

ラッカセイ毛状根における根粒形成

赤坂庸子・大門弘幸（大阪府立大学農学部）、上田英二（大阪府立大学先端科学研究所）

土壌細菌の*Agrobacterium rhizogenes*は、植物に感染すると感染部位から毛状根と呼ばれる不定根を発生させる。この毛状根は、旺盛な生長と著しい分枝を示すことがいくつかの植物で知られている。これは*A. rhizogenes*が有するRi(root inducing)プラスミドの一部であるT-DNA領域が植物細胞の染色体DNAに導入され、その領域上の*rol*遺伝子群の発現によって植物体内のオーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンのバランスが変化することにより生じる現象である(Chilton et al., 1982)。毛状根から再分化した植物は、節間が詰まることによる矮化、葉の波打ち、花粉稔性の低下、頂芽優勢の低下、根量の増大といった毛状根症候群(hairy root syndrome)と呼ばれる特徴的な形態的变化を示すことが報告されており、これらの形態変化を育種素材として利用することに興味を持たれている(Daimon et al., 1993; Daimon and Mii, 1995; Handa, 1994; Oono et al., 1993; Schmulling et al., 1988; Tepfer, 1984)。

マメ科植物は、根粒菌と共生することによって大気中の窒素をアンモニア態窒素に還元する窒素固定を行う。両者の共生関係は、遺伝的に制御された複雑なシグナル伝達系によって、宿主認識、感染、根粒形成、ニトロゲナーゼの発現と進み成立する。窒素固定に関わる宿主側の遺伝子の解析は、根粒菌側の遺伝子に比べて遅れていたが、高等植物における分子遺伝学的手法の進展により徐々に解明されつつある。*A. rhizogenes*を利用した形質転換技術もその一助として用いられている。毛状根からの再分化系が確立されたミヤコグサ(*Lotus corniculatus*)(Petit et al., 1987)においては、ダイズ(*Glycine max*)(Stougaard et al., 1986, 1987; Miao et al., 1991)、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris*)(Forde et al., 1989)、セสบニア(*Sesbania rostrata*)(Szabados et al., 1990)から単離された根粒特異的遺伝子(ノジュリン遺伝子)やそのプロモーター領域を組み込んだ形質転換体が作出され、ノジュリン遺伝子の発現の時期や部位などが解析されている。

形質転換体をこれらの研究に利用する場合には、外来の遺伝子を導入した組織や器官などから植物体が容易に再分化しなければならないが、マメ科作物においてはその制御が難しいものが多い。そこで、地上部は非形質転換体であるが、地下部は形質転換体というcomposite plantの作出が試みられている。composite plantは、実生の胚軸に*A. rhizogenes*を接種した後、感染部位から発根した毛状根のみを残して胚軸から発生した不定根を切除することで作出できる。この方法により、簡便にかつ迅速に形質転換根における根粒の形成を解析することができる。現在までに*Casuarina glauca*(Diouf et al., 1995)、ダイズ(Kouchi et al., 1995)、ミヤコグサ(Hansen, et al., 1989; Jorgensen et al., 1991; Stougaard et al., 1990)、シロクローバー(*Trifolium repens*)(Diaz et al., 1989, 1995)、*Vicia hirsuta*(Quandt et

al., 1993)でその作出と利用が試みられている。

上述のように*rol*遺伝子が導入された根である毛状根は、作物の遺伝的改良や遺伝子発現機構の解析に用いられている。しかし、この”根”は植物が本来持たない遺伝子であるバクテリアの遺伝子を持っており、形態的、生理的な特徴については明確でない点が多い。そこで、著者らはマメ科作物の一つであるラッカセイ(*Arachis hypogaea*)の毛状根を、根量の増大や窒素固定機構の解析に利用するために、毛状根の”根”としての性状を調査し、いくつかの知見を得ているのでここに紹介する。

