

## 学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 十川 蒼  
Name

学位論文題目： ミヤコグサ根粒および種子形成に關与する輸送小胞系の解明  
Title of Dissertation

学位論文要約：  
Dissertation Summary

### 第1章 緒言

マメ科植物は土壤中の根粒菌と共生し、共生窒素固定を行うという他の植物種には見られない、農業生産上極めて重要な性質を持つ。陸上植物種の約8割が樹立している菌根共生は宿主特異性がほとんどないのに対し、マメ科植物に特徴的な根粒共生は宿主特異性が高い。菌根菌の感染は、植物と菌根菌間での相互認識が行われた後、菌根菌は外生菌糸を伸長させ根の細胞間隙に侵入する。菌根菌は根の皮層細胞内に侵入後、菌糸は宿主細胞由来の膜(アーバスキュラーメンブレン)に包まれ、樹枝状体(アーバスキュル)と呼ばれる特徴的な細胞内共生器官を形成し菌根共生を開始する。一方、マメ科植物と根粒菌では、根粒菌の放出するNod factorと呼ばれるシグナル物質を介した特異性の高い相互認識が行われ、共生プロセスがスタートする。相互認識後、菌根菌との共生にも必要な“共通共生経路”と呼ばれるシグナルカスケードが活性化し<sup>1)</sup>、共通共生経路を構成する*SYMRK*, *CASTOR*, *POLLUX*, *CCaMK*, *CYCLOPS*などの遺伝子や、その後誘導される根粒形成特異的な転写因子である*NSP1/NSP2*や*NIN*の働きにより、宿主植物の根毛内に感染糸が形成された後、根粒菌が感染糸を通じて宿主細胞内に侵入し、共生器官である根粒が形成され共生窒素固定を開始する。また、根粒菌は根粒内の感染細胞にて宿主細胞由来の膜であるペリバクテロイドメンブレン (PBM) に包まれ、バクテロイドと呼ばれる共生に特化した形態に分化する。根粒菌の感染機構は菌根菌の感染機構の一部をトレースする形で進化したものであると考えられており<sup>2)</sup>、共生の成立には宿主細胞と共生菌間での物質交換が重要である。特に、アーバスキュラーメンブレンやPBMなどの共生膜こそが、宿主細胞と共生菌間の物質輸送の現場であると考えられており、この物質のやり取り(メンブレントラフィック)に關与する因子として、本研究ではSNARE(Soluble N-Ethylmaleimide -sensitive factor attachment protein receptors)と呼ばれる膜タンパク質に着目した。SNAREは、輸送小胞膜上に存在するR-SNAREと、標的膜上に存在するQ-SNAREに分けられる。Q-SNAREはさらに、膜貫通ドメインを有するQa-SNAREと、Qa-SNAREに結合するQb-, Qc-SNAREに分類される。SNAREタンパク質はこのR-およびQ-SNAREが複合体を形成することで輸送小胞内の物質を膜特異的に輸送している<sup>3,4,5)</sup>。植物は進化の過程で固有のSNAREタンパク質を獲得してきたと考えられている。特にシロイヌナズナではSNAREの機能に関する研究が盛んに行われており、例として植物のR-SNAREの一つであるVAMP7グループ内の*AtVAMP722*は、エンドソームから液胞への輸送経路において機能しており、この輸送経路が種子形成において重要な機能を担っている事が報告されており<sup>6)</sup>、また植物のQa-SNAREであるSYPファミリーの内、根毛伸長や花粉管伸長に機能しているものがある事や、SYPファミリーそれぞれの細胞内局在なども徐々に明らかになりつつある<sup>7)</sup>。しかし、マメ科植物の共生系に対するSNAREの機能については未だに知見が少なく、まだまだ未知な部分が多い。そこで本研究では、モデルマメ科植物であるミヤコグサの根粒形成に対するSNAREタンパク質の機能解析を目的とし、中でも輸送小胞上のミヤコグサR-SNARE遺伝子*LjVAMP72*、および標的膜上のQa-SNARE遺伝子*LjSYP132*に着目した。また本研究では、ミヤコグサR-SNARE *LjVAMP72*グループの内、特に根粒での高い発現が確認された*LjVAMP72a*に着目し、その機能解析を行う過程において、*LjVAMP72a*と相同性の非常に高い*LjVAMP72b*の存在が明らかとなったため、*LjVAMP72a*の発現様式等の比較対象として、合わせて*LjVAMP72b*の機能解析も行った。さらにQa-SNARE *LjSYP132*も、転写過程において選択的スプライシングにより*LjSYP132a*と*LjSYP132b*(以後*LjSYP132a*および*LjSYP132b*の両者を述べる際は*LjSYP132s*と呼称する)の2つに分けられ発現していることが研究過程で明らかとなったため、この2つのスプライシングバリエーションの機能的差異にも着目し、形質転換体を用いた表現型解析、RNAレベルおよびタンパク質レベルでの発現解析ならびに局在解析などの研究手法を用いて、それぞれの根粒形成に対する機能解析を行った(図1)。

