

## 論文内容の要旨

### 論文題目

# Molecular genetic analysis of *KLAVIER* mediating long-distance negative regulation of nodulation in *Lotus japonicus*

(ミヤコグサ根粒形成の遠距離抑制に関わる *KLAVIER* 遺伝子の分子遺伝学的解析)

氏名 宮澤 日子太

### 序

マメ科植物は窒素固定細菌である根粒菌との共生に際して、根に根粒という器官を形成する。しかし、新たな器官の形成や窒素固定には大きなコストがかかるため、植物は根粒の形成や数を制御している。ミヤコグサではこの根粒形成の制御が破綻した *har1*、*klavier* (*klv*)、*tml* などの根粒過剰着生変異体が知られており、接ぎ木実験によって *HAR1* と *KLV* がシュートで、*TML* が根で機能することが示唆されている。さらに *HAR1* は、シロイヌナズナの *CLAVATA1* と相同性の高い LRR 型受容体キナーゼをコードすることが分かっており、この制御は遠距離シグナル伝達を介して行われると考えられている。根粒形成制御の分子機構に迫るため、本研究では *klv* の遺伝学的解析と原因遺伝子の同定を行った。

### 結果と考察

#### *KLV* 遺伝子の同定

マップベースドクローニングと相補実験によって、*KLV* は LRR 型受容体キナーゼをコードしていることが明らかになった (図1, 図2A-C)。根粒過剰着生以外にも、*klv* には葉の表側に浮き出るような葉脈、茎の矮化や帯化・二叉分岐といった形態異常、花成の遅延といった多面的な表現型が見られることが報告されている (Oka-Kira *et al.* 2005)。*KLV* を含むゲノム断片を *klv* に導入すると、根粒過剰着生のみならず、その他の多面的な表現型もすべて相補された (図2D-F)。

#### *KLV* の遺伝子発現

器官ごとにサンプリングを行った real-time RT-PCR による解析では、茎頂部で発現が抑制されている *HAR1* とは異なり、*KLV* は植物全体的に発現していた (図3A, B)。*klv* において茎の帯化や二叉分岐に先んじて茎頂分裂組織の形態が異常になることと併せて、このことは *KLV* が茎頂分裂組織の制御にも関わることを支持する結果であった。*HAR1* に関してはプロモーターGUS 解析によって維管束の師部で高く発現していることが報告されている (Nontachaiyapoom *et al.* 2007)。レーザーマイクロダイセクションを用いて本葉の葉肉組織と維管束

組織を別々にサンプリングし real-time RT-PCR で解析すると、*KLV* はより特異的に維管束で発現していた(図3C-E)。植物にとって維管束は、遠距離シグナルを輸送するのに適した組織だと考えられるため、*KLV* と *HAR1* の維管束での発現は、遠距離シグナルを仲介し根粒形成を制御するのに理に適うと考えられる。

### ***klv*における維管束の連続性欠損**

一方で、*klv* 変異体で葉脈に異常が見られることから、*KLV* が維管束の形成にも関わっていると考えられていた。透明化した葉では断片化した管状要素が観察されていた(Oka-Kira et al. 2005)が、この断片化した管状要素が異所的に過剰に形成されたものなのか、本来つながるはずの導管の接続に異常があるのかは明らかにされていなかった。そこで、発達初期の第一本葉における葉脈を観察したところ、播種後7日目の側小葉において *klv* では同時期の野生型に比べて導管形成の遅延が見られ断片化していた(図4)。このことから、*KLV* が維管束の形成を正に制御することが示唆された。

*KLV* が維管束の形態形成を制御しているとなると、*klv* で維管束の構造に欠陥が生じ、維管束での *HAR1* の発現が低下している可能性が考えられた。しかし、*klv* と野生型の地上部において *HAR1* の発現量に大きな差は見られなかった(図5)。

### ***KLV*の遺伝学解析**

*KLV* と *HAR1* の遺伝学的な関係を調べるため、*klv har1* 二重変異体を作成したところ、*klv har1* 二重変異体は *klv* と同程度の根粒着生数を示した(図6A)。根粒数が相加的でなかったことから、*KLV* と *HAR1* は根粒形成の遠距離抑制において遺伝学的に同一経路で機能すると考えられた。なお、二重変異体の根粒数が *har1* と同程度ではなく *klv* と同程度に現象していたことは、*HAR1* を介した根粒形成の制御機構とは別に、根粒形成を促進すると思われるシュートの生長などにも *KLV* が関わっていることが影響していると考えられた(図6B)。

