

宮 崎 大 学 大 学 院  
博 士 学 位 論 文

論 文 題 目

マメ科植物における成長制御遺伝子の解析に関する研究

学位授与年月

2015年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科  
資源環境科学専攻

矢野 翼

## 目次

第 1 章 緒論 .....	1
第 2 章 <i>SYNCl</i> を発現した FSL#121 の解析 .....	6
2-1 緒論	
2-2 実験方法	
2-3 結果	
2-4 考察	
第 3 章 <i>Agrobacterium</i> 由来 <i>rolB</i> 遺伝子を発現した FSL#35 の解析 .....	26
3-1 緒論	
3-2 実験方法	
3-3 結果	
3-4 考察	
第 4 章 遺伝子欠損系統 FSL#54 の解析 .....	53
4-1 緒論	
4-2 実験方法	
4-3 結果	
4-4 考察	
第 5 章 総合考察 .....	68
研究概要 .....	73
謝辞 .....	75
引用文献 .....	76

## 第1章 緒論

作物の生産は人が生きていくために欠かせないものであるが、人口増加や気候変動などによる食糧危機の到来が危惧されている(古川 2001)。また、現時点での世界の食糧生産力は世界人口をまかなえるだけの力を持っているが、飢餓が発生しているのも事実である(George 1984)。これは政治的・経済的な理由から、世界における食糧の分配が偏っていることが原因の1つで、日本のような飽食国がある一方で、貧困による飢餓が発生している国も存在している(古川 2001)。また、食糧危機発生の要因として気候変動に由来する食料生産適地の減少や沙漠化も危惧されている(勝俣 1998)。残念ながら、経済力の不足が要因で食糧不足に陥っている地域は環境的な食糧生産力も乏しい場合が多い。このような現状を打破し、来たる世界規模の食糧危機に対応するためには、食糧の偏りを生む国家間の政治的・経済的な軋轢をなくし、平等な食糧分配を実現することが長期的に見て必要である(Bov'e and Dufour 2001)。しかしながら、局所的な食料不足は既に発生しており、政治的・環境的事態に備えると共に、早急な作物の生産性の向上が求められている。食糧生産力の乏しい食糧不足地における収量増大が、局所的食糧不足を解消する1つの手段である。

ダイズ、エンドウ、インゲン等のマメ科作物は穀類の中でも「しゅ穀類」に分類され、主に炭水化物の供給源となる「禾穀類」とは異なる需要があるため、増産が望まれている(Iqbal *et al.* 2006)。マメ科作物はタンパク質やミネラル、ビタミンを豊富に含むため(Deshpande 1992)、アフリカやアジアの食糧不足地への栄養供給において重要な役割を担う(Iqbal *et al.* 2006)。また、マメ科作物の種子は様々な機能性成分を含有し、例えばダイズは心臓疾患やガン、糖尿病、高血圧を予防するイソフラボンを多く含み、ヒトの健康面への貢献度も大きい(Mateos-Aparicio *et al.* 2008)。さらに、近年ではバイオ燃料としての利用が増え、需要が高まっている(Pimentel and Patzek 2005)。このように、マメ科作物は食糧供給への高い貢献度を持つだけでなく、様々な面において有用であるため、今後増収が望まれる作物の1つである。

昨今の農業では大量の肥料を用いることで、高い生産性を維持している

(Brown 1999). 一方で、過剰な肥料や連作は地力の低下や生育障害を引き起こし、継続的な作物生産の問題となる。また、これまでの農法による作物個体あたりの生産力の向上には限界があるとされ、現代農業は、作物個体あたりの増収を目指す農業から、大規模化農業に移行している (Brown 2000). しかし、地球上のすべての土地で大規模な農業が可能なのではなく、水資源や労働力、そして資金が豊富にある場所でのみ実行できる (Tilman *et al.* 2002). 食糧を必要とする途上国の様な地域では、大規模農業に耐えるだけの地力が不足し、設備投資や人件費に費やす資金がない場合が多い。このような現状を打破し、作物生産量を増加させるためには、作物自体の生産力を向上させることが 1 つの打開策である。

作物自身の生産力を向上させるために、交配により様々な作物品種が作出された。一般的な交配による有用品種の作出には膨大な時間と労力が必要であった (Hubbell and Welsh 1998). しかしながら、昨今では分子生物学的な手法を用いて、育種の短時間化が図られている (Collard *et al.* 2005). また、有用な形質の要因となる遺伝子を特定し、植物内で発現させることで、有用な形質をもった系統を得られるようになっている。このような遺伝子組換え作物は大量生産に適しており、一部の地域で既に利用されている (Hubbell and Welsh 1998). 一方で遺伝子組換え作物については、倫理的なハードルが高く、多くの国で規制が設けられている。しかしながら、前述したように肥料や栽培環境による増収には限界があり、より効率よく栽培できる植物を獲得するためには遺伝子組換え技術を用いることが必要だと考えられる (Jansen and Gupta 2009). 遺伝子組換え植物を直接栽培することも有用であるが、有用な遺伝子を特定することができれば、倫理面に問題のない交配により有用な形質を得た植物を分子生物学的な手法を用いて (Collard *et al.* 2005) 得ることも可能となる。このような点から、将来の農業利用にむけた有用遺伝子の同定と解析が重要である。

有用遺伝子の解析にあたり、着目すべきは根の表現型である。植物は地上部で光合成を行い、空気中の二酸化炭素を同化し炭素源として利用する。生長に必要な養分を十分に獲得できれば次世代のための蓄積となり、種子や球根とい

った食糧としての可食部の生長を助ける(Poorter and Nagel 2000). 植物は光合成により炭素源を作り出す一方で、体内で合成できない栄養成分や水を根から取り込む(Somma *et al.* 1998). 根は土壌の環境に適応し、植物体の生長や種子の収量を増加させるために栄養分を獲得する(Kashiwagi *et al.* 2006). マメ科植物において根は根粒菌との共生の場でもあり、共生器官である根粒を形成する. 根粒の形成により、マメ科植物は窒素栄養分を他の植物よりも多く獲得できる(Lodwig *et al.* 2003). マメ科植物における根の伸長やストレス耐性そして根粒着生が促進されれば、植物の獲得できる栄養が増え、増収に繋がる. つまり、マメ科植物の根の表現型は、植物体の生長と生産性に関連しており、有効な表現型を示す作物を作出できれば増収が期待できる. したがって、マメ科植物の根の表現型をコントロールする遺伝子の単離と同定が、有用なマメ科作物を作出する上で重要となる.

マメ科植物のみならず、有用な表現型を制御する遺伝子の探索のために遺伝子組換えによる遺伝子機能解析が行われている. より短時間での解析を望むのであれば、対象の遺伝子を強発現した植物体を解析することが最適である(Weigel *et al.* 2000). 一方で遺伝子を欠損させた個体の評価も可能である. 欠損変異体は比較的作成が容易であり、特徴的な形質を示す植物をスクリーニングし、その原因遺伝子を同定し機能を特定する. これらの遺伝子の有用性が予測されれば、植物体に再導入し、遺伝子発現解析を行う. つまり、遺伝子欠損による遺伝子機能の評価は機能獲得型の変異体による解析が次に必要であり、遺伝子機能獲得型の変異体群が作出できれば、遺伝子の評価はより迅速になると考えられる. 遺伝子機能獲得型の変異体群を容易そして大量に作成する方法として、Full-length cDNA overexpressor gene (FOX) hunting system が開発されている(Ichikawa *et al.* 2006). FOX-hunting system はシロイヌナズナの cDNA ライブラリーを組み込んだベクタープラスミドを保持した *Agrobacterium tumefaciens* を用いて、一度に大量の組換え体を作成することが可能である. この方法で導入された遺伝子は、強発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターと共に植物内に導入されることから、植物内で強発現される. 加えて、*Agrobacterium* を用いた遺伝子組換え法であることから、遺伝子の導入は

ランダムであり、作出された一部の植物は機能獲得型ではなく、欠損型による表現型を示す可能性もある。導入遺伝子の発現を調べることで、機能獲得型の変異体か、欠損型の変異体であるか特定できる。FOX hunting system はアブラナ科であるシロイヌナズナで作られた方法であり、現在ではイネでも応用され (Nakamura *et al.* 2007), 有用遺伝子探索に利用されている。

先行研究において、FOX hunting system を用いたマメ科における機能獲得型変異体群が作出された (Himuro *et al.* 2011)。その際、供試植物としてマメ科のモデル植物である *Lotus corniculatus* の Super growing root (SR) 系統が用いられた。SR 系統は、*L. corniculatus* の異質倍数体の根培養系から見つかった系統で、野生型よりも旺盛な成育を示し、ホルモン非存在下での液体培地上で無限に増殖することが可能である (Akashi *et al.* 1998, 2003)。また、SR 系統は再分化能を有しており、再分化した植物はマメ科植物の特徴である根粒着生能も保持している (Tanaka *et al.* 2008, Jian *et al.* 2009)。SR 系統の再分化植物は野生型よりも生長が早く、マメ科植物の表現型解析を行う上で非常に有用な植物となる。このような特徴を持つ SR 系統に FOX-hunting system を適応することで作出されたのが、FOX-SR 系統である。FOX-SR 系統はマメ科植物でありながら、シロイヌナズナの cDNA を導入し発現させた系統となる。FOX-SR 系統はこれまでに 72 系統が報告されており、再分化植物の根の簡易的な伸長解析が行われた。そのうち、FOX-SR 系統 (FSL) #4 はアクアポリンの遺伝子である *AtPIP1;2* が導入されており、分枝の数、地上部乾燥重、地下部根量そして根粒着生数の減少、さらに乾燥重における地上部/地下部比の増加を示すと報告されている (Himuro *et al.* 2010)。これらの結果は、他のアクアポリン強発現植物の結果と一致していた (Kaldenhoff *et al.* 1998, Aharon *et al.* 2003)。また、いくつかの FOX-SR 系統、FSL #6, #55, #78 等は親系統である SR に比べて根の伸長が促進されている (Himuro *et al.* 2011)。このような報告をまとめると、FOX-SR 系統は外来遺伝子によって誘導された表現型を解析するのに適した系統といえる。

本研究では、FOX-SR 系統のうち、特徴的な根の表現型を示す系統をスクリーニングし、より詳細な表現型解析と生理学的な解析を行った。まず 1 つ目の供試

系統は、タンパク質合成時に利用されるアスパラギンと tRNA の複合体合成を触媒する *SYNCl* 遺伝子が導入された FSL#121 である。FSL#121 は親系統である SR よりも根の伸長度が高い (Himuro *et al.* 2011)。また、*SYNCl* を含む Aminoacyl-tRNA synthetase のマメ科の表現型における機能は未確認である。このような点から FSL#121 を供試系統として選抜し、解析を行った。2 つ目の供試系統として、*Agrobacterium rhizogenes* の Ri プラスミド由来の遺伝子である *rolB* 遺伝子が導入された FSL#35 を選抜した。*rolB* 遺伝子は *A. rhizogenes* が植物細胞に感染した際に形成される毛状根(Hairy root)の原因遺伝子の 1 つである。*rolB* 遺伝子は FOX hunting system が作成された際に、遺伝子導入効率を測定する内部標準遺伝子として用いられた遺伝子で、シロイヌナズナにおいては、発現しても表現型に大きな影響を与えなかった (Ichikawa *et al.* 2006)。しかし、SR 系統に導入した場合、顕著な再分化植物根の伸長 (Himuro *et al.* 2011) が見られたことから、本研究において FSL#35 の解析を行った。さらに、先行研究で根の白色化が報告 (Himuro *et al.* 2011) されている FSL#54 を 3 つ目の供試系統として選抜した。FSL#54 は本研究によって機能欠損型の変異体である可能性が示唆されており、FOX-SR 系統の解析における機能欠損型変異体の初めての評価個体となった。

選抜した 3 つの FOX-SR 系統の解析により、マメ科植物の根における新たな有用遺伝子の知見獲得を最終目的とした。その中で、FSL#121, #35 の解析により、*SYNCl* 遺伝子並びに *rolB* 遺伝子の表現型への影響を評価した。また FSL#54 の解析により FOX-SR 系統における初の機能欠損型変異体の評価例として報告し、解析手法の標準化を検討した。

## 第2章 SYNC1 遺伝子を発現した FSL#121 の解析

### 2-1 緒論

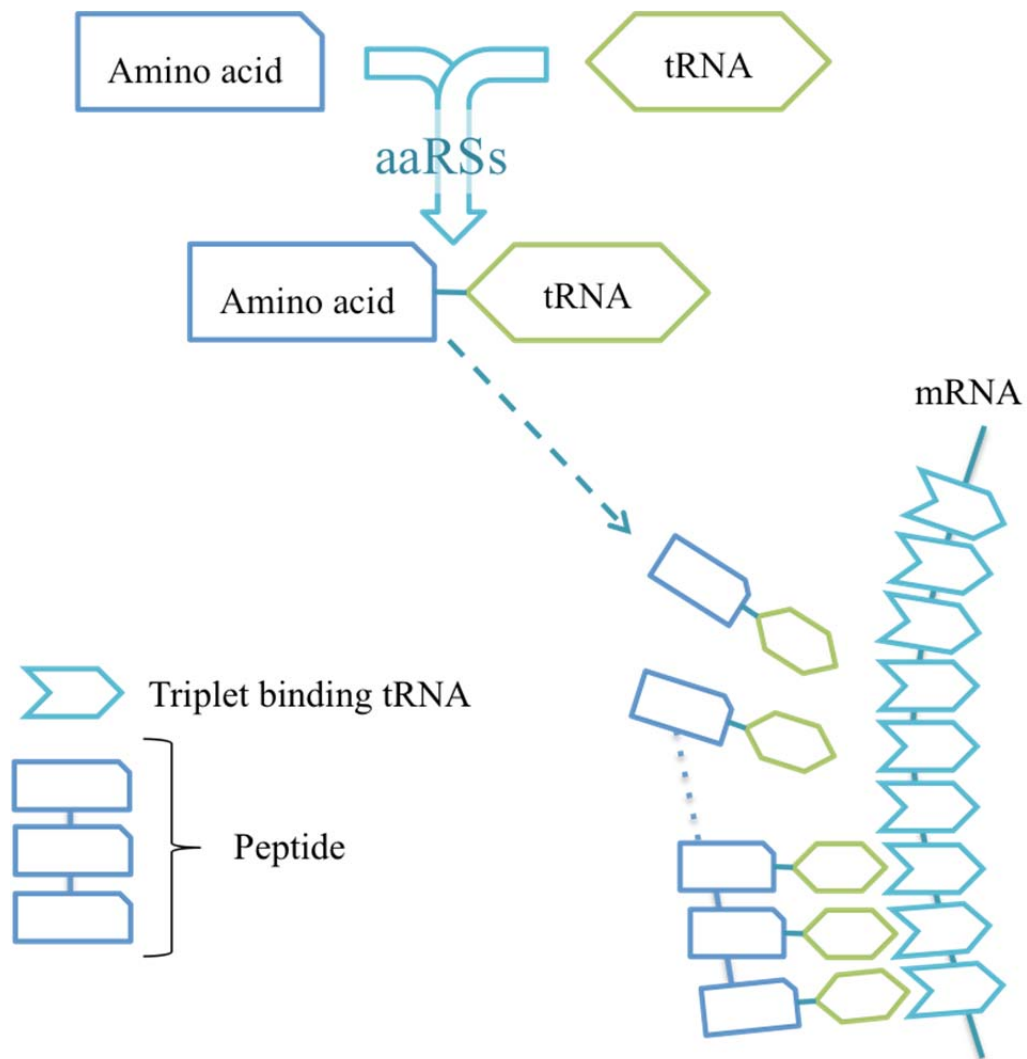
FSL#121 は Himuro *et al.* (2011)による報告で、シロイヌナズナの Asparaginyl-tRNA synthetase である SYNC1 遺伝子の挿入が確認されている。Asparaginyl-tRNA synthetase は Aminoacyl-tRNA synthetase(aaRSs)のうちの1つの酵素で、アミノ酸とそれに対応する tRNA の結合を触媒し、アミノ酸 tRNA 複合体の生合成酵素であり(Becker and Kern 1998, Fig. 2-1), SYNC1 はアスパラギンと tRNA の結合を触媒する酵素である(Peeters *et al.* 2000). 植物における SYNC1 遺伝子は、シロイヌナズナ中の発現部位や基質特異性の研究、発現による種子表現型への影響が報告されている(Peeters *et al.* 2000)が、マメ科植物における情報は不十分である。本研究では、シロイヌナズナ由来の SYNC1 遺伝子の発現をマメ科植物で解析し、SYNC1 遺伝子のマメ科植物の表現型への影響を評価した。供試個体中での SYNC1 遺伝子の発現を確認した後、*in vitro* による根の単独培養と再分化植物の栽培による表現型解析を行った。これらの実験により特異的な表現型を確認できた。確認できた表現型変化の要因探索のため、SYNC1 タンパクの標的であるアミノ酸含量の解析を行った。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験材料の継代操作と培養条件

本実験に供試したのは、FOX-SR 系統の FSL#121, SR そして Control の *in vitro* で培養した単独培養根と再分化植物である。Control は FOX-hunting system に使用されたベクター pBIG2113SF の非遺伝子導入ベクターである pBIG2113N の配列が挿入された系統を使用した。それぞれの単独培養根は MS 液体培地(Murashige and Skoog 1962)に継代し、無菌状態で増殖培養し実験に使用した。2週間培養した根から発生した側根を基部から採取し、滅菌した 20 mL の MS 液体培地を注いだ 50 mL 容フラスコに入れ、暗所、27°C 環境下でロータリシェイカーを用いた旋回培養(110 rpm)を行った。2週間の培養の後、伸長した根を新鮮な無菌 MS 培地に移し、更に2週間同じ環境で旋回培養し、一部を系統維持のため継代培養して、残りを伸長解析に使用した。再分化植物は、Himuro *et al.* (2011)により単独培養





**Fig. 2-1.** Function of AARSs in protein translation.

根から再分化され継代培養により個体維持されたものから増殖し、実験に使用した。無菌状態の 1/2MS 寒天培地(0.7%)を含むプラントボックス(AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan)で維持培養された再分化植物のシュートから、茎頂から3つの展開葉を保持した茎を切り取り、新鮮な滅菌 1/2MS 寒天培地に刺し、17時間明期/7時間暗期、27°C、光量  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の環境下で2週間培養した。培養後、一部を系統維持のため継代し、残りを実験に使用した。

### 2-2-2 導入遺伝子の解析

FSL#121 に導入された遺伝子の解析には、FSL#121 の再分化植物体の genomic DNA (gDNA)から増幅した標的配列を含む断片をクローニングし、シーケンス解析を行った。gDNA は約 100 mg の FSL#121 の葉から、TaKaRa Plant DNA Isolation Reagent (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて抽出した。抽出した gDNA をテンプレートとし、導入遺伝子が含まれる配列を増幅するプライマーGS17K (5'-GATCGTATTTTACAACAATTACCAAC-3') /GS18K (5'-GGATTCAATCTTAAGAACTTATTGC-3')と *TaKaRa Ex Taq* (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いてPCR増幅を行った。PCRプログラムは、94°Cで5分のインキュベーション後、94°Cで30秒、62°Cで30秒、72°Cで2分間の反応を35サイクル繰り返し、最後に72°Cで10分のインキュベーションを行った。PCRによる増幅産物をクローニングキットBDL TA PCR Cloning kit (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan)を用いてクローニングした。標的断片を含むプラスミドを抽出し、シーケンス解析のテンプレートとした。シーケンス解析には3130 Genetic analyzer(Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA)を用いた。シーケンス解析に使用したプライマーはM13 BDF w Primer (5'-CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') と M13 BDRev Primer (5'-CGGATAACAATTTCACACAGG -3')を使用した。シーケンス解析結果はシロイヌナズナ遺伝子のデータベースであるTAIR (<http://www.arabidopsis.org>)においてBLAST検索を行った。

### 2-2-3 発現解析

RT-PCRによる発現解析を行うために、FSL#121 と SR, Control の再分化植物の

葉・茎・根から totalRNA を RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて抽出した. 抽出した total RNA を PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて cDNA へ逆転写し, RT-PCR のテンプレートとした. RT-PCR には 20 ng の cDNA を用い, *SYNCl* 発現検出用のプライマー AtFSL#121Fw (5'- CGTAGATAACGAACAATGGCTGATG-3')/AtFSL#121Rv (5'- GATCTCTTCCGGATTTTACCCAAC -3')を使用して RT-PCR を行った. また, リファレンス遺伝子として *ACTIN1* 遺伝子を用い,プライマーは Lc-actin-Fw (5'-ACAATGAGTTGCGTGTTGCT-3')/Lc-actin-Rv (5'-ACTCACACCATCACCGGAAT-3') (Himuro *et al.* 2011)を用いて PCR 反応を行った. RT-PCR 用のプライマー AtFSL#121Fw と AtFSL#121Rv は, FSL#121 の配列を用いて設計した(Fig. 2-2). RT-PCR 用の PCR プログラムは, 94°C で 5 分のインキュベーション後, 94°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 1 分間の反応を 35 サイクル繰り返し, 最後に 72°C で 10 分のインキュベーションを行った. PCR 産物は TBE バッファーを用いた 3%アガロースゲル上で電気泳動し, 増幅を確認した.

#### 2-2-4 表現型解析

*in vitro* における根の単独培養は MS 培地(Murashige and Skoog 1962)を用いて行った. 2 週間の継代培養を経た根組織を, クリーンベンチ内で根端から 2cm となるように切り出した. これを 5 本まとめて 20 mL の MS 液体培地が含まれる 50 mL 三角フラスコに封入し, 4 週間, 暗所, 27°C 環境下でロータリシェイカーを用いた巡回培養(110 rpm)を行った. 1 週間毎にルートアナライザー WinRHIZO Arabidopsis software (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada)を用いて根の伸長度を解析した. ルートアナライザーによる解析後に新鮮重を測定した.

再分化植物は 1/2MS 固形培地上で継代培養して維持した. 茎頂から 3 つの展開葉を保持した茎を切り取り, 新しい 1/2MS 固形培地に刺し, 発根処理を行った. 2 週間後, 発根した個体を, バーミキュライトをつめたプラスチックポットに移植し, グロースチャンバー内で 17 時間明期/7 時間暗期, 27°C, 光量 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の環境下で 4 週間の栽培をおこなった. 栽培後, 茎葉部の草丈, 茎径, 分枝数を測定した. 根部については WinRHIZO Arabidopsis software (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada)を用いて根の伸長度を解析した. また, 茎葉部と

根部の新鮮重と乾燥重も合わせて測定した。また、再分化植物の解析では根粒菌接種区を別に設け、根粒の着生数を計測した。根粒菌は Yeast-extract Mannitol (YM)培地で培養した *Mesorhizobium loti* NZP2037 株を用い、1 植物体当たり  $1.0 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> となるように調製した菌液 1 mL を接種した。

#### 2-2-5 アミノ酸解析

アミノ酸は Yamamoto *et al.* (2003)の方法を用いて抽出を行った。グロースチャンバー内で4週間培養した SR と Control, FSL#121 の植物体から葉、茎、根 100 mg 新鮮重を採取し、液体窒素と乳鉢、乳棒を用いて粉末化した。1 mL の 5 mM HCl を加え均一化した後、サンプルを 2 mL チューブに回収し、4 °C、2,500 x g で 15 分間遠心して上清を回収した。回収した上清に 100 g/L スルホサリチル酸 50 μL を加えて氷上で 20 分インキュベートし、4 °C、2,500 x g で 15 分間遠心して上清を回収した。2 M NaOH によりサンプルの pH を 6 から 8 の間に調整し、遊離アミノ酸量解析サンプルとした。このサンプル 50 μL を、100 μL のアセトニトリルと 50 μL の HPLC グレードの蒸留水と混合し、1.4 mL ラウンドバイアルに移した。解析には UF-Amino Station (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた。

### 2-3 結果

#### 2-3-1 導入遺伝子の確認と発現解析

シーケンス解析により、FSL#121 には *A. thaliana* の *SYN1* 遺伝子の導入が確認された(Fig. 2-2)。BLAST 検索の結果、FSL#121 には *A. thaliana* の *SYN1* 遺伝子の完全長(2016 bp)の挿入が確認できた(Fig. 2-3)。FSL#121 の *SYN1* 遺伝子の発現は RT-PCR を用いて解析した。シーケンス解析結果より作成したプライマーを使用して RT-PCR を行ったところ、FSL#121 の cDNA をテンプレートとした反応区のみ断片の増幅が確認できた(Fig. 2-4)。増幅は葉、茎そして根でもみられ、FSL#121 の全ての組織で *SYN1* 遺伝子の発現が確認できた。一方で、SR と Control の cDNA をテンプレートとした RT-PCR では *SYN1* 遺伝子に特異的な増幅は確認できなかった(Fig. 2-4)。

### 2-3-2 根単独培養における表現型解析

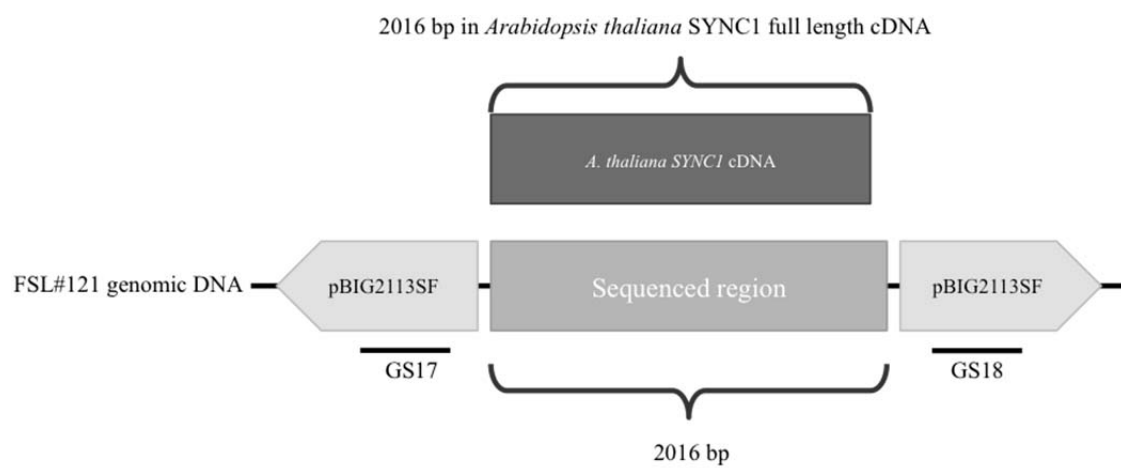
ホルモンフリーのMS液体培地で培養した, SR, ControlそしてFSL#121の根単独培養の組織には生長に特徴的な差が検出された. FSL#121は総根長において, 1-3週間の培養ではSRとControlと同等の生長を示したが, 4週間培養したFSL#121の根はSRとControlよりも伸長度が減少した. FSL#121の4週間培養根は3週間培養した根と同等の総根長であった(Fig. 2-5A). FSL#121の平均根径においては, 解析した全ての培養期間でSRとControlよりも有意な増加がみられた(Fig. 2-5B). FSL#121の表面積は, 培養2週間目ではSRとControlと比較して有意に増加していたが, 3週間の培養で差はなくなり, 4週間の培養で一転してSRとControlよりも低い表面積を示した(Fig. 2-5C). FSL#121根の体積においては, 培養初期である培養1週間目と2週間目でSRとControlに対して有意な増加が検出されたが, 培養3週間から4週間では差は検出されなかった(Fig. 2-6A). 特に特徴的な表現型として, FSL#121では側根数がSRとControlに比べて大きく減少しており, 培養2週間から4週間で有意な差が確認できた(Fig. 2-6B). FSL#121根は培養初期の1週間と2週間の培養においてはSRとControlよりも新鮮重が増加したが, 培養3週間以降にはその差は見られず, 同等の新鮮重を示した(Fig. 2-6C). 以上のように, 根単独培養におけるFSL#121はSRとControlとは異なった生長を示した.

