

学 位 論 文 要 旨

氏 名 富永 晃好

題 目 マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定能強化の分子基盤解明
(Analysis of molecular basis for enhanced symbiotic nitrogen fixation
between leguminous plants and rhizobia)

マメ科植物と根粒菌との共生による窒素固定を増強させることが、マメ科作物の収量増加、化学窒素肥料使用量の削減、ひいては化石燃料の枯渇や窒素の流出による環境汚染の防止に役立つことが指摘されている。しかしながら、窒素固定の分子メカニズムは依然として未知の部分が多い。本研究は、マメ科モデル植物であるミヤコグサ(*Lotus japonicus*)を用いて、1.「窒素固定活性上昇の分子メカニズム解明」、2.「マメ科作物の分子育種に利用可能な窒素固定活性制御遺伝子の同定」を目標として遂行された。

初めに、植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) が根粒形成を負に制御することが報告されていたため、ABA への感受性が低くなった変異体は根粒数が増加し、総窒素固定量が増加するのではないかと考えた。そこで、70 μ M ABA を含む寒天培地で生き残った変異体を選抜することで、根粒数の増加だけでなく、窒素固定能力が上昇している *enfl* (*enhanced nitrogen fixation 1*) を単離した。*enfl* 変異体は野生型 MG20 と比較して、内生 ABA 濃度が減少しており、根粒内の一酸化窒素(NO) 濃度も減少していた。NO は ABA シグナル伝達経路の生産物であり窒素固定活性の抑制物質であることから、*enfl* においては、ABA 濃度の減少に伴う NO 発生量の低下によって窒素固定活性が上昇するというメカニズムが明らかになった。また、トランスクリプトーム解析によって *enfl* 変異体では *Thioredoxin-like (Trxl)* 遺伝子の発現が欠失している事が判明した。毛状根形質転換実験の結果、*Trxl* 遺伝子の発現量と、根粒数および窒素固定活性の間に負の相関があることが明らかになった。*enfl* は生育に特に悪影響がなく、MG20 に比べて種子 100 粒重が有意に増加していたことから、*Enfl* 遺伝子と *Trxl* 遺伝子が、変異育種の重要なターゲットに成り得ると考えられた。

次に、143 系統の MG20 \times B129 RILs (recombinant inbred lines) を用いて QTL 解析を行い、窒素固定活性に影響を与える DNA 領域の探索を行った。34 箇所の QTL がマップされ、特に第4染色体の TM0832 マーカー付近に、窒素固定活性、根粒重、茎長の QTL が同じ相加作用でマップされていることが注目された。この領域には、以前の報告で種子重の QTL が2つマップされており、さらに窒素固定活性に必須である *Senl* 遺伝子が存在していた。そこで RIL の親品種間で *Senl* 遺伝子の配列を比較したところ、B129 では1アミノ酸が欠失している事が明らかとなった。以上の結果から、*Senl* 遺伝子がこれらの形質の原因遺伝子である可能性が示唆された。この可能性を検証するために、毛状根形質転換法を用いて、MG20 型 *Senl* と B129 型 *Senl* 遺伝子の窒素固定能力を比較した結果、MG20 型 *Senl* の方が B129 型 *Senl* よりも効果が高いことが示された。また、シンテニー解析によってダイズの *Senl* 遺伝子を同定し、38 種類のダイズ品種間で配列を比較したところ、ダイズ栽培品種である Enrei において1アミノ酸置換が確認された。さらにこのダイズ *Senl* 遺伝子は、Enrei \times Peking RILs の QTL 解析によって近年報告された種子重の QTL の位置と一致していた。以上の結果から、*Senl* 遺伝子は有効な分子育種マーカーになる可能性が考えられた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Akiyoshi TOMINAGA

題 目 Analysis of molecular basis for enhanced symbiotic nitrogen fixation between leguminous plants and rhizobia
(マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定能強化の分子基盤解明)

Symbiotic nitrogen fixation (SNF) between leguminous plants and rhizobia is necessary for the increase of crop yields, and for reducing artificial nitrogen fertilizer applications. However, the molecular mechanism of nitrogen fixation in the host plant is less understood. The purposes of this study are to reveal the molecular mechanism of enhanced nitrogen fixation ability, and to identify the effective genes for molecular breeding of leguminous crops.

