

(様式第5号)

蛍光 X 線分析によるマメ科植物根粒のモリブデンの動態解析
The behavior of molybdenum content in the nodule of leguminous plants by the
fluorescence X-rays analysis

鈴木章弘・江上由佳
Akihiro Suzuki, Yuka Egami

佐賀大学農学部・佐賀大学大学院農学研究科
Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Saga University

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開〔論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表〕が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

マメ科植物と根粒菌による共生窒素固定において、*SEN1* 遺伝子の遺伝子型の違いによって窒素固定活性に差が生じる。本研究では、*SEN1* タンパク質の機能を明らかにするために、根粒におけるモリブデンと鉄の含量を蛍光 X 線解析によって比較した。その結果、得られたピーク強度はモリブデンでは差がなかったが、鉄では Peking 型 *SEN1* 遺伝子を持つ根粒においてピーク強度が高い値を示した。以上の結果は、*SEN1* タンパク質が鉄の輸送に関わっている可能性を示しているが、今回はサンプル数が少なかったため更なる解析を行う必要がある。

(English)

In symbiosis between leguminous plants and rhizobia, genotypic difference of *SEN1* gene affect symbiotic nitrogen fixation activity. Here, content of molybdenum (Mo) or iron (Fe) in root nodule was compared between Peking type and Enrei type by the fluorescence X-rays analysis. Although no significant difference was detected in the peak intensity derived from Mo, the peak intensity of Fe in Peking type was clearly higher than that of Enrei type. This result shows the possibility that *SEN1* protein is involving in membrane traffic of Fe in leguminous plants. However, further analyses should be required for the responsible results.

2. 背景と目的

根粒菌との共生窒素固定に必須のマメ科宿主植物側の遺伝子である *SEN1* は、ミヤコグサの B129 と MG20 間（いずれも実験系統）でアミノ酸配列に多型があり、その領域には窒素固定活性や種子重に関する QTL（量的形質遺伝子座）が検出されている。また、ダイズにおいてもエンレイとその他多くの品種間でアミノ酸配列が異なっており、*SEN1* 遺伝子の近傍に種子重の QTL が存在することも報告されている。したがって、ミヤコグサやダイズにおいて窒素固定活性や種子重の QTL を与えている遺伝子は *SEN1* である可能性が考えられる。

根粒菌はニトロゲナーゼによって空気中の窒素を固定するが、その活性中心にはモリブデンが存在し、*SEN1* タンパク質はモリブデンの輸送に関与することが想定されている。以上のことを踏まえると、ダイズやミヤコグサにおいて多型を示す系統間において根粒内のモリブデンなどの濃度が異なっている可能性が考えられるため、それを測定することを計画した。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

①根粒ペレットの作成

根粒菌接種後約1ヶ月のダイズ根粒を乾燥させ、ビーズクラッシャーを用いて破碎した。次に100 mgの窒化ホウ素と100 mgの根粒粉末をよく混合し、プレス機でペレット状に成形した。ペレットの大きさは直径10mmφ、厚さ1mm程度であった。サンプルに用いた根粒は、エンレイ型SEN1ダイズとPeking型SEN1ダイズに形成されたものであり、サンプル数はそれぞれ2とした。

②X線の照射および蛍光X線の検出

測定は図1に示す標準的な蛍光X線スペクトル測定の配置でおこなった。試料前に入射X線の強度を測定する検出器を置き、試料透過後のX線の強度を測定する検出器を試料の下流に設置した。それぞれの測定試料に対し入射X線と透過X線の強度比を求め、この値を得られた蛍光X線の強度の規格化に用いた。試料から放出される蛍光X線はSDD検出器（シリコンドリフト検出器）を用いて測定した。励起X線のエネルギーは25keVとし、1スペクトルあたりの測定時間は10分でおこなった。