### 2-3-3 再分化植物の表現型解析

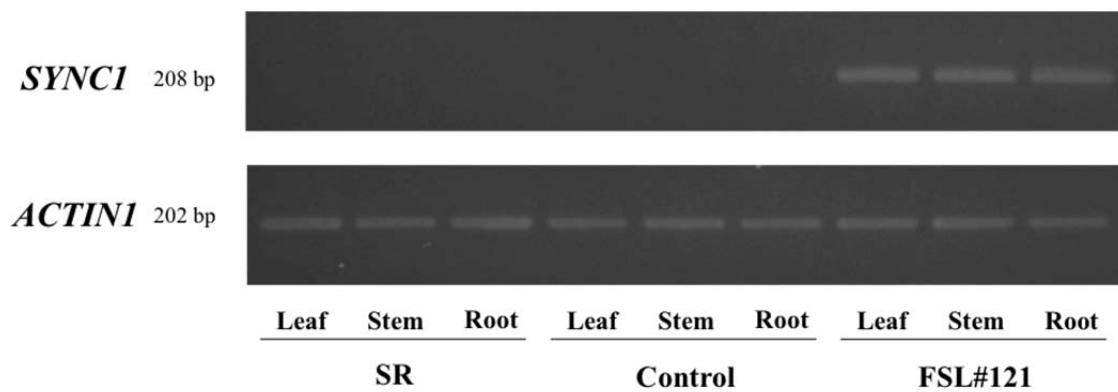
*SYNCl* 遺伝子発現の再分化植物への影響を調査するために, FSL#121とSR, Control再分化植物の表現型を比較したところ, FSL#121はSRとControlと比較して, 異なる表現型を示した. FSL#121の草丈と莖径はSRとControlよりも有意に高い値を示した(Figs. 2-7, 2-8AB). また, FSL#121の莖葉部新鮮重もSRとControlよりも24%高く(Fig. 2-8D), 一方でFSL#121の分枝数はSRとControlよりも減少した(Figs. 2-7, 2-8C). 栽培したFSL#121植物は根部でもSRとControl植物の根部と差が見られた. FSL#121の総根長と根径はSRとControlよりも高い値を示した(Fig. 2-9AB). 根単独培養時とは異なり, 側根数もFSL#121ではSRとControlよりも増加した(Fig. 2-9C). 根部の新鮮重はSRよりも27%増加していた(Fig. 2-9D). 根粒着生においては, FSL#121の根粒着生数はSRとControlよりも

CGAGCTCACTAGTCCCCCCCCCGAAGCTATTTTTATGTGTTATAAAGGCTT  
 CTTGTCAAAATACGCAGCCAAATACACTCTCTCTGAAACCTCTCCTCTTTT  
 AGGGTTTAATATCAACGCCTCCAAAATTTCCGTGCTTTTGTTTTCGTAGATA  
 ACGAACAAATGGCTGATGAGATTGTGCCGCCGGCGACTCAATTAGCCGCCGT  
 ATCCTTAGAAAACGATGGATCTACGGTGCAAAGAGCTCAATTCTCTAACCG  
 GGTTTTGATTCGAACGATTTTGGATCGACCTGACGGCGGAGCTGGACTCGCC  
 GGTCAAACGGTTCGAATCGGTGGTTGGGTAAAATCCGGAAGAGATCAAGGG  
 AAAAGAACGTTTTCTTTCCTTGCGGTTAACGATGGATCTTGTCCAGCGAATC  
 TTCAGGTTATGGTGGATCCGTCTCTCTATGATGTCTCTAACTTGGTTGCTACG  
 GGAAGTTGTGTGACTGTTGATGGAGTTTTGAAGGTTCCACCGAAAGGTAAA  
 GGTACGCAGCAGCAGATTGAGCTTAACGTTGTGAAGGTGATTGATGTTGGA  
 ACGGTGGATGCGTCTAAGTATCCACTTCCTAAGACTAAGTTGACTCTTGAGA  
 CTTTGAGAGATGTGCTTCATCTTCGTTCTAGAATAACTCGATCTCAGCTGTT  
 GCAAGAATTCGTAATGCTCTTGCTTTTGCGACTCACAGTTTCTTTCAAGAGC  
 ATAGTTTCTTTACATTACACTCCTATCATCACGACAAGTGATTGTGAAGG  
 TGCTGGTGAAATGTTCCAAGCAACAACCTTTGATCAATTACACTGAGAGGTTG  
 GAGCAGGATCTCATTGATAACCCTCCGCCTACTGAGGCTGATGTTGAAGCTG  
 CGAGGCTCATTGTCATTGAGAGAGGTAATGTTGTAGCGGAACTGAAAGCTG  
 CCAAAGCAAGCAAGGAAGCGATCACTGCTGCTGTTGCTGAACTTAAAATAG  
 CAAAGGAGACTTTTGCTCATATTGATGAGAGGTCGAGGCTTAGACCTGGAC  
 TACCTAAGAAAGATGGAAACATTGATTATTCCAAGGATTTCTTTGGTCGTCA  
 AGCTTTCTTGACAGTTTCCGGTCAATTACAAGTGGAGACCTATGCTTGTGCT  
 CTTAGCAATGTGTATACATTTGGCCCGACTTTCCGGGCAGAGAACTCTCACA  
 CTTCAAGGCATCTTGCTGAATTCTGGATGGTTGAGCCTGAGATTGCTTTTGC  
 AGATCTAGAGGACGACATGAACTGTGCAGAGGCGTATGTGAAATACATGTG  
 CAACTGGTTGCTTGAGAAATGTTACGCTGACATGGAAGTTATGGCTAAGAA  
 TTTGACTCAGGATGCATTGACAGGCTAAAATTGGTTGCCTCTACTCCGTTT  
 GGGCGTATAACATACTAAAGCAATAGAGCTACTTGAGGAAGCTGTGGCT  
 AAAGGAAAGGAATTTGATAACAATGTGGAGTGGGGAATCGACTTAGCCTCG  
 GAGCATGAAAGATACTTGACAGAGGTTCTGTTTCAAAGCCACTTATTGTCT  
 ATAACACCCGAAAGGAATCAAAGCTTTTTACATGAGACTTAACGATGATG  
 AGAAGACAGTTGCTGCCATGGATGTCCTCGTTCCAAAGGTTGGAGAAGTCA  
 TTGGTGGAAAGCCAAAGGGAAGAACGATATGATGTCATCAAAAAGAGGATT  
 GAGGAGATGGGTCTTCCAATAGAGCCATATGAGTGGTACCTAGACTTGCGC  
 CGTTATGGAACAGTGAAGCATTGTGGGTTTGGACTTGGCTTCGAACGTATGA  
 TTCTCTTCGCTACTGGACTTGATAACATCAGAGACGTTATTCTTTCCCTCGC  
 TATCCTGGAAAAGCTGATCTTTGATTCTCTCTTTACACCATTTACATAACAC  
 AATTTGCTTTTATTAGCTGGTCTGGTTTCCATAACCGACTTGGTTTAGTTTA  
 CTTTTTAAGTTGGTTAAAGGAAAATTGTATTGACTTTTGATTTTTTATCTCTA  
 TGGATCTGGTTTTGTTCCGGTTATCCCGATTTGGCTATTGAATGATAGGAGAA  
 CCAATTTGGCCGATTTGGCCTCTAGATGTAGTTGTAGAAT

**Fig. 2-2.** Sequence data of FSL#121. Blue characters indicate vector sequence. Black characters indicate *SYN1* gene sequence. Shaded characters indicate primer position for RT-PCR.

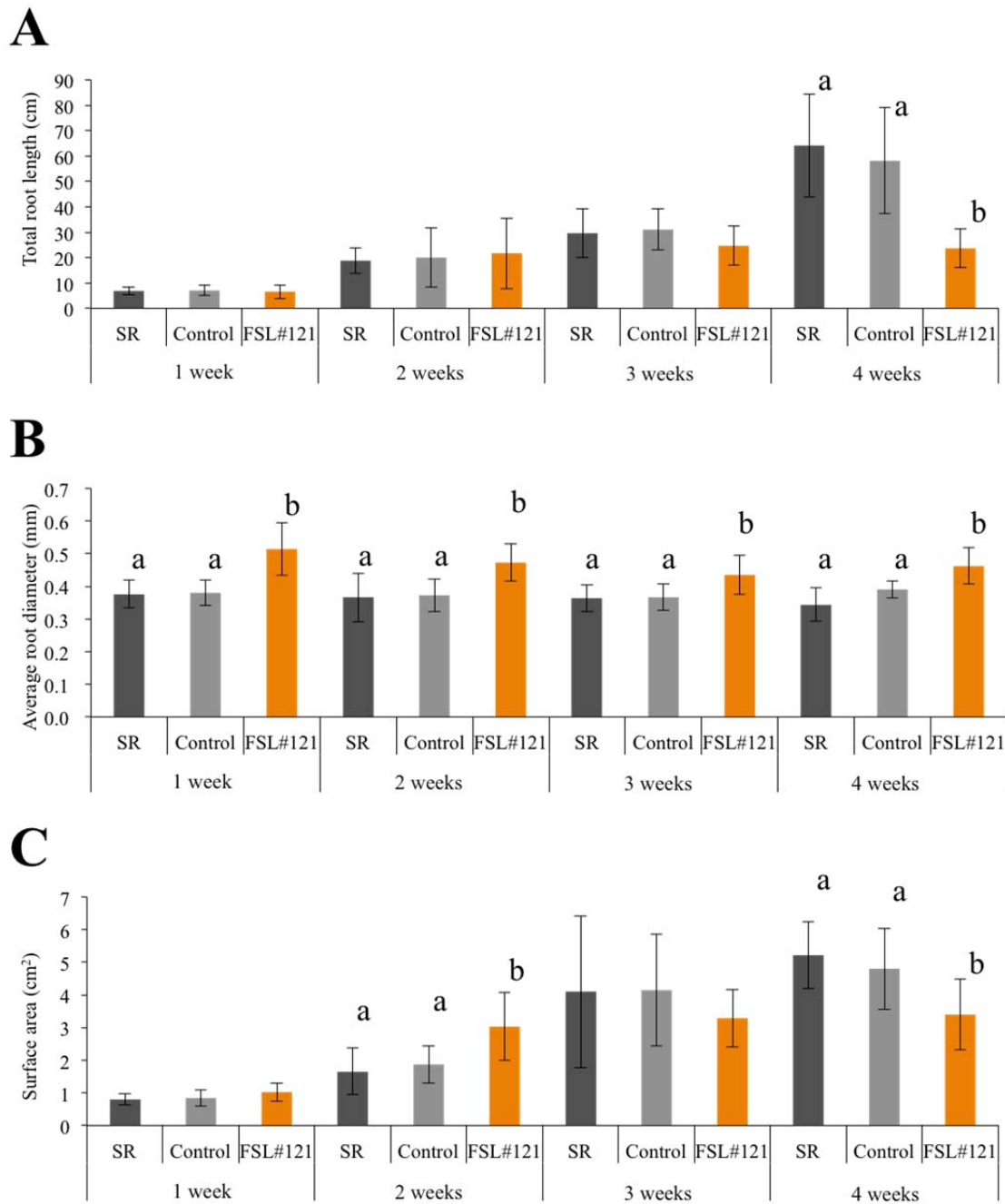


**Fig. 2-3.** Image of complimentary region in FSL#121 plant.

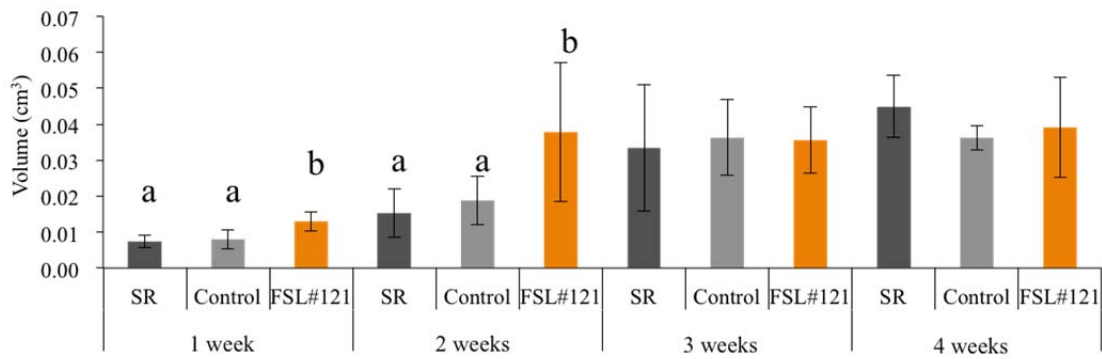
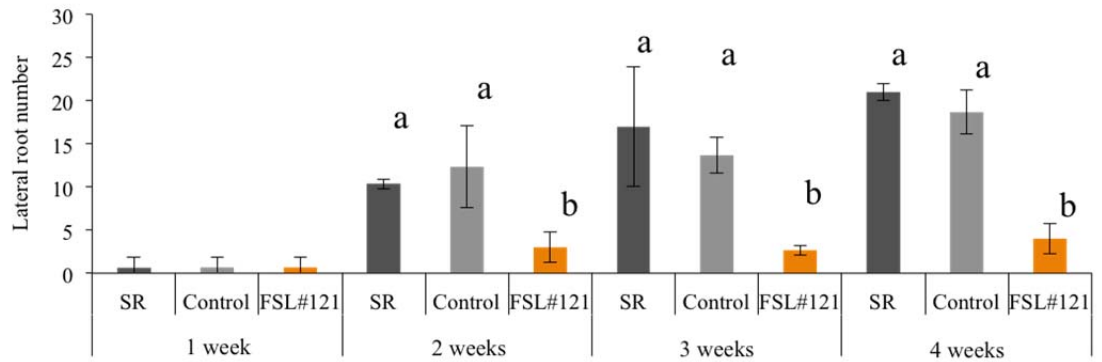
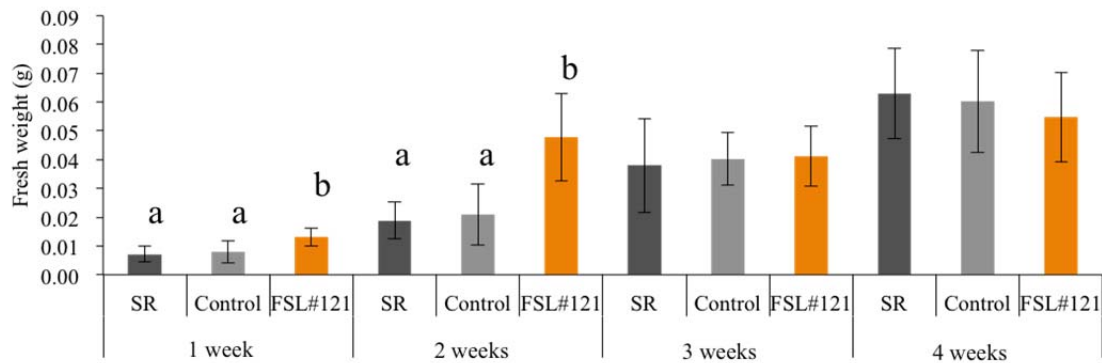


**Fig. 2-4.** Expression analysis of the *SYNC1* gene by RT-PCR in SR, Control and FSL#121. The upper panel shows the expression of *SYNC1*; the lower panel shows the expression of the *ACTINI* gene used as an internal standard.





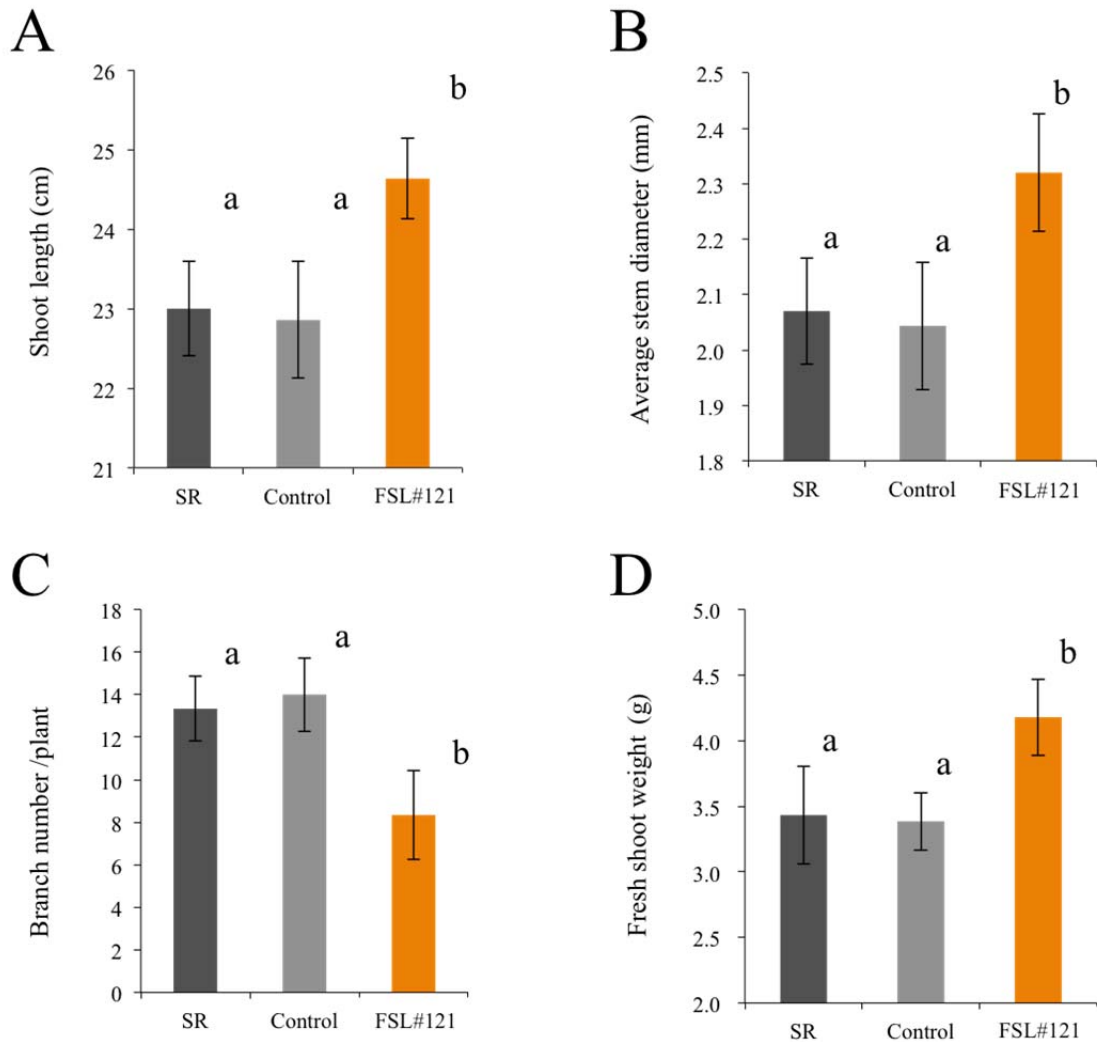
**Fig. 2-5.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#121. A, B and C indicate total root length, average root diameter and surface area, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**A****B****C**

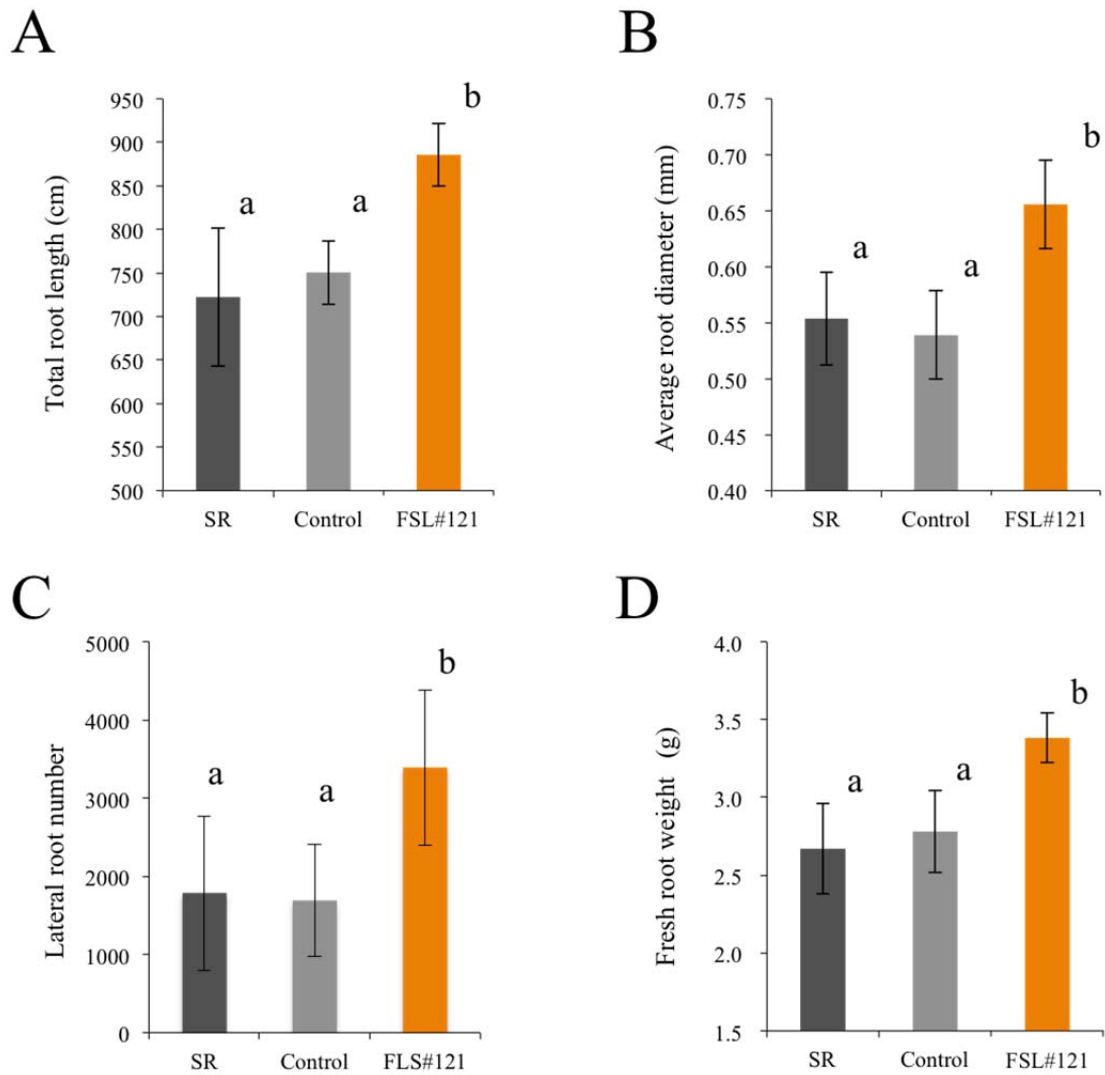
**Fig. 2-6.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#121. A, B and C indicate volume, lateral root number and fresh weight, respectively. White arrows indicate branch stems. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



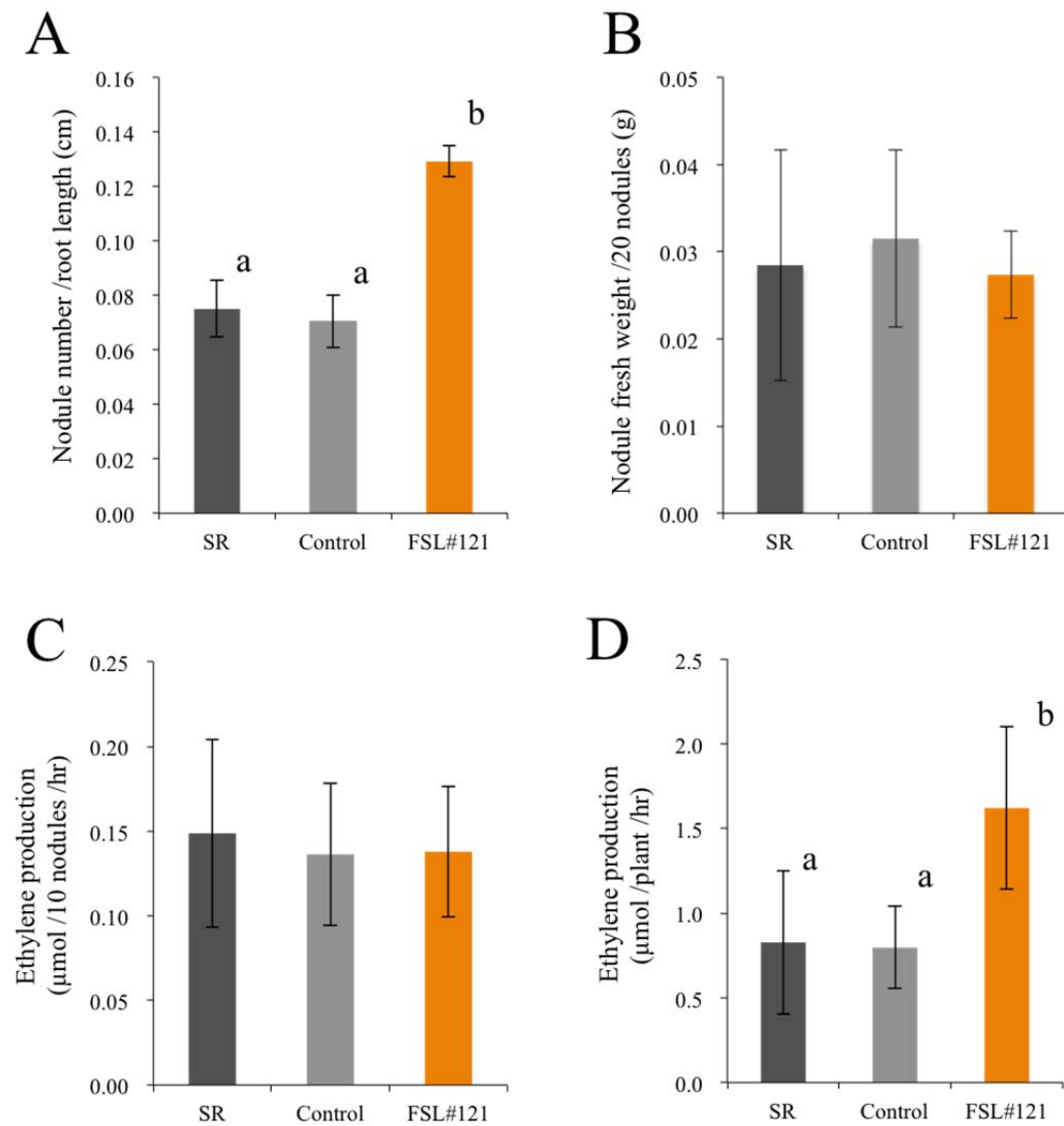
**Fig. 2-7.** Comparison of phenotypes in SR, Control and FSL#121 cultured for 2 weeks. Photograph indicates SR (A), Control (B) and FSL#121 (C). White arrows indicate branch stems. The white bar indicates 5 cm.



