

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	根粒共生系の総合的理解による、低窒素肥料農業を目指した基礎的研究
研究機関・部局・職名	独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域 植物共生機構研究ユニット・ユニット長
氏名	林 誠

【研究目的】

植物と根粒菌との相互作用はマメ科特有の現象であり、根粒内において、根粒菌は細胞内共生を維持しながら大気中の窒素を固定し、植物の生育に貢献している。土壌中の根粒菌は植物の根から滲出されるフラボノイドなどの低分子化合物を認識することで、リポキトオリゴ糖である Nod ファクター (NF) を分泌する。植物は NF を認識した後、一連のシグナル伝達経路を介して、根粒菌の感染および根粒器官形成に必要な遺伝子セットを発現させると考えられている。

これまでに、マメ科モデル植物ミヤコグサおよびタルウマゴヤシをもちいた分子遺伝学的解析により、特に根粒菌の認識機構である初期シグナル伝達に関わる遺伝子産物の多くが同定されてきた。NF の受容にはキチンを認識する LysM ドメインを有する受容体キナーゼである NFR1/NFR5 が関与している。下流の細胞内シグナル伝達経路には、菌根菌の感染における初期シグナル伝達にも重要な共通共生経路に属する 8 種のタンパク質が同定されている。このうち、我々が以前同定した CASTOR/POLLUX についてはイオンチャネルであることが明らかになっているものの、シグナル伝達系に関与する分子メカニズムは不明のままである。そこで、*castor* 変異の抑圧変異遺伝子を同定することで、CASTOR/POLLUX の機能を明らかにする。

根粒原基の誘導に関与する転写因子はこれまで 3 種が同定されている。NSP1/NSP2 は GRAS ファミリーに属する転写因子であり、相互作用の結果、協調して機能することが示唆されている。一方、NIN は複数のドメインを有する新規タンパク質であり、アミノ酸配列の相同性から転写因子の機能を有すると言われている。また、根粒原基の誘導には植物ホルモンであるサイトカイニンが必要であることが、サイトカイニン受容体である LHK1 の解析から明らかになっている。そこで、サイトカイニンのシグナル伝達系の根粒形成への関与、および NIN の機能解析とその下流因子の同定をおこなう。

根粒原基の誘導と並行して、根粒菌が表皮から根の内部に感染する際に必要な、感染系が形成される。感染系形成は根粒形成と密接に関連しており、遺伝子の機能欠損表現型からは感染系形成と根粒形成のどちらに直接的に関与しているのかの判断はできない。ERN は AP2 結合ドメインを有する ERF ファミリーに属する転写因子である。NAP1/PIR1 はアクチンの重合に関与するタンパク質である。CERBERUS は U-Box ド

メインを有するタンパク質であり、タンパク質分解に関与すると考えられている。我々は最近、小胞輸送に関与すると考えられる CRINKLE を同定している。そこで、CRINKLE の相互作用因子の同定をおこなう。

以上に羅列したように、これまでに変異系統からマッピングとポジショナルクローニングを利用して共生的窒素固定の成立に関与する 20 以上の遺伝子が同定されている。しかし共生遺伝子は全体で 50 以上あると見積もられ、したがって、その過半数は未同定である。ポジショナルクローニングは形質とマーカとの連鎖を確認しながら変異遺伝子を同定することから、時間と労力が必要である。短期間に共生遺伝子を網羅的に同定するためには、特定の配列を遺伝子に挿入し、その配列情報を利用して直接的に変異遺伝子を同定する方法が効率的である。このためには、大規模なタグライン集団を作出する必要がある。LORE1 はミヤコグサ内在のレトロトランスポゾンであり、ミヤコグサゲノムに約 10 コピー存在する。我々は、そのうちの 1 コピーが、胚軸由来の培養細胞から再分化させた植物体において確率論的に転移することを明らかにした (Fukai et al. 2010)。活性化された LORE1 は特に花粉で高頻度に転移するため、LORE1 活性化状態の植物体から採種した次世代種子は、各種子がそれぞれ別の LORE1 新規挿入をヘテロで持つ。このような配偶体的な転移様式により、LORE1 を利用することにより、効率の良い遺伝子タギング系を確立できる。そこで、期間内におよそ 40,000 系統の LORE1 新規挿入による大規模タグライン集団を確立し、そこから共生変異系統を選抜し、挿入配列を指標にした近傍挿入配列決定により破壊遺伝子を同定する。

以上のようにして、機能欠損変異系統から遺伝子を同定すると、その形質に必要な遺伝子は明らかとなるが、その形質の「程度」を左右している、いわゆる量的形質に関わる遺伝子は必ずしも明らかにはできない。共生的窒素固定の場合、重窒素希釈法で固定窒素寄与率を測定すると、マメ科作物の種間で 20% から 90% までの差が見られる。このような違いは遺伝的に決定されており、固定窒素寄与率を支配する量的遺伝子座 (QTL) を同定することで、固定窒素寄与率の高い品種を作出することが可能になる。そこで、既に確立されている組換え自殖系統 (RIL) を用いた QTL 解析により固定窒素寄与率を支配する遺伝子座を同定することを目的とする。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題は低窒素肥料農業を目指して植物と根粒菌との共生系を総合的に解明しようとするものである。網羅的な遺伝子同定のリソースとして、目標を上回る

46,000 系統のタグラインを作成したことや、根粒菌形成の主要因子 NIN タンパク質が根粒形成を直接制御している転写制御因子であること、更にその下流の遺伝子を同定したことは、共生系の理解をする上で重要な成果である。3 つ目の課題である窒素固定率を支配する遺伝子座を同定した点は、研究が進展すれば新たなブレークスルーにつながる成果が得られることが期待される。研究の成果である CCaMK や NIN の機能解析について既に論文発表されているが、早急に成果をまとめて論文発表することが期待される。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題は、マメ科植物のミヤコグサを材料として、1) これまで知られている共生遺伝子の機能解析、2) 大規模タグラインの確立による共生遺伝子の網羅的な同定、3) 窒素固定率を支配する量的遺伝子座の確定の3つを目的として、根粒共生系の総合的な理解を目指した。このうち、1) の遺伝子の解析では、NIN タンパク質が根粒形成を直接制御している転写制御因子であることを明らかにし、更に NIN の下流にある根粒形成因子を同定したことは重要な成果である。2) の内生レトロトランスポゾン LOREI を利用した 46,000 系統の大規模タグラインの作製については、調整した約 46,000 系統のタグラインから 170 系統の共生変異体候補を選抜し挿入近傍配列を決定した。また、3) に関しては量的遺伝子座を同定したとされているが、詳細は記述されていない。

③ 研究の成果

・ これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・ 当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究課題で確立されたミヤコグサにおける 46,000 系統のタグラインは今後のマメ科植物の遺伝子機能の研究が、シロイヌナズナと同様のスピードで行うことを可能に点で極めて先進的であると評価できる。また、当初の研究計画にはないテーマであるが、根粒形成と根粒菌の菌根共生にともに必須である CCaMK の機能解析の成果は大きな先進性があるものといえる。

④ 研究成果の効果

・ 研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・ 社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

ここで取り上げた研究課題での研究成果は窒素固定と共生関係という農業的にも重要な課題に関する基礎的な貢献であり、その社会的な意義は大きい。また、具体的なことがまだ明らかではないが、固定窒素寄与率を支配する遺伝子座の同定もマメ科植物の分子育種に直接生かされる成果である。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

予定通り 46, 000 系統のタグラインが達成されたことは、適切なマネジメントがなされたと高く評価できる。また、研究発表も適切にされている。