次に、システミックな根粒形成抑制活性をもつ *LjCLE-RS1* および *RS2* ペプチド遺伝子に対する *KLV* の関係性を確かめた。*LjCLE-RS1/2* は毛状根形質転換法によって根で過剰発現させることによって、野生型の植物では根粒の形成を抑制するが(図6C)、*har1* ではその抑制が効かないことから、*HAR1* の上流で働くと考えられている(Okamoto et al. 2009)。*LjCLE-RS1/2* を *klv* の根において過剰発現させた植物体に根粒菌を接種した結果、着生した根粒数はコントロールの *GUS* 過剰発現体と比べて有意な差は認められなかった(図6D)。このことから、*LjCLE-RS1/2* による全身的な根粒形成の抑制は、*HAR1* 同様に *KLV* も介して行われることが示唆された。

さらに *KLV* と根粒形成のシグナル伝達経路の関わりを調べるため、*snf2* 変異体と *klv* との二重変異体を作成した。この *snf2* は、根粒形成に必要とされるサイトカニン受容体様ヒスチジンキナーゼ *LHK1* に恒常的な活性化状態となるような変異が入ることで、根粒菌による根粒形成シグナル伝達の開始を経ることなく、根粒菌非存在下で根粒様の器官(spontaneous nodule、自発的根粒)を形成する優性の変異体である(図8E)。これまでに *har1 snf2* 二重変異体では自発的根粒が増加することから、*HAR1* は自発的根粒の形成も負に制御するということが報告されている(Tirichine et al. 2007)。交配したF1を展開したF2世代において、*snf2* の表現型を示す個体では *klv* 変異がホモで入ることによって、自発的根粒の数が増加した(図6F)。このことから、自発的根粒形成の抑制には *HAR1* 同様に *KLV* も必要とされることが示唆された。自発的根粒形成においては根粒形成のシグナル伝達経路の中で *LHK1* 以降のみが活性化していると考えられるため、根粒と自発的根粒の形成が同様の機構で制御されているとすると、*KLV* と *HAR1* を介した抑制は、少なくとも、根粒形成のシグナル伝達経路において *LHK1* を含めたそれ以降の経路において作用することが示唆された(図8G)。

これら知見は、根粒形成の制御機構において共に地上部で機能すると考えられる *KLV* と *HAR1* が遺伝学的に同一経路で機能することを支持する結果である。

### 根粒形成抑制に関わる地上部因子の相互作用解析

*Nicotiana benthamiana* での一過的過剰発現系と免疫共沈法を用いて物理的な相互作用を解析したところ、*KLV* と *HAR* が相互作用する能力を持っていることが示唆された(図9A 右下パネル 4レーン目、9B 右下パネル 3レーン目)。また *KLV*、*HAR1* それぞれがホモマーを形成することが示唆された(*KLV*: (図9A 右下パネル 3レーン目、*HAR1*: 図9B 右下パネル 4レーン目)。

### まとめ

以上の結果から *KLV* が機能する分子機構に対するモデルを提唱する。根粒形成の抑制において *KLV* は地上部において *HAR1* と受容体複合体を形成して根からの *CLE-RS1/2* シグナルを受容し、シュート由来の根粒形成抑制遠距離シグナルの生成を活性化すると考えられる。また、茎頂分裂組織の大きさや、葉脈の連続性、花成時期の制御においては、*har1* 単独変異体ではそれらの表現型が見られないことから、*KLV* は *HAR1* とは独立の受容体(例えば *KLV* のホモダイマーなど)として機能すると考えられる。

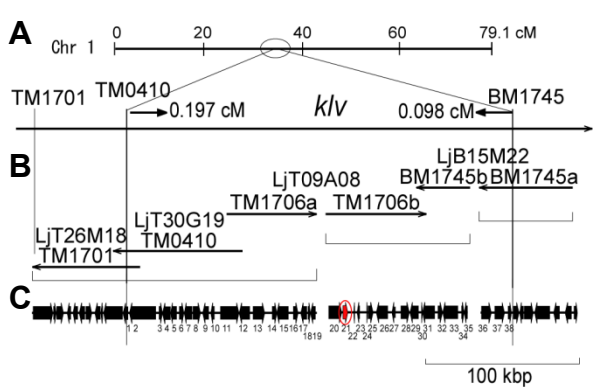


図1. *KLV* のマップポジション。(A) 第一染色体上の *KLV* とマーカーの遺伝地図。(B) TAC/BAC クローン (黒矢印) の物理地図。LjT09A08 と LjB15M22 の両クローン内にはそれぞれ配列未解読の領域がある。(C) *KLV* 遺伝子座に予測された 38 の ORF (太黒矢印)。*KLV* 候補の遺伝子は赤丸で囲って示した。