(様式5) (Style5)

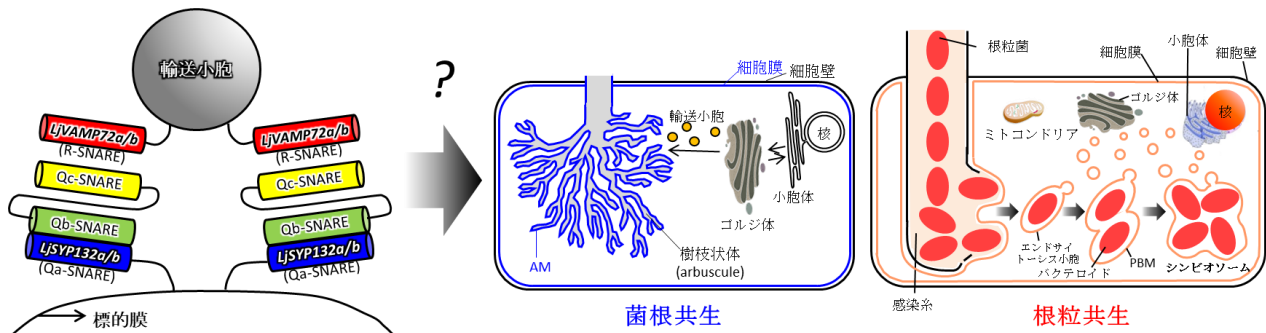


図1 研究主題の概要

本研究では細胞内での膜特異的な小胞輸送を担うSNAREの根粒共生および菌根共生に対する機能解析を研究主題とし、モデルマメ科植物であるミヤコグサを用い、ミヤコグサR-SNARE遺伝子LjVAMP72a/72bおよびQa-SNARE遺伝子LjSYP132a/132bの機能解析を行った。

## 第II章 ミヤコグサR-SNARE遺伝子LjVAMP72a/72bの根粒・菌根共生に対する機能解析

### 【実験方法および結果】

#### LjVAMP72a および LjVAMP72b の分子系統解析およびアミノ酸配列アライメント

ミヤコグサのゲノムデータベース(Lotus japonicus genome assembly build 3.0)に登録されているVAMP72 遺伝子情報を用いて、種々の植物におけるVAMP72 グループ遺伝子の配列相同性による分子系統解析とアミノ酸配列のアライメントによるSNAREモチーフの比較を行った。分子系統解析の結果、LjVAMP72a と 72b は89%と高い配列相同性を示し、それぞれ相同性の非常に高いタルウマゴヤシのオルソログ(MtVAMP721d, MtVAMP721e)が存在していることが明らかとなった。また、SNAREモチーフの比較により、LjVAMP72a および 72b が含まれたVAMP72 タンパク質群にのみ、植物-微生物間共生において形成される共生膜への局在モチーフと考えられるモチーフが存在することが判明した。

#### 根粒菌接種後のLjVAMP72a および LjVAMP72b の発現解析

根粒菌非接種および接種後各タイミングにおけるLjVAMP72a および 72b の mRNA 発現量をqRT-PCRにより解析した。その結果、LjVAMP72a は根粒菌接種後の根と根粒にて高発現しており、LjVAMP72b は根粒菌非接種・接種によらず植物体全体で恒常的に発現していた。さらに、LjVAMP72a prom::GUS コンストラクトを導入した形質転換毛状根を作成した。この形質転換根に根粒菌または菌根菌を接種し、プロモーター活性をGUS染色により観察した。その結果、LjVAMP72a は、根粒菌・菌根菌との共生により高発現することが明らかとなった。

