

マメ科植物研究のためのミヤコグサバイオリソース

橋口正嗣¹, 佐藤修正², 橋口拓勇¹, 田中秀典¹, 明石 良¹

¹宮崎大学農学部

〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

²東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

Masatsugu Hashiguchi¹, Shusei Sato², Takuyu Hashiguchi¹, Hidenori Tanaka¹
and Ryo Akashi¹

Development of *Lotus japonicus* bioresources for legume plant research

Keywords: Bioresource, legume, LegumeBase, *Lotus japonicus*, NBRP

¹Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan

²Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c9.00169

1. はじめに

マメ科植物は、730 属 20,000 以上の種からなる多様な分類群の 1 つであり (Doyle & Luckow 2003), 生物窒素固定の大部分を担い、ダイズ (*Glycine max*), エンドウ (*Pisum sativum*), アズキ (*Vigna angularis*) など主要な作物を多く含んでいる。マメ科植物の一つであるミヤコグサ属 (*Lotus* spp.) は地中海を原産として 200 以上の種から構成され、牧草や観賞用の他、薬用植物としても利用される種が存在する。ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、日本、韓国、中国を含む東アジアと中央アジアに分布し、西はアフガニスタンまで広く分布しており (Pajuelo & Stougaard 2005), ゲノムサイズが小さい (442 Mb) (Ito et al. 2000) こと、世代期間が 3~4 ヶ月と短く種子生産が多いこと、植物サイズが小さいこと、人工受粉が容易であること、更に、アグロバクテリウムによる形質転換が可能であることからマメ科植物における最初のモデル植物として提唱された (Handberg & Stougaard 1992)。この Handberg & Stougaard (1992) の報告以降、日本とデンマークを中心とする研究グループによりマメ科の最大の特徴である共生窒素固定に関する研究が躍進してきた。さらに、Sato ら (2008) は、ミヤコグサの実験系統である Miyakojima MG-20 を用いてマメ科植物で初となる全ゲノム配列の決定を報告したことから、ミヤコグサのモデルマメ科植物としての地位は確固たるものとなった。

このような研究背景の中で、ミヤコグサの実験生物としての重要性が高まり、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ミヤコグサ・ダイズが開始された。ミヤコグサ・ダイズ課題は、2002 年の NBRP 発足の翌年 2003 年の下半期に採択・開始された課題であり、第 4 期となった現在は宮崎大学を代表機関、東北大学を分担機関として「基盤情報の再構築と拡充」をテーマに事業を進めている。本総説では、NBRP ミヤコグサ・ダイズのデータベー

ス LegumeBase (<https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/>) で整備しているミヤコグサリソース (表) の概要について紹介する。

表. LegumeBase で保存中のミヤコグサリソース

リソースの種類	保存数	寄託元
ミヤコグサ植物リソース		
野生系統 (*一部)	208	ミヤコグサ研究者コミュニティ・NBRP
実験系統 (B-129, MG-20, B-303)	3	川口氏, Grant 氏
RI 系統(Gifu B-129×Miyakojima MG-20)	205	かずさ DNA 研究所
RI 系統(Gifu B-129× <i>L. burtii</i> B-303) *	163	オーフス大学
RI 系統(<i>L. filicaulis</i> B-37×Gifu B-129) *	100	オーフス大学
EMS 突然変異体	170	理化学研究所
アクティベーションタグライン*	960	日本大学
SR 根培養系	1	宮崎大学
EMS M2 バルク種子	162	NBRP
LORE1 タグライン (*一部)	975	農業生物資源研究所
合計	1,000	オーフス大学
ミヤコグサ根粒菌リソース		
野生種および実験系統	17	奈良女子大学
STM 変異株	6,671	かずさ DNA 研究所
内生菌プラスミドクローン*	3,072	京都産業大学
根粒菌プラスミドクローン	11,520	かずさ DNA 研究所
合計	21,280	
ミヤコグサ DNA リソース		
TAC クローン	72,192	かずさ DNA 研究所
BAC クローン (Miyakojima MG-20 由来)	14,976	かずさ DNA 研究所
cDNA クローン	140,544	かずさ DNA 研究所
BAC クローン (Gifu B-129 由来) *	32,000	オーフス大学
形質転換ベクター	6	林 氏
完全長 cDNA クローン	104,064	かずさ DNA 研究所
合計	363,782	
総計	389,009	