**Fig. 2-8.** Evaluation of shoot phenotypes in SR, Control and FSL#121. A, B, C and D indicate shoot length, average stem diameter, branch number and fresh shoot weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2-9.** Evaluation of root phenotypes in SR, Control and FLS#121. A, B, C and D indicate root length, average root diameter, lateral root number and fresh root weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2-10.** Measurement of nodule number and ethylene production in SR, Control and FSL#121 nodules. A, B, C and D indicate nodule number per root length, nodule fresh weight per 20 nodules, ethylene production per 10 nodules and ethylene production per plant, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

多く、単位根長当たりの根粒数も増加していた(Fig. 2-10A). 着生した根粒の新鮮重に差はなく(Fig. 2-10B), 根粒あたりの窒素固定活性に差は見られなかったが(Fig. 2-10C), 根粒着生数に依存する形で、植物体あたりの窒素固定活性が FSL#121 で上昇した(Fig. 2-10D).

#### 2-3-4 アミノ酸解析

*SYNC1* 遺伝子発現のアミノ酸合成への影響を見るために、葉と茎、そして根から抽出した遊離アミノ酸を解析した. FSL#121 のアスパラギン量は葉と根で、SR と比較して、それぞれ 50%と 15%高い含量を示した. 一方で、茎のアスパラギン量は、SR よりも 42%低い含量となった(Table 2-1). また、FSL#121 のアスパラギン酸の含量は、SR よりも葉において 48%、根において 17%高い値を示したが、茎においては 36%低い含量を示した. また、バリンとリシン、そしてロイシンの FSL#121 の葉における含量は SR の含量より高く、FSL#121 の根のバリンとロイシンにおいても同様の結果となった. その他のアミノ酸に有意な差は見られなかったが、FSL#121 の植物体では一部のアミノ酸で SR と Control とは異なった含有パターンを示した.

#### 2-4 考察

##### *SYNC1* の発現によるアスパラギン含量の増加

FSL#121 には完全長の *SYNC1* が導入されている(Fig. 2-3). *SYNC1* は Asparaginyl-tRNA synthetase をコードしており、タンパク質翻訳に利用されるアスパラギンと tRNA の複合体合成を触媒する(Peeters *et al.* 2000). 植物において、*SYNC1* のような Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs)遺伝子は核とミトコンドリア、そして葉緑体ゲノムにコードされている. いくつかの核ゲノムにコードされている aaRSs は N 末端にトランジットペプチド配列を持っており、翻訳後に細胞質からミトコンドリアに移動する(Duchêne *et al.* 2005). シロイヌナズナは *SYNC1*, *SYNC2* そして *SYNC3* と呼ばれる 3 つの *SYNC* 遺伝子を保有しており、これらの遺伝子は N 末端のトランジット配列を持っておらず、主に細胞質で機能していると考えられている(Peeters *et al.* 2000).

FSL#121 のアミノ酸含量には SR と Control と比較して有意な差があり(Table

**Table 2-1.** Amino acid content of FSL#121, SR and Control tissues

	SR	Control	FSL#121
Asn ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FW)			
Leaf	56.1 $\pm$ 1.5a	57.3 $\pm$ 1.1a	84.3 $\pm$ 0.9b
Stem	143.5 $\pm$ 6.8a	131.4 $\pm$ 7.1a	83.0 $\pm$ 8.4b
Root	136.1 $\pm$ 0.8a	132.9 $\pm$ 5.4a	156.4 $\pm$ 1.5b
Asp ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ FW)			
Leaf	6.3 $\pm$ 0.4a	5.6 $\pm$ 0.7a	9.2 $\pm$ 0.3b
Stem	13.8 $\pm$ 1.9a	12.5 $\pm$ 1.7a	8.8 $\pm$ 1.6b
Root	14.2 $\pm$ 0.2a	14.1 $\pm$ 0.6a	16.7 $\pm$ 0.9b
Val (nmol $\text{mg}^{-1}$ FW)			
Leaf	141.7 $\pm$ 29.6a	155.5 $\pm$ 14.9a	225.6 $\pm$ 9.9b
Stem	306.2 $\pm$ 12.9a	238.3 $\pm$ 13.8a	286.9 $\pm$ 47.1a
Root	354.4 $\pm$ 22.2a	349.5 $\pm$ 13.4a	498.6 $\pm$ 16.7b
Lys (nmol $\text{mg}^{-1}$ FW)			
Leaf	10.3 $\pm$ 2.7a	10.5 $\pm$ 3.2a	33.6 $\pm$ 9.3b
Stem	83.3 $\pm$ 11.3a	100.7 $\pm$ 9.7a	94.6 $\pm$ 9.0a
Root	82.1 $\pm$ 27.5a	84.1 $\pm$ 29.3a	114.8 $\pm$ 17.0a
Leu (nmol $\text{mg}^{-1}$ FW)			
Leaf	15.9 $\pm$ 11.1a	29.5 $\pm$ 12.6a	121.5 $\pm$ 37.8b
Stem	33.0 $\pm$ 8.6a	32.4 $\pm$ 7.6a	41.0 $\pm$ 10.0a
Root	55.3 $\pm$ 7.7a	63.6 $\pm$ 5.9a	98.8 $\pm$ 11.3b

Results are expressed as means  $\pm$  SD from 5 replications. Different letters indicate significant differences by multiple comparison of Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



2-1), これは *SYNC1* 遺伝子の発現がアスパラギンやアスパラギン酸の含量を増加させ、さらにそれらのアミノ酸の下流の反応で合成されるアミノ酸含量にも影響したと考えられる。本研究のアミノ酸解析の結果は、シロイヌナズナの Lysyl-tRNA synthetase をニンジンの細胞とトウモロコシの植物体で発現させた際の結果と類似している(Wu *et al.* 2003, 2007)。本研究の結果は、*SYNC1* の強発現によるアスパラギンやその他のアミノ酸の含量変化を示し、*SYNC1* タンパク質がアミノ酸含量に影響を与える可能性が示唆された。

### *SYNC1* の発現の表現型への影響

本研究における結果で、再分化植物における *SYNC1* 遺伝子の発現は、茎葉部と根のバイオマスの増加を同時に起こした(Figs. 2-8, 2-9)。分枝数の減少が FSL#121 で確認され、一般的に分枝数の減少はバイオマスの低下につながると考えられる。しかし、FSL#121 では、草丈や茎が肥大することで、分枝数減少の影響は打ち消され、さらに、増加する傾向を示した。再分化植物の根においては、総根長、平均根径だけでなく、側根数も増加し、新鮮重を増加させたと考えられる。一方で MS 液体培地を用いた根単独培養では、FSL#121 は SR と Control に比べて総根長が短く、また側根数が顕著に減少した(Figs. 2-5, 2-6)。FSL#121 では総根長と側根数に比例するように表面積と体積が減少したが、根径については再分化植物の解析時と同様に増加した。総根長や側根数の減少から、FSL#121 新鮮重の減少が予想されたが、培養初期では側根の影響を受けにくいことから、FSL#121 の新鮮重が SR と Control よりも多く、培養後期でも、同程度にとどまっていた。このように再分化植物と根単独培養において異なる結果を示し、再分化植物では根単独で培養した場合よりも生長量が増加した。これらの違いは地上部の存在に左右されると考えられ、再分化植物では地上部から光合成産物が供給されるため、より多くのバイオマス生産を行えたと推測される。

aaRSs は植物細胞内のタンパク質合成に不可欠な成分であり、この基本的な機能の欠如は初期発達の致死性を意味する。葉緑体やミトコンドリアで機能する aaRSs 遺伝子の欠損は胚形成への移行期における種子の発達不全を引き起こし、また受精の直後や直前の胚珠の発達不全を引き起こす(Berg *et al.* 2005)。同様に、*SYNC1* 遺伝子の欠損は胚の欠損を引き起こし (Berg *et al.* 2005)、また

glycyl-tRNA synthetase が不活性化したシロイヌナズナでは胚発達が抑制された (Uwer *et al.* 1999). これらの結果は, aminoacyl-tRNA 複合体の存在量の増加と aaRSs の発現促進が植物の発達と生長に影響を与えていることを示しているが, SYNC1 を含む asparagiyl-tRNA synthetase の発現が植物に与える影響についての知見はまだ少ない.

アスパラギンの大部分は tRNA 依存性のアミノ基転移経路におけるアスパラギン酸から合成される (Becker and Kern 1998). ミヤコグサやルーピンのようなマメ科植物において, 大部分の窒素はアスパラギンとして根粒から導管を經由して輸送される (Morot-Gaudry *et al.* 2001). ルーピンにおけるアスパラギンは, 種子発達時の主な窒素栄養源となる (Atkins *et al.* 1975). 加えて, ルーピン種子では, アスパラギンが発芽と発達時のデンプン蓄積を促進することも報告されている (Borek *et al.* 2013). これらの報告は, アスパラギンレベルの増加が結果として高いバイオマス量と収量を誘導することを示唆している. 本研究において, FSL#121 における SYNC1 遺伝子の発現によるアスパラギン量の増加 (Table 2-1) は, 地上部と地下部のバイオマスを増加させた. これは *Lotus* 属において, アスパラギン含量の増加が茎葉部と根部のバイオマスを改善した最初の報告となる. マメ科植物, 特にセイヨウミヤコグサにおける SYNC1 発現はアミノ酸代謝に影響を与えている可能性がある. 本研究の結果は, 飼料作物の収量改善に貢献し, アミドにより固定窒素輸送を行うマメ科植物における SYNC1 遺伝子の機能同定にとって重要な知見となる.

#### SYNC1 遺伝子発現の根粒形成への影響

FSL#121 は単位根長あたりの根粒数が増加しただけでなく, 植物あたりの根粒数も SR と Control と比較して増加していた (Fig. 2-10A). FSL#121 の根粒新鮮重は SR と Control と同様で (Fig. 2-10B), 根粒あたりの窒素固定活性も FSL#121 と SR と Control に差がなかったが (データ示さず), FSL#121 では根粒を多く着生したことから, 植物あたりの窒素固定活性が増加した (Fig. 2-10C). これらの結果は FSL#121 において, SYNC1 遺伝子の発現が根粒着生に影響を与えたことを示唆している.

アルファルファの Asparagine synthetase 遺伝子の過剰発現によって, アスパラ

ギンの含量は増加することが報告されている(Shi *et al.* 1997). ミヤコグサにおいて、低い Glutamine synthetase の量が、高いアスパラギン含量を引き起こし、さらに根粒の新鮮重と乾燥重を変化させた(Harrison *et al.* 2003). アスパラギンは N-Feedback 調節の役割を持っており、結果として根粒内のアスパラギン含量を増加させ、根粒活性を低下させた (Sulieman *et al.* 2010). 加えて、アスパラギンだけでなく、他のアミノ酸代謝変化もマメ科植物と根粒菌の共生による窒素固定を促進する (Lodwig *et al.* 2003). このように、アスパラギンを含む植物のアミノ酸は根粒着生に影響を与えている. 本研究で確認できた根粒着生数の増加は、*SYNCl* 遺伝子の発現に誘導されたアミノ酸代謝の変化が引き起こしたと考えられる.

## 第3章 *Agrobacterium* 由来 *rolB* 遺伝子を発現した FSL#35 の解析

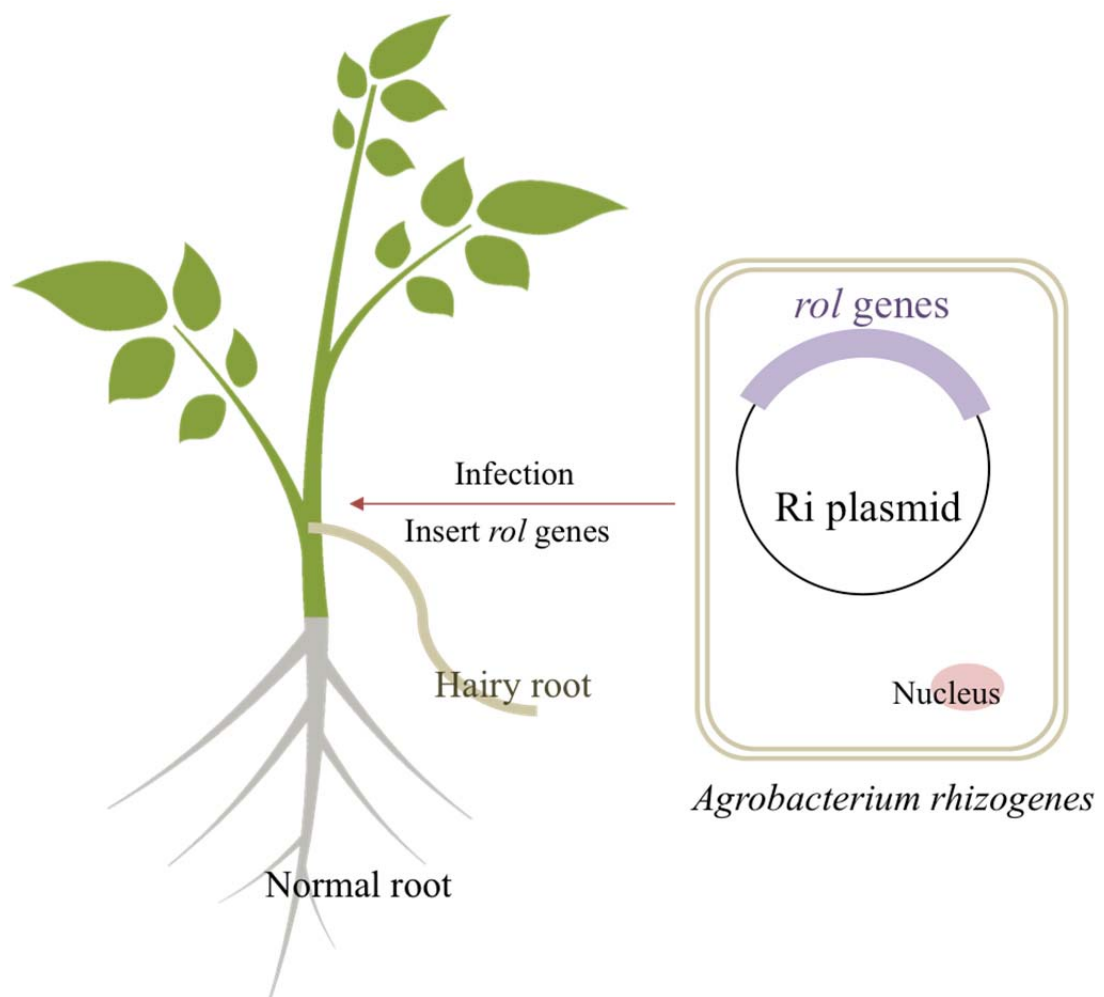
### 3-1 緒論

*rolB* 遺伝子は *Agrobacterium rhizogenes* Ri プラスミド中に存在する TL-DNA 中の遺伝子の 1 つであり, TL-DNA は植物細胞に *A. rhizogenes* を接種した際に, 接種箇所が生じる毛状根(Hairy root)の原因遺伝子として報告されている(Fig. 3-1)(Cardarelli *et al.* 1987, Nilsson and Olsson 1997, Aoki and Syōno 1999). 形質転換タバコを用いた先行研究では, *rolB* 遺伝子は *rolA* 遺伝子, もしくは *rolC* 遺伝子と同時に機能した際に, 根の形成を促進する(Spena *et al.* 1987). しかし, *rolB* 遺伝子の機能は, 根の形成を制限するだけでなく, 新規の花芽形成や茎頂成長点の形成(Altamura *et al.* 1994, Koltunow *et al.* 2001), 単為結実の誘導(Carmi *et al.* 2003), そして雌しべと葯の成熟を遅延させる(Cecchetti *et al.* 2004)ことなどが報告されている. *rolB* 遺伝子のホモログを持つタバコにおいて, 雄ずい発達中の procambial cell と導管の分化のバランスを変化させることも報告されている(Cecchetti *et al.* 2007). さらに, 植物細胞中での *rolB* 遺伝子の発現はプログラム細胞死を抑制し(Bulgakov *et al.* 2012, Gorpenchenko *et al.* 2012), そしてこの細胞死の抑制は酸化ストレスに関与する活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)合成の下方調整により引き起こされる(Bulgakov *et al.* 2012). これらの報告から, *rolB* 遺伝子の発現は茎葉部の表現型や酸化ストレス耐性に影響するために作物の生産に有用であると考えられるが, 根における *rolB* 遺伝子発現の影響はまだよく分かっていない. シロイヌナズナで *rolB* 遺伝子発現の影響が見られなかったが, 先行研究では, *rolB* 遺伝子を発現した FSL#35 は SR に比べて根の伸長度が高い系統であると報告されている(Himuro *et al.* 2011). そこで本研究では FSL#35 の解析により, *rolB* 遺伝子のマメ科植物における機能解析を行った.

### 3-2 実験方法

#### 3-2-1 実験材料の継代操作と培養条件

本実験に供試したのは, FOX-SR 系統の FSL#35, SR そして Control の *in vitro* で培養した単独培養根と再分化植物である. Control は 2-2-1 と同様に FOX-hunting system に使用されたベクター pBIG2113SF の非遺伝子導入ベクターである



**Fig. 3-1.** Effect of *rol* genes insertion by *Agrobacterium rhizogenes* infection.

pBIG2113N の配列が挿入された系統を使用した。これらの単独培養根と再分化植物は 2-2-1 と同様の方法で継代培養され、実験に使用した。

### 3-2-2 導入遺伝子の解析

FSL#35 に導入された遺伝子の配列は、2-2-2 と同様の方法を用いて解析した。解析結果は総合データベース Nucleotide(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)における BLAST 検索により挿入配列の詳細を調査した。

### 3-2-5 発現解析

発現解析は 2-2-2 と同様の方法でプライマーを変更して行った。使用プライマーは、*rolB* 発現確認用として L35-RT3-Fw (5'-GGTCACTTTTAACTCCAGCAAG-3') と L35-RT3-Rv (5'-AGAAAGTGCTGAAGGAACAATC-3') を使用した。RT-PCR 用のプライマー L35-RT3-Fw と L35-RT3-Rv は、FSL#35 の配列を元に設計した(Fig. 3-2)。リファレンス遺伝子として *ACTIN1* 遺伝子を用い、使用プライマーは 2-2-2 と同様である。

### 3-2-4 表現型解析

FSL#35 の表現型解析は 2-2-5 と同様の方法を用いて、*in vitro* における根単独培養による伸長解析と、再分化植物の生長解析を行った。

### 3-2-5 呼吸活性の測定

Triphenyl tetrazolium chloride(TTC)還元活性を用いて、単独培養根の呼吸活性を解析した。TTC は呼吸の律速酵素である succinate dehydrogenase により formazan と呼ばれる赤色の不溶性物質に還元される(Block and Brouwer 2002)ため、合成された formazan 量を測定することで、植物組織の呼吸活性評価を行うことができる(Block and Brouwer 2002)。継代培養した根の側根を根端から 2 cm 切り取り、ホルモンフリーの MS 液体培地で 2 週間培養した。培養後、培養根は TTC 溶液(0.5% TTC, 0.05% sodium phosphate buffer, pH 7.0)中にて 30°C、暗所にて一晩静置した。インキュベーション後、formazan 合成パターンを比較するために、写真を撮った。その後、側根を取り除き、主根にあたる根を先端から 5 cm 切り

取り、それをさらに1 cm ずつの5つのセクションに分け、formazan 合成量を測定した。それぞれのセクションを1 mLの95%エタノールを注入した1.5 mL チューブに移し、80°C で5分間のインキュベーションにより、formazan を組織から95%エタノールへ溶出させた。ブランクには10分間煮沸して酵素を失活させた根を用いて同様のTTC還元活性を測定した。95%エタノール中に含まれるformazan量の測定は分光光度計UVmini 1240 (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて470 nmの吸光度測定により測定した。

### 3-2-6 顕微鏡観察

細胞サイズを測定するために、根の薄切片の顕微鏡観察を行った。SR と Control, そして FSL#35 の2週間培養した単独培養根から、側根を採取し、根端と基部を約1 cm ずつサンプリングした。また、主根の根端と基部も同様にサンプリングした。サンプリングした切片を FAA 液(formalin: acetic acid: ethyl alcohol: distilled water = 1:1:9:9)に浸漬し、水流アスピレーターによる脱気を行い固定した。固定後、濃度の異なるエタノール水溶液(60, 80, 90, 99.5, 100%)を用いて、段階的に脱水し、脱水組織を Technovit 7100(Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany)に包埋した。包埋組織は、カミソリで形を整えた後に、ミクロトームを用いて薄切した。薄切片は0.05%のトルイジンブルー(in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8))に1分間浸漬し、その後蒸留水で洗い余分な染色液を取り除いた。染色セクションは ECLIPSE E600 microscope で観察し、DXM1200F digital camera (Nikon, Tokyo, Japan)を用いて、写真撮影を行った。撮影写真の細胞サイズは画像解析ソフト Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて、皮層細胞と内鞘細胞の細胞サイズの測定を行った。

### 3-2-7 植物ホルモン解析

植物ホルモンの解析は、解析サンプルの培養とサンプリングを行い、ホルモン含量の解析は植物科学最先端研究拠点ネットワーク (<http://www.psr-net.riken.jp>)の協力を仰いだ。サンプリングのために、維持培養した側根の根端2 cm を培養した。4週間の培養後、サンプルを氷上で細かく刻み、2 mL チューブに100 mg サンプリングした。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 導入遺伝子の確認と発現解析

シーケンス解析により, FSL#35 に *A. rhizogenes* の *rolB* 遺伝子の導入が確認された(Fig. 3-2). BLAST 検索の結果, FSL#35 には *rolB* 遺伝子の CDS (780 bp) の挿入が確認できた(Fig. 3-3). FSL#35 の *rolB* 遺伝子の発現は RT-PCR を用いて解析した. シーケンス解析によって解析された FSL#35 に導入されている断片の配列情報(Fig. 3-2)より設計したプライマーを使用して RT-PCR を行ったところ, FSL#35 の cDNA をテンプレートとした反応区のみで断片の増幅が確認できた(Fig. 3-4). 増幅は葉, 茎そして根でもみられ, FSL#35 の全ての組織で *rolB* 遺伝子の発現が確認できた.