ラッカセイの数品種を供試して、千葉県館山市の温室メロン圃場から分離した*A. rhizogenes*の野生菌株(MAFF-02-10265, MAFF-02-10266)(大門ら, 1990)をリーフディスク法で感染させた結果、何れの品種においても毛状根が誘導された。誘導率には、ラッカセイ品種のタイプ間で差異が認められ、小粒種のスパニッシュタイプにおいて高かった。毛状根の構造や機能を評価するためには、導入された*A. rhizogenes*の遺伝子が安定的に発現する形質転換体の後代を供試することが望ましい。しかし、前述のように多くのマメ科作物では毛状根から植物体を再分化させることが困難であり、著者らもラッカセイにおいて試みているがその系を確立できていない。そこで、毛状根を地下部に持つcomposite plantを作出し、毛状根の根系形態、内部構造、根粒着生機能について明らかにすることを試みている。前述の菌株をラッカセイ品種Java13の胚軸に接種することによって作出したcomposite plantを、グロースポーチに移植して生育させたところ、その根系では、非形質転換根を地下部に持つ対照個体の根系と比較して、根量の増大、分枝根の増加、重力屈性の低下が認められた。さらに、これらの根系のフラクタル解析を行ったところ、対照個体よりも高いフラクタル次元(D)を示した。最も新しい分枝根の発生部位から基部側へ5cmの間における分枝根数も対照個体に比べて多く、composite plantの根系が形態的により複雑であることが示された(Akasaka and Daimon, 1997)。

ラッカセイは、分枝根の基部にロゼット根毛という長い根毛を形成する。この根毛は分枝根の表皮に由来し、根粒菌の感染に関与するといわれている(Chandler, 1978)。composite plantの根においても対照個体の根と同様にロゼット根毛が認められた。なお、ラッカセイの主根では根表面に密生する根毛はほとんど認められない。これは、発根後、表皮細胞を含む表層が脱落するためであるといわれている(Yarbrough, 1949)。著者らは、表層の脱落が生じる際の細胞壁構造の変化の様子およびセルラーゼ活性からみて、この現象が根冠の脱落と似たような現象であることを示した(Uheda et al., 1997)。一方、composite plantの根においては、表皮が観察され、表層の脱落は起こらず、皮層および中心柱の構造も対照個体の根との間に差異は認められなかった。

バーミキュライトを充填したビニールポットで生育させたcomposite plantに、ラッカセイの根粒菌*Bradyrhizobium* sp. A2R1系統を接種したところ、接種後20日目に

は根粒の着生が認められた。これらの根粒は対照個体の根における着生と同様に分枝根の基部にのみ着生した。その断面はレグヘモグロビンの産生を示す赤桃色を呈し、アセチレン還元法によってニトロゲナーゼ活性が認められたことから窒素固定能を有する有効根粒であることが示された。これらの根粒のほとんどは正常に発達し、ラッカセイの根粒タイプである非分裂型根粒(determinate type)であったが、根粒から新たな根が分化したり、根粒の皮層細胞が肥大するといった形状を示すものも観察された(Akasaka and Daimon, 1997)。

現在までに報告されているcomposite plantを用いた毛状根の根粒着生の様相は、供試植物、接種菌株によって様々である。Beach and Gresshoff(1988)は、サイラトロ(*Macroptilium atropurpureum*), アルファルファ(*Medicago sativa*), アカクロバー(*Trifolium pratense*)のcomposite plantの根系では、根粒着生が阻害されることを報告している。高橋ら(1996)は、ダイズでは根粒が小型化し、窒素固定活性が減少することを述べている。また、いくつかのマメ科作物においてStougaard(1986; 1987), Hansen(1989), Quandt(1993), Diouf(1995)は、根粒の着生までの日数、形状、窒素固定活性が対照個体の根粒と変わらないことを述べている。一方、composite plantではなく、*rol*遺伝子を導入した形質転換体における根粒着生についても報告されている。Pozarkovaら(1995)は、*rolABC*, *rolAB*, *rolC*をそれぞれ別個に導入したミヤコグサの形質転換体の根量、根粒数、窒素固定活性などを調査し、何れの遺伝子を導入した場合にも根粒の形状は正常であったが、導入遺伝子によって根粒数の減少や根粒着生の遅延などが生ずることを観察している。しかしながら、Kondorosiら(1993)は、*rolABC*, *rolB*の導入されたアルファルファでは非形質転換植物よりも根粒の着生が早く、植物体当たりの根粒着生数も多いことを報告している。このように、毛状根における根粒形成の遅速、形状の変化、窒素固定活性の増減について明確な傾向はない。おそらく、これらの現象は供試植物や接種する*A. rhizogenes*および根粒菌の菌株の違いによって生じる内生ホルモンのバランス変化が、根粒形成に関わる根粒菌側と宿主植物側の遺伝子の発現と複雑に関与することによって制御されているのであろう。今後の課題として非常に興味深い点の一つである。なお、composite plant法は、毛状根の根系解析やノジュリン遺伝子の発現機構を探るシステムとしては有効であると思われるが、非形質転換体である地上部と形質転換した地下部との間で生じる何らかの相互作用が根系および根粒着生に影響する可能性もあり、更に多くのマメ科作物での毛状根からの再分化個体の作出が待たれる。