*: 配布準備中

詳細は LegumeBase (<https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/>) を参照されたい。

2. 植物リソース

2-1. 実験系統

ミヤコグサの2つの重要な系統である Gifu B-129 (図 1a) および Miyakojima MG-20 (図 1b) は、本草種の実験 (標準) 系統として広く利用されている。Gifu B-129 は、Handberg & Stougaard (1992) により最初に確立された実験系統であり、岐阜県で平吉功氏により収集され、William Grant 氏によりアクセション番号が付与された後、Stougaard 氏により 9 回自家受粉され固定された (Stougaard & Beuselinck 1996)。さらに Kawaguchi (2000) は、日本の沖縄県宮古島由来の Miyakojima MG-20 を新たな実験系統として確立した。本株は、Gifu B-129 に比べて世代期間が短く (3

	Gifu B-129	Miyakojima MG-20	<i>L. burtii</i> B-303
ゲノムサイズ	442 Mb (Ito et al. 2000)	472 Mb (Ito et al. 2000)	Almost same as Gifu B-129
世代期間	3-4 カ月	2-3 カ月	2-3 カ月
室内での開花	蛍光灯下で開花が困難	蛍光灯下で開花が容易	蛍光灯下で開花が容易
花色	黄色、ペインが鮮明	黄色 (Gifu より若干薄い)、ペインが薄い	薄黄色~ピンク。成熟につれてピンク色が増す
種皮色	褐色	黒褐色	薄緑褐色
アントシアニン	茎と花柄に蓄積	蓄積無し	茎と花柄に少量蓄積
トライコーム	多い (頸周辺が顕著)	非常に少ない	少ない
その他	基部が木化する		耐裂葉性が高い・葉が細い

図 1. 3 種のミヤコグサ実験系統の特性と写真の比較

a : Gifu B-129 系統, b : Miyakojima MG-20 系統, c : *Lotus burtii* B-303 系統。

ヶ月程度) 蛍光灯などの弱い光の下でも容易に開花することが大きな特徴であり、2008年に発表されたミヤコグサのゲノム解析に用いられた (Sato et al. 2008)。3番目の実験系統である *Lotus burttii* B-303 (図 1c) は, Burt によってパキスタンで収集され (Sz.-Borso et al. 1972), W. F. Grant によりアクセッション番号が付与された後, Kawaguchi (2005) によって9回自家受粉された。本系統は, Miyakojima MG-20 と同様に室内環境で開花が容易で, 高い耐裂莢性を有している。これらの実験系統を交配した組換え自殖系統 (後述) の開発も進んでいる。

2-2. 野生系統

ミヤコグサ野生種は様々な環境への適応能力が高いことから, 大きな遺伝的および形態的変異を有している。LegumeBase では, 北は北海道の礼文島から南は沖縄県の宮古島までの広い地域に由来する野生系統を保存している (図 2)。これらの系統は日本大学の青木らが 1998年に一元化しアクセッション番号を付与した系統群と, 本プロジェクトの推進により収集された系統群の2つがある。また前者には, マメ科牧草としての有用性を評価することを目的として帯広畜産大学の嶋田 (板谷, 1982) および農水省ジーンバンク事業により収集された系統 (杉信ら 1988), さらに, モデル植物としての再評価に伴い 1996年以降に青木および川口 (現, 基礎生物学研究所) らにより収集された系統が含まれている。現在, LegumeBase には 200 を超える野生系統が保存されており, 108 系統が分譲可能である (表)。我々は, これらのミヤコグサ野生型における9つの形態学的特性を調査し, それらの情報をデータベース (LegumeBase -*Lotus japonicus*-: <https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/lotus/>) に公開している。本データベースでは, 採種地の地点・気象情報の他に, 宮崎県宮崎市 (北緯 31 度, 東経 131 度) および北海道札幌市 (北緯 43 度, 東経 141 度) で評価した形質データから系統の検索が可能である。