First, *enfl* was isolated through a survival screening for abscisic acid (ABA) as an ABA low-sensitive mutant. *enfl* mutants increased both root nodule number and nitrogen fixation activity (NFA). Seeds of *enfl* were larger than that of wild type MG20 due to the higher NFA and the endogenous ABA concentration of *enfl* was lower. Moreover, wild-type plants treated with abamine, a specific inhibitor of ABA biosynthesis, showed enhanced NFA. Furthermore, production of nitric oxide in *enfl* nodules was decreased. These results indicate that the decreased endogenous ABA concentration increased the nodule number and NFA while nitric oxide production in *enfl* nodules was decreased. Microarray analysis revealed that the expression level of *thioredoxine like (Trxl)* gene was apparently decreased in *enfl* mutant. Experiments with hairy root transformants revealed that the expression of *Trxl* gene have an inverse correlation with nodule number and NFA. Therefore, *Enfl* and *Trxl* genes should be useful targets for mutation breeding of leguminous crops.

Next, QTL analysis used MG20 × B129 RILs was carried out to identify the genetic region for the regulation of nitrogen fixation. In the results, QTLs for nitrogen fixation, nodule weight, and stem length were co-localized around marker TM0832 on chromosome 4 with additive effects of increasing MG20 allele. In the same region, QTLs for Seed Mass-1 and Seed Mass-2 reported before were co-localized. Furthermore, *Senl* gene that was an essential gene for SNF was also existed in the same genomic region, and there was a deletion of one amino acid (asparagine) in SEN1 amino acid sequence of B129 compared with that of MG20. It was indicated that MG20-type *Senl* is more effective in NFA compared with B129-type *Senl* by using transformants of *senl* mutant introduced B129-type or MG20-type *Senl* gene. These results indicate the possibility that the difference of nucleotide sequence of *Senl* is responsible for the nitrogen fixation-related QTLs. Furthermore, *Senl* gene of *Glycine max* was also existed in the same region of 100 Seeds weight QTL investigated in Enrei × Peking RILs, and interestingly, amino acid substitution was detected in *Senl* of Enrei. These results strongly suggest the availability of *Senl* gene as DNA marker for molecular breeding of soybean.

The findings of this thesis will be of immense importance towards the application of molecular breeding fundamentals from model plants to leguminous crops.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	富永 晃好
審査委員	主査 佐賀大学 准教授 鈴木章弘
	副査 佐賀大学 教授 有馬 進
	副査 鹿児島大学 教授 松尾友明
	副査 琉球大学 教授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島大学 教授 内海俊樹
審査協力者	
題 目	<p>Analysis of molecular basis for enhanced symbiotic nitrogen fixation between leguminous plants and rhizobia (マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定能強化に関する分子基盤解明)</p>
<p>マメ科植物と根粒菌との共生による窒素固定を増強させることが、マメ科作物の収量増加、化学窒素肥料使用量の削減、ひいては化石燃料の枯渇や窒素の流出による環境汚染の防止に役立つとされている。しかしながら、窒素固定の分子メカニズムは、依然として未知の部分が多い。申請者は、マメ科モデル植物であるミヤコグサ(<i>Lotus japonicus</i>)を用いて、1.「窒素固定活性上昇の分子メカニズム解明」、2.「マメ科作物の分子育種に利用可能な窒素固定活性制御遺伝子の同定」を目標として研究を遂行した。</p> <p>初めに、植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) が根粒形成を負に制御すると報告されていたため、申請者は「ABA への感受性が低くなった変異体は根粒数が増加し、総窒素固定量が増加するのではないか」と考えた。そして、70 μM ABA を含む寒天培地で生き残った変異体を選抜し、根粒数の増加だけでなく、窒素固定能力が上昇している <i>enfl</i> (<i>enhanced nitrogen fixation 1</i>) を単離することに成功した。さらに <i>enfl</i> 変異体は野生型 MG20 と比較して、内生 ABA 濃度が減少しており、根粒内の</p>	