#### 3-3-2 表現型解析

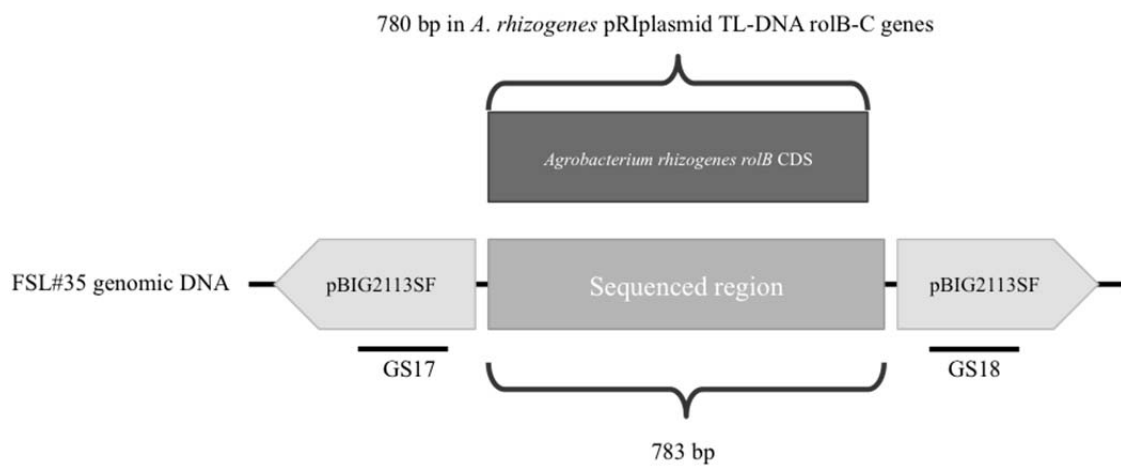
*rolB* 遺伝子の発現の表現型への影響を調査するために, *in vitro* における根単独培養における根長, 根径そして表面積を測定した. 結果 FSL#35 では総根長が SR と Control に比較して増加していた(Fig. 3-5A). また, FSL#35 では側根数が SR と Control に比べ増加しており, その傾向は培養開始から 3 週間と 4 週間目で顕著であった(Fig. 3-6B). 平均の根径は FSL#35 と SR, Control に有意な差は検出されなかった(Fig. 3-5B). FSL#35 は SR と比較して顕著な根単独培養時の促進が観察できた.

再分化植物の解析においては, FSL#35 の茎葉部は SR と Control と比較して差異を示さなかった(Figs. 3-7, 3-8). FSL#35 の分枝数は SR と Control に比べ平均数がやや劣るものの, 有意な差はみられなかった(Fig. 3-8C). 一方で, FSL#35 の再分化植物の根部では根単独培養の結果と同様の結果が得られた. FSL#35 再分化植物の総根長は増加し, 側根数も増加する傾向が見られた(Fig. 3-9AC). しかしながら, FSL#35 の根部新鮮重は有意に減少していた(Fig. 3-9D). また, FSL#35 で根粒着生数に有意な差はなく, 着生する根粒のサイズにも差は検出できなかった(Fig. 3-10). このように FSL#35 では根単独培養時における SR と異なる変化が確認でき, 同様の変化が再分化植物でも確認できたが, FSL#35 再分化植物の根部の新鮮重は, 根単独培養時の結果と相反するものであった.

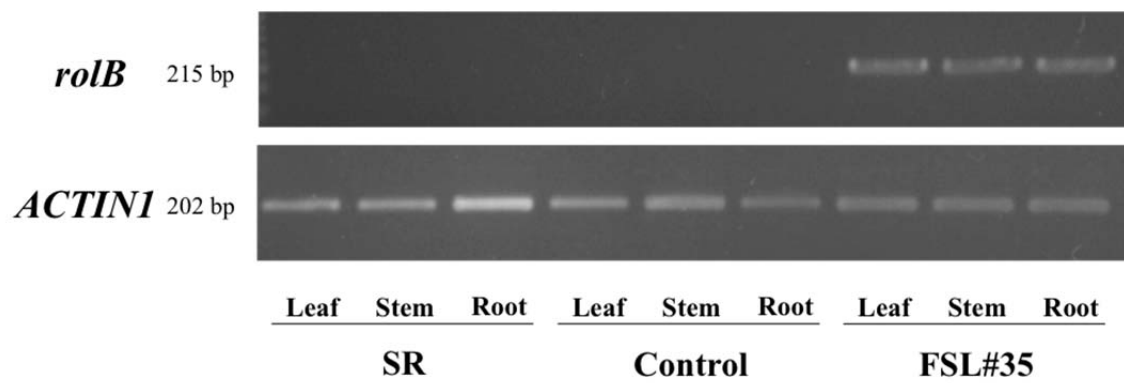


TCCTCTAGAGGCCCTTATGGCCTTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGCA  
GGCTTCATGACGCCCTCCTCGCCTTCCTGATCAGGCCCCGAGAGTCGCAGGG  
TTAGGTCTGGCTCCGGTGAGGAGGCGGCCGGACGTGATATCCCGAGGGCATT  
TTTGGTGAATTGTGTGGTGCCGCAAGCTACAACCTCATAGGGGCGGTTTTCA  
GTCCCTCGCCGCAGAAAGAAGGTGCAAGCTACCTCTCTCCCGTAAACGTTGG  
TCACTTTTAACTCCAGCAAGTGAATGAACGAGGAACTTGCGAAAATGGCGAT  
GAAGCATTCTAAATCAGGTTCCCTCCGTGCGGCTGTGCGGCCAAGCAAGGTTG  
TGAACACGGAGCATCTCCTGGTGGGCGAGCTCGCTCCGATATGGTTGAATCG  
TTGTCGCCAGCACGGCCTCCATTCCAAATGTAATGGATTGTTTCCTTCAGCACT  
TTCTGCATCTTCTCGCGAGAAAGATAGACAAATACATGTTGGTCGTTTTCTCG  
AGCCAGATCCGGCTGACTAACAACATAGGAGGATGATAGCAGACTTTGTTC  
TTCAAGAGCTCAGCTAGTTGTTTAAGTATATATATCGGGTGGAGAGTTTTCCTT  
CAAATCTAGCACTGCAAGAGCCATCGTTTCTGGAAATGCAGGAGGGGTTTG  
CTATAGTCACGGCTATAGATTGCAAAAAGCAAATCGGATCCCCTCGAATAGGTT  
TATCTGGCTCCATGCTGGAGTGAGATCTACTGGTTGAAATCGTGGGAATAGCA  
ATTTGGGATCCATGGCCGATTTGGCCTCTAGATGTAGTTGTAGAATGTAAAAT  
GTAATGTTGTTGTTGTTT

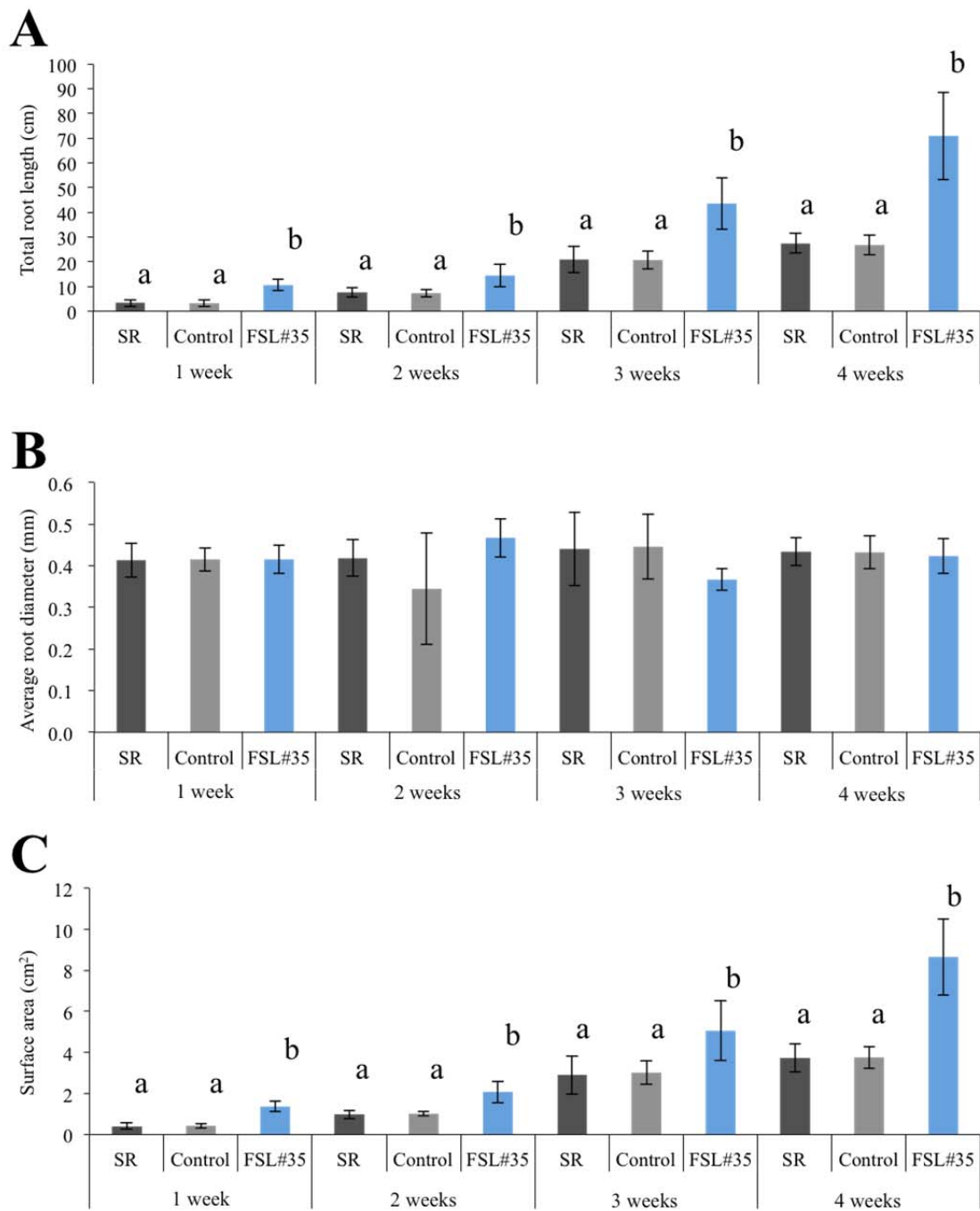
**Fig. 3-2.** Sequence data of FSL#35. Blue characters indicate vector sequence. Black characters indicate *rolB* gene sequence. Shaded characters indicate primer position for RT-PCR.



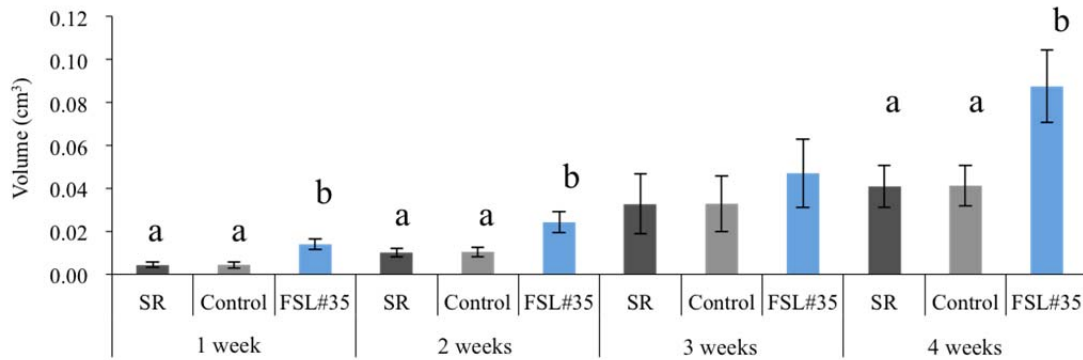
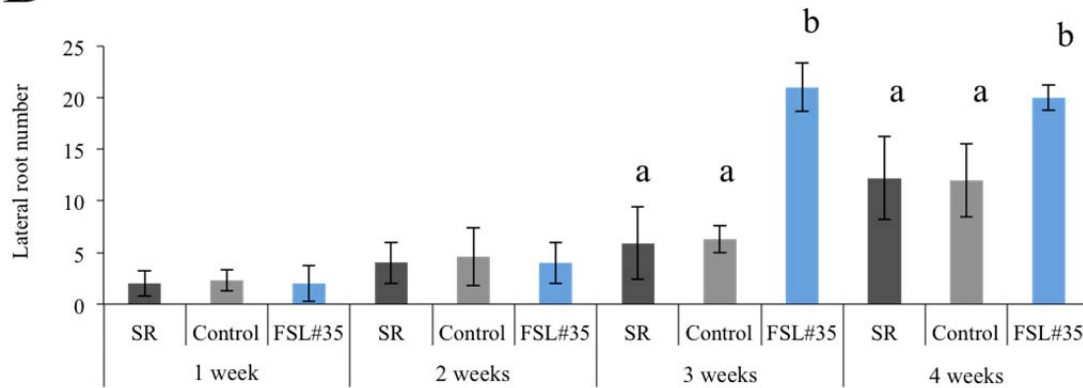
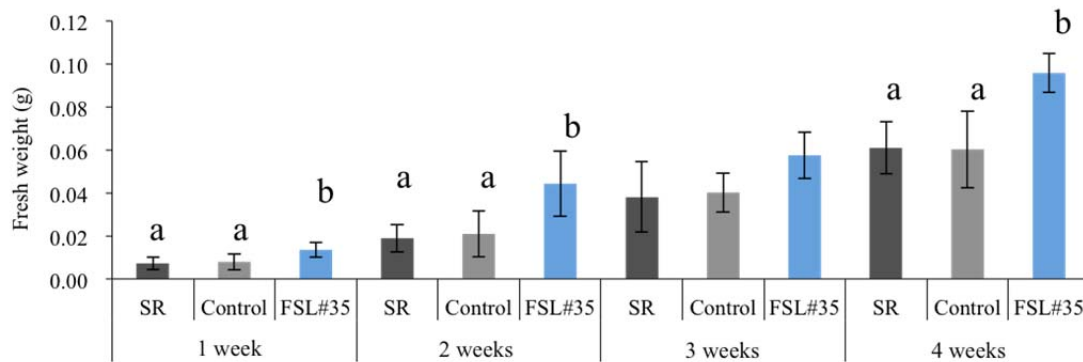
**Fig. 3-3.** Image of complimentary region in FSL#35 plant.



**Fig. 3-4.** Expression analysis of the *rolB* gene by RT-PCR in SR, Control and FSL#35. The upper panel shows the expression of *rolB*; the lower panel shows the expression of the *ACTINI* gene used as an internal standard.



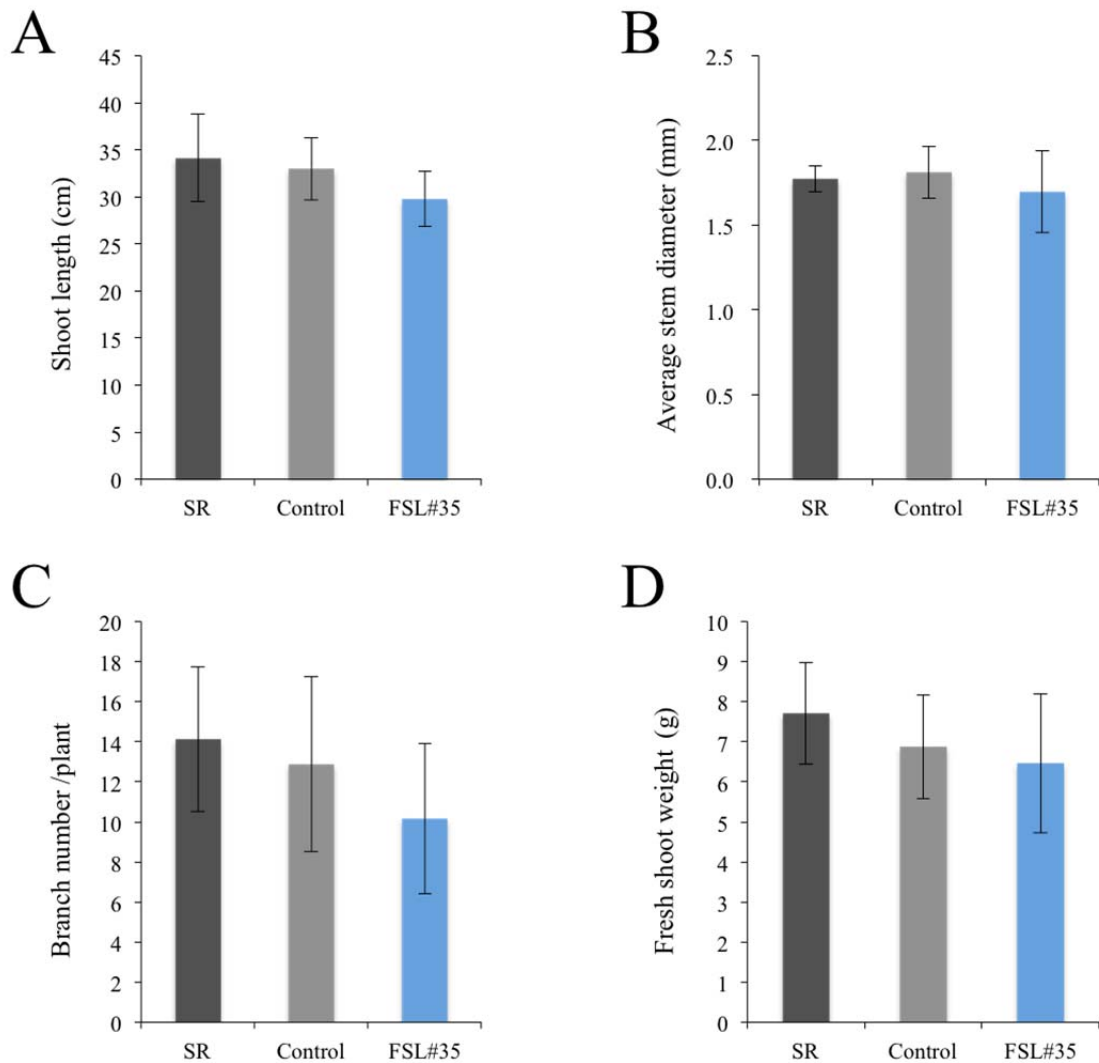
**Fig. 3-5.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#35. A, B and C indicate total root length, average root diameter and surface area, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**A****B****C**

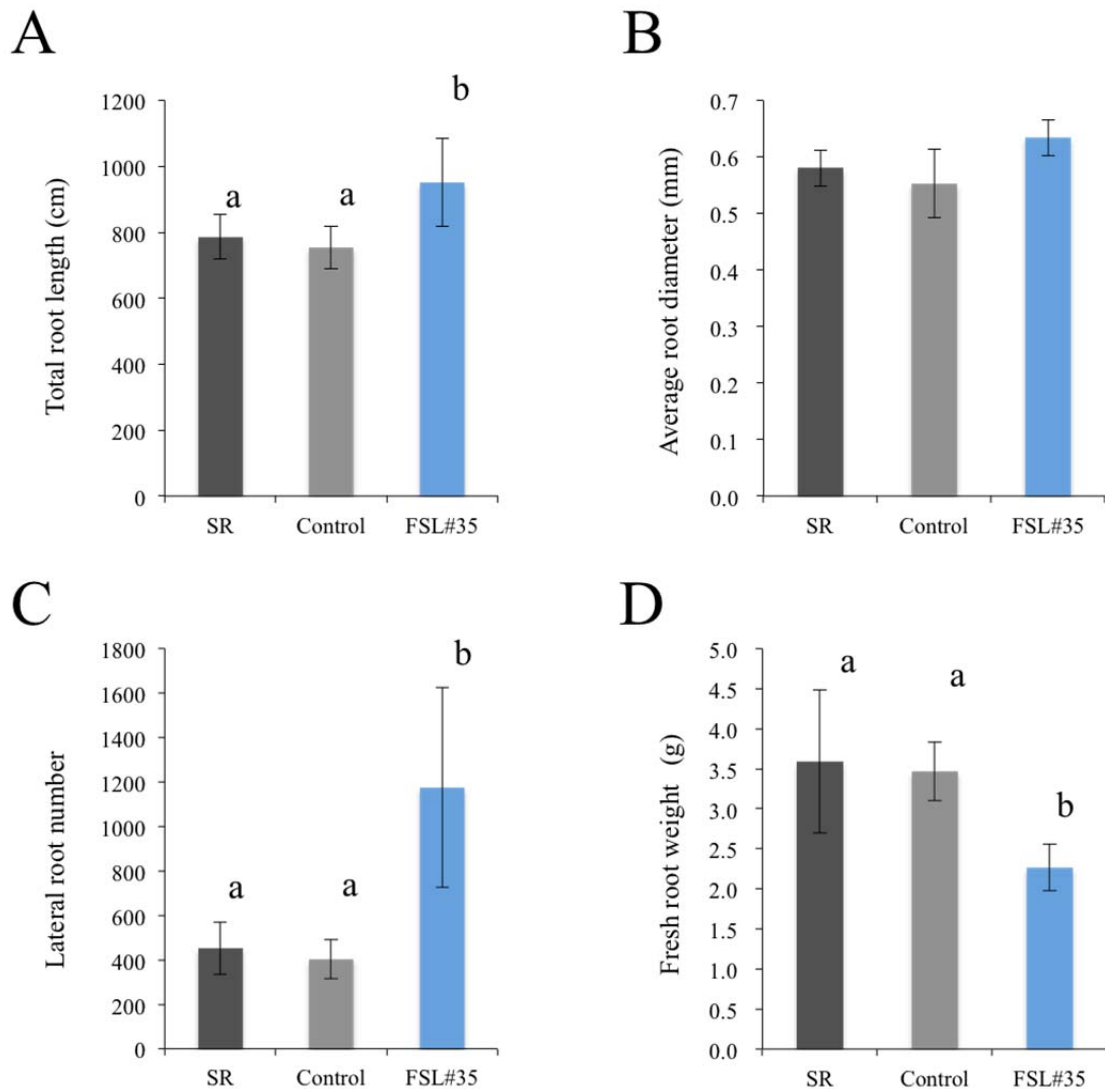
**Fig. 3-6.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#35. A, B and C indicate volume, lateral root number and fresh weight, respectively. White arrows indicate branch stems. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3-7.** Comparison of phenotypes in SR, Control and FSL#35 cultured for 2 weeks. Photograph indicates SR (A), Control (B) and FSL#35 (C). The white bar indicates 5 cm.

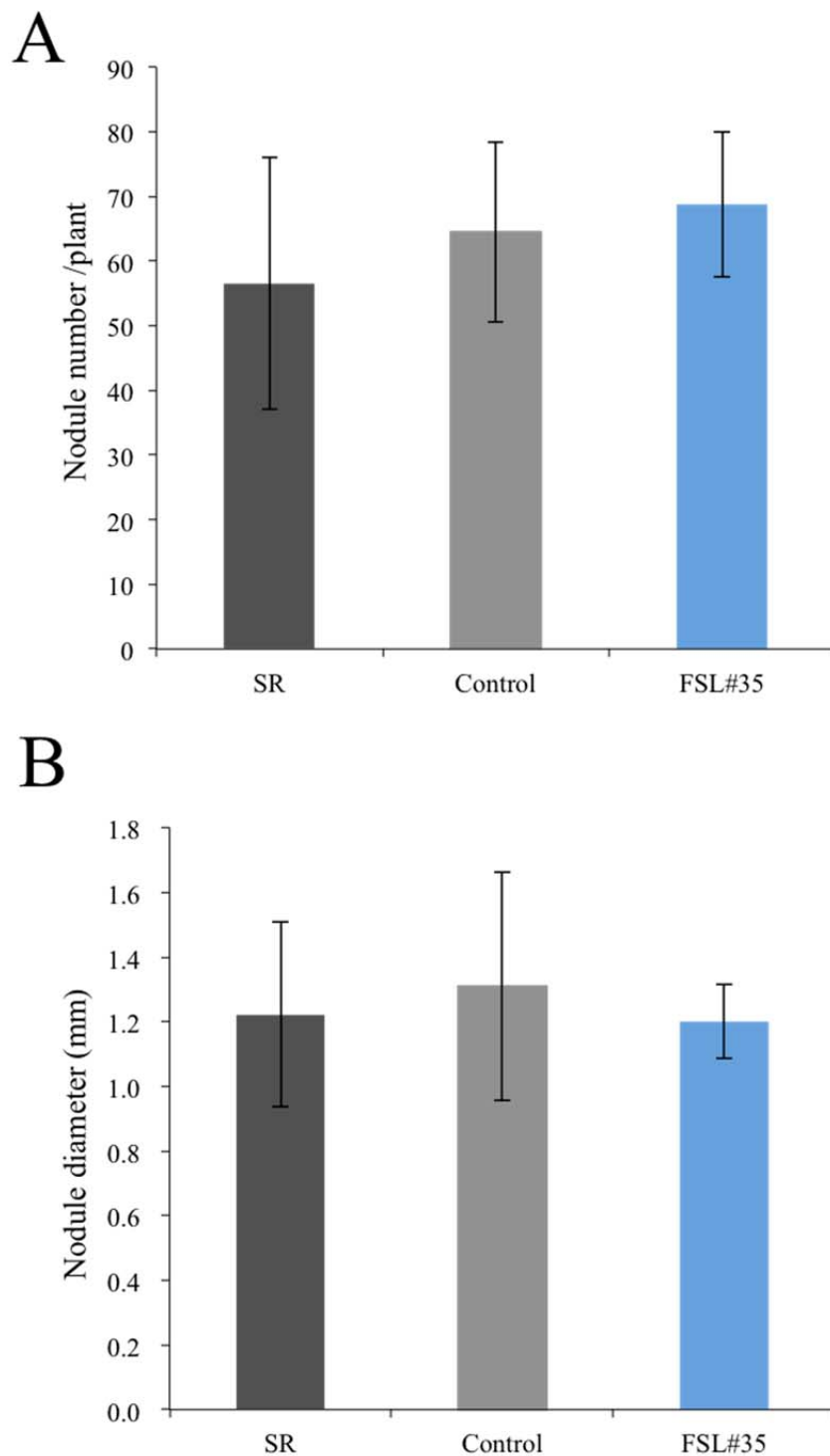


**Fig. 3-8.** Evaluation of shoot phenotypes in SR, Control and FSL#35. A, B, C and D indicate shoot length, average stem diameter, branch number and fresh shoot weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3-9.** Evaluation of root phenotypes in SR, Control and FSL#35. A, B, C and D indicate root length, average root diameter, lateral root number and fresh root weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).