#### LjVAMP72a/72b の細胞内局在

LjVAMP72a::GFP ベクターのシロイヌナズナ培養細胞への導入により、LjVAMP72a の細胞内局在を調べた。その結果、LjVAMP72a は原形質膜およびエンドソームに局在していた。さらに、ミヤコグサ根粒細胞内でのLjVAMP72a および 72b タンパク質の局在を調べるために、LjVAMP72a および 72b に共通するペプチド配列を抗原認識するLjVAMP72a/72b 抗体を用いたイムノブロットを行った。その結果、LjVAMP72a および 72b は根粒内のペリバクテロイド膜(PBM)に局在していることが示唆された。

#### RNAi-LjVAMP72a/72b 形質転換毛状根の表現型解析

RNAi-LjVAMP72a コンストラクトを作成し、コンストラクトを導入したアグロバクテリウムLBA1334を用いてRNAi-LjVAMP72a 形質転換毛状根を作成した。このRNAi 形質転換毛状根では、LjVAMP72a だけでなく72b も発現抑制されていることが確認されたため、RNAi-LjVAMP72a/72b 形質

転換毛状根とし、根粒菌接種後の感染表現型を解析した。まず、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根に *DsRed* 標識根粒菌を接種し、蛍光観察による感染表現型の観察を行った。その結果、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根では、成熟根粒数および根粒に含まれるバクテロイド数、そして窒素固定能の指標となる根粒あたりのアセチレン還元活性が、EV 根に対し有意に減少していた。さらに、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根の菌根菌接種に対する感染表現型の観察も行った。その結果、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根では、皮層細胞への内生菌糸(Ih)および樹枝状体(Ab)の形成が EV 根に対し有意に抑制されていた。次に、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根における根毛伸長の観察を行った。その結果、RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根では EV 根と比較して根毛が著しく少なく、形成されている根毛も短いものが目立つ所見があったため、画像解析ソフト ImageJ により、EV 根および RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根における根毛伸長を比較したところ、やはり根毛の伸長が抑制されていることが確認された。

### 【考察】

ミヤコグサ *VAMP72* 遺伝子のうち、*LjVAMP72a* と *LjVAMP72b* は、根粒共生と菌根共生に伴う共生膜形成に必要と考えられる局在モチーフを有しており、局在解析や RNAi-*LjVAMP72a/72b* 形質転換毛状根を用いた解析結果から、*LjVAMP72a* および *LjVAMP72b* は、共生膜形成と根毛伸長の二重の生理機能を持つことが明らかとなった(図 2)。今後は、*LjVAMP72a* および *LjVAMP72b* と共に共生膜形成と根毛伸長に共役する標的膜上の Q-SNARE の解明や、*LjVAMP72a* と *LjVAMP72b* の機能的キャラクターの差異をより明確にしていきたい。

