺伝子を明らかにするため、遺伝子座乗領域をカバーするTACコンティグをウォーキングにより作成中である。

大友グループ

昨年度に引き続き、培養変異によって得られた変異株集団の選抜を行った。特に初期認識に関与する因子の同定を念頭に、すべての株を独立した培養試験管で栽培して表現型解析を行っている。得られた候補株からは種子を回収し二次選抜を行った。一次選抜の際に多くの擬陽性株が選抜されていたことから、年度後半には一次選抜後に発根処理をして再試験を行い、形質を再確認できた物についてのみ種子を回収するという方針に変更した。また生物研チームで新たに取得された根粒菌共生変異株の菌根共生に関する表現型の解析を行った。選抜の効率化のために地上部栄養条件などを指標とする方法を検討したが、有望な系を確立することはできなかった。

16年度は366ラインから2,787株をスクリーニングし80株の候補株を得た。これらについては二次選抜のために種子を回収中である。また15年度に選抜した変異株候補37株について二次スクリーニングを行ったが目的とする変異株は得られなかった。

根粒変異株の表現型解析では合計7株の分析を実施した結果、菌根共生に変異を認めたものは3株であった。

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研究項目：
 - ・ HAR1 レセプターキナーゼによって認識される遠距離シグナル物質の探索
 - ・ 新奇超根粒着生変異体*klavier*の原因遺伝子のファインマッピングと同定

秋山グループ

- ①秋山 康紀：（大阪府立大学大学院農学生命研究科、助手）
- ②研究項目：
 - ・ 菌根菌共生における相互認識シグナル物質Branching factor (BF)の精製と同定
 - ・ 菌根菌共生における相互認識シグナル物質Myc factor (MF)の検出系の構築と精製

林グループ

- ①林 誠：（大阪大学大学院工学研究科、助手）
- ②研究項目：
 - ・菌根・根粒共生変異体原因遺伝子*CAS*, *POL*等の機能解析
 - ・感染系変異体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生理機能グループ、主任研究官）
- ②研究項目：
 - ・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と遺伝子クローニング

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研究項目：
 - ・菌根特異的共生変異体*myc⁻*の単離及び変異体の選抜
 - ・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

- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.-J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. and Hayashi, M. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433, 527-531 (2005)
- Ooki, Y., Banba, M., Yano, K., Maruya, J., Sato, S., Tabata, S., Saeki, K., Hayashi, M., Kawaguchi, M., Izui, K. and Hata, S.: Characterization of a *Lotus japonicus* symbiotic mutant, *lot1*, that shows a reduced nodule number and distorted trichomes. *Plant Physiol.* 137, 1261-1271 (2005)
- Kawaguchi, M., Pedrosa-Harand, A., Yano, K., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., Nagata, T., Namai, K., Nishida, H., Shibata, D., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, M., Harada, K., Sandal, N., Stougaard, J., Bachmair, A. and Grant, W.F.: *Lotus burttii* takes a position of the third corner in the *Lotus* molecular genetics triangle. *DNA Res.* 12, 63-71 (2005)
- Suganuma, N., Yamamoto, A., Itou, A., Hakoyama, T., Banba, M., Hata, S., Kawaguchi, M., and Kouchi, H.: cDNA macroarray analysis of gene expression in ineffective nodules induced on the *Lotus japonicus senI*

mutant. Mol. Plant Microb. Interac. 17, 1223-1233 (2004)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：2件）