

## 根粒共生における窒素応答に関わる *nitrate unresponsive symbiosis 3 (nrsym3)* 変異体の解析

三澤 文香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 寿崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景・目的】

マメ科植物は土壌細菌である根粒菌と相互作用を行い、根粒と呼ばれる共生器官を形成する。植物は根粒共生を行うことで、根粒菌が固定した大気中の窒素を利用することができる。この共生系では、植物は土壌中の窒素栄養状態を感知して、窒素欠乏時には根粒の形成を促進し、窒素栄養が豊富にあるときには共生を抑制することが知られている。窒素に応答した共生の抑制は、感染糸形成、根粒発生開始、根粒成長、根粒の窒素固定といった共生の成立に必須な様々な過程を多面的に作用する。しかし、その制御に関わる分子機構はほとんど未解明である。そこで、本研究では、窒素源に応答した植物による根粒共生の抑制機構を明らかにすることを目的に、高濃度硝酸存在下でも根粒を形成する *nitrate unresponsive symbiosis 3 (nrsym3)* 変異体の原因遺伝子の特定と表現型解析を行った。

### 【材料】

本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を実験材料に研究を行った。野生型植物として MG20 および MG52 を使用した。 *nrsym3* 変異体は、以前に当研究室において実施された、根粒共生における窒素抑制に耐性を示す突然変異体のスクリーニングによって単離されたものである。

### 【結果】

#### ● *nrsym3* 変異体の原因遺伝子の特定

*nrsym3* 変異体と MG52 を交配した植物の F2 植物の中から硝酸耐性を示す植物体を選抜し、ラフマッピングと次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の決定を行い、原因遺伝子候補を定めた。その結果、 *nrsym3* 変異体では、ある遺伝子にアミノ酸置換を伴う一塩基置換が生じていることが判明した。次に、この遺伝子を原因遺伝子候補として相補実験を行った。まず、候補遺伝子の野生型ゲノム断片を、 *nrsym3* 変異体に毛状根形質転換法を用いて導入した。形質転換根をもつ植物の表現型を解析したところ、形質転換された植物は、硝酸に応答して根粒形成が抑制されることがわかった。従って、 *nrsym3* の表現型が回復したといえ、この遺伝子が *nrsym3* の原因遺伝子であることが結論づけられた。

#### ● *NRSYM3* の発現解析

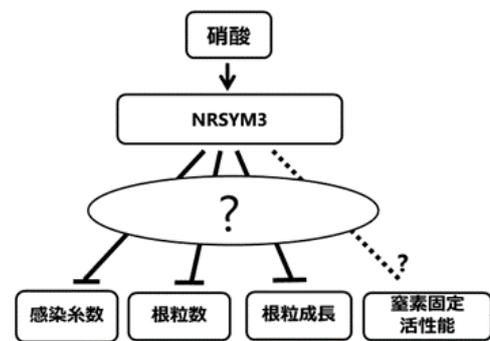
リアルタイム PCR を用いて、野生型植物と *nrsym3* 変異体における *NRSYM3* の発現を調べた。その結果、 *NRSYM3* の発現は硝酸誘導性があることが明らかとなった。

次に、 *GUS* 遺伝子をレポーターとし、 *NRSYM3* のプロモーターの活性部位を調べた。遺伝子の導入には、毛状根形質転換法を用いた。その結果、 *NRSYM3* は、地上部に近い主根、根粒の表皮で発現していることが明らかとなった。一方、主根の根端付近や側根の表皮では発現は見られなかった。

#### ● *nrsym3* 変異体の表現型解析

*nrsym3* 変異体と野生型植物の根粒共生における様々な局面 (感染糸数、根粒の数、根粒の成長) の比較を行った。その結果、 *nrsym3* 変異体では硝酸による感染糸、根粒形成数の減少、根粒の成長の抑制が緩和されていることが明らかとなった。次に、 *nrsym3* 変異体と野生型植物を、硝酸カリウムが含まれた溶液に一定時間つけ、植物体(地上部、根)の硝酸態窒素濃度、亜硝酸態窒素濃度の測定を行った。その結果、地上部、根において *nrsym3* 変異体では硝酸態窒素濃度が野生型植物と比べて低いことが示された。また根の亜硝酸態窒素濃度においても、 *nrsym3* 変異体が低いことが示された。

### 【考察と今後の展望】



(図 1: *NRSYM3* と根粒共生の関係)

*nrsym3* 変異体の表現型の多面的な異常から、 *NRSYM3* は、硝酸に応答した根粒共生の様々な局面の制御に関わることが考えられる(図 1)。また、硝酸窒素濃度が野生型と比べて減少することから、 *NRSYM3* は硝酸の取り込みの制御に関わることが推察される。

今後は、 *nrsym3* 変異体を用いたより詳細な表現型解析や遺伝子発現解析を行う。また、 *NRSYM3* を介した硝酸に応答した根粒共生の抑制機構を、他の *NRSYM* 因子、既知の硝酸応答性因子との制御関係も考慮に入れながら明らかにしていきたい。また、現在ゲノム編集技術を用いて *NRSYM3* の機能を完全に喪失させる植物を作成中である。その植物を用いた解析は、 *NRSYM3* の機能の深い理解につながることを期待される。さらに、 *NRSYM3* が非共生時や硝酸非存在時においても機能する可能性についても検証していきたい。 *NRSYM3* と構造が類似したタンパク質の機能解析も並行して進める予定である。これらの解析を統合して、植物の土壌中窒素源の利用機構、根粒共生促進および抑制機構の制御関係の詳細を明らかにしていきたい。