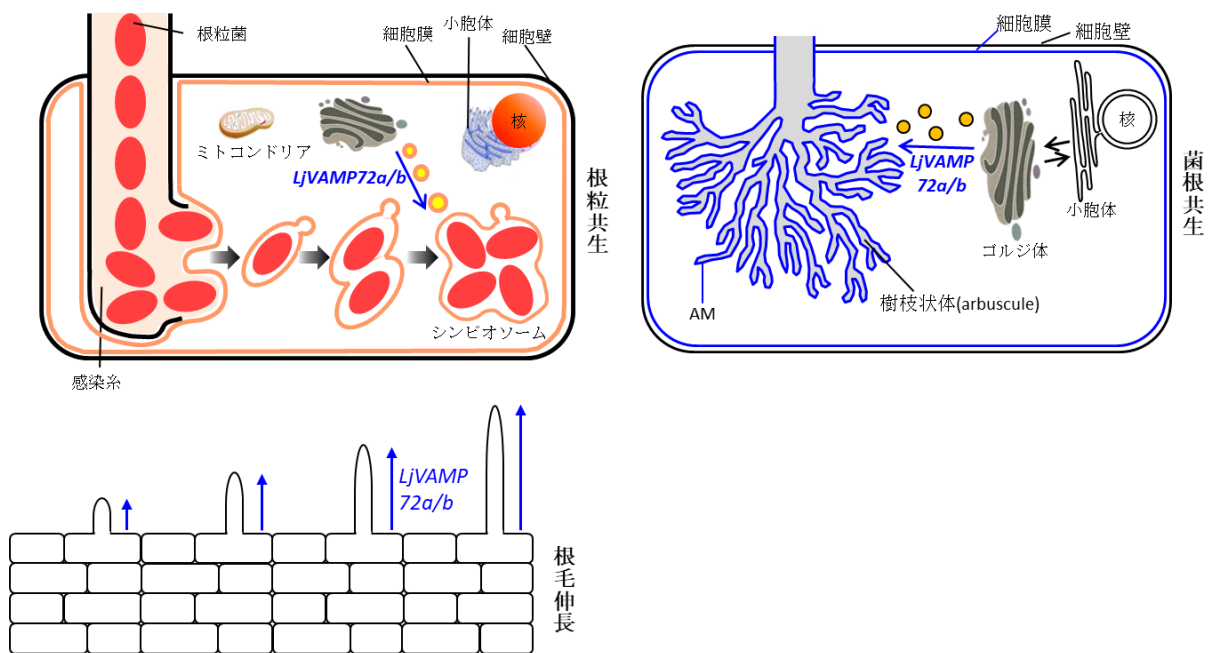


図2 本研究より明らかとなったミヤコグサ R-SNARE *LjVAMP72a/72b* の関与する2つの生理機能  
本研究より、ミヤコグサ R-SNARE 遺伝子 *LjVAMP72a/72b* が根粒共生および菌根共生時の共生膜形成と根毛伸長の二つの生理機能に関与していることが明らかとなった。

### 第III章 ミヤコグサ Qa-SNARE 遺伝子 *LjSYP132a* および *LjSYP132b* の根粒・種子形成に対する機能解析

#### 【実験方法および結果】

#### 根粒菌接種後の *LjSYP132a* および *LjSYP132b* の発現解析および局在解析

*LjSYP132a* および *LjSYP132b* のミヤコグサ各組織における発現箇所やその発現時期を qRT-PCR、プロモーター-GUS 解析、イムノブロットにより解析した。まず qRT-PCR 行った結果、*LjSYP132a* は根粒菌接種後 7 日目の根と 14 日目の根粒で高く発現していたのに対し、*LjSYP132b* は解析を行った全ての植物組織で遍在的に発現しており、特に接種後 3 日目根で高く発現していた。次に、*LjSYP132s prom::GUS* コンストラクトを導入した形質転換毛状根を作成し、根粒菌接種後のプロモーター活性を GUS 染色により観察したところ、*LjSYP132s* は根粒菌接種後の根および根粒、そして根毛にて高発現している事が確認された。また、*LjSYP132s* タンパク質は根粒菌感染根および根粒、種子にて発現しており、その発現は根粒形成や種子形成が進むにつれて高まっていく事が確認された。さらに、*LjSYP132s* の局在を *LjSYP132s::GFP* ベクターを導入したシロイヌナズナプロトプラストの蛍光観察や、根粒抽出物での *LjSYP132s* 抗体を用いたイムノブロットにより解析した結果、*LjSYP132s* は PBM(ペリバクテロイドメンブレン)にて機能していることが示唆された。

#### RNAi-*LjSYP132a* および RNAi-*LjSYP132b* 形質転換毛状根の表現型解析

*LjSYP132a* および *LjSYP132b* は根粒菌接種根にて発現が誘導されていたため、根粒形成に対する機能を、RNAi 法により *LjSYP132a* および *LjSYP132b* それぞれをノックダウンさせた形質転換毛状根を作成し、それぞれの根粒菌接種に対する感染表現型を観察することにより調べた。その結果、RNAi-*LjSYP132a* 形質転換毛状根および RNAi-*LjSYP132b* 形質転換毛状根は、どちらも EV 根と比較して有意に根粒数が減少しており、形成された根粒も未成熟根粒の割合が EV 根と比較して高かった。また、感染糸数も両者とも EV 根と比較して有意に減少しており、僅かに形成された感染糸も皮層細胞まで伸長できていない様子が観察され、特に RNAi-*LjSYP132b* 形質転換毛状根では、感染糸伸長が表皮や根毛でストップしている様子が多く観察された。さらに、RNAi-*LjSYP132b* 形質転換毛状根では根毛伸長が EV 根と比較し抑制されていることが確認された。