**Fig. 3-10.** Measurement of nodule number and ethylene production in SR, Control and FSL#35 nodules. A and B indicate nodule number per plant and nodule diameter, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3-3-3 呼吸活性の測定

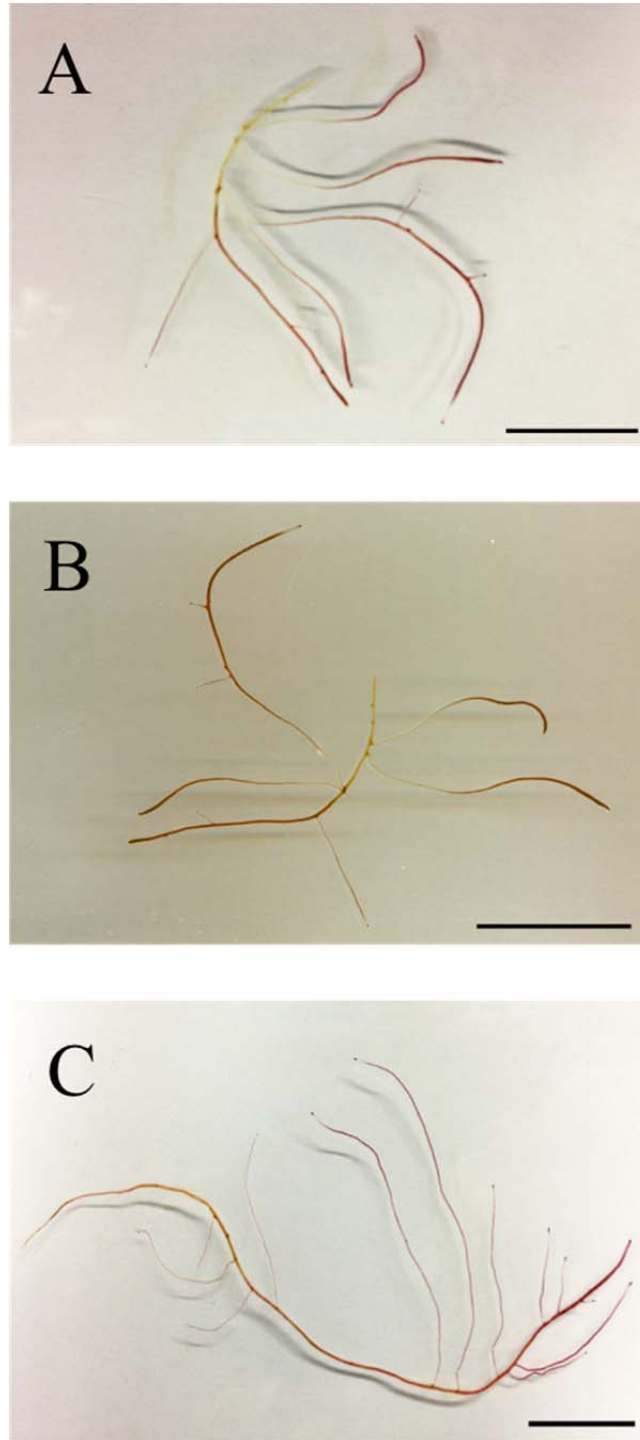
Fig. 3-11 は FSL#35 と SR, Control の単独培養根を TTC 溶液内でインキュベートした後に撮影したものである。これらの写真から、FSL#35 と SR において formazan 生成パターンに違いがみられた。SR と Control の単独培養根は根端が赤く染まり、基部に向かいその赤色が薄くなった(Fig. 3-11AB)。一方で FSL#35 の単独培養根は培養根全体に formazan 蓄積が見られた(Fig. 3-11C)。この違いをより詳細に解析するために、根を 1 cm ごとのセクションに分けてその部分の formazan 量を測定して比較した。その結果、FSL#35 では全ての測定セクションで SR よりも高い formazan 量を検出した(Fig. 3-12)。さらに、最も活性の高いセクションの位置が異なり、SR においては先端よりやや根基部側で最も高い活性が見られたのに対し、FSL#35 では根端に高い活性部位がみられた(Fig. 3-12)。また、FSL#35 の最も呼吸活性が高い部位の formazan 量は、SR の formazan 量最高点よりも 55%高かった。このように、FSL#35 では TTC 還元活性を用いた呼吸活性測定で SR とは異なる反応を示した。

### 3-3-4 細胞サイズの測定

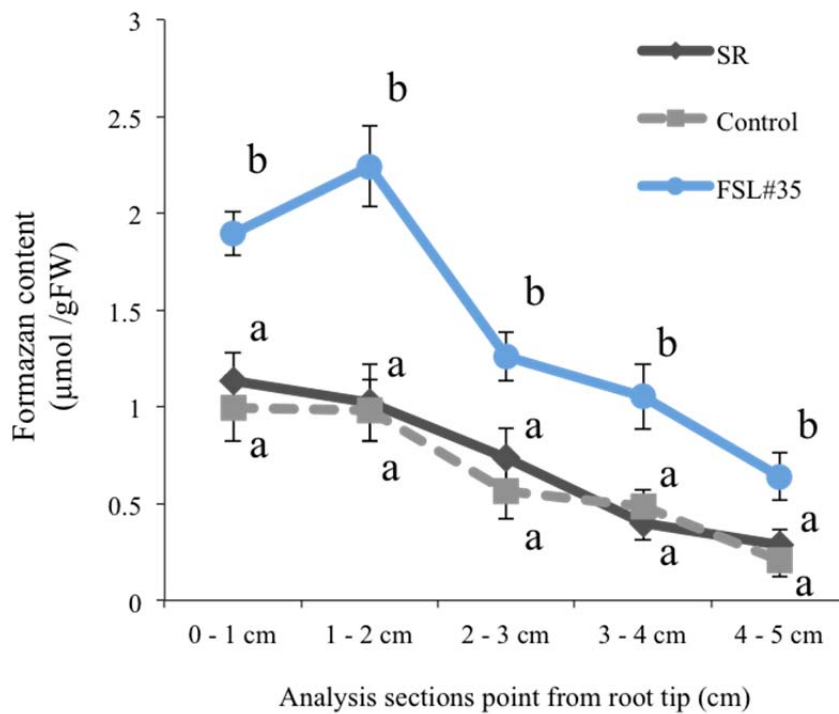
FSL#35 の皮層細胞は垂直方向への肥大を示した(Fig. 3-13, Table 3-1)。一方で FSL#35 と SR の皮層細胞の水平方向の細胞サイズには有意な差はみられなかった(Table 3-1)。また、FSL#35 の内鞘細胞のサイズは SR のそれに比べて垂直方向に短くなっており、しかし、水平方向のサイズに有意な差はなかった(Fig. 3-14, Table 3-2)。これらの結果は FSL#35 の皮層細胞と内鞘細胞において SR とは異なる細胞発達があることを示している。

### 3-3-5 植物ホルモン解析結果

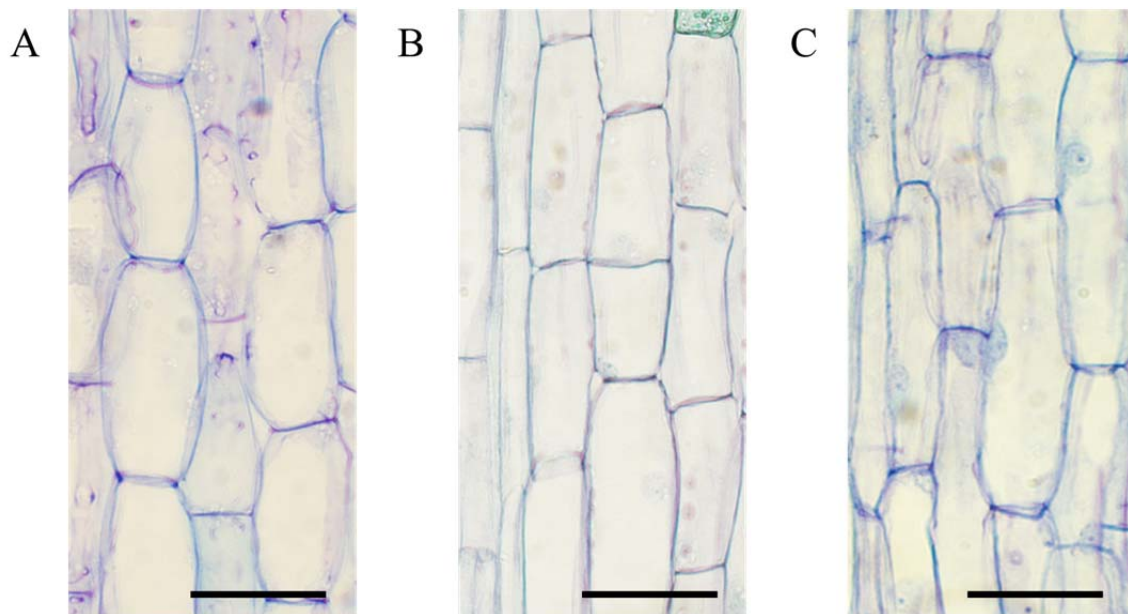
2 週間培養した FSL#35 の植物ホルモン含量を、SR と Control の培養根と比較した。FSL#35 のサイトカイニンとアブシジン酸の含量は SR と Control に比べて有意な減少を示した(Fig. 3-15AC)。一方で FSL#35 のオーキシンの含量に、SR と Control との有意な差は見られなかった(Fig. 3-15B)。以上のように、FSL#35 は SR と異なる植物ホルモンの含量を示した。



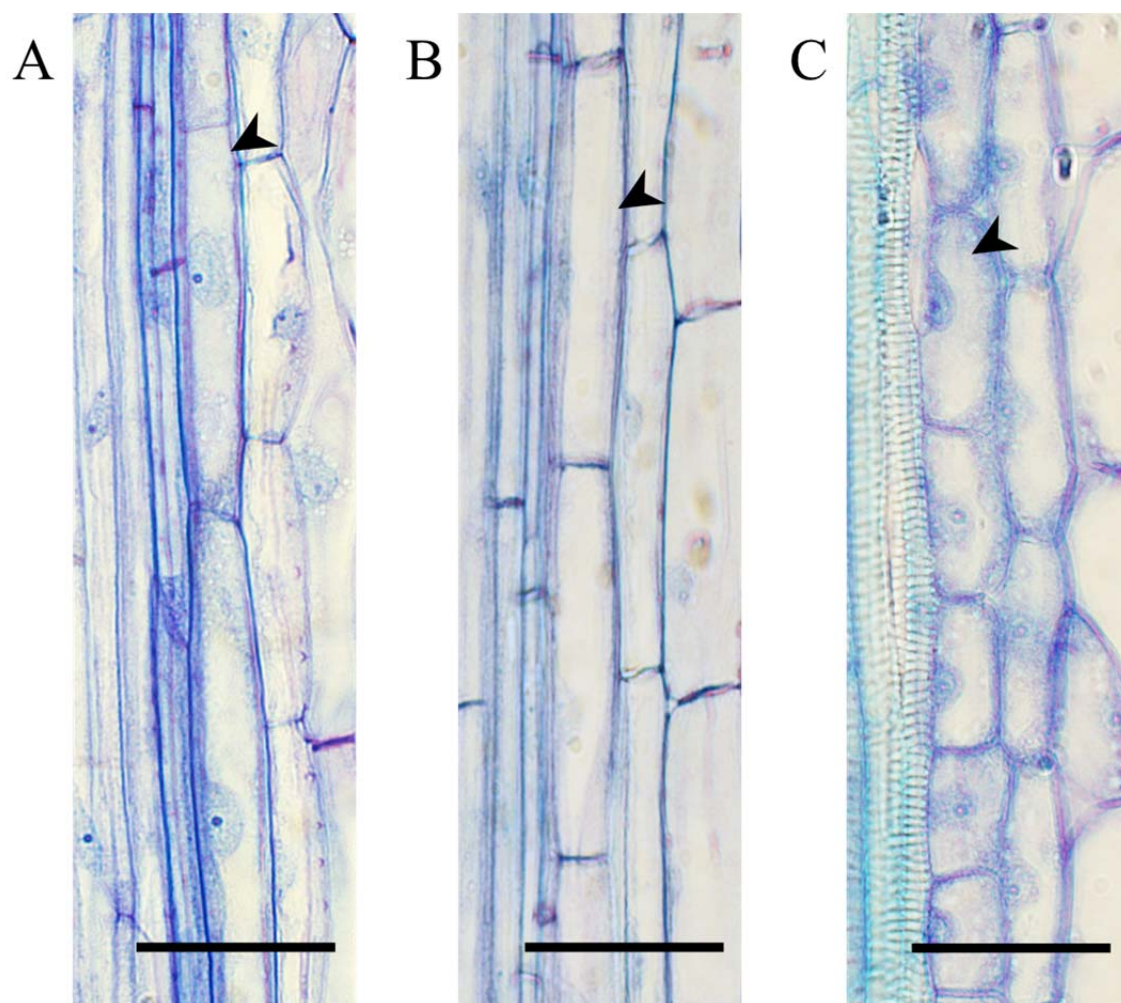
**Fig. 3-11.** Responses of TTC reducing activity in FSL#35, SR and Control. (A) is SR, (B) is Control and (C) is FSL#35 root appearance after incubation in TTC solution. Black bar indicates 2 cm.



**Fig. 3-12.** Relative contents of formazan in FSL#35, SR and Control at 470 nm absorbance. Results are expressed as means  $\pm$  SD from 3 independent experiments. The data of each section were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3-13.** Root cross sections. (A) Cortex cells in a SR root; (B) cortex cells in a Control root, and (C) cortex cell in a FSL#35 root. Black bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 3-14.** Root cross sections. (A) pericycle cells in a SR root; (B) Pericycle cells in a Control root, and (D) pericycle cells in an FSL#35 root. Black bar indicates 50 µm. Black arrowheads indicate a pericycle cell.

**Table 3-1.** Cortex cell width on several part of mono-culture roots.

		Short lateral root		Middle lateral root		Tap root	
		Tip	Base	Tip	Base	Tip	Base
Vertical direction ( $\mu\text{m}$ )	SR	57.5 $\pm$ 1.7a	91.9 $\pm$ 1.5a	57.7 $\pm$ 1.2a	80.4 $\pm$ 1.0a	66.1 $\pm$ 1.9a	80.6 $\pm$ 3.8a
	Control	55.1 $\pm$ 2.2a	88.9 $\pm$ 1.5a	57.9 $\pm$ 2.5a	76.1 $\pm$ 1.9a	59.7 $\pm$ 2.0a	80.7 $\pm$ 2.3a
	FSL#35	81.7 $\pm$ 3.5b	125.0 $\pm$ 3.1b	85.9 $\pm$ 5.0b	110.2 $\pm$ 2.1b	99.4 $\pm$ 5.3b	107.2 $\pm$ 2.7b
Horizontal direction ( $\mu\text{m}$ )	SR	16.3 $\pm$ 0.3	24.9 $\pm$ 0.8	17.5 $\pm$ 0.3	18.6 $\pm$ 0.5	29.0 $\pm$ 0.5a	29.4 $\pm$ 0.6
	Control	18.1 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 0.4	18.6 $\pm$ 1.4	21.9 $\pm$ 0.5	23.6 $\pm$ 0.5a	28.0 $\pm$ 0.5
	FSL#35	19.3 $\pm$ 0.6	23.8 $\pm$ 0.5	20.7 $\pm$ 0.7	20.6 $\pm$ 0.8	35.7 $\pm$ 0.9b	29.1 $\pm$ 0.9

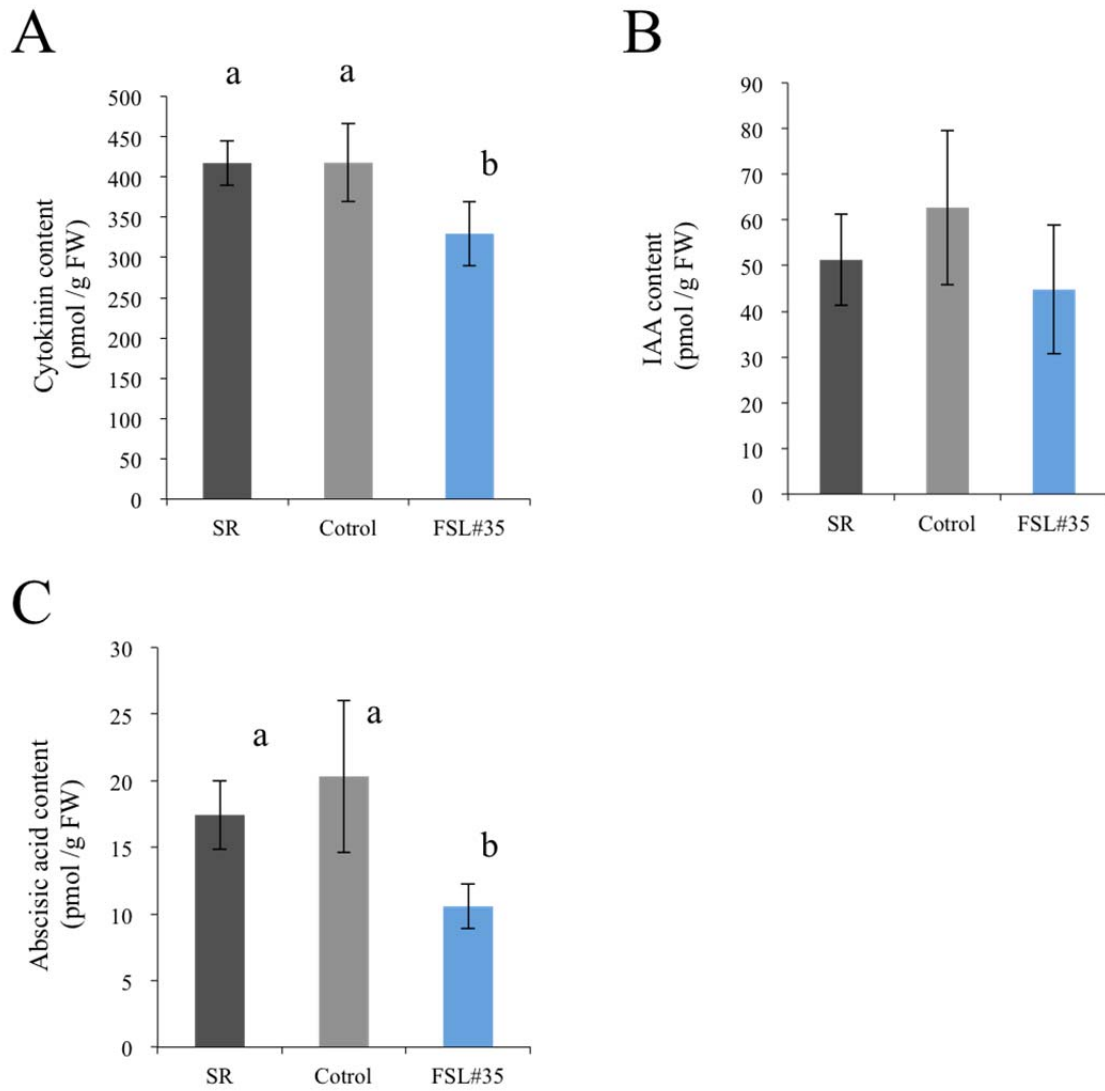
Results are expressed as means  $\pm$  SD from 5 replications. Different letters indicate significant differences by multiple comparison of Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

**Table 3-2.** Pericycle cell width on several part of mono-culture roots.

		Short lateral root		Middle lateral root		Tap root	
		Tip	Base	Tip	Base	Tip	Base
Vertical direction ( $\mu\text{m}$ )	SR	37.0 $\pm$ 0.4a	53.5 $\pm$ 1.9a	46.7 $\pm$ 0.9a	66.8 $\pm$ 2.5a	73.0 $\pm$ 3.2a	87.2 $\pm$ 3.3a
	Control	43.5 $\pm$ 1.0a	47.6 $\pm$ 0.8a	40.9 $\pm$ 1.4a	67.1 $\pm$ 1.3a	69.5 $\pm$ 6.7a	80.9 $\pm$ 2.6a
	FSL#35	28.0 $\pm$ 1.3b	30.6 $\pm$ 1.4b	34.9 $\pm$ 2.1b	43.3 $\pm$ 1.3b	48.4 $\pm$ 1.8b	53.0 $\pm$ 2.4b
Horizontal direction ( $\mu\text{m}$ )	SR	8.1 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.2a	10.0 $\pm$ 0.3a	9.7 $\pm$ 0.5a
	Control	7.6 $\pm$ 0.2	8.5 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.1a	8.7 $\pm$ 0.1a	10.3 $\pm$ 0.4a
	FSL#35	6.6 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.2b	15.1 $\pm$ 0.2b	14.7 $\pm$ 0.7b

Results are expressed as means  $\pm$  SD from 5 replications. Different letters indicate significant differences by multiple comparison of Tukey's test ( $P < 0.05$ ).





**Fig. 3-15.** Plant hormones contents in SR, Control and FSL#35. A is cytokinin content, B is IAA content and C is abscisic acid content. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3-4 考察

#### FSL#35 における *rolB* 遺伝子の発現の影響

本研究では *A. rhizogenes* の Ri プラスミド由来の *rolB* 遺伝子が発現した FOX-SR 系統の 1 つである FSL#35 を解析した(Figs. 3-2, 3-3). FOX hunting system では約 10, 000 の完全長 cDNA が *Agrobacterium* 発現ライブラリーに含まれている(Ichikawa *et al.* 2006). この手法において, *rolB* 遺伝子は形質転換効率を測るための内部標準遺伝子として利用された. 先行研究では, 側根形成や外生根形成における *rolB* 遺伝子の役割が明らかとなっている(Cardarelli *et al.* 1987, Capone *et al.* 1989, Moriuchi *et al.* 2004). シロイヌナズナを用いた FOX hunting system によって作出された *rolB* 強発現体においては *rolB* 遺伝子の発現の影響は示されなかったにもかかわらず(Ichikawa *et al.* 2006), 本研究において, FSL#35 では *rolB* 遺伝子発現の影響と推測される根の特異的な変化が確認できた. 加えて, 本研究がマメ科植物における *rolB* 遺伝子解析の新たなアプローチと新規の解析手法の報告例となる. *rolB* 遺伝子の発現は茎葉部の表現型や酸化ストレス耐性に影響するために作物の生産に有用であると考えられるが, 根における *rolB* 遺伝子発現の詳細な影響は不明である. シロイヌナズナで *rolB* 遺伝子発現の影響が見られなかったことから考えて(Ichikawa *et al.* 2006), *rolB* 遺伝子が本実験で使用した *L. corniculatus* のようなマメ科植物など, 特定の属や種において機能することが考えられる.

#### *rolB* 遺伝子が強発現した FSL#35 における根の伸長促進

*rolB*, *rolA* そして *rolC* 遺伝子は毛状根の原因遺伝子である. *A. rhizogenes* の接種部位に見られる毛状根の形成は, 細胞内で *A. rhizogenes* の遺伝子が発現することで引き起こされる(Spena *et al.* 1987). しかし, それらの遺伝子は植物の細胞に対して, 独立的な機能も持つ. 単細胞の解析において, *rolC* 遺伝子はアカネ属植物 *Rubia cordifolia* の細胞内で ROS のレベルを抑制し, ROS 合成を調節していることが分かっている(Bulgakov *et al.* 2008). 細胞内における *rolB* 遺伝子の発現については, ROS 代謝を制御し(Bulgakov *et al.* 2012), プログラム細胞死を抑制し(Gorpenchenko *et al.* 2012), そしてオーキシン感受性に伴う細胞増殖を促進する(Spanò *et al.* 1988, Maurel *et al.* 1994)と報告されている. このように *rolB* 遺伝子の

発現が植物の表現型や(Cecchetti *et al.* 2007), 細胞代謝に影響を与えている(Bulgakov *et al.* 2012, Gorpenchenko *et al.* 2012)という報告があるにも関わらず, シロイヌナズナでの発現は植物体に影響を与えないと報告されている(Ichikawa *et al.* 2006). そこで, 本研究では *rolB* 遺伝子発現の, マメ科植物の根における影響を解析した.