図 2. 日本に自生する3種のミヤコグサ属野生種の生息地と保存系統の草型と種子
 a: 宮崎県日南海岸に生息するミヤコグサ。 b,e,f,j :長崎県平戸市 (b), 対馬諸島の岬の断崖 (e) と石灰岩 (j), 小値賀島 (f) に自生するミヤコグサ。 i: 沖縄県波照間島の海岸に自生するシロバナミヤコグサ。 c, d: 愛媛県由来の MG-74 直立型で種子が小さい g, h: 北海道由来の MG-34, ほふく型。 k, l: 青森県由来の MG-23, 矮性型。 Hashiguchi & Akashi (2014) を改変。

2-3. 組換え自殖系統

組換え自殖系統 (RILs : Recombinant inbred lines) は, 純系同士の F_2 を自殖させ遺伝子型の固定を行うことにより, 純系統間のマッピング集団を恒久的に維持できる実験材料である。また, RILs における形質変異の遺伝解析では, 系統による形質評価と反復実験が可能であるため, データの精度を高めることができる。ミヤコグサでは, Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 の交雑から 205 系統の RIL が確立された。Gondo ら (2007) はこれらの RIL を利用して, 13 の表現型形質の量的形質遺伝子座 (QTL) 分析を行った。この報告で評価された表現型データは, LegumeBase で閲覧可能である。また, Tominaga ら (2012) は, 窒素固定に関する遺伝子の QTL 解析も報告している。これらの RIL の 187 個体はリシーケンスによって遺伝子型が決定され, さらに, 1,929 個の recombination breakpoints (組換え切断点) を有する高解像度遺伝子地図が構築された (Shah et al. 2016)。

2-4. EMS 変異体と M2 バルク種子

ミヤコグサにおけるメタンスルホン酸エチル (EMS) 処理変異株は, Miyakojima MG-20 を背景に理研植物科学研究センターで作出された。突然変異体には, 地上部形態突然変異体 (小植物体, 葉, 茎, 花など) および地下部 (根) 形態学的突然変異体 (根の伸長, 根の太さ, 根の毛の長さおよび根毛の数など) の 2 種類があり, 現在, 98 系統のホモ接合変異体が入手可能である (図 3)。Suzuki ら (2011) は, 変異株 01-0017 (図 3 f) と 01-1428 を用いて, 根粒形成はジャスモン酸シグナリングを通して赤/遠赤の比率を感知することによって光形態形成的に制御されることを報告した。また同じく, Miyakojima MG-20 の EMS 処理バルク M2 種子も整備している (図 3, 表)。各セットは, 0.4%EMS 溶液で 8 から 10 時間処理された 1,000 から 2,000 個体の M1 植物に由来する 5,000 から 9,000 粒の M2 バルク種子である。利用者は, 自身で目的とする突然変異体をスクリーニングすることができる。本リソースを利用して単離された変異体は, 自身の研究論文発表後に LegumeBase に寄託することが MTA に定められている。Nishida ら (2018) は, 本 M2 バルク種子から変異体 *nrsym1* を単離し, *NRSYMI* 遺伝子は高濃度硝酸に応答した根粒着生の抑制を制御する因子であることを明らかにした。

