

論文内容の要旨

Search for root-derived signals in autoregulation of nodulation (根粒形成のオートレギュレーションにおける根由来シグナルの探索)

岡本 暁

<背景>

窒素の乏しい土壌ではマメ科植物は根に根粒と呼ばれる器官を形成し、根粒菌と共生する。両者の共生関係は根粒菌が植物に窒素固定産物を供給し、植物は根粒菌に光合成産物を提供することによって成り立っている。しかしながら宿主植物は根粒菌との共生に多くの生体エネルギーを消費するため、必要以上の根粒形成はかえって植物の生長を妨げる結果となる。そのためマメ科植物は土壌中の窒素の濃度や、既に形成されている根粒の数に応じて新たな根粒形成を制御している。特に後者の根粒形成のフィードバック抑制を「根粒形成のオートレギュレーション」と言い、シュートを介したシステム的な制御であることがわかっている。また近年、根粒菌の分泌する Nod ファクターは根粒形成の初期応答を誘導するだけでなく、根粒形成のシステム的な抑制を誘導することが明らかにされている。これらの知見から根粒形成のオートレギュレーションは Nod ファクターにより誘導されると考えられており、根とシュートの間を結ぶ 2 つの遠距離シグナルが想定されている。その 2 つの遠距離シグナルとは、Nod ファクターにより根で

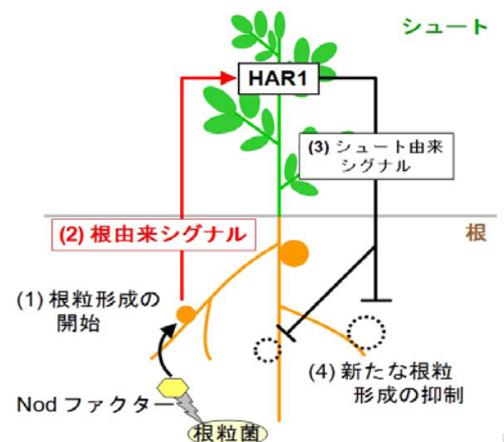


図 1 ミヤコグサにおける根粒形成のオートレギュレーションモデル

誘導されてシュートへ根粒形成を伝える「根由来シグナル」と、シュートからシステミックに根粒形成を抑制する「シュート由来シグナル」である(図1)。しかしこのモデルの妥当性あるいは分子的機構は長らく謎のままであった。

ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)では2002年に根粒形成のオートレギュレーションに関わる因子として *HAR1* が単離された。*HAR1* はロイシンリッチリピート(LRR)を持つ受容体型キナーゼ(RLK)をコードし、接木実験によりシュートで機能することが明らかにされている。このことから *HAR1* は根由来シグナルをシュートで受容し根粒形成を抑制すると予想された。また、*HAR1* はシロイヌナズナの全RLKの中で茎頂分裂組織の未分化細胞の増殖を負に制御する *CLAVATA1* (*CLV1*) と最も相同性が高いことがわかっている。*CLV1* は成熟型 *CLV3* ペプチドをリガンドとして認識することが明らかにされており、成熟型 *CLV3* ペプチドは前駆体 *CLV3* タンパクのC末端側にある保存領域(CLEドメイン)に由来する。なお、CLEドメインを持つペプチドをコードする遺伝子を *CLE* 遺伝子と言い、*CLV3* は *CLE* 遺伝子の一種である。本研究ではこれらの知見から *HAR1* は根由来シグナルとしてミヤコグサ *CLE* (*LjCLE*) ペプチドを受容して根粒形成を抑制すると想定し、その探索を行うことにした。

本研究では当初、根由来シグナルの候補としてシロイヌナズナの *CLV3* と相同性の最も高い *LjCLE* 遺伝子 (*LjCLV3*) に着目して解析を行ったが、*LjCLV3* はミヤコグサの茎頂分裂組織の維持に関わることが示唆された。そこで次に全 *LjCLE* 遺伝子から根由来シグナル候補の探索を行い、その有力な候補として *LjCLE-RS1*, *-RS2* を見出した。学位論文では第1章で *LjCLE-RS1*, *-RS2* について述べ、第2章では *LjCLV3* について述べる。

