

根粒共生の制御に関わるミヤコグサ *EARLY NODULIN40* のノックアウト植物の作出

岩本 輝明 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 壽崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

マメ科植物と共生関係を構築する微生物として、根粒菌が知られている。根粒菌はマメ科植物から光合成産物である炭素を受け取る代わりに、窒素固定によって固定した窒素を植物に提供している。この共生関係の開始は根粒菌と植物のシグナル交換により制御されている。根粒形成の初期に発現する宿主植物の遺伝子の1つとして *ENOD40* が知られている。*ENOD40* は *ENOD40-1* と *ENOD40-2* の2つが存在しており、それぞれが12程度の非常に短いアミノ酸からなるペプチドをコードしている。また、根粒形成時に RNA-binding protein の核から細胞質への再局在化が *ENOD40* の RNA 依存的に起こることが知られている (Canmpalans et al. 2004)。これらのことから、*ENOD40* は翻訳産物が short-peptide (sPEP) として働くだけでなく、non-coding RNA (ncRNA) としても機能をもつことが示唆されている。これまでの *ENOD40* に関する研究は RNAi やアンチセンス法などで遺伝子をノックダウンした植物を用いて行われていた。*ENOD40* を RNAi によりノックダウンした植物を用いた先行研究では感染糸形成などの感染プロセスは抑制されなかった。一方で皮層細胞の分裂や根粒原基の成長など、根粒の形成プロセスへの抑制が確認されている。このことから *ENOD40* は根粒菌の感染プロセスには関与せず、根粒の形成に関与していることが示唆された (Kumagai et al. 2006)。また、*ENOD40-1* と *ENOD40-2* を RNAi によって同時に抑制した研究では、片方を抑制した場合よりも根粒形成がより強く抑制された。このことから *ENOD40-1* と *ENOD40-2* は重複して作用せず、それぞれ別の作用によって根粒形成に関与している可能性が示唆された (Wan et al. 2007)。*ENOD40* は根粒形成に関わる重要な遺伝子として知られており、39 bp という短さや、sPEP としても ncRNA としても作用するなど特徴的である。しかし、*ENOD40* の研究はノックダウン植物を用いた解析にとどまり、かつ研究数も少ないことから *ENOD40* の機能については未解明な点が多い。本研究では、*ENOD40* の詳細な機能を解明することを目的に、モデルマメ科植物のミヤコグサを用いて CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集による *ENOD40-1* および *ENOD40-2* のノックアウト植物の作出を行なった。

【方法】

モデルマメ科植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を実験材料として使用した。CRISPR-P を用いて、*ENOD40-1* および *ENOD40-2* にそれぞれの coding sequence を両端から囲い込む形で gRNA を2つずつ設計した。設計した gRNA をアニーリング反応により2本鎖 DNA にした。アニーリングさせた gRNA を gRNA クローニングベクター (pMR203_AB, pMR203_BC) にライゲーション反応によって導入した。その後、プラスミド DNA の抽出を行い、DNA シークエンスを行なうことで目的の gRNA が導入されていることを確認した。制限酵素処理により gRNA の発現カセットを取り出し、植物形質転換用のバイナリーベクター

(pMR285_AD3) に導入した。抽出したプラスミドは急速冷凍法を用いて *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株に導入した。その後、当該プラスミドを有するアグロバクテリウムをミヤコグサの胚軸に感染させた。アグロバクテリウムを感染させた植物の胚軸からハイグロマイシンによる形質転換体の選抜、カルス誘導、シュートの再分化、伸長、発根過程を経て、得られた個体の DNA シークエンスを行うことでゲノム編集個体の選抜を行なった。

【結果】

ENOD40-1 ノックアウト植物を T₀ 世代で 12 個体、T₁ 世代で 6 個体得ることができた。*ENOD40-2* ノックアウト植物を T₀ 世代で 17 個体、T₁ 世代で 2 個体得ることができた。

ENOD40-1 ノックアウト植物では 5' 側に作成した gRNA がより効率のよい編集を引き起こした。5' 末端側に作成した gRNA の PAM 配列付近で変異が生じた個体では、開始コドンを残し下流のアミノ酸のフレームシフト変異が起こっていた (図1)。この植物では野生型の *ENOD40-1* とは全く異なるアミノ酸配列を有することから *ENOD40-1* のタンパク質としての機能が完全に喪失していることが考えられる。*ENOD40-1* ノックアウト植物は WT と同程度の成長を示しているのに対し、*ENOD40-2* ノックアウト植物は非常に成長が悪かった。現在これらの変異をホモにもつ T₁ 植物を栽培し種子の収穫を待っている状況にある。

enod40-1-2

ATG | c.5delA


ENOD40-1 M K L C W Q I S I H G S **enod40-1-2* M S S A G R F P S M V L K *図1 *ENOD40-1* ノックアウト植物のアミノ酸配列。

enod40-1-2 では開始コドンの A より 5 番目のアデニンが欠失した。この塩基の欠失によりフレームシフト変異が起こり、野生型の *ENOD40-1* とは全く異なるタンパク質が翻訳されている。

【考察および展望】

本研究で *ENOD40-1* のタンパク質としての機能が完全に失われていると思われる植物を作出することができた。その一方で、この植物では *ENOD40* の ncRNA に変異は起こっていないことが推察される。したがって、この植物の表現型を調べることで、*ENOD40-1* の sPEP としての機能に注目した解析が可能と思われる。*ENOD40* の ncRNA としての機能を明らかにするために、今後は ncRNA を標的にしたゲノム編集を行うことも予定している。sPEP、ncRNA それぞれおよび両方の機能喪失個体を用いて、*ENOD40* の根粒形成における詳細な機能を明らかにしていきたい。