

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏名 横田 圭祐

指導教員名 小柳津 広志

論文題目 アクチン骨格形成に異常を示すミヤコグサ変異株の解析

根粒菌は土壤中に単生する時には窒素固定活性を示さず、宿主植物と共生することによって窒素固定能を発現する。窒素は作物栽培の最重要肥料成分であるが、その化学合成には多大なエネルギーを消費しており、この植物-微生物間で行われる共生窒素固定機能の有効利用は 21 世紀の持続型農業技術の開発上、イネなどの非マメ科植物への共生窒素固定機能付与といった応用技術開発を含め、非常に重要な課題であると考えられる。そして、そのためには共生窒素固定成立の分子機構を明らかにすることが必要不可欠である。ここ数年間で根粒菌により放出される Nod ファクターの受容とその直下シグナル伝達系に位置付けられる「共生初期過程」に関わる多くの宿主植物側の初期シグナル伝達因子が解明されてきた。しかしながら、こうした初期シグナル伝達に引き続いて起こる具体的な感染プロセス（感染糸形成）や根粒組織形成、細胞内共生成立（バクテロイド化）、共生特異的オルガネラ（シンビオゾーム）形成、共生窒素固定発現などの「共生後期課程」に関わる宿主植物因子について分かっている事は極めて少ない。近年、多くのマメ科植物で根粒菌が正常に内部共生出来ず、不完全な根粒が形成される根粒組織形成変異体 (cooperative histogenesis<sup>-</sup>, Hist<sup>-</sup>)、そして根粒は正常に形成され、その中に根粒菌が内部共生するにもかかわらず、窒素固定活性が全く、あるいは極わずかしか検出されない共生窒素固定変異体 (fixing<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup>) が多数分離されている。この事は根粒組織形成や根粒菌の窒素固定発現が宿主植物遺伝子によってコントロールさ

れている事を物語っており、これらのことから「共生初期過程」に引き続く根粒菌の感染プロセスと根粒組織形成、共生窒素固定発現に関与する宿主植物因子の探索が重要であると考えられる。そこで本研究では「共生初期過程」に引き続く根粒菌の感染プロセスと根粒組織形成、共生窒素固定発現に関与する宿主植物メカニズムの解明を目的としてマメ科モデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根粒組織形成変異体及び共生窒素固定変異株を用いて変異原因遺伝子の同定及び機能解析を行った。

### 1. ミヤコグサ根粒組織形成、共生窒素固定変異株の網羅的解析

本研究では最初に共同研究グループである Denmark, Aarhus 大学、Jens Stougaard 教授のグループにより作成されたミヤコグサ Gifu B-129 再生固体由来共生変異株ライブラリーの中から、根粒組織形成変異株 *sym40*、*sym67* 共生窒素固定変異株 *sym10*、*sym43* について解析した。遺伝子座が分かっていた *sym40*、*sym67*、*sym10* についてはマップベースクローニング法によりイニシャルマッピング及びラフマッピングを試みた。その結果、*sym40* は第 1 染色体下腕部、*sym67*、*sym10* は第 4 染色体上腕部に位置することが分かり、これまでに報告されていない新規ミヤコグサ共生変異株であることが分かった。また、既にラフマッピングが終了していた *sym43* については同様にマップベースクローニング法によりファインマッピングを完了することができた。