<結果と考察>

第1章 Nod factor, nitrate-induced *CLE* genes that drive systemic regulation of nodulation

1. *LjCLE-RS1*, *-RS2*, 3は根粒菌の接種により根で強く誘導される

根由来シグナルの候補となる *LjCLE* 遺伝子を見つけるため、ミヤコグサのゲノム情報から39個の *LjCLE* 遺伝子を同定した。根由来シグナルは根粒菌の接種に反応すると考えられたので根粒菌接種に対する *LjCLE* 遺伝子の発現応答を調べたところ、シュートでは大きく発現量の変化した *LjCLE* 遺伝子は無かったが、根では3つの *LjCLE* 遺伝子 (*LjCLE-RS1*, *-RS2*, 3) の発現量が顕著に上昇することがわかった(図2A)。なお、*LjCLE-RS1*, *-RS2* は根のみで発現が検出され、これらがコードするペプチドのCLEドメインは14アミノ酸中12アミノ酸が一致していた。以降はこの3つの *LjCLE* 遺伝子に焦点を絞って研究を行った。

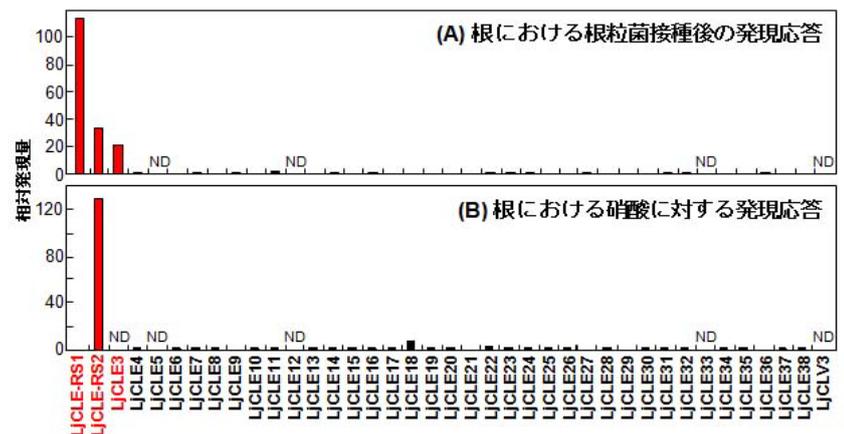


図2 根における *LjCLE* 遺伝子の(A)根粒菌接種及び、(B)硝酸に対する発現応答。ND: 発現が検出されなかった。n=2、2回とも同じ傾向が観察された。

2. *LjCLE-RS1*, *-RS2* はシステミックかつ *HAR1* 依存的に根粒形成を抑制する

根由来シグナルは根粒形成のシステミックな抑制を誘導すると考えられている。そこで主根を切除したミヤコグサのシュートにアグロバクテリウムを感染させて *LjCLE-RS1*, *-RS2*, *3* を過剰発現させた毛状根を誘導し、形成される根粒数を調べた (図 3)。なお、形質転換マーカーとして GFP 蛍光を用いた。その結果、野生型バックグラウンドの GFP 蛍光を示す根では過剰発現させた *LjCLE-RS1*, *-RS2* は著しく根粒形成を抑制することがわかった。また、興味深いことに GFP 蛍光の見られなかった根でも根粒形成が強く抑制されていた。このことから *LjCLE-RS1*, *-RS2* はシステミックに根粒形成を抑制することが示唆された。このシステミックな抑制効果を明確に示すために本研究では主根系 (非形質転換根) を保持した植物体から毛状根 (形質転換根) を誘導する新たな毛状根形質転換法を開発し、主根系に形成される根粒数を計測した (図 4)。その結果、過剰発現させた *LjCLE-RS1*, *-RS2* は主根系の根粒形成を強く抑制することがわかり、*LjCLE-RS1*, *-RS2* はシステミックな効果を持つことが明らかになった。なお、*LjCLE3* は過剰発現させても根粒形成を抑制しなかった。一方、*har1* 根粒過剰着生変異体バックグラウンドでは *LjCLE-RS1*, *-RS2* の過剰発現による有意な根粒形成の抑制は見られなかった (図 3)。従って *LjCLE-RS1*, *-RS2* による根粒形成の抑制は *HAR1* 依存的であることが示された。また、*HAR1* はシュートで機能することを考えると *LjCLE-RS1*, *-RS2* ペプチドは根からシュートへ移行し *HAR1* に受容されて根粒形成のオートレギュレーションを誘導する可能性が考えられる。以降は *LjCLE-RS1*, *-RS2* について研究を進めた。

