

課題番号	GS029
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	根粒共生系の総合的理解による、低窒素肥料農業を目指した基礎的研究
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域植物共生機構研究ユニット・ユニット長
氏名	林 誠

1. 当該年度の研究目的

根粒形成に関与する遺伝子を網羅的に同定するために、平成24年度に引き続きタグラインの大規模な展開を実施し、次世代シーケンサを用いた大規模挿入近傍配列決定方法により、破壊遺伝子を網羅的に同定する。また、根粒共生特異的転写因子について、次世代シーケンサによる ChIP-Seq などから網羅的に同定した標的遺伝子群から、根粒形成に関与する標的遺伝子の解析をおこなうとともに、新規に同定した、根粒形成を負に制御する遺伝子の機能解析をおこなう。さらに、固定窒素寄与率の解析において、量的遺伝子座を同定する。

2. 研究の実施状況

・根粒共生遺伝子の網羅的同定  
18,000 系統のタグラインを展開した。この結果、当初の目標値を大幅に上回る総計 46,000 系統を展開できた。挿入近傍配列決定方法をさらに改良した結果、検出感度が3倍程度に上昇した。そこで、これまでに選抜したおよそ 170 系統の根粒共生変異体候補において次世代での表現型の遺伝を確認し、挿入近傍配列を決定した。その結果、同定した全遺伝子における既知遺伝子の割合から共生遺伝子がおよそ 50 存在するという当初の想定が裏付けられ、このプログラムで開発した手法の有効性が示された。

・根粒共生遺伝子の機能解析  
根粒共生特異的転写因子 NIN については、その標的遺伝子群の中に根粒数を全身的に制御するペプチド遺伝子が含まれていたことから制御機構を解析した。根粒数は宿主植物によって厳密に制御されているが、これまで根粒菌の感染によって根粒数が制御されるメカニズムは不明であった。今回、根におけるその制御の中核因子として NIN が同定されたことから、メカニズムの全貌が明らかとなった。

抑圧変異によって同定した、根粒形成を負に制御する遺伝子については、その予測配列および遺伝的上位下位試験から、このプログラムで詳細な機能を明らかにした共生シグナル伝達経路の中核因子、CCaMK と核内で競合していると考えられた。さらにこの遺伝子が欠損すると、根粒菌が感染しなくとも根粒形成が誘導されることを発見した。

・固定窒素寄与率を支配する遺伝子座の同定  
重窒素希釈法により固定窒素寄与率に差の見られた野生系統において、組換え自殖系統 90 系統における寄与率を測定した。マッピングの結果、固定窒素寄与率を支配する主要遺伝子座を同定した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計2件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計2件 Hayashi T, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M. Rhizobial infection does not require the cortical expression of upstream common symbiosis genes responsible for the induction of Ca<sup>2+</sup> spiking. <i>Plant J.</i> 77: 146–159 (2014). Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an endogenous retrotransposon associated with epigenetic changes in <i>Lotus japonicus</i>. A tool for functional genomics in legumes. <i>Plant Gen.</i> 10.3835/plantgenome2013.04.0009 (2013). (掲載済み一査読無し) 計0件  (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計17件</p>	<p>専門家向け 計17件  下田宜司、山谷紘子、佐伯和彦、眞板寛子、平川英樹、佐藤修正、西ヶ谷有輝、山崎俊正、河内宏、梅原洋佐、林誠「宿主変異体の窒素固定表現型を規定する根粒菌因子の同定」基礎生物学研究所、2013/9/7-9、植物微生物研究会  山崎明広、下田宜司、林誠「ミヤコグサの根粒着生に関与する Nod factor 受容体の新規相互作用因子の同定」基礎生物学研究所、2013/9/7-9、植物微生物研究会  宮原章、田中福代、林誠「ミヤコグサ組換え自殖系統を用いた固定窒素寄与率及び根粒共生に関わる量的形質遺伝子座のマッピング」基礎生物学研究所、2013/9/7-9、植物微生物研究会  横田圭祐、林誠「NSP1 は根粒・菌根共生において異なるシグナル伝達経路で機能する」基礎生物学研究所、2013/9/7-9、植物微生物研究会  Makoto Hayashi, Takashi Soyano “Transcriptional regulation by NIN for nodulation in legumes” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Takashi Soyano, Makoto Hayashi, Masayoshi Kawaguchi “Lotus japonicus NIN is a bifunctional factor that regulates root nodule formation” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Teruyuki Hayashi, Yoshikazu Shimoda, Makoto Hayashi, Haruko Imaizumi-Anraku “Functional analysis of symbiotic genes by root epidermis-specific expression system in Lotus japonicus” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Keisuke Yokota, Makoto Hayashi “NSP1 acts in distinct pathways for root nodule and arbuscular mycorrhizal symbiosis” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Akihiro Yamazaki, Yoshikazu Shimoda, Makoto Hayashi “A novel interactor of nod factor receptor affects the nodulation phenotype of <i>Lotus japonicus</i>” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Tsuneo Hakoyama, Norio Suganuma, Hiroshi Kouchi, Makoto Hayashi, Toru Fujiwara “Analysis of a host factor required for efficient symbiotic nitrogen fixation in model and crop plants –Functional analysis of <i>Lotus japonicus</i> SEN1 protein–”Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation  Masaki Hayashi, Sokichi Shiro, Hiroyuki Kanamori, Satomi Mori, Harumi Sasaki, Kazue Ito, Takashi Sayama, Miki Nishioka, Masakazu Takahashi, Masao Ishimoto, Yuichi Katayose, Akito Kaga, Kyuya Harada, Hiroshi Kouchi, Makoto Hayashi, Yuichi Saeki, Yosuke Umehara “Map-based cloning of Rj4 gene that controls a nodule symbiotic specificity in soybean” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation</p>