本研究において, SR と比較して FSL#35 の単独培養根は総根長の増加, 側根数の増加, 表面積, 体積の増加が見られた(Figs. 3-5AC, 3-6B). 一方で根径については FSL#35 と SR で有意な差は見られなかった(Fig. 3-5B). これらの結果から, 総根長の増加と側根数の増加が, 表面積と体積を増加させたことを示唆できる. FSL#35 の単独培養根で見られた傾向は, 再分化植物でも確認でき, 総根長や側根数は有意に増加する傾向が得られたが, 再分化植物における新鮮重は茎葉部で変化せず, 根部で減少した(Figs. 3-8, 3-9). 再分化植物の茎葉部では, 分枝数が若干の減少傾向を示すものの(Fig. 3-8C), 有意な差は得られず, その他の解析項目にも SR との差は見られなかった. 根における特徴的な表現型, 特に根単独培養における表現型は, 細胞の特性が変化して引き起こされたものと予想された. そこで細胞サイズを測定すると, 皮層細胞の垂直方向への伸長と, 内鞘細胞数の垂直方向への縮小, つまり内鞘細胞数の増加が確認できた(Tables 3-1, 3-2). FSL#35 における総根長の増加は, 皮層細胞の拡大によりもたらされたことが推測できる. また, 内鞘細胞は側根原基となる細胞であり, 内鞘細胞数の増加はこの細胞の活性が高いことを意味し, 側根数増大をもたらしたと考えられる. FSL#35 の側根数の増加は, *rolB* 遺伝子を強発現させた際に側根数が増加する研究結果と一致する(Wang *et al.* 2014). *rolB* 遺伝子の発現は, 雄ずい発達時の procambial cell と木部分化のバランスを変動させると報告されている(Cecchetti *et al.* 2007). 加えて, *rolB* 遺伝子と *rolC* 遺伝子のプロモーターは, 側根への分化能を持つ内鞘細胞内で機能することも報告されている(Nilsson *et al.* 1997). さらに, *rolB* 遺伝子は外来根形成の原因遺伝子であり (Cardarelli *et al.* 1987), 組織培養条件下における側根形成を誘導することも示されている (Capone *et al.* 1989). 外来根形成の誘導における *rolB* 遺伝子の機能も明らかとなっており, *rolB* 遺伝子は外生根の誘導のために, 14-3-3 タンパクとの相互作用と核内への局在が必要となる(Moriuchi *et al.* 2004). 本研究における FSL#35 の側根数の増加は, *rolB* 遺伝子

発現が側根分化と木部などの維管束組織の誘導を活性化したために生じた結果であると考えている。FSL#35 の解析結果やリングにおける解析のように、*rolB* 遺伝子の発現が根の伸長を促進し、有用な形質に繋がる場合もあるが(Zhu *et al.* 2001, Radchuk and Korkhovoy 2005)、一方で大部分の *rolB* 強発現植物においては異常性の再分化誘導 (Spena *et al.* 1987)や、葉のネクロシス(Röder *et al.* 1994)など、不利な形質を示す場合もある。FSL#35 の再分化植物の根は SR と異なる形質を示すが(Fig. 3-9)、茎葉部においては特異的な差異を示さなかった(Fig. 8)。これらの結果から、FSL#35 における茎葉部の不利な形質を示すことのない根の伸長形質は、*rolB* 遺伝子の発現量で制御された結果である可能性がある。今後の解析では *rolB* 遺伝子の発現量の異なる系統を用い、*rolB* 遺伝子発現量の違いによる影響を解析する必要がある。

#### *rolB* 遺伝子発現による細胞特性の変化

FSL#35 の根は、細胞特性の変化による総根長の増加と側根数の増加という特異的な表現型を示した。このような変化を解析するために、TTC 還元活性を用いた呼吸活性の評価を行った。TTC は呼吸の律速酵素である succinate dehydrogenase により formazan と呼ばれる赤色の不溶性物質に還元され、安定的な formazan の量を測定することで、植物組織の呼吸活性評価を間接的に行うことができる(Block and Brouwer 2002)。TTC 還元活性による評価は、様々な植物組織の活性評価に用いられており、例えば、種子発芽率(Bennett and Loomis, 1949)や低温障害の評価(Steponkus and Lanphear 1967, Lee *et al.* 1997)、そして塩ストレスの評価(Atia *et al.* 2011)に使用されている。根単独培養根における TTC 還元活性の測定の結果、FSL#35 は SR とは異なる formazan 蓄積パターンが検出された。FSL#35 では培養根全体に formazan の蓄積がみられた(Fig. 3-11C)のに対し、SR と Control では培養根の先端付近にのみ formazan の蓄積がみられた(Fig. 3-11AB)。この反応をより詳細に評価するために、根端から 5cm の根を切出し、その根の 1cm ごとの formazan 蓄積量を測定した。FSL#35 では、解析した全ての部位において SR と Control よりも高い formazan 蓄積量がみられ、また SR と Control の formazan 蓄積量の最大値が根の先端であるのに対し、FSL#35 では根端から 1-2cm 離れた解析部位に最も多くの formazan が蓄積していた(Fig. 3-12)。これら

の結果は、高呼吸活性を示す根端分裂域や細胞伸長域が拡大していることを示唆している。一般的に、植物細胞は様々なストレス環境下で ROS の合成が促進される(Tiwari *et al.* 2002). *rolB* 遺伝子は、ROS を代謝する抗酸化酵素の代謝促進(Bulgakov *et al.* 2012, Gorpenchenko *et al.* 2012), そしてプログラム細胞死の抑制(Gorpenchenko *et al.* 2012)により、酸化ストレスのダメージの軽減に関与している。外来根誘導の際に *rolB* 遺伝子と相互作用を示す 14-3-3 タンパクは ROS レベルを調節すると報告されており(Moriuchi *et al.* 2004, Elmayan *et al.* 2007), このことから *rolB* タンパク質の複合体が ROS 代謝に関連し、それによって形態学的な変化を引き起こされたのではないかと推察される。本研究の栽培条件は低ストレス環境であり、今回 FSL#35 で検出された呼吸活性の増大は、*rolB* 遺伝子がストレス応答を誘導せず、ROS 代謝の変化のみを誘導した結果であると予想される。FSL#35 では植物ホルモンの含量にも差が見られ、FSL#35 のサイトカイニンとアブシジン酸は SR よりも低下していたが、オーキシンの含量に大きな差はなかった(Fig. 3-14)。オーキシンは細胞肥大に関与しており(Jones *et al.* 1998), オーキシンとサイトカイニンは側根形成時に相互作用を示す(Chang *et al.* 2013)。サイトカイニンのレセプターを欠損した個体では、側根の増加とオーキシン含量の増加(Chang *et al.* 2013)が確認されており、本研究の FSL#35 の単独培養根における側根数増加もサイトカイニンの減少と関連すると示唆される。FSL#35 におけるオーキシン含量は SR や Control と有意な差を示さなかったが(Fig. 3-15B), *rolB* 発現細胞のオーキシンに対する高い感受性が確認されていることから(Spanò *et al.* 1988, Maurel *et al.* 1994), FSL#35 が、オーキシン含量が増加した場合と同様の反応を示した可能性が考えられ、結果としてオーキシンとサイトカイニンの比率がオーキシン側に傾き、FSL#35 の側根形成を促進したと推測される。アブシジン酸においては、感受性低下時に側根形成数を低下させる事が報告されているが、オーキシンとの拮抗作用もあることから(Gibson *et al.* 2012), FSL#35 の場合はアブシジン酸自体の側根形成への影響よりも、オーキシンの活性との関連性から側根の発達に関与したと考えられる。以上のことから、FSL#35 内で発現した *rolB* 遺伝子の発現は、植物ホルモンの含量変化と関連し、細胞特性に影響を与えたと推測できる。総合すると、マメ科植物における *rolB* 遺伝子の発現は呼吸活性や植物ホルモンのバランスの変化を介して、根の生長

を著しく促進した可能性が示唆される。 *rolB* 遺伝子の発現による形質の制御は MicroRNA が関与している可能性が報告されている (Bulgakov *et al.* 2014)。 *rolB* 遺伝子が発現したシロイヌナズナ細胞では、MicroRNA 制御プロセスに関連するタンパク質をコードした遺伝子の発現が増加しており、 *rolB* 遺伝子発現が RNA サイレンシング経路に関与していると推測される。本研究で用いた FSL#35 の培養根においても、 *rolB* 遺伝子発現によるサイレンシング制御が、植物ホルモン含量の変化や呼吸活性の上昇に繋がった可能性がある。

## 第4章 遺伝子欠損系統 FSL#54 の解析

### 4-1 緒論

先行研究では, FSL#54 の再分化植物の根は, 白色化すると報告されている (Himuro *et al.* 2011). FSL#54 は, シロイヌナズナ遺伝子 *At2g30550* が導入されていると報告されているが, 本研究では, 発現が確認できなかった. この結果から, FSL#54 は, 2章と3章で前述した FSL#121 と#35 の様な遺伝子獲得型の変異体ではなく, 遺伝子欠損変異体の可能性がある. そこで本研究では FSL#54 の表現型解析を行い, FOX-SR 系統を用いた遺伝子欠損変異体の評価とその方法の確立を目的に, 実験を行った.

### 4-2 実験方法

#### 4-2-1 実験材料の継代操作と培養条件

本実験に供試したのは, FOX-SR 系統の FSL#54, SR そして Control の *in vitro* で培養した単独培養根と再分化植物である. Control は 2-2-1 と同様に FOX-hunting system に使用されたベクター pBIG2113SF の非遺伝子導入ベクターである pBIG2113N の配列が挿入された系統を使用した. これらの単独培養根と再分化植物は 2-2-1 と同様の方法で継代培養し, 実験に使用した.

#### 4-2-2 導入遺伝子の解析

FSL#54 に導入された遺伝子の配列は, 2-2-2 と同様の方法を用いて解析した. 解析結果は総合データベース Nucleotide(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)における BLAST 検索により挿入配列の詳細を調査した.

#### 4-2-3 発現解析

2-2-2 の実験と同様の方法を用いて発現解析を行った. その際使用したプライマーは L54-RT3-Fw (5'- CAACCACAAAACCTCCATAACC -3')/L54-RT3-Rv (5'- AAATCACGGCGGATAAAGAC-3') を使用した. RT-PCR 用のプライマー L54-RT3-Fw と L54-RT3-Rv は, FSL#35 の配列を用いて設計した(Fig. 4-1). リファレンス遺伝子は *ACTIN1* 遺伝子を用い, 使用プライマーは 2-2-2 と同様である.

#### 4-2-4 導入遺伝子の挿入位置の解析

FSL#54 に導入された遺伝子の挿入部位を解析するために、Inverse PCR による挿入部位断片の増幅を行った。CTAB 法により抽出した FSL#54 の genomic DNA の 2 µg をテンプレートとし、200 µL 反応系で 1 晩消化反応を行った。制限酵素は *EcoR* I と *Kpn* I を使用し、それぞれを単独の反応系に添加して消化反応を行った。エタノール沈殿により精製・回収した消化 gDNA 断片 200 ng を T4 DNA リガーゼ(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて 200 µL 反応系で 1 晩セルフライゲーションを行った。セルフライゲーション処理を行ったサンプルはエタノール沈殿により精製・回収し、Inverse PCR に使用するテンプレートとした。Inverse PCR には 2 つのプライマーセットと *TaKaRa Ex Taq*(Takara Bio, Shiga, Japan)を用いた Nested PCR を行った。使用したプライマーセットは、1st PCR において L54-IPCR-Fw : CCAATACCTCAAAAACACCAAC/L54-IPCR-Rv : CAGAAATAGGCGGCACTAAA を使用し、2nd PCR においては L54-IPCR2-Fw : CCAACTACCATTCTTCCAACAAC/L54-IPCR2-Rv : CACTAAAGAGCGGAGCTCC のセットを使用した。1st PCR は、回収したテンプレート 100 µg を 50 µL 反応系に使用し、96°C、5 分のインキュベーション後、96°C で 1 分、62°C で 2 分、72°C で 3 分を 35 サイクル行い、72°C で 10 分のインキュベート後にサンプルを回収した。2nd PCR では 1st PCR の 5 µL をテンプレートとして 50 µL の反応系に入れ、96°C、5 分のインキュベーション後、96°C で 1 分、57°C で 2 分、72°C で 3 分を 35 サイクル行い、72°C で 10 分のインキュベート後にサンプルを回収した。PCR 産物は TAE バッファーを用いた 1%アガロースゲル電気泳動により増幅断片の確認を行った後に、得られた増幅産物をアガロースゲルから切り出し精製した。精製した断片は T-vector pMD-20(Takara Bio, Shiga, Japan) に導入し、コンピテントセル JM109(Takara Bio, Shiga, Japan)にプラスミドを形質転換した。培養した菌から、プラスミドを抽出し、シーケンス解析のテンプレートとした。シーケンス解析には 3130 Genetic analyzer(Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA)を用いた。シーケンス解析に使用したプライマーは M13 BDFw Primer (5'- CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')と M13 BDRv Primer (5'- CGGATAACAATTCACACAGG -3')を使用した。



#### 4-2-5 表現型解析

*in vitro* における根の単独培養, さらに再分化植物の解析は 2-2-3 の方法を用いて解析した.

### 4-3 結果

#### 4-3-1 導入遺伝子の確認と発現解析

シーケンス解析により, FSL#54 に *A. thaliana* の *At2g30550* 遺伝子の導入が確認された(Fig. 4-1). BLAST 検索の結果, FSL#54 には *At2g30550* 遺伝子の配列の一部(219 bp)の挿入が確認され, そのうち 129 bp の配列は *At2g30550* 遺伝子のトランジットペプチドをコードする領域と判明した(Fig. 4-2). FSL#54 における *At2g30550* 遺伝子断片の発現を, RT-PCR を用いて解析した. Sequence 解析による FSL#54 に導入されている断片の配列情報(Fig. 4-1)より作成したプライマーを使用して RT-PCR を行ったところ, FSL#54 の cDNA をテンプレートとした反応区で遺伝子の増幅が確認できなかった(Fig. 4-3). 増幅は葉, 茎そして根でもみられず, FSL#54 の全ての組織で導入遺伝子の発現が確認できなかった.

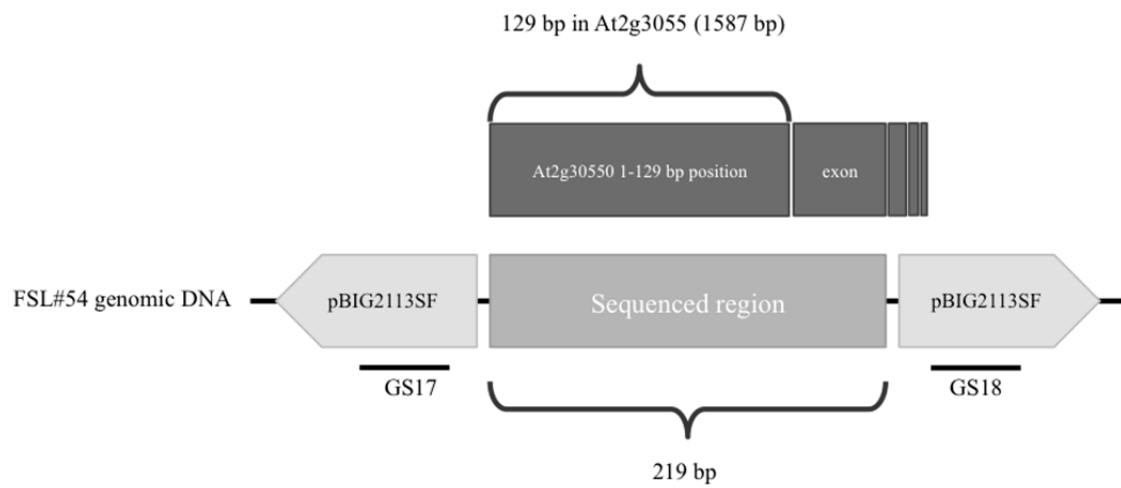
導入遺伝子の解析, 発現解析の結果から, FSL#54 においてはシロイヌナズナの遺伝子が導入されているものの, 発現していないため, 遺伝子導入による遺伝子欠損を推測し, Inverse PCR を用いた遺伝子導入位置の解析を行った. 消化とセルフライゲーション反応の後, 2つのプライマーセットを用いた Inverse PCR を行った. それぞれの制限酵素処理区から, 特異的なバンドが得られたものの, シーケンス解析の結果, 導入位置を示す結果ではなかった. 今回設計したプライマーセットや選択した制限酵素を使用した Inverse PCR では FSL#54 の導入部位を特定するにいたらなかった.

#### 4-3-2 根単独培養における表現型解析

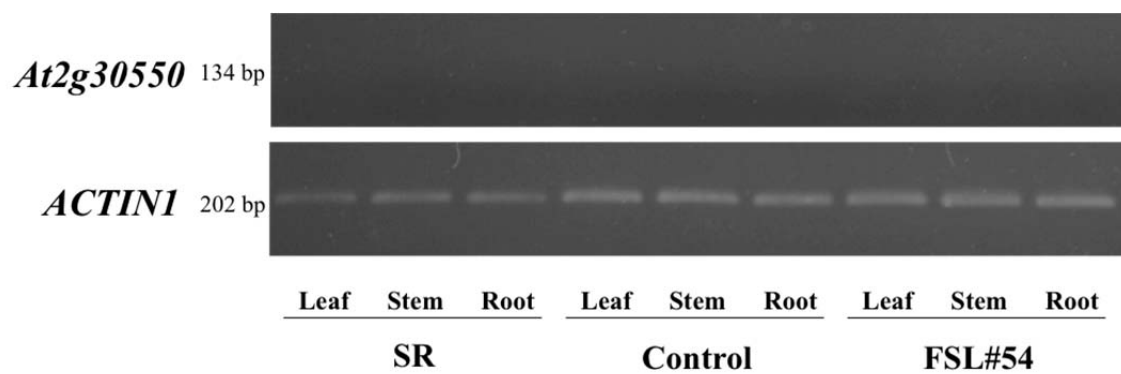
ホルモンフリーの MS 液体培地上で培養した, SR, Control そして FSL#54 の根単独培養の組織には表現型に違いが見られた. FSL#54 の単独培養根は総根長や表面積に差は生じなかったが(Fig. 4-4AC), 体積や新鮮重においては, 培養初期の 1 週間培養と 2 週間培養時に SR と Control よりも有意な増加が見られた(Fig. 4-5AC). また特に特徴的な形質であったのが, 根茎と側根数であり, FSL#54 の根

CCTCTAGAGGCCCTTATGGCCGAGCTCACTAGTCCCCCCCCCGAAGCTATT  
TTTATGTGTTATAAAGGCTTCTTCGTCAACCAATTACGAAATCAAGCTTTTG  
AAGCTTCTCAACAATGGCGGCTATTCCTTCCCACAACAACCTTCTTACCATC  
AACCACAAAACTCCATAACCGGTTCTTCTTCCCTAAATACCAATTTCTCAN  
AAATCAATTTTCCCGCCAAATTCCGAGTAGCTACGAGAGCTTTGTCCAGAAC  
CGACGAGTCGTCTTTATCCGCCGTGATTTCTCGCCTCGAGGGCCGATTTGGC  
CTCTAGATGTAGTTGTAGAATGTAAAATGTAAT

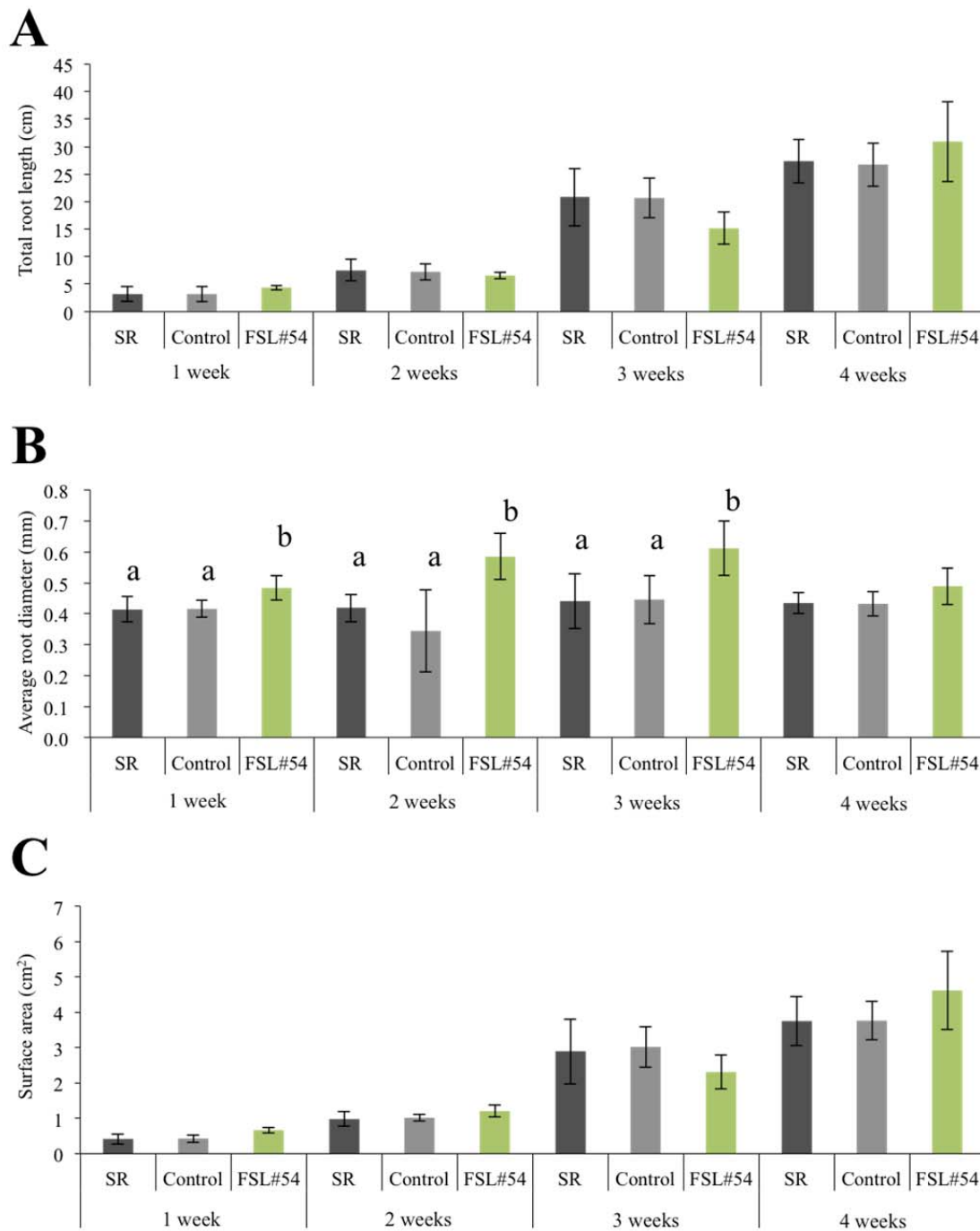
**Fig. 4-1.** Sequence data of FSL#54. Blue characters indicate vector sequence. Black characters indicate insert gene sequence. Shaded characters indicate primer position for RT-PCR.



**Fig. 4-2.** Image of complimentary region in FSL#54 plant.



**Fig. 4-3.** Expression analysis of the fragment of *At2g30550* by RT-PCR in SR, the Control and FSL#54. The upper panels show the expression of fragment of *At2g30550*; the lower panels show the expression of the *ACTINI* gene used as an internal standard.



**Fig. 4-4.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#54. A, B and C indicate total root length, average root diameter and surface area, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

径は全ての培養期間において SR と Control よりも太くなり (Fig. 4-4B), FSL#54 の側根数は全ての培養期間で SR と Control よりも有意に少なくなった (Fig. 4-5B). 以上のように根単独培養における FSL#54 は SR と Control と異なる表現型を示した.

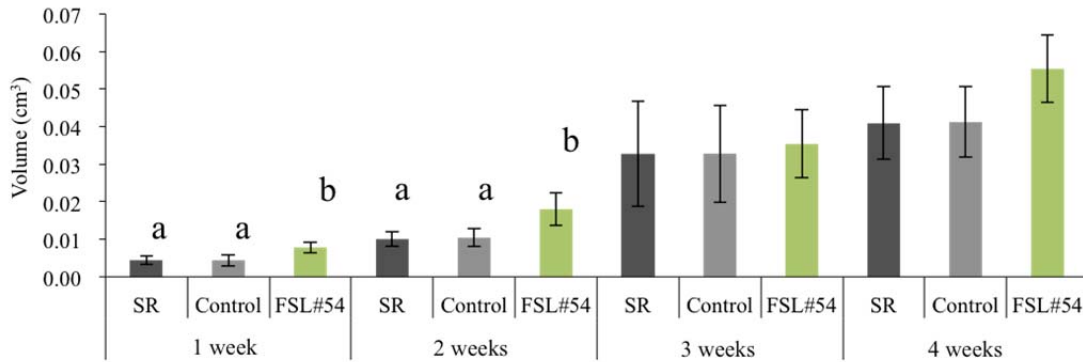
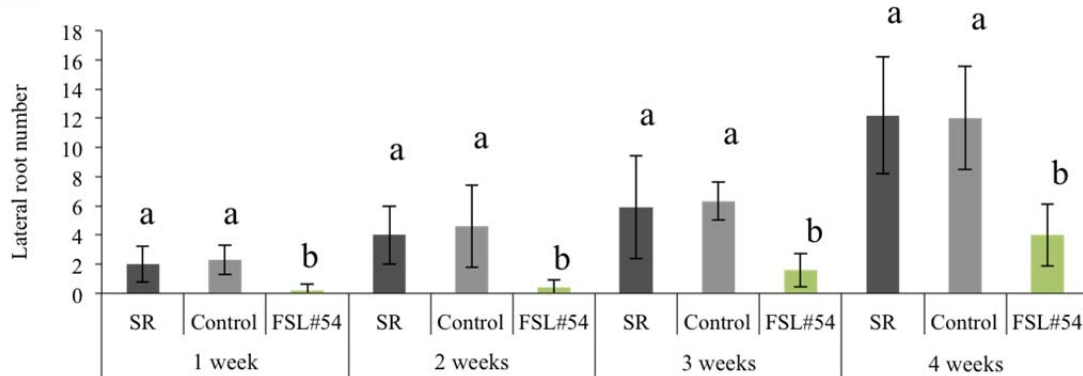
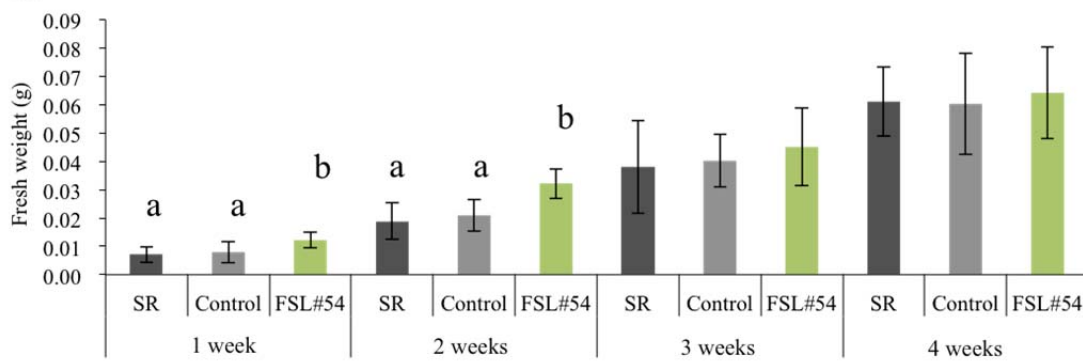
#### 4-4-3 再分化植物の表現型解析

FSL#54 の再分化植物の表現型を比較解析するために, FSL#54 と SR, Control 再分化植物の表現型を比較した. まず茎葉部において, SR と Control に比べ FSL#54 の草丈が有意に減少し (Figs. 4-6, 4-7A), 平均の茎径と分枝数が増加した (Figs. 4-6, 4-7BC). このように表現型に差が見られたものの, 茎葉部の新鮮重に差は見られなかった (Fig. 4-7D). また根部では FSL#54 は SR と Control に比べて側根数が減少するという表現型を示したが (Fig. 4-8C), 新鮮重に差は見られなかった (Fig. 4-8D). 根粒着生解析において, FSL#54 は SR と Control と比較して根粒着生数が減少したが (Fig. 4-9A), 着生した根粒の大きさに有意な差は見られなかった (Fig. 4-9B). 以上のように, FSL#54 の再分化植物は, 根単独培養時と同様に SR と Control とは異なった生長を示したが, バイオマス生産量は変化しなかった.