3. *LjCLE-RS1*, *-RS2* は根粒菌の接種後速やかに応答する / 根粒形成の抑制を誘導する Nod ファクターや *LjCCaMK* は *LjCLE-RS1*, *-RS2* の誘導にも必要である

根粒菌接種後の *LjCLE-RS1*, *-RS2* の経時的な発現解析を行ったところ、*LjCLE-RS1*, *-RS2* は根粒菌の接種からおよそ 3 時間後に発現量の上昇が始まり、24 時間後にはピークに達することがわかった。ミヤコグサでは根粒菌の接種からおよそ 3 日で根粒形成のオートレギュレーションが観察されることから、*LjCLE-RS1*, *-RS2* はそれに先立って応答することがわかった。

根粒菌の分泌する Nod ファクターやそのシグナル伝達経路の構成因子である *LjCCaMK* は根粒形成のオートレギュレーションの誘導にも関わると考えられている。そこで Nod ファクターを合成できない根粒菌変異株 (*nodA*)、ミヤコグサ *Ljccamk* 変異体、さらに他の Nod ファクターシグナル伝達経路の構成因子である *castor*, *Ljnspp2* 変異体を用いて *LjCLE-RS1*, *-RS2* の発現を調べた。その結果、Nod ファクターや *CASTOR*, *LjCCaMK* は *LjCLE-RS1*, *-RS2* の発現応答に必要であることがわかった。また、*LjNSP2* は *LjCLE-RS1* の発現応答に必要であることがわかった。

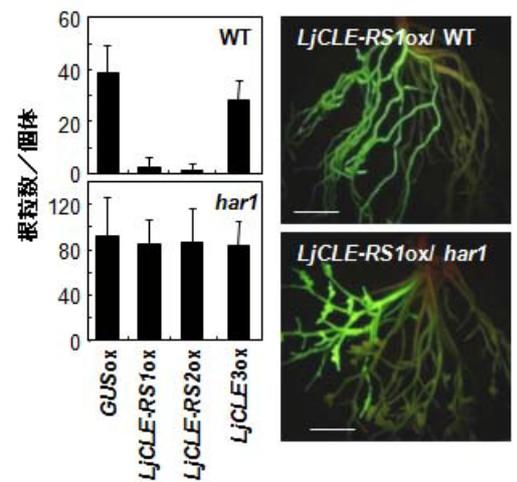


図 3 毛状根形質転換法による *LjCLE-RS1*, *-RS2*, *3* の過剰発現。 Bars = 1 cm

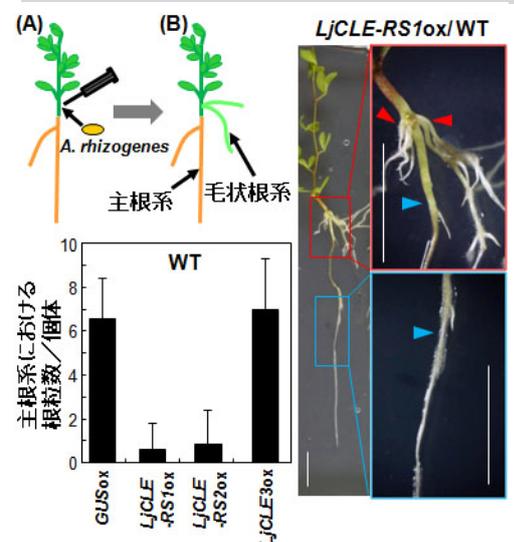


図 4 毛状根形質転換法による *LjCLE-RS1*, *-RS2* のシステミックな根粒形成の抑制。(A) 植物体の主根を切り落とさずに胚軸にアグロバクテリウムを感染させると、(B) その部分から毛状根が誘導される。毛状根系は赤の三角で、主根系は青の三角で示す。 Bars = 1 cm

