

2010年度 大学教育研究重点配分経費成果報告書

テーマ：共生変異体を用いた窒素固定機構の解析

研究代表者：菅沼教生

【目的】

マメ科植物は根粒菌と共生関係を営み、根粒と呼ばれる特殊な器官を形成する。形成された根粒に根粒菌は内部共生し、大気中の窒素ガスを固定し、宿主植物に供給する。そのため、マメ科植物は化合態窒素がなくても旺盛に生育することができる。このような根粒菌の空中窒素固定作用は、根粒菌が単独で生活する場合には行われず、根粒菌がマメ科植物に共生することではじめて発揮される。したがって、根粒菌の空中窒素固定機能の発現は、宿主植物によって制御されていると考えられる。実際に、マメ科植物の変異体の中から、根粒菌との共生によって根粒は形成されるが形成された根粒の窒素固定能力が極めて低い、あるいは、欠落した Fix⁻変異体が見つまっている。このことは、宿主であるマメ科植物に根粒菌の窒素固定機能を制御する遺伝子が存在することを示している。しかしながら、これまでに明らかにされた共生窒素固定に必須の宿主植物遺伝子は数少ない。共生した根粒菌の窒素固定機能の発現制御機構を解明するためには、より多くの宿主植物遺伝子を同定する必要がある。そこで、マメ科のモデル植物ミヤコグサの Fix⁻変異体を作成し、原因遺伝子の同定、機能解析を行っている。本研究では、これまでに単離されたミヤコグサ Fix⁻変異体 F39 に焦点を当て、原因遺伝子の同定ならびに遺伝子の機能の解明を目指し、F39 変異体の表現型解析と原因遺伝子のポジショナルクローニングを行った。

【結果及び考察】

ミヤコグサ変異体 F39 は、メチルエタンスルホン酸処理によって、根粒菌との共生状態において根粒は形成されるものの植物体の生育が野生型よりも劣る変異体として単離された (図1)。野生型との交配によって得られた F2 世代では、野生型と変異体の分離比が 3 : 1 に適合したことから、F39 変異体は、劣性の単一遺伝子によって支配される変異体であると考えられた。共生状態における F39 変異体では、植物体のみならず形成される根粒も、野生型の根粒に比べ小さかった。また、白色と薄いピンク色の 2 種類の根粒が観察された。これらの特徴から、F39 変異体は窒素固定能力に異常を来した Fix⁻変異体であると予想された。そこで、F39 変異体が Fix⁻変異体であるかどうかを明確にするために、F39 変異体の共生状態における植物体重量、根粒着生数、根粒重量、窒素固定活性を調べた。

F39 変異体における根粒着生数は野生型と同様であったが、植物体重量、根粒重量は野生型に比べ顕著に劣った (図2)。さらに、窒素固定活性を測定したところ、F39 変異体に形成された根粒の窒素固定活性は、野生型の根粒に比べ最大で 20 分の 1 程度の活性しか示さないことが明らかになった。したがって、F39 変異体は、典型的な Fix⁻変異体であると判断された。また、共生状態で抑制された F39 変異体の生育は、硝酸カリウムを添加することで野生型と同程度まで回復したことから、F39 原因遺伝子は、共生過程に特異的に作用する遺伝子であると推測された。

次に、F39 変異体に形成された根粒に根粒菌が内部共生しているかどうかを明らかにするために、根粒の内部構造を光学顕微鏡を用いて観察した。F39 変異体に形成されたピンク色の根粒では、正常な根粒で観察される根粒菌が共生した感染細胞とほぼ同様な感染細胞が観察された (図3)。しかし、白色の根粒では、根粒の先端が陥没し、かつ染色領域が不均一の異常な感染細胞が観察された。これらの結果から、F39 原因遺伝子は、窒素固定活性に直接関与する遺伝子ではなく、根粒菌の根粒細胞への内部共生過程に関与する遺伝子である可能性が示唆された。