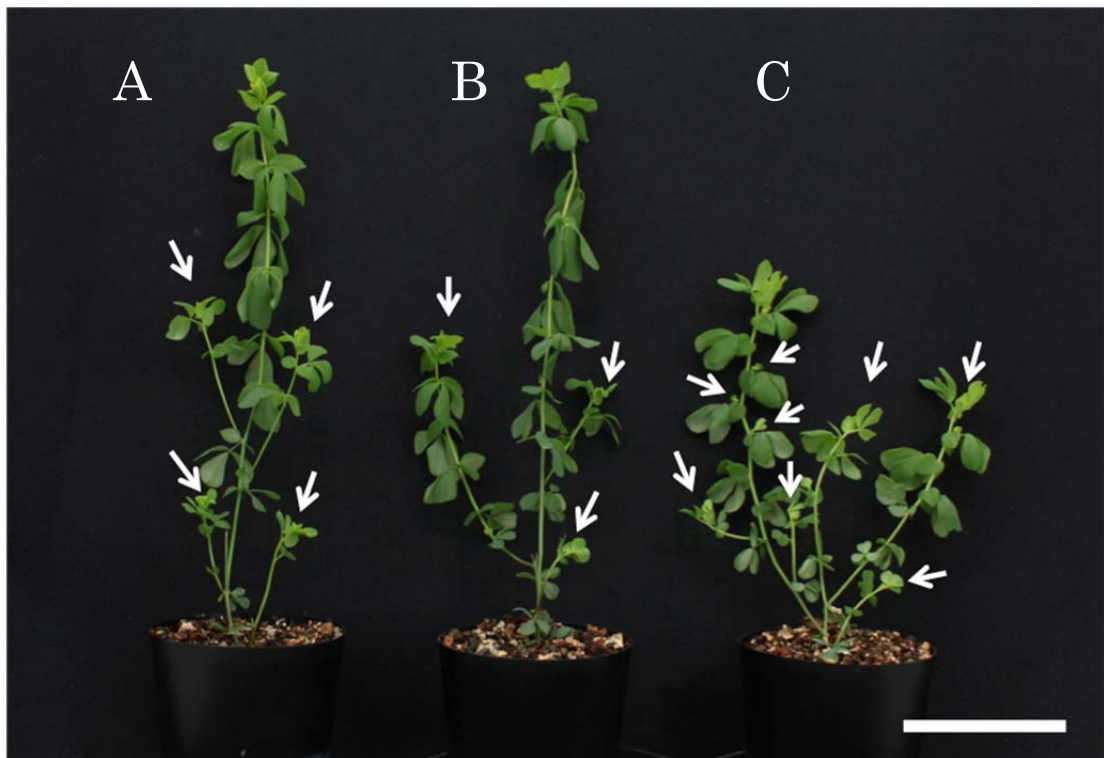
#### 4-4 考察

##### FSL#54 は欠損変異体

FSL#54 にはシロイヌナズナ遺伝子の *At2g3050* が導入されていると報告されていた (Himuro *et al.* 2011). 本研究で導入遺伝子の発現解析を行ったところ, 発現が確認できなかった (Fig. 4-3). シークエンス解析の結果から, FSL#54 に *At2g30550* が導入されていること再確認できたが, その総断片が 219 塩基しか無いことが新たに判明した (Fig. 4-1). 導入されていた 219 塩基は全て *At2g30550* の配列であり, そのうち 129 塩基は葉緑体へのトランジットペプチドをコードしていた (Fig. 4-2). これらの遺伝子断片を含む FOX hunting system のベクター配列が, FSL#54 中に存在していることは確かであり, しかしながら発現していないことが解析の結果判明した. このことから FSL#54 は FOX hunting system による機能獲得型の変異体ではなく, 機能欠損型の変異体である可能性が高い. 本研

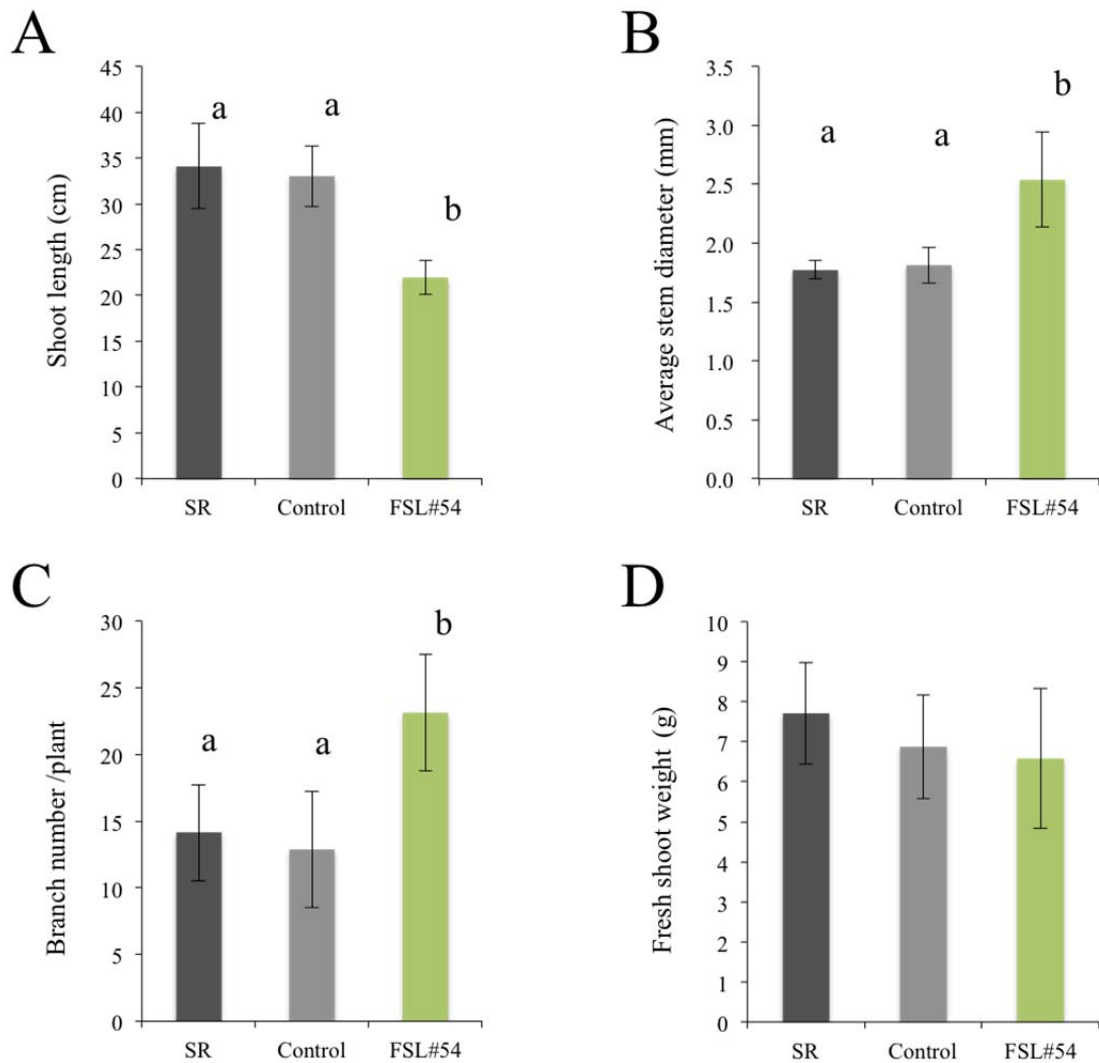
**A****B****C**

**Fig. 4-5.** Comparison of mono-culture root phenotypes in SR, Control and FSL#54. A, B and C indicate volume, lateral root number and fresh weight, respectively. White arrows indicate branch stems. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data of each week were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

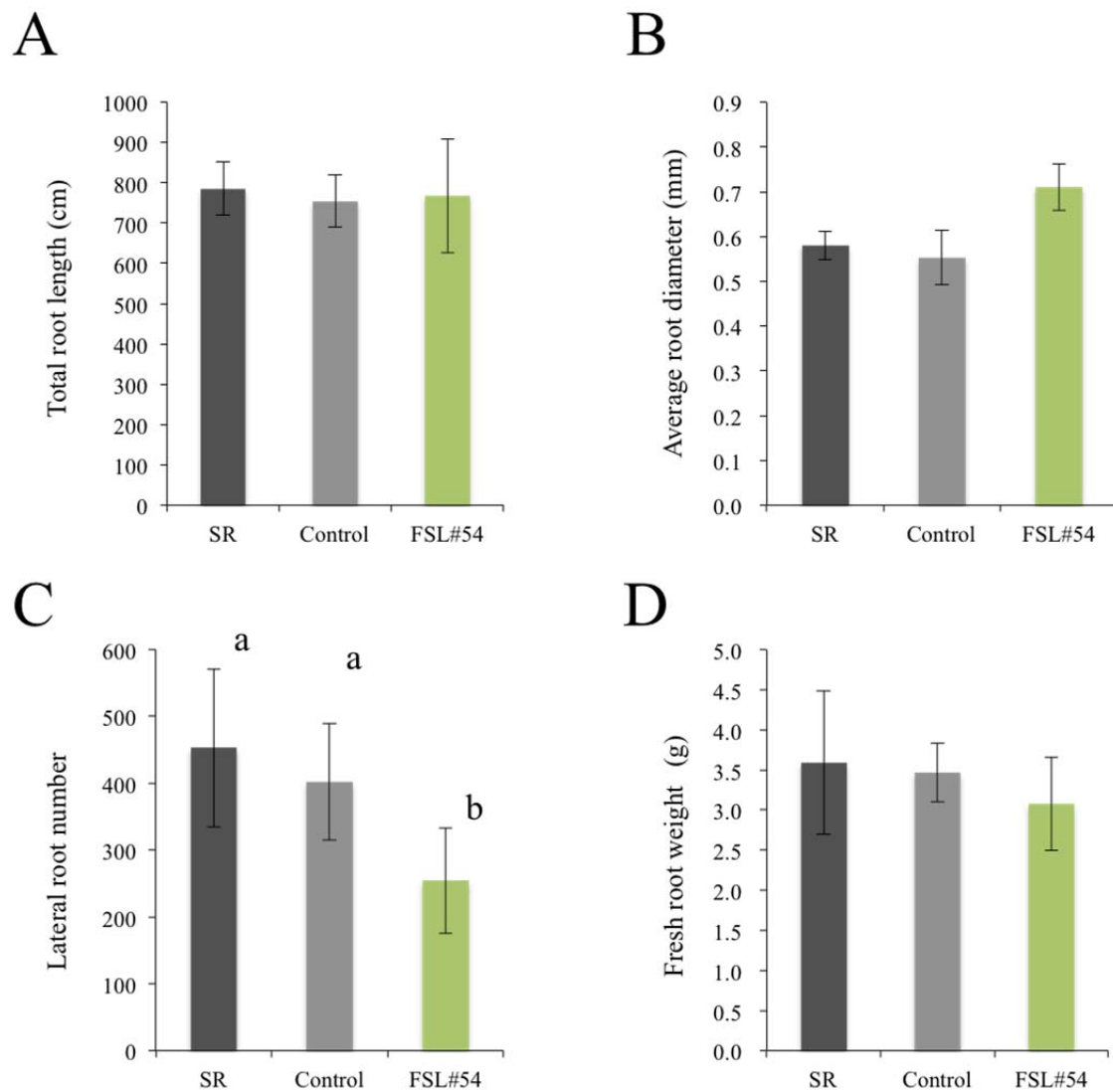


**Fig. 4-6.** Comparison of phenotypes in SR, Control and FSL#54 cultured for 2 weeks. Photograph indicates SR (A), Control (B) and FSL#54 (C). White arrows indicate branch stems. The white bar indicates 5 cm.

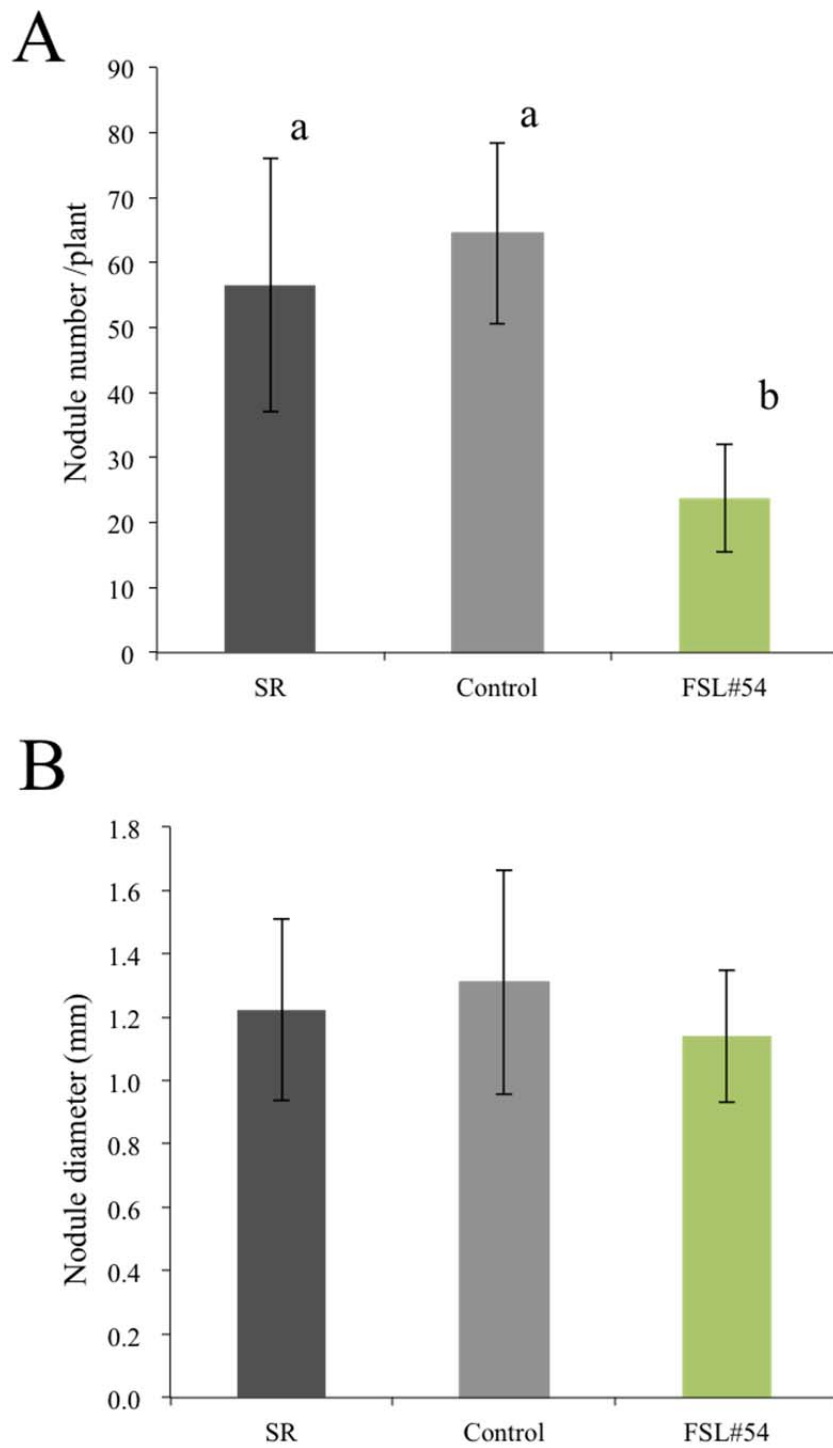




**Fig. 4-7.** Evaluation of shoot phenotypes in SR, Control and FSL#54. A, B, C and D indicate shoot length, average stem diameter, branch number and fresh shoot weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4-8.** Evaluation of root phenotypes in SR, Control and FSL#54. A, B, C and D indicate root length, average root diameter, lateral root number and fresh root weight, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4-9.** Measurement of nodule number and ethylene production in SR, Control and FSL#54 nodules. A and B indicate nodule number per plant and nodule diameter, respectively. Results are expressed as the means  $\pm$  SD from 5 independent experiments. The data were analyzed by multiple comparison of Tukey's test. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

究では, Inverse PCR を用いて, 挿入部位を検出する試みを行った. Inverse PCR は大腸菌のゲノムにおける未同定隣接配列を検出するために開発された手法である(Ochman *et al.* 1988). 植物のインサート遺伝子の探索においても, Inverse PCR が使われており, 単子葉類のユリでは報告がある(Hoshi *et al.* 2004). しかし, Inverse PCR では FSL#54 の遺伝子挿入部位を特定することは出来ず, FSL#54 が欠損している可能性のある遺伝子の特定は出来なかった. セイヨウミヤコグサを含む双子葉類での Inverse PCR の使用例は無く, プロトコルの不適合が今回の結果の原因と考えている. FSL#54 は特徴的な表現型を示すことから, 欠損遺伝子の同定が植物の生長制御に関する遺伝子の同定に貢献するかもしれない. 今後の実験展開としてはゲノムウォーキング法など, これまでとは異なったアプローチでの早期の挿入部位決定が望まれる.

#### FSL#54 の表現型と欠損遺伝子の関連性

FSL#54 は SR と Control と比較して特徴的な表現型を示した. FSL#54 の根単独培養の解析の結果, SR と Control よりも根径が増え, 側根数が減少した(Figs. 4-4, 4-5). この形質は FSL#54 の再分化植物でも同様で(Fig. 4-8BC), また茎葉部では草丈の低下や分枝数の増加(Fig. 4-7AC)といった SR とは異なる表現型を示した. また, 根粒着生数が SR よりも大きく減少しているのも特徴である(Fig. 4-9A). FSL#54 は遺伝子欠損変異体と推測しており, 先行研究で報告されていた根の白色化や, 本研究で確認された特異的な表現型は遺伝子の欠損により引き起こされたと考えられる.

FSL#54 の根単独培養根と再分化植物が特徴的な表現型を示すことから, FSL#54 内で欠損した遺伝子が植物ホルモンなどの生長調節物質の生合成系に関与する遺伝子であると推測される. 植物ホルモンであるオーキシンやサイトカイニン, ストリゴラクトンの生合成の変化が, 表現型に影響しており, 今回特徴的であった分枝数の増加には, これらの植物ホルモンが深く関連していると考えられる. オーキシンとサイトカイニンの植物組織での比率は, 側芽の出芽をコントロールしており, 分枝数増加の一因となる. 茎頂の脱落によるオーキシンの生合成量の減少はサイトカイニン量の増加を誘導し, 分枝数が増加することが報告されている(Bangerth 1994; Li *et al.* 1995). また, オーキシンはストリゴ

ラクトンをシグナルとした分枝形成に関与している。エンドウマメにおいて、オーキシンはストリゴラクトン合成遺伝子の調節を介して、側芽の出芽を抑制する(Beveridge *et al.* 2000)。ストリゴラクトンは頂芽優勢にも関与しており、その際のオーキシンによるストリゴラクトン生合成遺伝子の調節も報告されている(Sorefan *et al.* 2003; Bainbridge *et al.* 2005; Foo *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2006)。このように、植物ホルモンによる植物の表現型の制御例は多数報告され、本研究の FSL#54 の表現型が植物ホルモンにより調節された可能性は十分考えられる。さらに、マメ科特有の反応である根粒着生が抑制されたことから、根粒着生メカニズムに関連した遺伝子である可能性も考えられる。根粒着生についても、植物ホルモンの制御例が報告されている(Sasaki *et al.* 2014)。FSL#54 の欠損した遺伝子の特定に加えて、FSL#54 組織中の植物ホルモンの解析を行うことで、生長と根粒着生の双方に関連する遺伝子の機能が解明できる。

## 第5章 総合考察

本研究では、シロイヌナズナ遺伝子を導入したセイヨウミヤコグサ FOX-SR 系統を用いてマメ科における遺伝子機能解析を行った。FOX-SR 系統は、形質転換体の母体として、野生型セイヨウミヤコグサよりも成育が旺盛な Super growing root 系統を用いており、FOX-SR 系統も SR 系統の基本的な形質を受け継いでいる。そのため、FOX-SR 系統はホルモンフリーの MS 液体培地内での根単独培養による増殖や、再分化が可能であり、さらに再分化植物による根粒着生解析が可能である。そして、FOX-hunting system は一度に大量の組換え体を得られる有用な方法である。つまり、FOX-SR 系統は SR と FOX-hunting system の利点を併せ持つ系統であるため、マメ科における遺伝子の単離・機能解析を迅速に行える有用な系統群である。

FOX-SR 系統に導入されている遺伝子はセイヨウミヤコグサの遺伝子ではなく、シロイヌナズナ等の外来遺伝子であり、純粋にマメ科植物の遺伝子をターゲットとした解析ではない。有効な遺伝子が発見できた場合でも、新たにセイヨウミヤコグサにおける遺伝子単離を行う必要があるが、一方で、セイヨウミヤコグサで未同定である遺伝子をターゲットとした解析が可能である。植物の生長や表現型に影響を与えるような遺伝子は植物間における保存性が高い場合が多く、FOX-SR 系統でのシロイヌナズナ遺伝子の解析はセイヨウミヤコグサでの未同定遺伝子の解析にも貢献する。本研究においても、*A. thaliana* 由来の *SYN1* が発現した FSL#121 の解析により、セイヨウミヤコグサで未同定のシロイヌナズナ遺伝子の解析が行われ、将来的にマメ科作物にとって有用な表現型の要因となる遺伝子の詳細が明らかとなった。また、FSL#35 と FSL#54 の解析から、FOX-SR 系統の他の利用法が模索できる。*A. rhizogenes* 由来の *rolB* 遺伝子を保持した FSL#35 の解析例では FOX-hunting system の本来の使用目的からは外れるが、マメ科における生産性向上の新たな可能性をもつ遺伝子が発見できた。加えて、FSL#54 のような遺伝子欠損による変異も当然起こる可能性があり、その場合は遺伝子欠損を踏まえた解析を行うことで遺伝子機能を評価できる。こういったことから、FOX-SR 系統は一樣に FOX-hunting system によるシロイヌナズ

ナ遺伝子の強発現による評価だけでなく、様々な面から遺伝子機能解析が行える系統群であるといえる。

FSL#121 にはアスパラギンと tRNA の複合体を合成する Asparaginyl-tRNA synthetase である *SYNCl* 遺伝子が導入され、強発現していた。FSL#121 根単独培養では SR と Control に比べ、新鮮重は変化しないものの、側根数の減少や根茎の増加など、特異的な表現型を示し、これらが *SYNCl* 遺伝子の強発現によるものであると示唆される。茎葉部の存在する再分化植物の根では、FSL#121 の根の生長は促進され、側根数や根茎の増加、総根長が伸びたことによる有意な新鮮重増加が確認できた。根単独培養時と異なる FSL#121 再分化植物の根の反応は茎葉部の存在の影響が出ていると考えられる。茎葉部の有無で生長に影響する最も大きな要因は光合成である。FSL#121 の再分化植物は根単独培養では得られない光合成産物を得られ、これが根部のバイオマス量増加に関与したと考えられる。また、FSL#121 では各組織におけるアミノ酸含量が変動していた。アミノ酸はマメ科植物の窒素輸送体となり (Atkins *et al.* 1975)、セイヨウミヤコグサにおいては根粒で固定した窒素の輸送体として利用される (Sprent *et al.* 1994)。アミノ酸の代謝変化は植物体内の窒素輸送変化を意味し、FSL#121 の再分化植物のアミノ酸含量の変化がバイオマス量増加に関与したと推測される。アミノ酸の合成には窒素のみならず炭素の供給も必要となり、この点においても光合成に由来する炭素源の供給が影響しているとかんがえられる。本研究で FSL#121 が示したバイオマス量が増加する表現型は、牧草としての飼料植物に有効な形質となり、特に草丈の増加は放牧家畜の牧草摂取を助ける (Rook *et al.* 1994)。また、根粒着生数がアミノ酸含量の増加や根粒着生数の増加はマメ科植物の種子への窒素充填量を促進する (Atkins *et al.* 1975) ため、種子生産においても *SYNCl* 遺伝子が有効に機能する可能性がある。今後、*SYNCl* 遺伝子の解析をマメ科植物の窒素転流や種子形成に着目して進めれば、飼料マメ科植物の生産性増大や種子生産性の向上につながると考えられる。*SYNCl* 遺伝子は本研究で使用した *L. corniculatus* を始めとする *Lotus* 属では未同定である。しかしながら、*L. japonicus* の塩基配列データベース (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) 上で *A. thaliana* 由来 *SYNCl* 遺伝子と相同な配列が確認できた。今後はこの遺伝子配列を *SYNCl* として同定

