

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	十川 蒼
審査委員	主査 野村 美加 副査 松枝 直人 副査 康 峪梅 副査 京 正晴 副査 望岡 亮介

### 論文名

ミヤコグサ根粒および種子形成に関与する輸送小胞系の解明

### 審査結果の要旨

根粒菌はマメ科植物の根に感染すると感染糸を通り植物細胞内に侵入し、根の皮層細胞に到達後シンビオゾーム膜に取り囲まれ、窒素固定を行う。本研究では根粒菌感染により新たに形成される感染糸やシンビオゾーム膜などがいかにして合成され、物質が輸送されるのか、これらの疑問を解き明かすために新規膜形成や新規オルガネラ間の物質輸送に関与する小胞輸送に着目した。

一般的に小胞輸送では小胞上の R-SNARE と、標的膜上の Q-SNARE が複合体を形成し、膜特異的な物質輸送が行われている。申請者はマメ科植物ミヤコグサ根粒で発現が誘導する R-SNARE の LjVamp72 と Q-SNARE の LjSYP132 を見だし、それぞれの SNARE の機能解析を行った。

### R-SNARE の LjVamp72 の根粒形成への関与

高等植物の小胞に結合する R-SNARE 群は、輸送されるオルガネラによって5つのアミノ酸が植物種を問わず高く保存されている。申請者がマメ科植物を調べると、他の高等植物では存在しない HHQAQ を保有している R-SNARE が存在することが明らかとなった。このシグナルがマメ科植物特有の根粒膜形成に関与する可能性があると推測し、HHQAQ 配列を保有している LjVamp72 に着目した。ミヤコグサゲノムシーケンスから LjVamp72 は LjVamp72a と LjVamp72b の2つ存在し、それぞれが 89% の相同性を持つ。RT-qPCR の結果、LjVamp72a は根粒が成熟するにつれて発現量が増加するのに対し、LjVamp72b は根粒感染初期に若干発現が誘導するものの他の器官でも恒常的な発現が確認された。根粒のシンビオゾーム膜を単離した後、LjVamp72a と LjVamp72b 両方を認識する抗体を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、予想通りシンビオゾーム膜に輸送される小胞に局在することが明らかとなった。またこの2つの SNARE 遺伝子の発現抑制した形質転換体 RNAi-LjVamp72a/b を作成し、その表現型を調べた結果、根粒形成が抑制された。さらに菌根菌形成も抑制された。本研究により LjVamp72 が根粒菌感染や菌根菌感染のための新規オルガネラ形成や物質輸送に関与する R-SNARE であることを明らかにした。

## Q-SNARE の LjSYP132 の根粒形成への関与

次に申請者は、根粒形成に関与する Q-SNARE を検索した。マイクロアレー解析から Q-SNARE の LjSYP132 が根粒で強く発現していることが明らかとなった。LjSYP132 のゲノム解析結果から 1 つの遺伝子から 2 つの遺伝子が合成されるスプライスバリエントが起きていることが予測された。それぞれを LjSTP132a と LjSYP132b と名付けた。特異的プライマーを作成し、それぞれの遺伝子発現を確認した結果、LjSYP132a は根粒で発現が誘導し、LjSYP132b は根粒を含むどの器官でも恒常的に発現しているが根粒菌感染初期の根ではその発現が誘導することが明らかとなった。両者の遺伝子は第 13 エキソンのみ異なっていた。13 エキソンの領域で特異的ペプチド抗体を作成したが残念ながら互いに認識することはできなかったが、共通配列のペプチド抗体を作成し、イムノブロット解析を行った結果、LjSYP132 はシンビオゾーム膜に局在することが明らかとなった。次に、遺伝子発現を抑制した RNAi-LjSYP132a と RNAi-LjSYP132b の形質転換体の作成を行った。その結果、RNAi-LjSYP132a は成熟できない小さな根粒を形成した。このことから LjSYP132a は根粒が成熟するのに必要な物質輸送に関与しているのではないかと推測した。一方、LjSYP132b は未成熟の根粒すら確認できなかった。蛍光顕微鏡で観察した結果、RNAi-LjSYP132b の根毛では感染糸形成が確認できたが、それに続く根の皮層細胞での感染糸あるいはシンビオゾーム膜形成が抑制されていた。この結果から LjSYP132b は根の皮層細胞における感染糸あるいはシンビオゾーム膜形成の段階で必要な Q-SNARE として機能していると推測した。さらに RNAi-LjSYP132b は、種子形成が阻害された。RNAi-LjSYP132b の花は野生株と同程度咲いたため開花直後の花を採取し経時的に花粉管の伸長を観察すると、著しく抑制されていた。これらの結果から、本来花粉管伸長に利用されていた LjSYP132b がマメ科植物では根粒形成の感染糸形成またそれに続くシンビオゾーム膜形成にも関与するようになったのではないかと考えられる。そして、スプライスバリエントにより LjSYP132a を合成し、根粒細胞での物質輸送にも関与するようになったのではないかと推測した。

以上のように、申請者は、根粒で発現する LjVamp72 と LjSYP132 について解析を行った。LjVamp72 は LjVamp72a と LjVamp72b、LjSYP132 は LjSYP132a と LjSYP132b とそれぞれの SNARE が相同性の高い 2 つのアイソフォームが存在していることを明らかにした。RT-qPCR の発現パターンの結果から、LjVamp72a は LjSYP132a と複合体を形成し、また LjVamp72b は LjSYP132b と複合体を形成する可能性が高い。根粒はマメ科植物特有の器官であるが今回の結果から、これら SNARE は菌根菌感染にも関与すると思われる。根粒菌や菌根菌感染領域の新規膜形成や物質輸送に SNARE がどのように関与しているのか、今後の解明が期待される。また LjSYP132b が種子形成にも関与しているという結果はマメ科植物がどのようにして共生に機能する SNARE を獲得したのか、マメ科植物と根粒菌あるいはマメ科植物と菌根菌の共生進化という点からもその解明が待たれる。

本論文に関する公開審査会は令和 4 年 2 月 3 日にリモートシステムを利用して開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本学位論文の内容を慎重に審査した結果、審査員全員一致して博士（農学）の学位を授与するものと判定した。