以上のように、分枝根基部にのみ根粒を形成するという独特な根粒着生様式を示すラッカセイにおいて、根量の増大や分枝根の増加を示した”根”がどのように根粒着生様式を変化させるのかについて興味を持って研究を進めている。さらに、これらの形態的变化を示した”根”の養水分吸収などの機能についても明らかにしていきたいと考えている。

〈引用文献〉

- Akasaka, Y. and H. Daimon 1997. (投稿中)
- Beach, K. E. and P. M. Gresshoff 1988. *Plant Sci.* 57:73-81.
- Chandler, M. R. 1978. *J. Exp. Bot.* 29:749-755.
- Chilton, M. D., D. A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. C. Delbart and J. Tempe 1982. *Nature* 295:432-434.
- 大門弘幸・深見正信・三位正洋 1990. 植物組織培養 7:31-34.
- Daimon, H., Y. Ito, A. Ohara and M. Mii 1993. *Crop Production and Improvement Technology in Asia* 529-535.
- Daimon, H. and M. Mii 1995. *Jpn. J. Crop Sci.* 64:650-655.
- Diaz, C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg and J. W. Kijne 1989. *Nature* 338:579-581.
- Diaz, C. L., H. P. Spaink, C. A. Wijffelman and J. W. Kijne 1995. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:348-356.
- Diouf, D., H. Gherbi, Y. Prin, C. Franche, E. Duhoux and D. Bogusz 1995. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:532-537.
- Forde, B. G., H. M. Day, J. F. Turton, S. Wen-jun, J. V. Cullimore and J. E. Oliver 1989. *Plant Cell* 1:391-401.
- Handa, T. 1994. In Bajaj, Y. P. S. ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 29. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 226-235.
- Hansen, J., J. E. Jorgensen, J. Stougaard and K. A. Marcker 1989. *Plant Cell Rep.* 8:12-15.
- Jorgensen, J. E., J. Stougaard and K. A. Marcker 1991. *Plant Cell* 3:819-827.
- Kondorosi, A., M. Schultze, B. Hoffman, C. Koncz, L. Borge, M. Cren, I. Dusha, D. Duditis and E. Kondorosi 1993. *Grasslands for our World* 381-384.
- Kouchi, H. 1995. *Abs. Molecular, Physiological and Ecological Aspects of Symbiotic N₂ Fixation.* 18.
- Miao, G., B. Hirel, M. C. Marsolier, R. W. Ridge and D. P. S. Verma 1991. *Plant Cell* 3:11-22.
- Oono, Y., E. T. Aspuria, R. Matsuki and H. Uchimiya 1993. *J. Plant Res. Special Issue* 3: 193-200.
- Petie, A., J. Stougaard, A. Kuhle, K. A. Marcker and J. Tempe 1987. *Mol. Gen. Genet.* 207: 245-250.
- Pozarkova, D., G. Siffelova, V. Nasinec and I. Machackova 1995. *Bio. Plant.* 37:491-499.
- Quandt, H. J., A. Puhler and I. Broer 1993. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:699-706.
- Schmulling, T., J. Schell and A. Spena 1988. *EMBO J.* 7:2621-2629.
- Stougaard, J., K. A. Marcker, L. Otten and J. Schell 1986. *Nature* 321:669-674.
- Stougaard, J., T. E. Petersen and K. A. Marcker 1987. *Proc. Natul. Acad. Sci. USA* 84:5754-5757.
- Stougaard, J., D. Abildsten and K. A. Marcker 1990. *Mol. Gen. Genet.* 220:353-360.
- Szavados, L., P. Ratet, B. Grunenberg and F. J. de Bruijn 1990. *Plant Cell* 2:973-986.
- 高橋 幹・国分牧衛・赤尾勝一郎 1996. 日作紀 65(別1):94-95.
- Tepfer, D. 1984. *Cell* 37:959-967.
- Uheda, E., Y. Akasaka and H. Daimon 1997. *Can. J. Bot.* (印刷中)
- Yarborough, J. A. 1949. *Amer. J. Bot.* 36:758-772.