し、*L. japonicus* を用いて解析することで、よりマメ科植物に適合した *SYN1* 遺伝子の機能を解明できる。

FSL#35 は *A. rhizogenes* 由来の *rolB* 遺伝子が導入されている。元来、FOX-hunting system における *rolB* の役割は形質転換時の効率を測定するための内部標準遺伝子として使用されていた(Ichikawa *et al.* 2006)。シロイヌナズナにおいて、強発現した *rolB* 遺伝子は表現型に影響を与えないが、本研究で使った FSL#35 では表現型に違いが現れた。特に根単独培養における生長は著しく、野生型よりも生長の良い SR をさらに上回る生長を示した。側根増加に伴う総根長の増加は、表面積と体積の増加を引き起こし、さらに新鮮重の増加を示した。この傾向は根単独培養時に顕著に現れ、再分化植物では同様の変化は見られなかった。FSL#35 の伸長度増加の要因は、細胞レベルの変化が要因であり、皮層細胞の増加が伸長を促進したと考えられる。また、側根に分化する内鞘細胞数が増加したことは内鞘細胞が活性化されていることを意味し、側根数増加に貢献する要因であると考えられる。このような FSL#35 の細胞の変化は呼吸活性の上昇を伴うため、FSL#35 における *rolB* 遺伝子の強発現が呼吸活性の促進を介して生長を促進させたと推察される。*rolB* 遺伝子はオーキシン感受性の増大や ROS 代謝への関与が報告されている(Spanò *et al.* 1988, Maurel *et al.* 1994, Bulgakov *et al.* 2012, Gorpenchenko *et al.* 2012)。今回の場合、非ストレス環境下での試験であることから、ROS 代謝活性が呼吸活性の電子伝達系における ROS 除去や電子受容体の還元に関与した可能性があり、その結果呼吸活性の上昇が引き起こされたと推測される。複数の先行研究から、*rolB* 遺伝子の発現はストレス環境における ROS 代謝反応において有意に働くかもしれない(Bulgakov *et al.* 2012, Gorpenchenko *et al.* 2012, Moriuchi *et al.* 2004, Elmayer *et al.* 2007)。一方で、共同研究者の FSL#35 の単独培養根の塩ストレス試験において、10 mM の NaCl 処理で SR と FSL#35 の単独培養根の伸長に有意な差がなくなり、50 mM の試験で SR が FSL#35 よりも伸長することが判明している(データ示さず)。この結果から、*rolB* 発現が必ずしもストレス環境に耐性を示すわけではなく、塩ストレスにおいては *rolB* 遺伝子の発現による影響が負に働く可能性がある。FSL#35 の根単独培養根ではアブシジン酸の含量が低下していた。アブシジン酸は植物のストレ



ス応答を媒介するホルモンであり (Zhang *et al.* 2006), アブシジン酸含量の低下が高濃度の塩ストレス培地における FSL#35 培養根の伸長抑制に関連している可能性がある。塩ストレスにおいてはこのような知見も得られているが, *rolB* 遺伝子発現のストレス応答への関与はまだ未解明な点が多い。今後 *rolB* 遺伝子発現の様々なストレス条件下におけるさらなる評価が必要と考える。*rolB* 遺伝子による毛状根を用いた研究は, 物質生産に関連したものが多い。本研究でも根単独培養時に根が増加していることから, FSL#35 が新たな物質生産の培養母材となる可能性は十分にある。*rolB* 遺伝子を含めた TL-DNA のマメ科植物における機能はまだ情報不足であり, 本研究の結果は, *rolB* 遺伝子単独のマメ科植物における機能解析の一端となる。

FSL#54 は欠損変異体として評価した。根単独培養, 再分化植物の解析において非常に特徴的な形質を示した。しかしながら, FSL#54 内で欠損している遺伝子の特定には至らず, 表現型の原因となる遺伝子の特定は未完了である。Inverse PCR による挿入部位の増幅を試みたが, 本研究で行った方法では標的断片の単離が行えなかった。原因として, 設計プライマーの特異性の低さがあげられる。本研究で設計したプライマーは FSL#54 の内部に導入された配列を用いて作成した。対象となる配列はシロイヌナズナ遺伝子のものであり, セイヨウミヤコグサの遺伝子とは相同性が低いものである。しかしながら, 今回のように制限酵素処理やセルフライゲーション処置により, 予測不能の断片の生成や BLAST における未検出配列による相同性の欠落により, プライマーの特異性が下がり, 非特異的なバンドを検出する要因となったと考えられる。Inverse PCR による挿入位置の確認のためには, 特異的なプライマーの再設計が必要であり, 場合によっては他の分子生物学的手法による挿入部位の決定が必要である。欠損遺伝子が未確認であるものの FSL#54 は非常に興味深い形質を示した。特に分枝数の増加は花芽形成を左右する要因であり, 分枝数の増加は花芽形成数を促進する要因となる。FSL#54 で欠損する遺伝子を特定することにより, セイヨウミヤコグサにおける分枝形成の調節に関与する遺伝子を特定できる可能性があり, 作物生産において有用な遺伝子の単離となる。また, FSL#54 は根粒着生数が減少している。FSL#54 の根粒着生数の減少は, 分枝数の増加を引き起こした遺伝

子の欠損と関連が考えられる。根粒着生は地上部を介したシグナル伝達で制御され、その際に植物ホルモンであるサイトカイニンの関与が報告されている (Sasaki *et al.* 2014)。さらに、ジャスモン酸を介した根粒着生の制御も報告されている (Suzuki *et al.* 2011) ため、植物の生長を制御する植物ホルモン代謝の変化が、FSL#54 における様々な表現型の発生に起因する可能性が示唆される。FSL#54 のさらなる解析においては欠損遺伝子の特定が最優先事項であり、標的となる遺伝子はマメ科植物の増収に貢献できる可能性を秘めている。

本研究では FOX-SR 系統の FSL#121, #35 そして #54 を供試植物として選抜した。3 系統を用いた解析に共通する実験は、発現解析と表現型解析である。表現型解析では根単独培養での評価に加え、再分化植物の解析を行った。これらの共通した実験により、それぞれの系統にみられる特異的な「表現型」と「導入または欠損遺伝子」との関連性を発見できる。さらに、発見した関連性を元に 3 系統それぞれで異なる解析を実施したため、導入または欠損遺伝子の機能を詳細に評価できたと考えられる。FOX-SR 系統から有用な遺伝子を持つ系統をを選抜する方法の 1 つとして、本実験のような表現型解析を用いたスクリーニングが挙げられ、効果的である。一方で、FOX-SR 系統の中には表現型に差がみられない系統も存在していることから、今後 FOX-SR 系統から供試系統を選抜する際は、植物ホルモンやポリアミンといった生理活性物質の含量の違いに目を向け、スクリーニング法を確立していくことが望まれる。このような手法を用いることで、通常の栽培条件では選抜できない有用遺伝子を保持した系統を単離できる。例えば、低温や高温、乾燥といった環境ストレスに対して高い耐性をもつ系統の選抜は、作物育種において有用な研究材料の獲得となり、遺伝資源としての価値も高い。このように、未解析の FOX-SR 系統を用いた遺伝子解析はさらなる有用遺伝資源の発見が期待できる。本研究はマメ科植物における新規の遺伝子機能を報告し、これらの遺伝子の利用はマメ科作物の育種に貢献できると考えられる。本研究で得られた有用遺伝子、そして今後解析される FOX-SR 系統から得られる有用遺伝子が今後の育種、ひいてはマメ科作物の生産増大に利用されることを切に願う。

## 研究概要

人口の増加や農地環境の劣化により将来的に食糧危機が危惧される。また現時点で食糧自給に地域による偏りが生じ、食糧生産の改善が求められる。1つの対策として、有用形質を保持した栽培品種の作出が挙げられ、そのためには有用形質の要因となる有用遺伝子の単離、解析が必要となる。本研究では、セイヨウミヤコグサ Super growing root (SR) 系統に Full length cDNA overexpressor gene (FOX) hunting system を適用した FOX-SR 系統 (FSL) から特徴的な形質を示す系統を選抜し、表現型や生理活性物質の解析結果を SR と比較し、マメ科における有用遺伝子の解析を行った。解析した系統は *SYNC1* 遺伝子を保持・発現した FSL#121, *rolB* 遺伝子を保持・発現した FSL#35, そして遺伝子断片の挿入による欠損変異体である FSL#54 の3系統である。

FSL#121 の再分化植物は、SR よりも旺盛な生長を示し、地上部と地下部共に新鮮重が増加した。FSL#121 では根粒着生数が増加したため、個体あたりの窒素固定活性も上昇した。また FSL#121 の再分化植物ではアスパラギンやアスパラギン酸を含むアミノ酸含量が変動していた。FSL#121 における *SYNC1* 遺伝子の発現は、アミノ酸代謝に影響を及ぼし、再分化植物の生長促進を誘導したと考えられる。続いて FSL#35 では根単独培養での総根長が SR よりも有意に増加した。FSL#35 の呼吸活性を TTC 還元活性法により測定したところ、SR よりもフォルマザンの生成量が多く、呼吸活性の上昇が示唆された。顕微鏡観察により細胞サイズを比較したところ、FSL#35 では根長増大の要因となる皮層細胞が垂直方向へ伸長し、さらに側根原基となる内鞘細胞数の増加が増加したことから、側根数が増え、総根長が増加したものと示唆される。また、2週間培養した単独培養根ではサイトカイニンとジベレリンが減少していた。FSL#35 における *rolB* 遺伝子の発現は呼吸活性を促進し、植物ホルモン含量の変調により根単独での伸長を促進した。FSL#54 の根単独培養では、側根数が減少するものの、総根長に差がなく、新鮮重に差は見られなかった。FSL#54 の再分化植物の根における反応も同様で、側根数は減少したが、新鮮重は SR と有意な違いは検出されなかった。FSL#54 の地上部においては、草丈の低下、茎径と分枝数の増加といった特徴的な形質は見られたが、地上部でも新鮮重に差は見られなかった。また FSL#54

では根粒着生数が減少していた。FSL#54 の欠損遺伝子は未同定であるが、該当遺伝子の欠損が FSL#54 の特徴的な表現型を誘導している可能性は十分に考えられる。

本研究により、マメ科における新規の遺伝子機能が解明された。また本研究における解析手法は今回使用していない FSL に即時適応することができるため、今後の FOX-SR 系統を用いた解析において有用な知見となる。

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の取りまとめに際し、終始懇切丁寧な指導と御助言を賜りました宮崎大学農学部教授 佐伯雄一博士に深甚なる感謝を申し上げます。細やかなご指導・激励のお言葉を頂きました、同教授 明石良博士、同教授 國武久登博士に心からの感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。また、本論文の取りまとめに際し貴重なご助言を賜りました、同教授 河原聡博士、同大工学部准教授 塩盛弘一郎博士にも感謝の意を表します。研究の遂行に際し、数々の指導と御助言、ご校閲を頂きました、宮崎大学農学部助教 山本昭洋博士、同助教 田中秀典博士、共同研究者の栗野太貴氏、論文投稿に当たり、丁寧な英文添削と数多くの助言を賜りました、Dr. Melody Muguera に御礼申し上げます。実験遂行にあたり、懇切丁寧な対応をしていただきました宮崎大学フロンティア科学実験総合センターの先生並びにスタッフの方々に、心より感謝いたします。植物ホルモン解析において、理化学研究所 榊原均博士にご協力を賜り、重ねて御礼申し上げます。

そして、共に研究を行い、終始励まし、支えあってきた土壌肥料学研究室の皆様感謝の意を表します。

## 引用文献

Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galilia G 2003 Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15: 439-447.

Akashi R, Hoffmann-Tsay S-S, Hoffmann F 1998 Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor Appl Genet* 96: 758-764.

Akashi R, Kawano T, Hashiguchi M, Kutsuna Y, Hoffmann-Tsay S-S, Hoffmann F 2003 Super roots in *Lotus corniculatus*: a unique tissue culture and regeneration system in a legume species. *Plant Soil* 255: 27-33.

Altamura MM, Capitani F, Gazza L, Capone I, Costantino P 1994 The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flowers and root meristemoids in tobacco thin cell layers. *New Phytol* 126: 283-293.

Aoki S, Syōno K 1999 Horizontal gene transfer and mutation: *Ngrol* genes in the genome of *Nicotiana glauca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13229-13234.

Atia A, Abdelly C, Smaoui A 2011 ROS accumulation and TTC reduction in growing embryo of *Crithmum maritimum* L. isolated from water or salt imbibed seeds. *Not Sci Biol* 3: 98-103.

Atkins CA, Pate JS, Sharkey PJ 1975 Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol* 56: 807-812.

Bangerth F 1994 Response of cytokinin concentration in the xylem (*Phaseolus vulgaris*

L.) plants to decapitation and and relationship to apical dominance. *Planta* 194: 439-442.

Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O 2005 Hormonally controlled expression of the *Arabidopsis* MAX4 shoot branching regulatory gene. *Plant J* 44: 569-580.

Becker HD, Kern D 1998 *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12832-12837.

Bennett N, Loomis WE 1949 Tetrazolium chloride as a test reagent for freezing injury of seed corn. *Plant Physiol* 24: 162-174.

Berg M, Rogers R, Muralla R, Meinke D 2005 Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J* 44: 866-878.

Beveridge CA 2000 Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. *Plant Growth Regul* 32: 193-203.

Block MD, Brouwer DD 2002 A simple and robust in vitro assay to quantify the vigour of oilseed rape lines and hybrids. *Plant Physiol Biochem* 40: 845-852.

Borek S, Galor A, Paluch E 2013 Asparagine Enhances Starch Accumulation in Developing and Germinating Lupin Seeds. *J Plant Growth Regul* 32: 471-482.

Bov'e J, Dufour F, 新谷淳一訳 2001 地球は売り物じゃない!, p193, 紀伊國屋書店

Brown L, 浜中裕徳監訳 1999 90 億人を養えるか, ブラウン L 編著・地球白書

1999～2000, p205-235, ダイヤモンド社

Brown L, 2000 地球データブック, ワールドウォッチ研究所, p31, 45, 家の光協会

Bulgakov VP, Aminin DL, Shkryl YN, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN, Dmitrenok PS, Zhuravlev YN 2008 Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 1561-1570.

Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN, Shkryl YN, Tchernoded GK, Bulgakov DV, Aminin DL, Zhuravlev YN 2012 The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiol* 158: 1371-1381.

Bulgakov VP, Veremeichik GN, Shkryl YN 2014 The *rolB* gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery. *Biotechnol Lett* Epub ahead of print.

Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spanò L, Capone I, Costantino P 1987 *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol Gen Genet* 209: 475-480.

Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R 2003 Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* 217: 726-735.

Capone I, Spano L, Cardarelli M, Bellincampi D, Petit A, Costantino P 1989 Induction and growth properties of carrot roots with different complement of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol Biol* 13: 43-52.



Cecchetti V, Pomponi M, Altamura MM, Pezzotti M, Marsilio S, D'Angeli S, Tornielli GB, Costantino P, Cardarelli M 2004 Expression of *rolB* in tobacco flowers affects the coordinated processes of anther dehiscence and style elongation. *Plant J* 38: 512-525.

Cecchetti V, Altamura MM, Serino G, Pomponi M, Falasca G, Costantino P, Cardarelli M 2007 *ROX1*, a gene induced by *rolB*, is involved in procambial cell proliferation and xylem differentiation in tobacco stamen. *Plant J* 49: 27-37.

Chang L, Ramireddy E, Schmülling T 2013 Lateral root formation and growth of *Arabidopsis* is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *J Exp Bot* 64: 5021-5032.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK 2005 An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.

Deshpande SS 1992 Food legumes in human nutrition: a personal perspective. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 333-363.

Duchêne AM, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Maréchal-Drouard L, Small ID 2005 Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16484-16489.

Elmayan T, Fromentin J, Riondet C, Alcaraz G, Blein JP, Simon-Plas F 2007 Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ* 30: 722-732.

Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA 2005 The branching

gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 17: 464-474.

古川潤 2001 2050 年, 90 億人分の食料を生産する, 古川潤編著・NHK 地球白書, p85-128, 家の光協会

George S, 小南祐一郎・谷口真理子訳 1984 なぜ世界の半分以上が飢えるか, p12-341, 朝日選書, 朝日新聞社

Gibson SW, Conway AJ, Zheng Z, Uchacz TM, Taylor JL, Todd CD 2012 *Brassica carinata* CIL1 mediates extracellular ROS production during auxin- and ABA-regulated lateral root development. *J Plant Biol* 55: 361-372.

Gorpenchenko TY, Aminin DL, Vereshchagina YV, Shkryl YN, Veremeichik GN, Galina K, Bulgakov VP 2012 Can plant oncogenes inhibit programmed cell death? The *rolB* oncogene reduces apoptosis-like symptoms in transformed plant cells. *Plant Signaling Behav* 7: 1058-1061.

Harrison J, Crescenzo MPD, Sene O, Hirel B 2003 Does Lowering Glutamine Synthetase Activity in Nodules Modify Nitrogen Metabolism and Growth of *Lotus japonicus*? *Plant Physiol* 133: 253-262.

Himuro Y, Tanaka H, Hashiguchi M, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Fujita M, Shinozaki K, Matsui M, Akashi R, Hoffmann F 2011 FOX-superroots of *Lotus corniculatus*, overexpressing *Arabidopsis* full-length cDNA, show stable variations in morphological traits. *J Plant Physiol* 168: 181-187.

Himuro Y, Tanaka H, Hashiguchi M, Yamashige R, Simajiri Y, Akashi R 2010 Characteristics of FSL-PIP-#4 as overexpressed by *Arabidopsis thaliana* plasma membrane aquaporin gene, AtPIP1;2. *Root Res* 19: 143-149. (in Japanese with English

abstract)

Hoshi Y, Kondo M, Mori S, Adachi Y, Nakano M, Kobayashi H 2004 Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 22: 359-364.

Hubbell BJ, Welsh R 1998 Transgenic crops: Engineering a more sustainable agriculture? *Agric Human Values* 15: 43-56.

Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsuchida Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M, Fujita M, Motohashi R, Nagata N, Takagi T, Shinozaki K, Matsui M 2006 The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J* 45: 974-985.

Iqbal A, Khalil IA, Nadia S, Khan SM 2006 Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem* 97:331-335.

Jansen K, Gupta A 2009 Anticipating the future: 'Biotechnology for the poor' as unrealized promise? *Futures* 41: 436-445.

Jian B, Hou W, Wu C, Liu B, Liu W, Song S, Bi Y, Han T 2009 *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biol* 9: 78-91.

Johnson X, Brcich T, Dun EA, Goussot M, Haurogne K, Beveridge C, Rameau C 2006 Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* 142: 1014-1026.

Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt NG, Shillito R, Binns AN 1998 Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1.

*Science* 289: 1114-1117.

Kaldenhoff R, Grote K, Zhu J, Zimmermann U 1998 Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14: 121-128.

勝俣誠 1998 食糧生産, 不破敬一郎編著・地球環境ハンドブック, p85-88, 朝倉書店

Kashiwagi J, Krishnamurthy L, Crouch JH, Serraj R 2006 Variability of root length density and its contributions to seed yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. *Field Crops Res* 95: 171-181.

Koltunow AM, Johnson SD, Lynch M, Yoshihara T, Costantino P 2001 Expression of *rolB* in apomictic *Hieracium piloselloides* Vill. causes ectopic meristems in planta and changes in ovule formation, where apomixis initiates at higher frequency. *Planta* 214: 196-205.

Lee TM, Lur HS, Chu C 1997 Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings.: II. Modulation of free polyamine levels. *Plant Sci* 126: 1-10.

Li CJ, Guevara E, Gerra J, Bangerth F 1995 Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Physiol Plant* 94: 465-469.

Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS 2003 Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422: 722-726.

Mateos-Aparicio I, Redondo CA, Villanueva-Suárez MJ, Zapata-Revilla MA 2008 Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp* 23: 305-312.

Maurel C, Leblanc N, Barbier-Brigoo H, Perrot-Rochemann C, Bouvier-Durand M, Guern J 1994 Alteration of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplasts. *Plant Physiol* 105: 1209-1215.

Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita I, Machida Y, Tanaka N 2004 Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB*. *Plant J* 38: 260-275.

Morot-Gaudry JF, Job D, Lea PJ 2001 Amino acid metabolism. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF, Eds., Plant Nitrogen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 167-211.

Murashige T, Skoog F 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 471-497.

Nakamura H, Hakata M, Amano K, Miyao A, Toki N, Kajikawa M, Pang J, Higashi N, Ando S, Toki S, Fujita M, Enju A, Seki M, Nakazawa M, Ichikawa T, Shinozaki K, Matsui M, Nagamura Y, Hirochika H, Ichikawa H 2007 A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol Biol* 65: 357-371.

Nilsson O, Olsson O 1997 Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant* 100: 463-473.

Nilsson O, Tuominen H, Sundberg B, Olsson O 1997 The *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiol Plant* 100: 456-462.

Ochman H, Gerber AS, Hartl DL 1988. Genetic applications of an inverse polymerase

chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.

Peeters NM, Chapron A, Giritch A, Grandjean O, Lancelin D, Lhomme T, Vivrel A, Small I (2000) Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol Evol* 50:413-423.

Pimentel D, Patzek TW 2005 Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research* 14: 65-76.

Poorter A and Nagel O 2000 The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Aust J Plant Physiol* 27: 595–607.

Radchuk VV, Korkhovoy VI 2005 The *rolB* gene promotes rooting in vitro and increases fresh root weight in vivo of transformed apple scion cultivar 'Florina'. *Plant Cell Tiss Org* 81: 203-212.

Röder FT, Schmülling T, Gatz C 1994 Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system: complete suppression and efficient induction of the *rolB* phenotype in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 243: 32-38.

Rook AJ, Huckle CA, Penning PD 1994 Effects of sward height and concentrate supplementation on the ingestive behaviour of spring-calving dairy cows grazing grass-clover swards. *Appl Anim Behav Sci* 40: 101-112.

Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M 2014 Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* 5: 1-9.

Shi L, Twary SN, Yoshioka H, Gregerson RG, Miller SS, Samac DA, Gantt JS, Unkefer PJ, Vance CP 1997 Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell* 9: 1339-1356.

Sorefan K, Booker J, Haurigné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, Leyser O 2003 *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev* 17: 1469-1474.

Somma F, Hopmans JW, Clausnitzer V 1998 Transient three-dimensional modeling of soil water and solute transport with simultaneous root growth, root water and nutrient uptake. *Plant Soil* 202: 281-293.

Spanò L, Mariotti D, Cardarelli M, Branca C, Costantino P 1988 Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol* 87: 479-483.

Spena A, Schmülling T, Koncz C, Schell JS 1987 Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J* 6: 3891-3899.

Sprent JI 1994 Nitrogen acquisition systems in the Leguminosae. In Sprent JI, McKey D, Eds., *Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor*. Kew, UK, Royal Botanic Gardens, pp. 1-15.

Steponkus PL, Lanphear FO 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* 42: 1423-1426.

Sulieman S, Fischinger SA, Gresshoff PM, Schulze J 2010 Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of N<sub>2</sub> fixation in *Medicago truncatula*. *Physiol Plant* 140:

21-31.

Suzuki A, Suriyagoda L, Shigeyama T, Tominaga A, Sasaki M, Hiratsuka Y, Yoshinaga A, Arima S, Agarie S, Sakai T, Inada S, Jikumaru Y, Kamiya Y, Uchiumi T, Abe M, Hashiguchi M, Akashi R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Hirsch AM 2011 *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16837-16842.

Tanaka H, Toyama J, Hashiguchi M, Kutsuna Y, Tsuruta S, Akashi R, Hoffmann D F 2008 Transgenic superroots of *Lotus corniculatus* can be regenerated from superroot-derived leaves following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Plant Physiol* 165: 1313-1316.

Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S 2002 Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677.

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A 2002 Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol* 128: 1271-1281.

Uwer U, Willmitzer L, Altmann T 1999 Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell* 10: 1277-1294.

Wang JH, Lin HH, Liu CT, Lin TC, Liu LY, Lee KT 2014 Transcriptomic analysis reveals that reactive oxygen species and genes encoding lipid transfer protein are associated with tobacco hairy root growth and branch development. *Mol Plant-Microbe Interact* 27: 678-687.

Weigel D, Ahn JH, Bla MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferra C,



Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, Nguyen JT, Sato S, Wang ZY, Xia Y, Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ, Yanofsky MF, Chory J, Fankhauser C 2000 Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 1003-1013.

Wu XR, Chen ZH, Folk WR 2003 Enrichment of cereal protein lysine content by altered tRNA<sup>lys</sup> coding during protein synthesis. *Plant Biotechnol J* 1: 187-194.

Wu XR, Kenzior A, Willmot D, Scanlon S, Chen Z, Topin A, He SH, Acevedo A, Folk WR 2007 Altered expression of plant lysyl tRNA synthetase promotes tRNA misacylation and translational recoding of lysine. *Plant J* 50: 627-636.

Yamamoto A, Shim IS, Fujihara S, Yoneyama T, Usui K 2003 Physiochemical factors affecting the salt tolerance of *Echinochloa crus-galli* Beauv. var. *formosensis* Ohwi. *Weed Biol Manage* 3: 98-104.

Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM 2006 Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res* 97: 111-119.

Zhu LH, Holefors A, Ahlman A, Xue ZT, Welander M 2001 Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the *roIB* gene and its influence on rooting and growth. *Plant Sci* 160: 433-439.