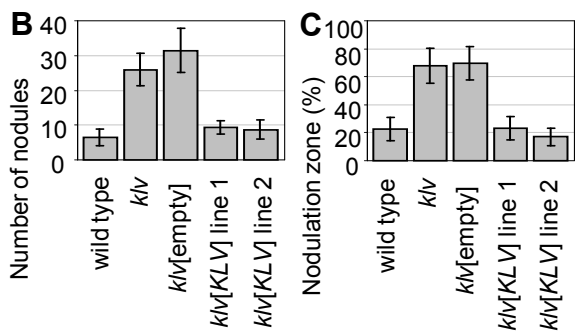
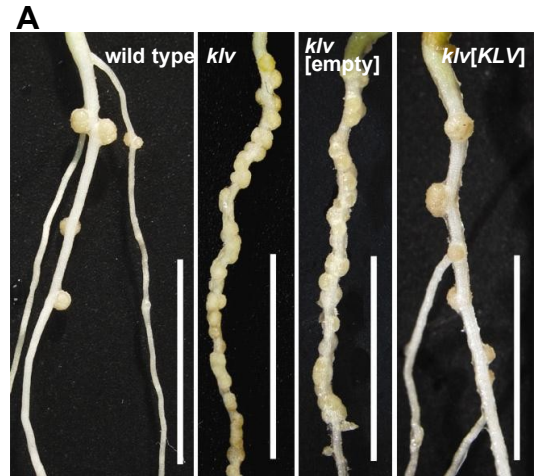


図2. *KLV* による *klv* 変異体の根粒形成に関する表現型の相補。播種・感染後21日。(A) 根粒形成。スケールバーは1 cm。(B) 根粒形成数。(C) 根に占める根粒形成領域の割合。*klv* [empty] は空ベクターを *klv* に導入した形質転換体、*klv* [*KLV*] は *KLV* を含むゲノム領域を *klv* に導入した形質転換体。

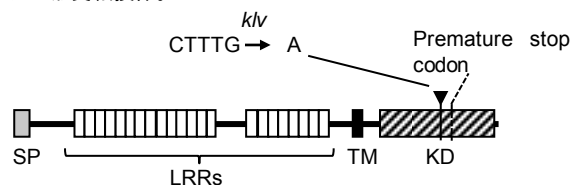
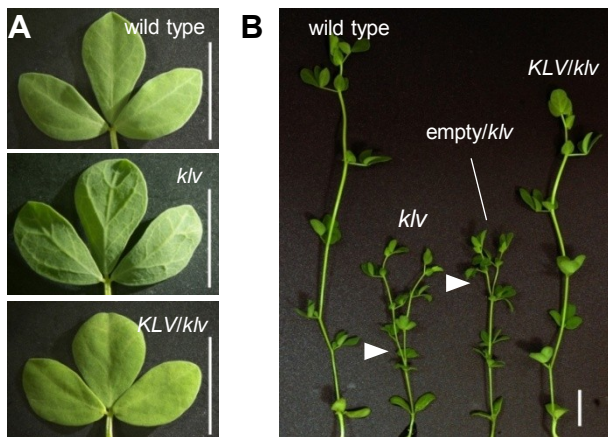


図3. 予測された *KLV* の構造。SP はシグナル配列、LRRs はロイシンリッチリピート、TM は膜貫通ドメイン、KD はキナーゼドメイン。矢尻は *klv* での変異を示す。



Genotype	Number of flowers	DAG
wild type	68 ± 9	DAG
<i>klv</i>	131 ± 24	DAG
<i>KLV/klv</i>	73 ± 7	DAG

図4. *KLV* receptor like kinase による *klv* 変異体の多面的な表現型の相補。(A) 本葉の向軸側。スケールバーは1 cm。(B) 根粒菌非感染で播種後30日後のシュート。白矢頭は茎の二分岐の位置。スケールバーは1 cm。(C) 花成の開始時期。DAGは播種後日数。n は8から12。

