

(様式第5号)

蛍光 X 線分析によるマメ科植物根粒内元素の動態解析 The behavior of element 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鉄とモリブデンにおいて Peking 型 *SEN1* 遺伝子を持つ根粒の方がエンレイ型よりも高いきらいが見られた。この結果は、*SEN1* タンパク質が鉄やモリブデンの輸送に関わっている可能性を示している。しかし今回は、ビームラインのトラブルによって約半数の根粒サンプルを凍結保存することとなったため、融解後の測定時には根粒の内容物が浸出しており、サンプルの状態が異なっていた可能性が高い。したがってさらなる解析が必要であると考えられた。

(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. The peak intensity of Fe and Mo in Peking type was slightly higher than that of Enrei type. This result shows the possibility that *SEN1* protein is involving in membrane traffic of Fe and Mo 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測定用ダイズ根粒の準備

根粒菌接種後約2ヶ月のダイズ根粒を中央でメスによって切断し、3M社のスコッチメンディングテープを用いてマウントに固定した（図1）。測定した根粒は、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10及び8とした。

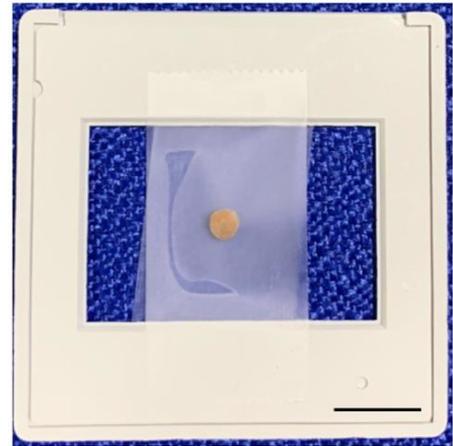


図1：切断した根粒をマウントに固定した様子
bar=1cm

②X線の照射および蛍光X線の検出

測定は図2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7分でおこなった。

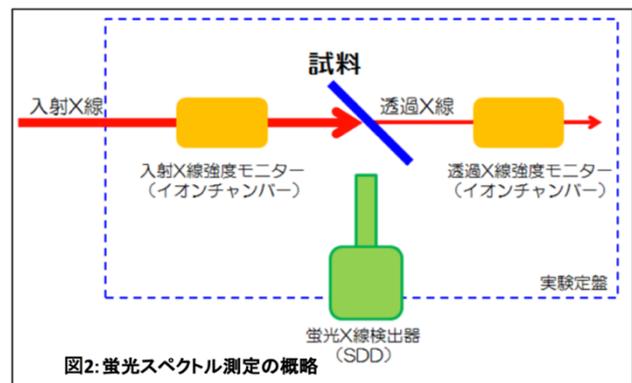


図2：蛍光スペクトル測定の概略 (SDD)

4. 実験結果と考察

図3にモリブデンと鉄に由来する蛍光X線強度を示す。モリブデンから得られた蛍光X線強度はエンレイ型 SEN1の方が低い値を示したが、その差は小さく有意差はなかった（パネルA）。また鉄についてもエンレイ型 SEN1 から得られた蛍光X線強度が低かったが有意差は検出されなかった（パネルB）。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を考えていたが、それを示す結果とはならなかった。

今回の測定は当初、2018年11月13日にすべてを完了させる予定であったが、解析途中でビームラインがダウンするトラブルが発生し、当初日には予定の約半分のサンプルを測定することしかできなかった。未測定だったサンプルについては-80℃で凍結保存し、翌週2018年11月20日に測定に供したが、融解にともなって根粒内容物が浸出していたため、測定日によって条件が異なっていた可能性が高い。

5. 今後の課題

上述したように今回の測定では、途中でサンプルの状態が大きく変化していた可能性が高い。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。

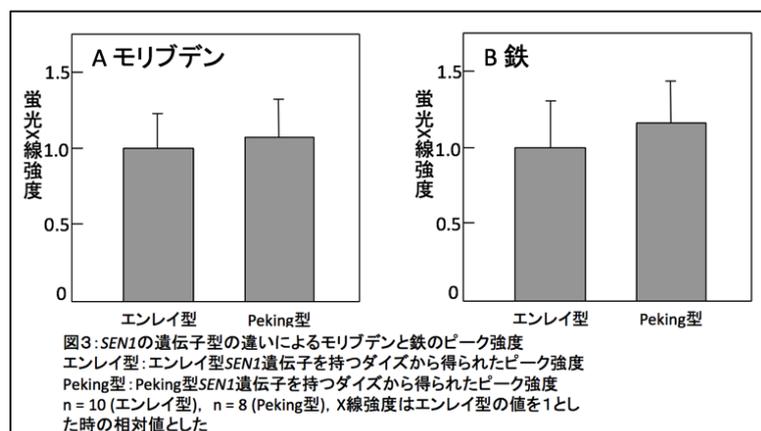


図3：SEN1の遺伝子型の違いによるモリブデンと鉄のピーク強度
エンレイ型：エンレイ型SEN1遺伝子を持つダイズから得られたピーク強度
Peking型：Peking型SEN1遺伝子を持つダイズから得られたピーク強度
n = 10 (エンレイ型), n = 8 (Peking型), X線強度はエンレイ型の値を1とした時の相対値とした

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：2021年3月)