#### RNAi-*LjSYP132b* の全身性形質転換体の表現型解析

*LjSYP132b* の mRNA の発現解析において、*LjSYP132b* は解析を行った全ての組織で遍在的に発現していたことから、RNAi-*LjSYP132b* の全身性形質転換体 (以後、R132b 形質転換体と呼称する) をカルス法により作成し、その表現型の観察を行った。まず窒素を含まない土壌にて根粒菌を接種し生育させた R132b 形質転換体では、同条件で生育させたミヤコグサ WT と比較して有意にシュート長および根長などの生長が低下し、根粒数も減少していた。次に窒素を含む土壌で生育させた R132b 形質転換体ではその生長は回復したものの、種子形成に異常が見られ、WT と比較して鞘の長さおよび鞘当たりの種子数が有意に減少しており、R132b 形質転換体から得られた種子は明らかに小さな不稔種子が多く見られた。この結果 *LjSYP132b* の種子形成への関与が示唆されたため、R132b 形質転換体の花粉管伸長を観察したところ、WT と比較して花粉管の発芽率および花粉管伸長が有意に抑制されていた。このため *LjSYP132b* は種子形成過程における花粉管伸長にも機能している事が示唆された。

#### 根粒形成初期シグナル遺伝子変異体での *LjSYP132s* の発現解析

RNAi-*LjSYP132a* および RNAi-*LjSYP132b* 毛状根形質転換体への根粒菌接種に対する感染表現型の解析により、根粒菌は根毛の感染糸までは進入できるものの、その後の根粒形成が抑制されている表現型が示された。そこで、根粒形成初期シグナルカスケードを構成する 8 つの遺伝子、*NFR1*, *CASTOR*, *POLLUX*, *CCaMK*, *CYCLOPS*, *NSP1*, *NSP2*, *NIN* の各変異体の根粒菌接種後 10 日目での *LjSYP132s* の発現を、*LjSYP132s* 抗体を用いたイムノブロットにより解析した。その結果、*nfr1* 変異体の根において

LjSYP132s の高い発現が見られ、*castor* および *pollux* 変異体でも WT の半分程度の LjSYP132s の発現強度があることが確認された。しかし、*ccamk* 変異体以降から LjSYP132s の発現強度が急激に弱まり、*cyclops*, *nsp2*, *nin* 変異体ではほとんど発現が見られなかった。これらの結果から、LjSYP132s の発現には、根表皮における感染糸形成に不可欠な *NFR1* や *CASTOR*、*POLLUX*<sup>8)</sup> は関与しないことが示唆された。

### 【考察】

本研究により、LjSYP132s(LjSYP132a と LjSYP132b)は根粒菌と宿主植物の物質交換の現場である共生膜(PBM)において蓄積し、*LjSYP132a* は根粒菌接種後の根および根粒にて高く発現しており、根粒菌が根の皮層細胞内に侵入する際の PBM 形成に対し発現・機能していると考えられた。また RNAi-*LjSYP132a* および RNAi-*LjSYP132b* 形質転換毛状根では共に感染糸形成の異常が観察され、RNAi-*LjSYP132b* 形質転換根では根毛伸長の異常も観察されたことから、*LjSYP132a* および *LjSYP132b* は感染糸形成に対し共役しており、特に *LjSYP132b* は根毛伸長を正に制御することが明らかになった。さらに、*LjSYP132b* はミヤコグサの種子形成過程における花粉管伸長にも機能している事が示唆された(図 3)。そして、LjSYP132s の発現は根粒形成初期シグナル遺伝子のうち、根表皮での感染糸形成に必要であるとされる *NFR1*、*CASTOR*、*POLLUX* の発現<sup>8)</sup> と関与していなかった。この結果から、LjSYP132s の発現は根表皮における感染糸形成とは無関係に誘導され得ることが考えられた。