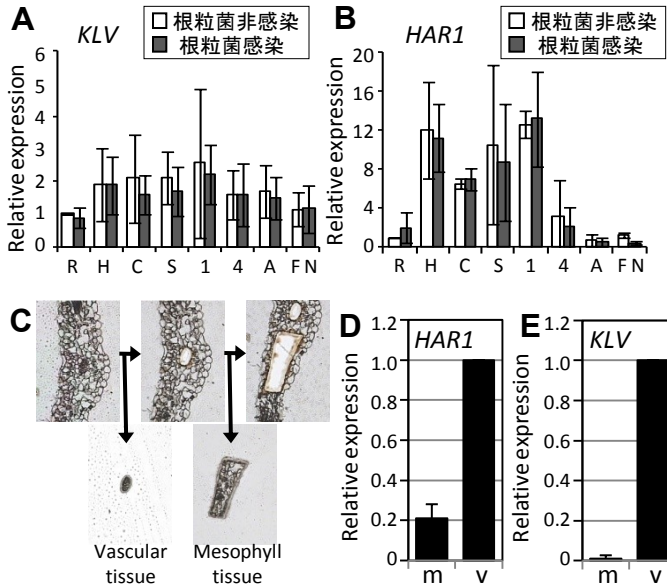


図5. *KLV* と *HAR1* の発現解析。(A, B) *KLV* (A) と *HAR1* (B) の相対発現量。R は根、H は胚軸、C は子葉、S は茎、1 は第一本葉、4 は第四本葉、A は茎頂部、F は花、N は根粒。花以外は感染、非感染で播種後2週間の植物体からサンプリング。エラーバーは3反復の実験の標準偏差。(C) レーザーマイクロダイセクションを用いたサンプリングの流れ。根粒菌感染播種後2週間の野生型の第一本葉。(D, E) 葉肉組織 (m) と維管束組織 (v) における *HAR1* (D) と *KLV* (E) の相対発現量。エラーバーは3反復の実験の標準偏差。