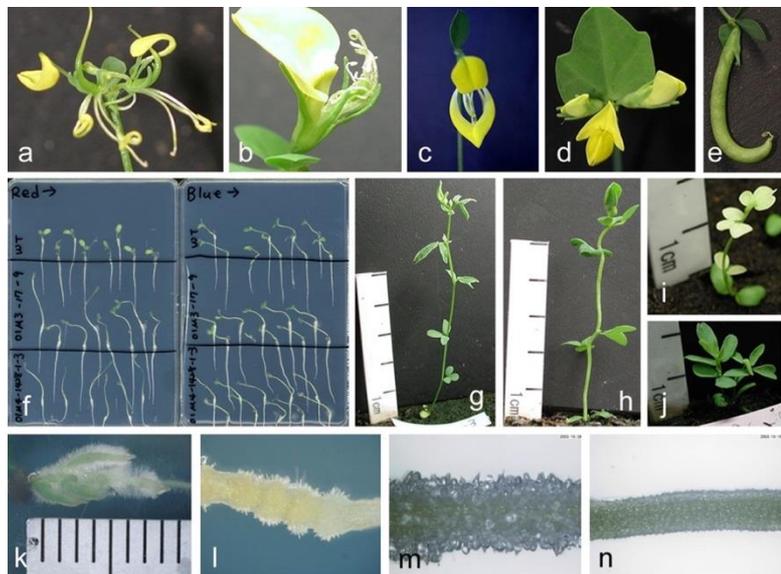


図 3. ミヤコグサ Miyakojima MG-20 に由来する EMS 処理突然変異体
 a, k: (212-003) 花の形態異常 (a) と多くの短い根 (k)。b, e, h: (212-103) 花の形態異常 (b), 曲がった莢 (e), 捻れた茎 (h)。c: (01-0210) 花の形態異常。d: (212-596) 結合した包葉。f: (01-0017) 赤色光照射による長い胚軸および不完全な胚軸伸長。g: (207-008) 細い葉。i: (206-105) 白い葉。j: (01-0196) 矮性。l: (207-034a) 異常な根の形と短い根毛。m: (01-0348) 膨潤した根毛。n: (01-1066) 短い根毛。これらの変異株は理化学研究所の酒井氏 (現, 新潟大学) によって開発された。説明中の括弧内の数字は変異体の系統番号を示す。Hashiguchi & Akashi (2014) を改変。

2-5. 根培養系（セイヨウミヤコグサ由来スーパールート）

スーパールート（SR）（図4）は、セイヨウミヤコグサ（*Lotus corniculatus*）から単離された植物ホルモン非存在下で無限的に伸長可能な培養根であり、発見から約 20 年を経過した現在でもその特性を維持している（Akashi et al. 1998）。培養根は光を当てることで根から直接的に体細胞不定胚を形成し植物体へと再生可能である。また、SR は根のクローニング、植物体再分化（Akashi et al. 1998）、プロトプラスト培養（Akashi et al. 2000）、および *Agrobacterium* 法による形質転換（Tanaka et al. 2008, Jian et al. 2009）が可能などの特徴から、植物ホルモンに関与する形質発現や根粒形成に関する根の生理学的研究の他、形質転換系による遺伝子の機能解析（Himuro et al. 2010）等に有用な材料である。

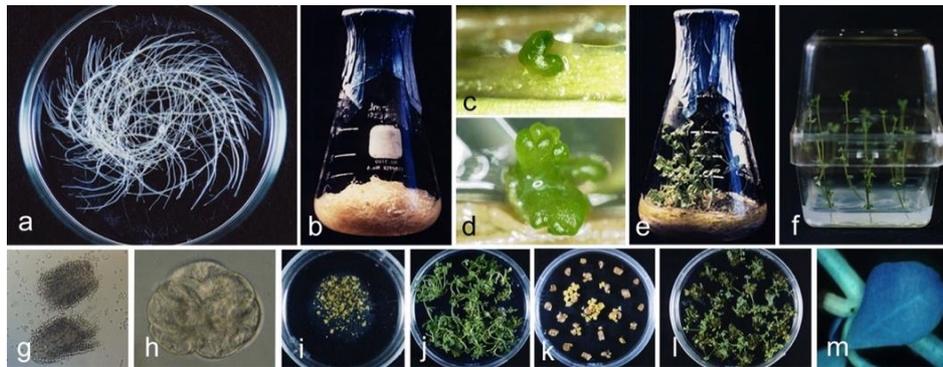


図4. セイヨウミヤコグサ(*Lotus corniculatus*)由来スーパールート(SR)

a: 継代培養 28 日目の 10 本の側根に由来する根培養物(φ9 cm シャーレに移したもの)。b: 継代培養 28 日目(側根約 30 本)の SR 培養。c, d: 明条件に設置後、培養根から再分化した体細胞胚。e: 明条件に設置後の根から再生したシュート。f: 再分化植物体。g: 酵素処理 2 時間後に分解された根端とプロトプラスト。h: プロトプラストからの微小カルス。i: 寒天ディスク中で増殖したカルス(φ6 cm シャーレ 4 週間目)。j: プロトプラスト由来カルスからのシュート形成と伸長(φ9 cm シャーレ)。k: 100 mg/L カナマイシンを含む MS 培地上の耐性カルス。l: 培養 8 週間後の葉外植片由来のシュート。m: 再分化植物体の葉における GUS 活性。(Akashi et al. 1998, 2003 および Tanaka et al. 2008 から抜粋・改変)