図1 ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の野生型 (Wt) と F39 変異体

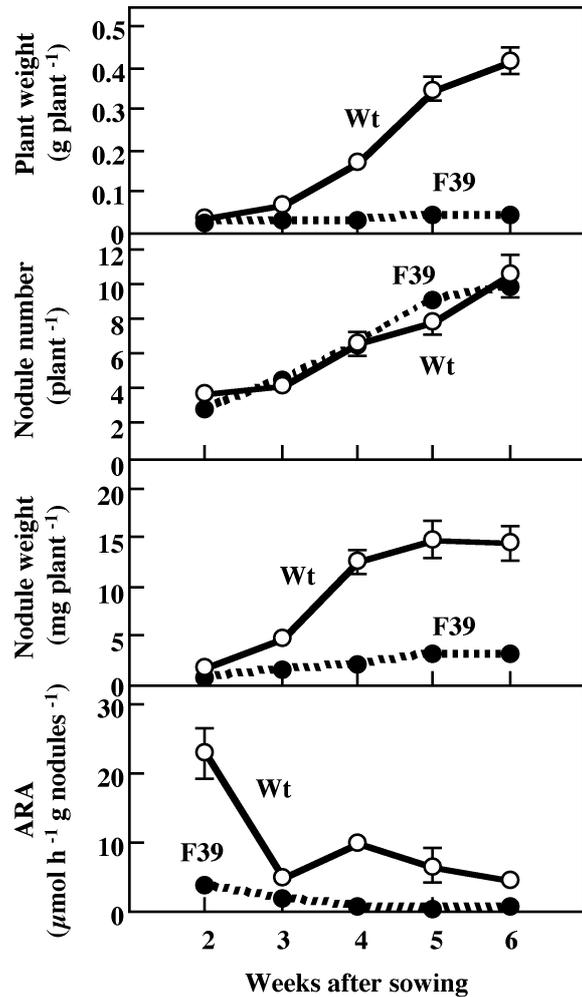


図2 野生型 (Wt) と F39 変異体における植物体重量、根粒着生数、根粒重量、窒素固定活性 (ARA) の経時的変動

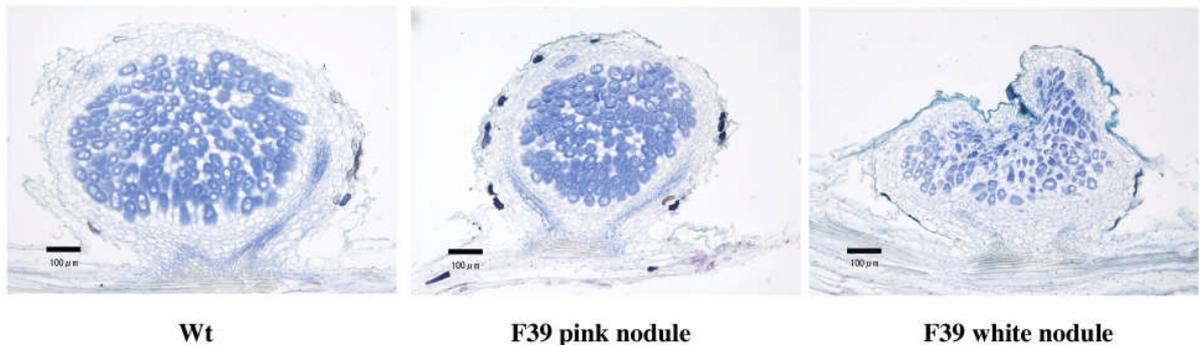


図3 野生型 (Wt) 根粒および F39 変異体のピンク色と白色の根粒の形態

表現型解析と同時に、F39 変異体の原因遺伝子の同定に向けて連鎖解析を行った。F2 劣性ホモ個体 762 個体について、報告されている 2 種類の DNA マーカーを用いて連鎖解析を行った結果、F39 原因遺伝子は、それぞれのマーカーから 0.4cM に位置することが明らかになった。この領域には、これまでに単離された Fix 変異体の原因遺伝子はマップされておらず、F39 変異体は新規

の Fix 変異体であることが確認された。さらに、両マーカーの間のゲノム塩基配列情報をかずさ DNA 研究所から入手し、交配パートナーである Gifu 系統と Miyakojima 系統でゲノム塩基配列を比較することによって作成した新たな DNA マーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、原因遺伝子の位置を約 200k 塩基の間に絞り込むことができた。次に、この領域に予測される遺伝子の塩基配列を野生型と F39 変異体とで比較したところ、塩基配列を比較した遺伝子の中に、タンパク質を構成するアミノ酸の置換を引き起こす一塩基の変異がみられる F39 原因遺伝子の候補遺伝子が見出された。

そこで、候補遺伝子の EST クローンを入手し、塩基配列を決定した。その結果、入手したクローンは、コーディング領域の 5'側が約 20 塩基欠落していることが判明した。そのため、根粒から RNA を抽出し、5'RACE 法を用いて欠落している 5'側の cDNA を増幅した。次に、得られた 5'RACE 産物を EST クローンに連結することで、最終的に候補遺伝子のコーディング領域の全長を含むクローンを作製した。

以上のように、本研究では、F39 変異体が根粒菌の共生過程に関与する遺伝子の変異と予測される Fix 変異体であることが明らかになった。さらに、F39 原因遺伝子の候補遺伝子が特定され、その cDNA クローンが得られた。今後、クローニングした遺伝子を用いて、相補実験、発現解析を行う予定である。