様式19 別紙1

	<p>Yoshikazu Shimoda, Hiroko Yamaya, Kazuhiko Saeki, Hiroko Maita, Hideaki Hirakawa, Shusei Sato, Yuki Nishigaya, Toshimasa Yamazaki, Hiroshi Kouchi, Yosuke Umehara, Makoto Hayashi “Exploring Mesorhizobium loti genes that determine strain-specific Fix- phenotype of <i>Lotus japonicus</i> mutant” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation</p> <p>Atsuko Hirota, Makoto Hayashi “Crosstalk between nodulation and cytokinin signalings in nodule development of <i>Lotus japonicus</i>” Miyazaki, 2013/10/14-18, 18<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation</p> <p>Makoto Hayashi “How nitrogen-fixing nodules were formed during evolution” RIKEN Yokoyama Campus, 2014/3/5-6, UK-Japan Workshop</p> <p>征矢野敬、平川英樹、佐藤修正、林誠、川口正代司「根粒原基を誘導するミヤコグサ NIN は CLE 遺伝子を標的として根粒形成を抑制する」富山大学、2014/3/18-20、日本植物生理学会</p> <p>矢野幸司、寿崎拓哉、梅原洋佐、佐藤修正、田畑哲之、河内宏、林誠、川口正代司、藤原徹「ミヤコグサの ARN1 は窒素濃度に応じた根の伸長を制御する」富山大学、2014/3/18-20、日本植物生理学会</p> <p>廣田敦子、林誠「マメ科植物ミヤコグサにおける根粒菌シグナルとサイトカイニンシグナルのクロストーク」富山大学、2014/3/18-20、日本植物生理学会</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>研究の概要、生物研(農業生物資源研究所) <a href="http://www.nias.affrc.go.jp/researchactivities/25hayashi/">http://www.nias.affrc.go.jp/researchactivities/25hayashi/</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>NIAS オープンカレッジ「共生から見る植物-植物と微生物の相互作用-」、2013/11/14、主婦会館プラザエフ、一般、13名、植物微生物共生の仕組みの解明とその応用についてスライドで解説した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計2件</p>	<p>農業共済新聞、2013/4/10、p13、「根粒形成の鍵となるタンパク質「NIN」の機能解明、チッ素肥料減らした低環境負荷の農業実現へ」</p> <p>ニューカントリー6月号、p84-85、「農業を変えるサイエンス マメ科植物の根粒形成における実行タンパク質の解明」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	136,000,000	99,722,000	36,278,000	0	0
間接経費	40,800,000	29,916,600	10,883,400	0	0
合計	176,800,000	129,638,600	47,161,400	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	1,328,642	36,278,000	0	37,606,642	34,208,495	3,398,147	0
間接経費	399,000	10,883,400	0	11,282,400	11,282,400	0	0
合計	1,727,642	47,161,400	0	48,889,042	45,490,895	3,398,147	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	6,561,183	外付けハードディスク、実験試薬等
旅費	1,042,690	東京大学大学院農学生命科学研究科等
謝金・人件費等	22,649,323	特別研究員等人件費
その他	3,955,299	シーケンス解析業務、ミヤコグサの圃場栽培管 理業務等
直接経費計	34,208,495	
間接経費計	11,282,400	
合計	45,490,895	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
試薬1式 合成DNA	オペロン DZ99 21,000mer	1	639,450	639,450	2013/8/5	農業生物資源研 究所
				0		
				0		