一酸化窒素(NO)濃度も減少していることを示した。NOはABAシグナル伝達経路の生産物であり、窒素固定活性の抑制物質であることから、*enfl*においては、ABA濃度の減少に伴うNO発生量の低下によって窒素固定活性が上昇するというメカニズムが明らかになった。また、トランスクリプトーム解析によって、*enfl*変異体ではThioredoxin-like (*Trxl*)遺伝子が発現していない事を見出した。そして毛状根形質転換実験の結果、*Trxl*遺伝子の発現量と、根粒数および窒素固定活性の間に負の相関があることを明らかにした。*enfl*の生育は正常であり、MG20に比べて種子100粒重が有意に増加していたことから、*Enfl*遺伝子と*Trxl*遺伝子が、変異育種の重要なターゲットに成り得ると考察した。

次に申請者は、143系統のMG20 × B129 RILs (recombinant inbred lines)を用いてQTL解析を行い、窒素固定活性に影響を与えるDNA領域を探索した。その結果、34箇所のQTLを見出し、特に第4染色体のTM0832マーカー付近に、窒素固定活性、根粒重、茎長のQTLが同じ相加作用でマップされていることに注目した。この領域には、以前の報告で種子重のQTLが2つマップされており、さらに窒素固定活性に必須である*Sen1*遺伝子が存在していた。そこでRILの親品種間で*Sen1*遺伝子の配列を比較したところ、B129では1アミノ酸が欠失している事を発見した。以上の結果から、申請者は*Sen1*遺伝子がこれらの形質の原因遺伝子である可能性を示唆した。次にこの可能性を検証するために、毛状根形質転換法を用いて、MG20型*Sen1*とB129型*Sen1*遺伝子の窒素固定能力を比較し、MG20型*Sen1*の方がB129型*Sen1*よりも効果が高いことを示した。また、シンテニー解析によってダイズの*Sen1*遺伝子を同定し、38種類のダイズ品種間で配列を比較し、ダイズ栽培品種であるエンレイにおいて、1アミノ酸置換を確認した。さらに、このダイズ*Sen1*遺伝子は、エンレイ × Peking RILsのQTL解析によって近年報告された種子重のQTLの位置と一致していた。申請者はこれらの結果について、*Sen1*遺伝子が有効な分子育種マーカーになる可能性があることを考察した。

以上のように、本研究では、根粒における窒素固定の増強に関するメカニズムを明らかにしており、さらに、それに関する遺伝子を同定し応用の可能性を示したものであることから、学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	富永 晃好
審査委員	主査 佐 賀 大学 准教授 鈴木章弘
	副査 佐 賀 大学 教 授 有馬 進
	副査 鹿児島 大学 教 授 松尾友明
	副査 琉 球 大学 教 授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島 大学 教 授 内海俊樹
審査協力者	
実施年月日	平成 25 年 1 月 16 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成25年1月16日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

富永 晃好

[質問 1] *enf1* 変異体が野生型に比べ内生 ABA 濃度が低くなり、NO 発生量も低くなっていたが、低下量があまり大きくないように見え、特に NO の発生量の低下が小さいようにみえたが、それが本当に窒素固定能の上昇に関わっているのか。また ABA と NO の濃度の測定方法が異なっているため、モル数あたりの感度を考えた時に、ほぼ同じレベルを見ているのか？

[回答 1] それについては詳しく検証は行っていない。実際は ABA の濃度が下がる事で、NO の濃度が下がっていると思われるので、NO の濃度が下がっているだけで窒素固定活性が上昇しているのではなく、ABA の濃度が減少する事に起因する他の要因によって、窒素固定活性の上昇が引き起こされている可能性も考えられる。また、ABA と NO をどの程度の感度で測定しているかについては把握していないので今後調べる必要がある。

[質問 2] *sen1* 変異体の原因遺伝子はまだ同定されていないのか？

[回答 2] *Sen1* 遺伝子は 2011 年の終わりくらいに、愛知教育大の菅沼先生のグループによって公表されている。

[質問 3] 窒素固定活性の上昇や種子が大きくなるということは、*Sen1* 遺伝子の機能で何か説明することができるか？また、いろんなダイズ品種の *Sen1* 遺伝子を調べて、エンレイだけでアミノ酸置換があったという事だが、多分タンパク含量が高い事や、成長が早い等の形質で選抜されてきたのだと思うが、*Sen1* 遺伝子の配列の違いがエンレイだけにあるというのは不思議な気がするが。