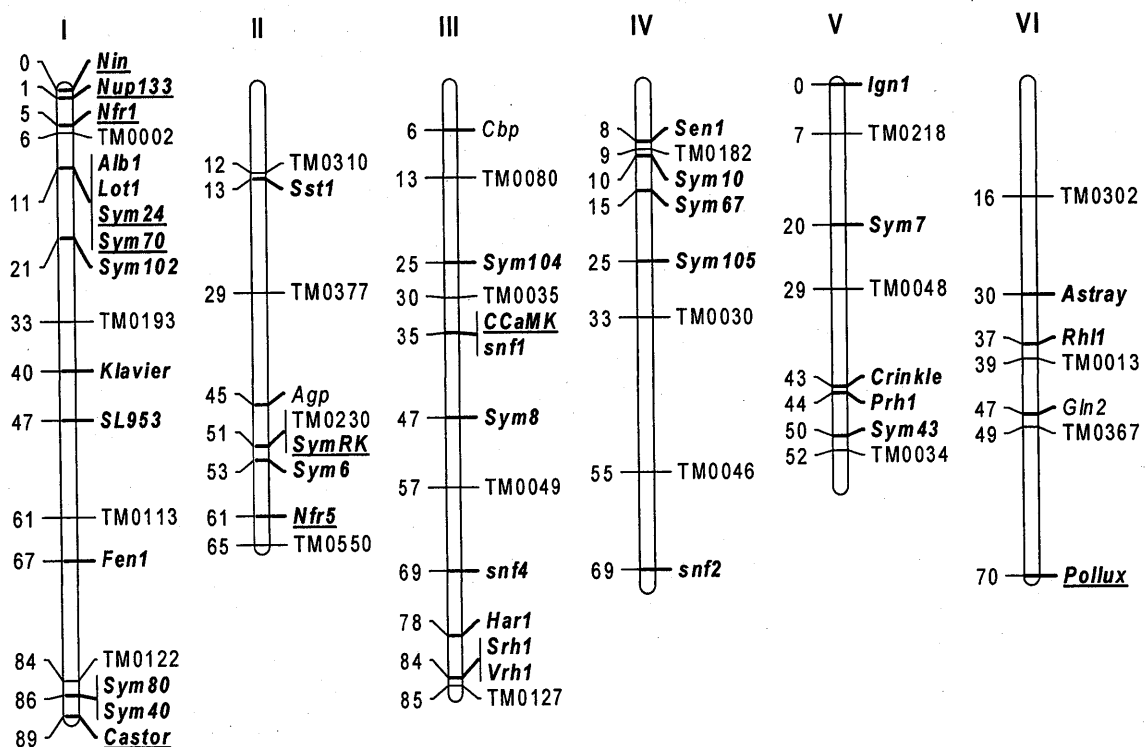


図 これまでに発表されているミヤコグサ共生変異株の遺伝子座

## 2. ミヤコグサ根粒組織形成変異体 *sym40*、*sym67*の変異原因遺伝子単離

ラフマッピングが完了した *sym40*、*sym67*についてクロモソームウォーキング及びファインマッピングを試みた。*sym67*についてマップベースクローニングにおける交配パートナーであるミヤコグサ Miyakojima MG-20 と交配して得られた変異表現型を持つ F2 集団約 1100 株を解析した結果、*sym67* 変異原因遺伝子を挟む近傍マーカール間の距離は約 1.2 cM であることが分かった。同様に *sym40* について F2 集団約 300 株を解析した結果、*sym40* 変異原因遺伝子を挟む近傍マーカール間の距離は約 2.0 cM であることが分かった。そこで、現在、Jens Stougaard 教授の研究グループが所有する再生固体由来ミヤコグサ Gifu 変異株ライブラリーの中で、既に変異原因遺伝子が単離されている変異株アリルにはミヤコグサ内在性レトロトランスポゾン (*Lotus retrotransposon 1*, LORE1) が挿入されたことにより変異が引き起こされている変異株が少なくとも 3 株 (*LjNin*、*LjSymRK*、*LjNup133*) 見つかったことが報告されており、このことから LORE1 を用いた Sequence Specific Amplified Polymorphism (SSAP) 法による *sym40*、*sym67* 変異原因遺伝子単離を試みた。その結果、*sym67* 親株及び Miyakojima と交配された変異表現型を持つ F2 集団 100 株について完全に連鎖された挿入バンドが確認され、LORE1 挿入部位配列解析の結果、*sym67* 変異原因遺伝子はアクチン重合核となる Arp2/3 (actin-related protein 2/3) 複合体活性化因子である WAVE (WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) family verprolin homologous protein) 複合体に含まれる Nap (Nck-associated protein) 相同遺伝子であることが分かった。また、*sym40* の根粒形成表現型は *sym67* と非常に似ており、このことから *sym40* は *sym67* と同様にアクチン重合に関与する遺伝子に変異があることが推測された。*sym40* は SSAP 法による変異原因遺伝子への LORE1 遺伝子挿入は確認されず、クロモソームウォーキングによるファインマッピング途中であったが、既に明らかにされていた *sym40* 変異領域配列内に *sym67* と同様に WAVE 複合体に含まれる Pir (p53-inducible mRNA) 相同遺伝子が確認された。そのため *sym40* の Pir 相同遺伝子配列を確認したところ Pir 相同遺伝子エキソン部位に約 400 bp の欠損が確認され、*sym40* 変異原因遺伝子は Pir 相同遺伝子であることが分かった。