2-6. LORE1 タグライン

ミヤコグサの突然変異体の解析の過程で、ミヤコグサの内在性のレトロトランスポゾンである *LORE1* の 1 つがカルス化から植物体再分化の過程で活性化することが見出された。その後の詳細解析の結果、*LORE1* の転移は生殖細胞形成過程で起こるため、活性化個体から収集した種子はそれぞれ独立の新規挿入をもつこと、挿入部位は遺伝子領域の頻度が高いことが確認された（Madsen et al., 2005）。この性質を利用することにより、大規模な挿入タグラインの構築が日本とデンマークとの共同で行われ、合わせて 10 万系統を超えるタグラインが作製された（Fukai et al. 2012, Urabański et al. 2012）。作製されたタグラインの *LORE1* 挿入部位の情報について、サンプルのバルク化と新型シーケンサーを用いた大規模解析で同定し、ミヤコグサのゲノムデータベースである [miyakogusa.jp](https://www.kazusa.or.jp/lotus/) (<https://www.kazusa.or.jp/lotus/>) および [LotusBase](https://lotus.au.dk/) (<https://lotus.au.dk/>) で検索可能になっている。日本で作製された系統については種子増殖ができた系統から順次 NBRP リソースとして提供されており、デンマークで作製された系統については [LotusBase](https://lotus.au.dk/) を通して入手することができる（Hashiguchi et al. 2018）。

3. DNA リソース

3-1. cDNA, TAC および BAC クローン

Sato ら (2008) は Miyakojima MG-20 を用いてミヤコグサの全ゲノム配列を決定した。Transformation-competent artificial chromosome (TAC) (Asamizu et al. 2003, Kaneko et al. 2003, Kato et al. 2003, Sato et al. 2001), Bacterial Artificial Chromosome (BAC) (Sato et al. 2007, 2008) および cDNA ライブラリー (Asamizu et al. 2000, 2004) はミヤコグサゲノムプロジェクトで開発され、その情報はかずさ DNA 研究所のデータベースサイト miyakogusa.jp や *Lotus japonicus* EST Index (<http://est.kazusa.or.jp/en/plant/lotus/EST/index.html>) で利用可能である。これらの DNA クローンは LegumeBase に寄託され公開されている (表)。

3-2. 完全長 cDNA

完全長 cDNA は遺伝子またはタンパク質の機能解析に有用な情報であり、シロイヌナズナ (Seki et al. 1998), イネ (Kikuchi et al. 2003), コムギ (Ogihara et al. 2004), ダイズ (Umezawa et al. 2008), トウモロコシ (*Zea mays*; Soderlund et al. 2009), トマト (Aoki et al. 2010) およびオオムギ (Matsumoto et al. 2011) などの主要な植物で整備されている。ミヤコグサの完全長 cDNA は、かずさ DNA 研究所で開発され、LegumeBase に寄託されている (表)。多様な処理条件の下で培養されたミヤコグサの培養細胞や、地上部および根から誘導された完全長濃縮 cDNA ライブラリーからの 3,874 の全長配列を含む、約 100,000 のミヤコグサ cDNA クローンを保存している。

3-3. 形質転換ベクター

本ベクターは、CAMBIA 社のベクター pCAMBIA1300 を骨格にプロモーター領域をミヤコグサ由来の polyubiquitin 1 (*Ljubq1*) プロモーターに改良し、ミヤコグサ専用の形質転換ベクターとして開発されたものである (Maekawa et al. 2008)。ミヤコグサ由来のプロモーターを使用しているため、ミヤコグサの葉、茎、根、根粒および花粉において CaMV 35 S プロモーターよりも高い活性を有することが報告されている。さらに、*Ljubq1* プロモーター制御下に GATEWAY システムを組み込んでいるため目的遺伝子の挿入が容易であり、強発現や RNA 干渉などに利用可能である。LegumeBase では、ミュンヘン大学 (現、理化学研究所) の林誠氏が寄託した 6 種類のベクターを公開している (表)。

3-4. ミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) プラスミドクローン

LegumeBase では、4,196 の *Mesorhizobium loti* プラスミドクローンが保存されている。かずさ DNA 研究所から寄託された本クローンは、ミヤコグサ根粒菌のゲノムプロジェクトで使用されたクローンを含んでおり、ミヤコグサ根粒菌のゲノム DNA の扱いやすいサイズを pUC プラスミドにクローニングしたものである (Kaneko et al. 2000)。これらの DNA クローン情報は、根粒菌ゲノム情報に関するデータベースである RhizoBase のゲノムブラウザ (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) で確認することが出来る。このゲノムブラウザでは、目的の DNA クローンを選択し、そのクローンの DNA 配列を他の遺伝子座やドメインと比較することが可能である。