[回答 3] *Sen1* 遺伝子の機能については未だに報告が無い。また、ダイズでは調べた限りエンレイだけでアミノ酸置換があったことから、何か意味があるのではと予想している。エンレイの親品種の農林 2 号が、エンレイ型の *Sen1* 配列を持っていて、エンレイがそれを引き継いで、そこから派生した系統では、味等の他の形質で選抜されていった結果、今ではエンレイだけが窒素固定活性を高くする効果のある *Sen1* 遺伝子をホモで持っているという状況になったと考えている。

[質問 4] ダイズの *Trx1* 遺伝子の発現については解析したか？

[回答 4] まだ解析していないが、*Trx1* 遺伝子の破壊株については探索している。

[質問 5] 野生型は進化の結果完成したゲノム配列を持っていると考えられる。

enf1 で ABA や NO の形質が変わっているが、本来何か意味があって完成された ABA や NO の機能を持っていると思われるので、その辺との関わりについて考えがあるか？

[回答 5] 植物にとって有用な形質と、人間にとって有用な形質は、それぞれ別の意味があると考えられる。例えば人が育てた場合に、収量が上がるなどといった形質というのは、必ずしも植物にとってはそれがプラスになるとは限らないのかもしれないということである。しかし *enf1* 変異体については人工的に育てている環境では負の影響は見られていない。

[質問 6] 環境要因として食料生産には、リン栄養や、水の過剰、欠乏が重要になってくるが、そういった要因とのこの変異体の関係はどのようなのか？

[回答 6] それらについてはまだ調べてないが、関係している可能性はあると考え

られる。応用の際には必ず調べる必要があると考えている。

[質問 7] こういった現象をラッカセイやササゲ、バンバラマメへ応用することは可能か？

[回答 7] 窒素固定活性を上昇させるという意味では、根粒のタイプがミヤコグサと同じ「有限型根粒」ならば可能性はあると考える。またそういった作物における窒素固定増強遺伝子のオルソログ遺伝子の探索も必要になってくる。

[質問 8] *enf1* を長期で生育したときの開花期が変化していたと思うが、その理由についてはどのように考えているか？

[回答 8] 菌接種をした場合に *enf1* の方が根粒からの窒素供給量が多くなり、野生型よりも生育が旺盛になることが、1つの可能性として考えられる。

[質問 9] 窒素量だけで単純に比べられるのか？本当に *enf1* の植物体の方が多くの窒素が供給されているのか？

[回答 9] 植物体の窒素含有量は測定しており、*enf1* の方で有意に高くなっているのだから、根粒由来の窒素の量は多いと考えている。

[質問 10] *enf1* の原因遺伝子にヒストンデアセチラーゼと unknown の遺伝子が候補であがっていたが、それらの配列は異なるか？

[回答 10] 塩基配列は異なっている。

[質問 11] unknown な遺伝子の解析はしているのか？

[回答 11] 現在、トランスポゾンが unknown 遺伝子の中に挿入された LORE1 変異体を解析している。またヒストンデアセチラーゼ遺伝子に変異の入った TILLING 変異体も入手したので、*Trx1* 遺伝子の発現が *enf1* 変異体のように欠失しているかを調べる必要がある。

[質問 12] ヒストンデアセチラーゼが壊れる事で窒素固定活性が上昇するというのは、どのような仮説が成り立つのか？

[回答 12] ヒストンデアセチラーゼというのは、DNA が巻き付いているヒストンを脱アセチル化する酵素であり、遺伝子の発現を制御している機能が知られている。もしこれが原因遺伝子であれば、チオレドキシンの発現がなくなるという現象を制御している可能性が考えられる。また、ほ乳類の細胞においても、ヒストンデアセチラーゼがチオレドキシンの量を制御しているという報告が多く有る。また、チオレドキシンは広い意味では抗酸化物質なので、活性酸素の一種である NO の発生の減少につながり、その結果、窒素固定活性が上昇しているという仮説は考えられる。

[質問 13] ABA もそこに関係するということか？

[回答 13] これらは ABA の下流にあるとは思いますが、*Enf1* がどこのメカニズムと関わっているかは現時点では分からない。

[質問 14] ヒストンデアセチラーゼはいろんな遺伝子の発現を制御するものであり、ある特定の locus を制御するには、他の物質が存在すると考えられる。そのような物質がつかまればすごく面白いと思うが。

[回答 14] ヒストンデアセチラーゼはエピジェネティックな制御をされているので、そのような物質が関わっている可能性は十分にあり、解析できれば面白いと思うが、現時点ではそこまで手が回っていない。