

## 窒素栄養によって根粒が早期に老化する機構の解析

藤戸 冨佳 (筑波大学 生物学類)

指導教員：壽崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景】

ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)などのマメ科植物は、根に根粒という器官を形成し、根粒を介して根粒菌と共生することにより、大気中の窒素を栄養として得ることができる。マメ科植物と根粒菌は、マメ科植物が光合成産物である炭素栄養を、根粒菌が窒素固定によって得られる窒素栄養を互いに差し出すことによって共生関係を成立させている。しかし、土壌中に硝酸イオンのような植物が直接利用可能な窒素栄養が存在する場合、植物が炭素栄養を差し出すメリットが少ない状況に陥る。この問題の解消のため、植物は硝酸に応答して根粒共生の各過程を多面的に抑制する機構をもつことが知られている。根粒菌の感染や根粒形成の抑制といった、根粒共生の前半過程を硝酸依存的に抑制する仕組みについては、その制御に関わる分子機構の詳細が近年明らかになっている。その一方で、成熟した根粒における硝酸依存的な共生の抑制については未解明な点が多い。本研究は、窒素栄養に応答した根粒共生の後期過程の制御を深く理解することを目的としている。

本研究では、硝酸依存的に機能し、根粒菌の感染や根粒形成を負に制御することが知られている *NIN-LIKE PROTEIN 1 (NLP1)* および *NLP4* に着目した。これらの遺伝子は、硝酸依存的な根粒共生の多面的な抑制に関わる転写因子をコードする。*NLP1* および *NLP4* が成熟した根粒においても共生への負の制御に関与するという仮説を立て、ミヤコグサ *nlp1 nlp4* 二重変異体を用いた解析を行った。

## 【材料と手法】

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*)根粒菌 (*Mesorhizobium loti*)

ミヤコグサの種子を一晩吸水させた後、寒天培地に植え、2日間育成した。その後、窒素栄養以外の必要最小限の栄養を含むバーミキュライトの入ったポットに根粒菌を接種し、植物体を植え替えた。ポットに植えてから3週間後に  $\text{KNO}_3$  (5 mM) を加える、もしくは対照として  $\text{KNO}_3$  の含まない水を加え、その後1週間もしくは2週間栽培し、各種実験に用いた。

## 1. 観察

上記の条件で植物一頭あたり根粒数、根粒の発達段階のそれぞれの個数、最大根粒の直径、根粒の色などについて観察を行った。

## 2. 樹脂切片の作成、染色

上記の条件でサンプリングした根粒をテクノビット 7100 を用いて包埋し、切片を作成した後、トレイジブルーによって根粒組織を染色した。

## 3. qRT-PCR、RNA シーケンス (RNA-seq)

一条件5個の根粒をサンプリングし、通常条件と硝酸処理条件、野生型と変異体での差異についてそれぞれ遺伝子発現解析を行った。

## 【結果】

*nlp1 nlp4* 二重変異体と野生型を用いて、3週間生育した植物に高濃度の硝酸を与え、その2週間後に観察を行った。その結果、野生型では通常は桃色をしている根粒が硝酸によって緑色になり、一般的に知られている根粒の老化現象が起こっていた。次に、同条件での根粒切片の観察を行ったところ、野生型では硝酸を与えた条件でのみ根粒内部で根粒菌の量の減少や、根粒菌の状態が変化している様子が観察された。また、DsRed と呼ばれる蛍光タンパク質を発現する根粒菌を感染させて形成された根粒の蛍光強度測定による根粒菌量の定量を行った。その結果、野生型では硝酸を与えた条件でのみ根粒菌量が減少しており、切片の観察と同様の結果が確認された。これらの変化は二重変異体では見られなかった。したがって、硝酸によって *NLP1/4* 依存的な根粒の早期老化が起こることが示された。本研究により、*NLP1/4* は根粒共生の後期においても硝酸依存的に共生を負に制御する因子であることが明らかとなった。

上述した野生型における根粒の老化は、硝酸を与えてから2週間後に見られた。遺伝子発現の変化はそれに先立って起こることが予想される。そこで、硝酸を与えてから1週間後の時点における各条件の根粒を用いて RNA-seq を行った。その結果、根粒において発現する遺伝子の 6.5%程度が *NLP1/4* 依存的に硝酸によって発現量が減少、もしくは増加することが分かった。その中には先行研究において根粒の老化に関与することが示されている遺伝子も多く含まれていた。これらの遺伝子について、より詳しい発現パターンを調べるために、硝酸を与えてからより早いタイミング (1日、3日、5日) の遺伝子発現を qRT-PCR により解析した。

## 【展望】

今後、根粒共生の後期における *NLP1/4* 下流遺伝子の同定や、欠損変異体の作成および表現型の観察を通じて、より詳しく根粒老化に関連する遺伝子の働きについて調べていきたいと考えている。窒素栄養による根粒共生抑制の仕組みの理解が進めば、窒素肥料と根粒共生を両立した農業の実現への寄与が期待される。