4. 根粒菌リソース

4-1. *Mesorhizobium loti* STM 変異株

ミヤコグサ根粒菌 (*M. loti*) の突然変異体ライブラリーは、かずさ DNA 研究所から寄託されたものであり、ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株のゲノム上にトランスポゾン挿入し作製した変異株集団である。変異の導入には Signature-Tagged Mutagenesis (STM) を用い、21 bp のタグ配列で標識した Tn5-mini transposon (27 種類) を挿入したミュータントライブラリーが構築された (Shimoda et al. 2008)。現在、6,671 個の *M. loti* STM 変異株が LegumeBase から入手可能である (表)。オペロン構造、予測タンパク質ドメイン、オルソログタンパク質グループなどの *M. loti* ORF に関する詳細な情報は、データベース RhizoBase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) で確認可能である

5. 遺伝子情報 (データベース)

ミヤコグサのゲノム情報はかずさ DNA 研究所のデータベースである miyakogusa.jp (<https://www.kazusa.or.jp/lotus/>) とデンマーク、オーフス大が整備している LotusBase (<https://lotus.au.dk/>) で公開されている。どちらのデータベースも基本的な情報は共通のものを提供しているが、miyakogusa.jp は個別遺伝子の詳細情報を入手しやすい構造になっており、LotusBase はゲノム構造の情報が把握しやすいゲノムブラウザの機能が充実しているため使用目的により使い分けると良い。また、NBRP のゲノム情報整備プロジェクト等で整備したミヤコグサ野生系統の SNPs 情報は統合データベースプロジェクトで整備された Plant Genome DataBase Japan (<http://pgdbj.jp/index.html?ln=ja>) から入手可能であり、これらの SNP 情報を基にゲノムワイド関連解析を行うことができるウェブサイトが LotusBase から提供される計画である。

7. まとめ

NBRP ミヤコグサ・ダイズは、マメ科植物研究のための貴重な資源を収集・保存し、良質な実験材料と情報を提供することを目的としている。また、我々のリソースを利用する際は、ユーザーは生物遺伝資源提供同意書 (MTA ; Material Transfer Agreement) に署名し、提供されたリソースを用いた研究成果には本リソースセンターから提供されたことを明記することが定められている。さらに、ミヤコグサ・ダイズ課題における提供手数料の徴収は 2010 年 4 月から開始したが、利用者は、オンラインショッピング形式でクレジットカードまたは銀行振込 (国内のみ) によって支払うことができる。なお、いくつかのリソースは研究者から寄託されたもので、寄託者によって規定された利用条件が定められたリソースも含まれていることをご了承願いたい。

これまで、実験株、突然変異体や DNA ライブラリーのような多量の重要な研究材料 (バイオリソース) が独立した研究資金により開発されてきたが、多くのバイオリソースはそれぞれの研究者が保有し散在している。これらのバイオリソースは、基礎研究や応用研究のための貴重な材料として今後も重要である一方で、開発者 (研究者) はこれらのリソースを自身で維持または分譲するために多くの時間と労力を費やしているものもある。本プロジェクト

トでは、これらの貴重な研究材料の寄託を受け入れ、一元化して保存、増殖および配布することによりこれらのサポートが可能である。

今後も引き続き良質なバイオリソースの収集・保存（維持）および提供を行い、ミヤコグサ・ダイズバイオリソースを用いた研究分野の発展に貢献したいと考えている。

8. 謝辞

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）のナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）の援助により実施した。LegumeBaseの構築と維持はNBRP情報センター整備プログラムの川本祥子博士をはじめとする国立遺伝学研究所系統情報研究室のスタッフの方々にご協力頂いた。また、プロジェクトの運営についてNBRPミヤコグサ・ダイズ運営委員の皆様が助言を賜った。さらに、ミヤコグサ・ダイズ研究コミュニティの多くの皆様にはリソースの利用や寄託等でご協力を頂いた。ここに記してお礼申し上げる。