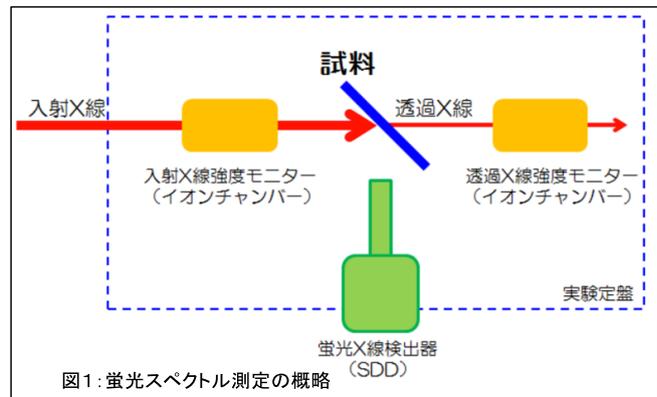


図1: 蛍光スペクトル測定の概略

4. 実験結果と考察

図2にモリブデンと鉄に由来する蛍光X線強度を示す。パネルAに見られるようにモリブデンにおいてはSEN1遺伝子の遺伝子型の違いによって強度にほとんど差が見られなかったのに対して、鉄ではエンレイ型よりもPeking型の方が高い傾向を示した（パネルB）。ニトロゲナーゼの活性中心にはモリブデンが存在していることから、当初はモリブ

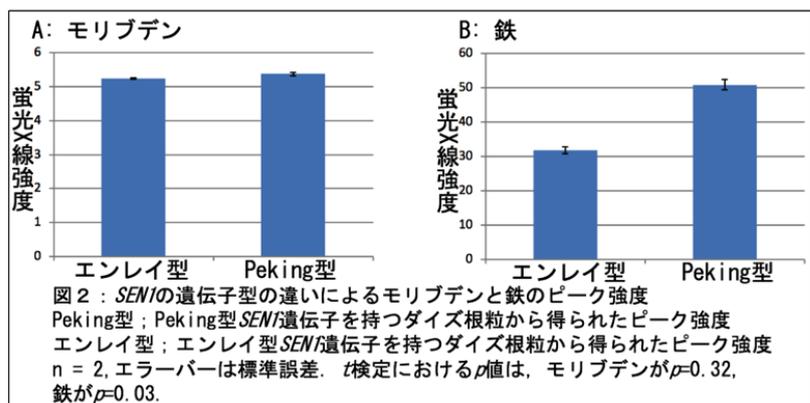


図2: SEN1の遺伝子型の違いによるモリブデンと鉄のピーク強度
Peking型; Peking型SEN1遺伝子を持つダイズ根粒から得られたピーク強度
エンレイ型; エンレイ型SEN1遺伝子を持つダイズ根粒から得られたピーク強度
n = 2, エラーバーは標準誤差。t検定におけるp値は、モリブデンがp=0.32、鉄がp=0.03。

ブデンに差が検出されると予想していたが、モリブデンではなく鉄のピーク強度に大きな差が見られた。SEN1タンパク質は酵母のCCC1と相同性があり、CCC1は鉄の膜輸送に関わっているとする報告があることから、マメ科植物のSEN1タンパク質も鉄の輸送に関わっている可能性が考えられた。

5. 今後の課題

今回はトライアル利用であったため、サンプル数が極めて限定的であった。したがって今後はそれぞれのサンプル数を十分に確保して同様の測定を行うことで、今回得られた結果の信頼性を検証しなければならない。さらに組織科学的な解析も行うことで、この遺伝子の発現場所等を明らかにしてSEN1遺伝子の違いによってマメ科植物と根粒菌による窒素固定活性に差が生じるメカニズムを理解する必要がある。

6. 参考文献

- ①A. Tominaga et al., (2012) Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*, 125 395-406.
- ②Hakoyama et al. (2015) The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiology*, 53, 225-236.

7. 論文発表・特許（注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果）

なし

8. キーワード（注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3）

窒素固定, ダイズ, ミヤコグサ

9. 研究成果公開について（注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文（査読付）発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください（2018年度実施課題は2020年度末が期限となります）。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文（査読付）発表の報告	（報告時期：	年	月）
② 研究成果公報の原稿提出	（提出時期：	年	月）