4. *LjCLE-RS2* は硝酸によって強く誘導される

土壤中に高濃度の窒素が存在すると根粒形成は抑制されることが知られている。また、*HAR1* やダイズのオーソログである *NTS1/ NARK* の変異体では硝酸による根粒形成の抑制が弱くなることが報告されている。そのためこの現象に *LjCLE* 遺伝子に関わる可能性を考え、硝酸に対する *LjCLE* 遺伝子の発現応答を調べたところ、*LjCLE-RS2* は硝酸に対して強く誘導されることがわかった (図 2B)。また *LjCLE-RS2* は硝酸濃度依存的に発現量が上昇し、この発現応答には Nod ファクターシグナル伝達経路の構成因子である *CASTOR*, *LjCCaMK*, *LjNSP2* は関与しないことがわかった。なお、*LjCLE-RS1* は硝酸により発現が抑制された。

第 2 章 Functional analysis of *Lotus japonicus CLAVATA3*

5. *LjCLV3* は茎頂、腋芽で発現する

本研究で単離した 39 個の *LjCLE* 遺伝子のうち、遺伝子構造やコードするペプチドの CLE ドメインの配列がシロイヌナズナの *CLV3* と高い類似性を示す *LjCLE* 遺伝子を *LjCLV3* とした。器官別発現解析では *LjCLV3* は主に茎頂で発現が検出され、根粒菌を接種しても発現量に変化は見られなかった。また *in situ* hybridization では、*LjCLV3* は茎頂及び腋芽分裂組織で発現が確認された。

6. *LjCLV3* は茎頂分裂組織の維持に関わる

LjCLV3 の機能を調べるために *LjCLV3* 過剰発現体および発現抑制体の作成を行った。その結果、*LjCLV3* を過剰発現させたカルスではシュートの再生が強く抑制された。一方、*LjCLV3* の発現抑制系統ではシュートの帯化や一つの花柄に形成される花の数の増加が見られたが (図 5)、形成される根粒数に変化はなかった。これら結果から、*LjCLV3* はミヤコグサの茎頂分裂組織の維持に関わることが示唆された。

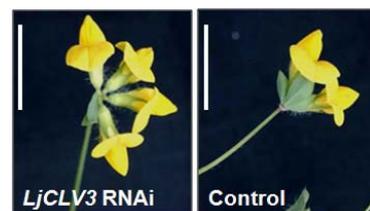


図 5 *LjCLV3* 発現抑制系統の表現型。Bars = 1 cm

<まとめ>

- 根粒形成のオートレギュレーションモデルで想定されていた「根由来シグナル」の分子の実体は長らく不明であったが、本研究はその有力な候補として *LjCLE-RS1*, *-RS2* を見出すことに成功した。さらに、*LjCLE-RS2* は硝酸にも応答することから、本研究は *LjCLE-RS1*, *-RS2* が *HAR1* を介して根粒形成のオートレギュレーションと硝酸による根粒形成の抑制の両方で機能するモデルを提唱する (図 6)。
- これまで *CLE* 遺伝子は細胞間近距離シグナル伝達を介した分裂組織の恒常性の維持に関わることが報告されてきたが、*LjCLE-RS1*, *-RS2* はシステム的な効果を持つ点、根粒菌の接種や硝酸の添加という植物の外部環境の変化に応答する点で新しいタイプの *CLE* 遺伝子であると言える。
- これまでマメ科植物では茎頂分裂組織の維持に関わる因子は知られていなかったが、本研究は *LjCLV3* の機能解析を通して、*CLV3* を介したシグナル伝達系がマメ科植物の茎頂分裂組織の制御機構に存在する可能性を見出した。

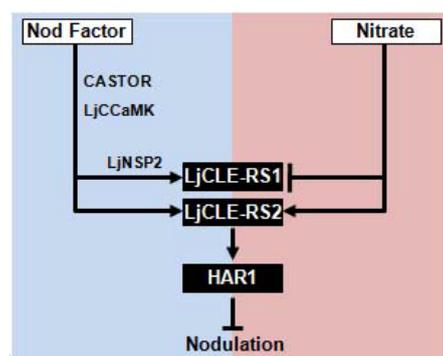


図 6 *LjCLE-RS1*, *-RS2*, *HAR1* による根粒形成の抑制モデル