9. 引用文献

- 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., Harris, S., Hoffmann-Tsay, S-S. & Hoffmann, F. 2000. Plants from protoplasts isolated from a long-term root culture (Super Root) of *Lotus corniculatus*. *J. Plant Physiol.* 157: 215-221.
- 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 and Soil.* 255: 27-33
- Aoki, K., Yano Kentar, Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Narita, T. Shin-i, T., Kohara, Y., Yamamoto, N., Takahashi, H., Watanabe, Y., Egusa, M., Kodama, M., Ichinose, Y., Kikuchi, M., Fukushima, S., Okabe, A., Arie, T., Sato, Y., Yazawa, K., Satoh, S., Omura, To., Ezura, H. & Shibata, D. 2010. Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11: 210.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. & Tabata, S. 2000. Generation of 7137 Non-redundant Expressed Sequence Tags from a Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 127-130.
- Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. IV. Sequence features and mapping of seventy-three TAC clones which cover the 7.5 mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 115-122.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. & Tabata, S. 2004. Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Mol. Biol.* 54: 405-514.
- Gondo, T., Sato, S., Okumura, K., Tabata, S., Akashi, R. & Isobe, S. 2007. Quantitative trait locus analysis of multiple agronomic traits in the model legume *Lotus japonicus*. *Genome* 50:627-637

- Doyle, J.J., Luckow, M.A. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Fukai, E., Soyano, T., Umehara, Y., Nakayama, S., Hirakawa, H., Tabata, S., Sato, S. & Hayashi, M. 2012. Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon *LOREI*. *Plant J.* 69: 720-730.
- Handberg, K. & Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
- Hashiguchi, M., Tanaka, H., Muguera, M., Akashi, R., Sandal, N.N., Andersen, S. U. & Sato, S. 2018. *Lotus japonicus* genetic, mutant, and germplasm resources. *Current Protocols in Plant Biology*, 3, e20070.
- Hashiguchi, M. & Akashi, R. 2014. The National BioResource Project in Japan. In: Tabata, S. & Stougaard, J. (eds.) *The Lotus japonicus genome*. pp. 245-258. Springer, Berlin.
- Himuro, Y., Tanaka, H., Hashiguchi, M., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Akashi, R. & Hoffmann, F. 2010. FOX-superroots of *Lotus corniculatus*, overexpressing Arabidopsis full-length cDNA, show stable variations in morphological traits. *J. Plant Physiol.* 168: 181-187.
- Ito, M., Miyamoto, J., Mori, Y., Fujimoto, S., Uchiyumi, T., Abe, M., Suzuki, A., Tabata, S. & Fukui K. 2000. Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicus*, *J Plant Res.* 113: 435-442.
- 板谷守 1982. ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* var. *japonica* Regel) の種生態学的研究. 帯広畜産大学大学院修士論文.
- 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.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. 2000. Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. III. Sequence features and mapping of sixty-two TAC clones which cover the 6.7 Mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 27-33.
- Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. & Tabata, S. 2003. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. V. Sequence features and mapping of sixty-four TAC clones which cover the 6.4 mb regions of the genome. *DNA Res.* 10: 277-285.
- Kawaguchi, M. 2000. *Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG-20': An early-flowering accession suitable for indoor handling. *J. Plant Res.* 133: 507-509.
- Kawaguchi, M., Andrea, P.H., Koji, Y., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., Nagata, T., Namai, K., Nishida, H., Shibata, D., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, M., Harada, K., Sandal, N., Stougaard, J.,