これまでに動物細胞をはじめとする他のモデル生物における WAVE 複合体の研究で NAP タンパク質と PIR タンパク質は互いに直接相互作用し、その他のタンパク質と共に WAVE 複合体を形成していることが報告されており、ミヤコグサでも同様に NAP タンパク質と PIR タンパク質が直接相互作用し、未だ見つからないその他の WAVE 複合体形成タンパク質と共に WAVE 複合体を形成することによって、ミヤコグサにも存在していると考えられる Arp2/3 複合体を活性化することにより、ミヤコグサ細胞内におけるアクチン重合をコントロールしている可能性が示唆された。

### 3. ミヤコグサ根粒組織形成変異体 *sym40*、*sym67* の表現型解析

無効根粒を形成する変異体の中には、根粒菌が正常に内部共生しない根粒 (empty nodule) が形成される変異体がある。これは、根粒菌の感染プロセスが正常に成立しない変異体で、ほとんどの場合、根粒の器官形成不全を伴うことから、前述の通り Hist<sup>-</sup> 変異体と分類される。*sym40*、*sym67* は温室内無窒素条件下での生育では根粒形成が白色瘤状の bump 段階で停止する典型的な Hist<sup>-</sup> 変異体であった。無窒素条件下での根粒菌接種 4 週間後の *sym40*、*sym67* は野生株ミヤコグサが着ける根粒数の約 5 倍の bump を形成し、窒素固定活性はほとんど検出されなかった。また、根毛形成は野生株に比べて遅く、根粒感染後の感染糸形成数は野生株よりも少なかった。さらに、*sym40*、*sym67* は根粒組織形成表現型以外にも trichome 形成、種子形成などに変異表現型を持ち、これらの変異表現型はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の Nap、Pir 変異株も trichome 形成、種子形成に変異表現型を持つことから共通した表現型であった。

#### まとめ

以上、本研究においてマメ科モデル植物ミヤコグサの WAVE 複合体に含まれると考えられる Nap、Pir 相同遺伝子が引き起こすアクチン重合が根粒菌との共生系成立における根粒組織形成に機能していることが分かった。これまでに他のモデル生物において解明されてきた WAVE 複合体及び Arp2/3 複合体の機能から、マメ科植物では根粒菌が根毛に付着し、根粒菌から放出される Nod ファクター受容後引き起こされる root hair deformation や根毛内での infection thread (感染糸) 形成、根粒菌の根細胞内へのエンドサイトーシス的な取り込みといったアクチン重合が深く関わりと考えられる一連の流れは主に WAVE 複合体による Arp2/3 複合体活性化により起こされる現象である可能性が考えられる。本研究により得られた知見は、マメ科植物におけるアクチン骨格形成が根粒組織形成に深く関与していることを如実に示すものであり、マメ科植物-根粒菌間共生機構成立の全貌解明へ大きく貢献するものと期待される。