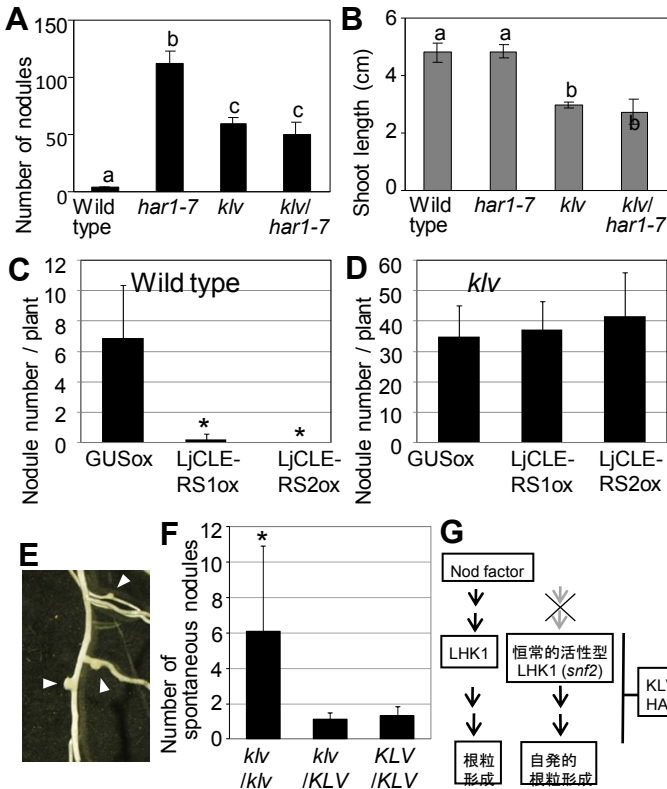


図8. 根粒過剰着生変異体の遺伝学的解析。(A, B) *har1 klv* 二重変異体の根粒菌接種3週間後の根粒形成数(A)と非接種で播種後3週間後のシュート長 (B)。a, b と c は有意水準0.02で有意差あり。エラーバーは標準誤差。(C, D) 野生型 (C) と *klv* (D) における *LjCLE-RS* 過剰発現時の根粒形成数。根粒菌接種後2週間。n は7から12。アスタリスクは有意水準0.02で有意差あり。エラーバーは標準偏差。(E) *snf2* 変異体における自発的根粒形成。根粒菌非感染で播種後5週間後。白矢頭は自発的根粒。(F) *klv snf2* 二重変異体の根粒菌非感染で播種後5週間後の自発的根粒数。*klv/klv* は *klv* 変異をホモでもつ *klv* 変異体、*klv/KLV* はヘテロ個体、*KLV/KLV* は野生型を示す。n は9から15。アスタリスクは有意水準0.02で有意差あり。エラーバーは標準偏差。(G) 根粒形成のNod factor シグナル伝達経路と *KLV*・*HAR1* による根粒形成抑制のモデル。

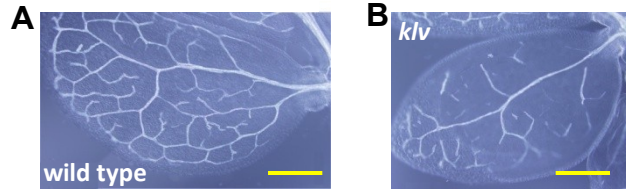


図6. 第一本葉の透明化による維管束導管。根粒菌非感染で播種後7日後における野生型 (A) と *klv* (B) の第一本葉の側小葉。スケールバーは1 mm。

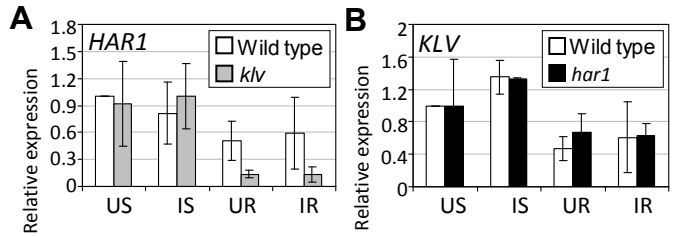


図7. (A) *klv* 変異体での *HAR1* の発現。(B) *har1* 変異体での *KLV* の発現。US は根粒菌非感染のシュート、IS は感染時のシュート、UR は非感染時の根、IR は感染時の根。エラーバーは3反復の実験の標準偏差。

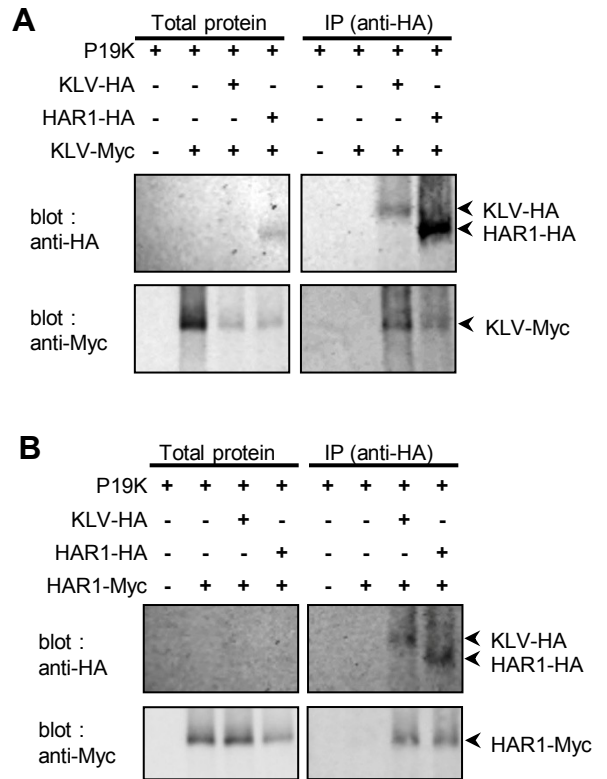


図9. (A, B) Myc融合 *KLV* (*KLV-Myc*) (A) とMyc融合 *HAR1* (*HAR1-Myc*) (B) をHA融合 *KLV* (*KLV-HA*) またはHA融合 *HAR1* (*HAR1-HA*) とともに *N. benthamiana* で一過的に発現させた。総タンパク質は抗HA抗体を用いて免疫沈降し、総タンパク質と免疫複合体をウェスタンブロッティングで解析した。*KLV-HA*, *HAR1-HA*, *KLV-Myc*, *HAR1-Myc* の存在は抗HA抗体もしくは抗Myc抗体で検出した。