- Bachmair, A. & Grant, F. W. 2005. *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the *lotus* molecular genetics triangle. *DNA Res.* 12: 69-77.
- Kikuchi, S. et al (The Rice Full-Length cDNA Consortium) 2003. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. *Science* 301: 376-379.
- Madsen, L.H., Fukai, E., Radutoiu, S., Yost, C.K., Sandal, N., Schauser, L. & Stougaard, J. 2005. *LORE1*, an active low-copy-number TY3-gypsy retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J.* 44: 372-381.
- Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y. & Hayashi, M. 2008. Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 21: 375-382.
- Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T. & Sato, K. 2011. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol.* 156: 20-28.
- Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., Betsuyaku, S., Miura, K., Soyano, T., Kawaguchi, M. & Suzaki, T. 2018. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun.* 9: 499.
- Ogihara, Y., Mochida, K., Kawaura, K., Murai, K., Seki, M., Kamiya, A., Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shin-I, T., Kohara, Y. & Yamazaki, Y. 2004. Construction of a full-length cDNA library from young spikelets of hexaploid wheat and its characterization by large-scale sequencing of expressed sequence tags. *Genes. Genet. Syst.* 79: 227-232.
- Pajuelo, E. & Stougaard, J. 2005. *Lotus japonicus* as a model system. In: Márquez, A.J. (eds.) *Lotus japonicus* Handbook. pp 3-24. Springer, Netherlands.
- Sandal, N., Jin, H., Rodriguez-Navarro, D. N. Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, E. J., Andersen, U. S. & Stougaard, J. (2012) A Set of *Lotus japonicus* Gifu × *Lotus burtii* Recombinant Inbred Lines Facilitates Map-based Cloning and QTL Mapping, *DNA Res.* 19: 317-323.
- Sato, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Asamizu, E., Kato, T. & Tabata, S. 2001. Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. *DNA Res.* 8: 311-318.
- Sato, S., Nakamura, Y., Asamizu, E., Isobe, S. & Tabata, S. 2007. Genome Sequencing and Genome Resources in Model Legumes. *Plant Physiol.* 144: 588-593.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H. & Tabata, S. 2008. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 15: 227-239.
- Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y. & Shinozaki, K. 1998. High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper. *Plant J.* 15: 707-720.

- Shah, N., Hirakawa, H., Kusakabe, S., Sandal, N., Stougaard, J., Schierup, M.H., Sato, S. & Andersen, U. S. 2016. High-resolution genetic maps of *Lotus japonicus* and *L. burttii* based on re-sequencing of recombinant inbred lines. *DNA Res.* 23: 487–494.
- Shimoda, Y., Mitsui, H., Kamimatsuse, H., Minamisawa, K., Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M., Shinpo, S., Watanabe, A., Kohara, M., Yamada, M., Nakamura, Y., Tabata, S. & Sato, S. 2008. Construction of Signature-tagged Mutant Library in *Mesorhizobium loti* as a Powerful Tool for Functional Genomics. *DNA Res.* 15: 297-308.
- Soderlund C, Descour A, Kudrna D, Bomhoff, M., Boyd, L., Currie, J., Angelova, A., Collura, K., Wissotski, M., Ashley, E., Morrow, D., Fernandes, J., Walbot, Vi. & Yu Y, 2009. Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genet.* 5: e1000740.
- Stougaard, J. & Beuselinck, P.R. 1996. Registration of GIFU B-129-S9 *Lotus japonicus* germplasm. *Crop Sci* 36:476.
- 杉信賢一, 鈴木信治, 小松敏憲. 1988. ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel) の特性評価. 3. 収集地を異にするミヤコグサの特性比較. *日草誌* 34:13-19.
- 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 M. A. 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. USA.* 108: 16837-16842.
- Sz-Borso, O., Somaroo, B.H. & Grant, W.F. 1972. A new diploid species of *Lotus japonicus* (Leguminosae) in Pakistan. *Can. J. Bot.* 50:1865-1870.
- Tanaka, H., Toyama, J., Hashiguchi, M., Kutsuna, Y., Tsuruta, S., Akashi, R. & Hoffmann, F. 2008. Transgenic superroots of *Lotus corniculatus* can be regenerated from superroot-derived leaves following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J. Plant Physiol.* 165:1313-1316.
- Tominaga, A., Gondo, T., Akashi, R., Zheng, S., Arima, S. & Suzuki, A. 2012. Quantitative trait locus analysis of symbiotic nitrogen fixation activity in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Plant. Res.* 125: 395–406.
- Umezawa, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Seki, M., Ishiwata, A., Akiyama, K., Kurotani, A., Yoshida, T., Mochida, K., Kasuga, M., Todaka, D., Maruyama, K., Nakashima, K., Enju, A., Mizukado, S., Ahmed, S., Yoshiwara, K., Harada, K., Tsubokura, Y., Hayashi, M., Sato, S., Anai, T., Ishimoto, M., Funatsuki, H., Teraishi, M., Osaki, M., Shinano, T., Akashi, R., Sakaki, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 2008. Sequencing and analysis of approximately 40,000 Soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15: 333-346.
- Urbański, D.F., Małolepszy, A., Stougaard, J. & Andersen, U.S. 2012. Genome-wide *LORE1* retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 69: 731–741.