

## 学位論文要旨 Dissertation Abstract

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  
Title of Dissertation 明

学位論文要旨：  
Dissertation Abstract

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。本研究では、この両者の相利共生メカニズムの遺伝学的解明に向けた研究を、モデルマメ科植物として研究リソースの確立されているミヤコグサを用いて行った。根粒菌はマメ科植物の根に侵入する際、植物との相互認識を経て共生プロセスをスタートさせ、その後根粒菌は根毛を通じて根の皮層細胞間隙に侵入後、エンドサイトーシスによって皮層細胞内に取り込まれ、植物の原形質膜由来の膜に包まれた後、バクテロイドと呼ばれる形態に分化し、小胞との物質交換を経て最終的にはシンビオソームと呼ばれる細胞内共生器官を形成し、共生窒素固定を開始する。このバクテロイドと宿主植物のコミュニケーションに小胞輸送が重要な役割を果たしている事が推測されるため、本研究では特に、細胞内での膜特異的な小胞輸送を担うSNAREに着目した。SNAREは輸送小胞上のR-SNAREと、ターゲット膜上のQ-SNAREが対になって存在しており、輸送小胞上のR-SNAREとターゲット膜上のQ-SNAREが特異的に結合し、膜特異的な小胞輸送が行われている。本研究ではミヤコグサ根粒で発現するSNARE遺伝子のうち、輸送小胞上のR-SNARE遺伝子*LjVAMP72a*および*72b*、そして標的膜上のQa-SNARE遺伝子*LjSYP132a*および*132b*の根粒形成に対する機能解析を行った。両者の機能解析に用いた手法としては、マメ科・非マメ科植物のSNARE遺伝子の相同性比較による分子系統解析、ミヤコグサ各組織でのRNAレベル、およびタンパク質レベルでの発現解析や、シロイヌナズナ培養細胞での一過性発現系および根粒切片の蛍光抗体染色による局在解析、そしてRNAiコンストラクトを導入し対象遺伝子の発現を抑制させた全身性、および毛状根形質転換体での表現型解析などを行い、ミヤコグサSNARE遺伝子の根粒共生に対する機能解析を行った。

*LjVAMP72a*と*LjVAMP72b*はどちらもR-SNAREのメンバーであり、両者とも根粒菌感染時の根で発現誘導されていた。まず*LjVAMP72a*の根粒での発現レベルは葉や根よりも高かった一方、*72b*は葉、根、根粒で一樣な発現を示した。続いてイムノブロットによる根粒内での局在解析を行った所、*LjVAMP72a*だけでなく*72b*もシンビオソームが豊富な抽出画分に蓄積されていることが示され、根粒共生における植物-根粒菌間の膜輸送を介したコミュニケーションの現場であるシンビオソーム膜での局在が示唆された。また、*LjVAMP72a*と*72b*の間には89%の配列相同性があったため、RNAi法による発現抑制変異体では両者の発現が抑制されており、根粒菌接種後のRNAi-*LjVAMP72a/72b*根では根粒形成が顕著に抑制されており、窒素固定活性の大幅な低下、およびわずかに形成された根粒に含まれるバクテロイド数も大幅に減少していた。また、このRNAi根では根粒菌の感染に関わらず、顕著な根毛伸長の抑制が見られ、さらに菌根菌感染に対しても、アーバスキュラー菌根

形成の顕著な抑制が観察された。また、マメ科植物2種、非マメ科植物3種におけるR-SNAREのアミノ酸配列アライメントにより、SNAREモチーフ内に保存された固有のアミノ酸領域を持つ“共生サブグループ”にLjVAMP72aおよび72bが含まれている事が明らかとなり、得られた知見から、LjVAMP72aと72bが共生と根毛形成の双方に対し、分泌経路に影響を及ぼすことにより積極的に制御していることが示唆された。

Qa-SNARE *LjSyp132s*は転写過程において、選択的スプライシングにより3'末端側の最終エクソンの異なる*LjSyp132a*と*LjSyp132b*の2つのアイソフォームが生成される。2つに共通する抗原認識抗体を用いたイムノブロット解析では根粒菌接種後の根粒および種子にて強く発現していることが分かったため、*LjSYP132a*および*LjSYP132b*の発現抑制根(RNAi-*LjSYP132a*, RNAi-*LjSYP132b*)を作製し、各形質転換根にDsRed標識根粒菌を接種して感染表現型の観察を行ったところ、どちらも感染糸形成が顕著に抑制されており、*LjSYP132s*は感染糸伸長に機能している事が示唆された。この結果は、双方の遺伝子が感染初期段階で発現していたqRT-PCRのデータと一致していたが、根粒形成ステージの間では、*LjSYP132a*のみが発現していた。また根粒形成初期シグナル変異体群での*LjSYP132s*タンパク質の発現解析を行ったところ、シグナルカスケード初期の変異体の根粒菌感染根において発現が確認されたことから、*LjSYP132s*の発現はNodファクターシグナルの伝達を介さずに誘導され得ることが示唆された。さらにシンビオソーム膜での*LjSYP132s*タンパク質の蓄積が確認されたことから、*LjSYP132s*は感染糸形成だけでなく根粒内での栄養輸送に対し機能していることも示唆された。

また*LjSYP132b*はqRT-PCRの結果、種子においても発現していたことから、RNAi-*LjSYP132b*形質転換植物を作製したところ、種子形成不全と花粉管の異常な先端成長が観察されたため、*LjSYP132b*は花粉管伸長と種子のプラズマメンブレンにおける栄養輸送にも機能していることが示唆された。