

ミヤコグサで開く根粒共生系の分子遺伝学

- ミヤコグサのモデル化に向けた基盤形成と根粒の数をシステム的に制御する宿主因子の
同定 -

川口 正代司

(東京大学・大学院総合文化研究科)

1. 研究のねらい

マメ科植物は、根粒細菌と共生し、空中窒素を固定をすることができる。またマメは非常に多くの種を有し、有用資源が多い。これらの形質を分子レベルで明らかにするためには、マメのモデル系が必要である。近年、日本に自生するミヤコグサが、その候補として注目されている。本研究ではミヤコグサの分子遺伝解析に必要とされる遺伝地図を構築するために、世界で広く使われている系統 Gifu と多くの DNA 多型をもつ交配パートナーの探索を行った。また根粒菌との共生を、システム的(全身的)に制御する宿主因子を明らかにするために、2つの根粒過剰着生変異体から原因遺伝子の単離を試みた。

2. 研究結果及び自己評価

(1) Gifu の交配パートナーとしての Miyakojima MG-20

日本各地より収集した15系統のミヤコグサを用い、Gifuと最も多くのDNA多型を示すミヤコグサを探した。その結果、南西諸島の宮古島で見いだしたミヤコグサ Miyakojima MG-20 が、AFLP 解析で4.5%と最も高いDNA多型率を示すことが明らかとなった。Gifu と Miyakojima は相互に交配が可能であり、F1植物は良好に生育し多くの豆果をつけた。以上の結果から、Gifu の交配パートナーとして、Miyakojima は優れていると考えられる。Miyakojima は、当研究者が日本各地のミヤコグサの中から、最も早咲きのものとして1998年1月に見出したもので、Gifu では難しかった実験室内の遺伝解析が可能である。遺伝的背景を均一にするために自家受粉を7回繰り返し、系統 Miyakojima MG-20-S7 を確立した。現在この系統は13カ国で使われており、大規模なEST解析とゲノム解析が、かずさDNA研究所で始まっている。また国内研究者の協働により、Gifu と Miyakojima のDNA多型に基づく高密度連鎖地図の構築も始まった。Miyakojima の発見と系統の確立は、ミヤコグサのモデル化に大きく貢献した。

(2) 根粒の数をシステム的に制御する2つの宿主遺伝子 HAR1, ASTRAY の同定

古くからダイズ等を用いた生理学的実験により、根粒の数をシステム的(全身的)に制御する宿主因子の存在が示唆されていた。この制御は「オートレギュレーション」と呼ばれ、その抑制シグナルは葉で合成されることが知られている。Gifu に EMS 処理を施して単離した har1 (Ljsym78) 変異体は、植物の生長が著しく阻害されるほどに多くの根粒を着生する。ミヤコグサの接ぎ木実験により、har1 変異体は葉で合成される「オートレギュレーションシグナル」を欠損していることが分かった。我々は Gifu と Miyakojima の DNA 多型に基づくポジショナルクローニングを試み、原因遺伝子を同定することに成功した。同定した遺伝子は、アラビドプシスの頂端分裂組織の構築に働くレセプターカイネースと高い相同性を有していた。これにより根の根粒細菌の感染情報は、葉で発現する HAR1 遺伝子産物により認識され、さらにそれに続くリン酸化によりオートレギュレーションシグナルが合成されるというメカニズムが見えてきた。植物におけるシステム的な制御は、病原菌やウイルスの感染を防ぐ術として重要でありながら、それに与るレセプターは過去同定されていない。従って今回の発見は、根粒共生系の域を越えて、システム的制御の分子的理解に大きく貢献するものと思われる。

一方、astray (Ljsym77) 変異体は、光や重力に対する応答など全身的な環境応答の異常を示す新規の根粒過剰着生変異体である。astray の変異形質は Arabidopsis の hy5 変異体と酷似していることから、原因遺伝子を HY5 のホモログであると推定し、ミヤコグサより高い相同性をもつ遺伝子 (LjBZF) を単離した。LjBZF 遺伝子のコードするタンパク質は、HY5 のそれに見られる bZIP motif を良く保存していた。しかし、N 末側には HY5 遺伝子のそれにはない zinc finger motif などの領域が見いだされ、これらの領域はダイズ、ソラマメにも保存されていた。astray 変異体の原因遺伝子が LjBZF であることを確認するために、遺伝子内における Gifu, Miyakojima 間の一塩基多型(SNPs)を検出し、dCAPS 法による連鎖解析を行った。その結果 F2 世代の変異体すべてにおいて、LjBZF 遺伝子との

連鎖が確認された。astray 変異株細胞への LjBZF 遺伝子の導入により変異形質が相補されたことから、ASTRAY は根粒形成を抑制するマメに特徴的な転写因子であることが証明された。以上の研究を通じ、世界で初めて根粒形成をシステム的に制御する2つの宿主因子を明らかにすることができた。

自己評価

マメ科植物の分子遺伝学的解析を実現しようと日本各地をさまよい歩き、沖縄県宮古島の早咲きミヤコグサ Miyakojima にたどり着いたのは1998年1月25日のことであった。その年、業績のない私は幸運にもさきがけ研究21に採用された。当時 *Medicago truncatula* との競合など多くの困難があったが、ミヤコグサ研究を支援する人がひとりまたひとりと増えてゆき、大規模 EST 解析が始まり、Miyakojima を交配パートナーとする高密度連鎖地図が構築され、ゲノムプロジェクトまで始動した。共生と器官形成をシステム的(全身的)に制御する宿主因子を分子遺伝学的に同定することが一つの大きな目標であった。Gifu, Miyakojima 間の DNA 多型を活用し、それは2001年6月29日に達成された。大きな力に支えられ、過去最高の発見をすることができた。

3. 領域総括の見解

マメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定反応は、地球規模の生物生存に重大な影響を及ぼす。本研究者は、窒素固定メカニズムの解明を目的として、モデル生物としてのミヤコグサに着眼し、既存のGifu系統に対する交配パートナーを探索し、Miyakojima 株を得たところからさきがけ研究の支援を得た。現在、根粒形成の制御に働く2種の宿主遺伝子変異を同定し、植物学界に大きな波紋を広げている。将来、窒素固定機構の改善を通して、農業に寄与することが期待される。

4. 主な論文

1. Kawaguchi, M. (2000) *Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG-20: An early flowering accession suitable for indoor handling. *J. Plant Res.* 113, 507-509.
2. Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., and Kawasaki, S. (2001) Providing the basis of genomics of *Lotus japonicus*: the accession Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. *Mol. Gen. Genomics* 226, 157-166.
3. Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Koiwa, H., Niwa, S., Ikuta, A., Syono, K., and Akao, S. (2002). Root, root hair and symbiotic mutants of the model legume *Kotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 15, 17-26.

5. その他

招待講演： 国内16件 海外1件