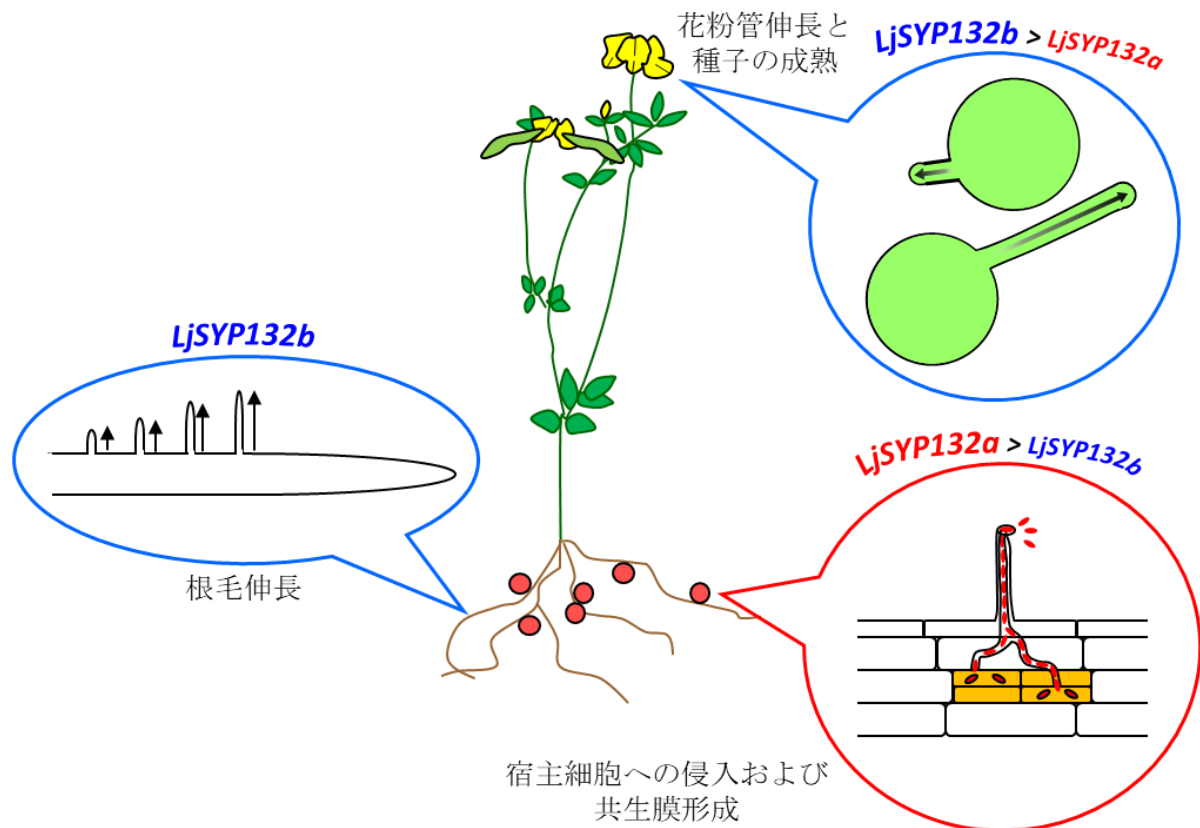


図 3 本研究より推察されたミヤコグサにおける Qa-SNARE *LjSYP132a* および *LjSYP132b* の機能  
本研究の結果から、ミヤコグサ Qa-SNARE LjSYP132s は小胞輸送により栄養素を獲得するために新しく合成された細胞膜や PBM に蓄積し、特に *LjSYP132a* は根粒菌の宿主細胞への侵入時に形成される PBM 形成に関与しており、*LjSYP132b* は花粉管および根毛伸長時の極性部位決定、および種子形成時の栄養輸送に関与していることが示唆された。

## 参考文献

- 1) Hocher, V., Alloisio, N, et al.; Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiol*, 156(2): 700-711. (2011)
- 2) 別役重之, 寿崎拓哉; 微生物・植物相互作用, *生物工学会誌*, 98(6): 309-313. (2020)
- 3) Rothman, J.E., Söllner, T.; Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion. *Science*, 267: 1212-1213. (1997)
- 4) McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H., Rothman, J.E.; Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407: 153-159. (2000)
- 5) Rothman, J.E.; Mechanisms of intracellular transport. *Nature*, 372: 55-63. (1994)
- 6) Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T, et al.; A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20: 3006-3021. (2008)
- 7) 佐藤雅彦, 市川美恵, 江波和彦; 高等植物細胞の先端成長時における SNARE タンパク質の役割, *横浜市立大学論叢 自然科学系列*, 60(2): 118-125. (2010)
- 8) Hayashi, T., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M.; Rhizobial infection does not require cortical expression of upstream common symbiosis genes responsible for the induction of Ca<sup>2+</sup> spiking. *The Plant Journal*, 77: 146-159. (2014)