

## 根粒形成の鍵転写因子 NIN の機能未知領域に関する研究

野田 桃菜 (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】

根粒とはマメ科植物が窒素固定細菌である根粒菌と共生するために根に形成する器官である。根粒は「根粒菌の感染および増殖・分化」と「細胞分裂などの器官形成」が発達段階に応じて同調しながら形成される。成熟した根粒内部では、根粒菌がニトロゲナーゼと呼ばれる酵素を用いて  $N_2$  を  $NH_4^+$  に還元する窒素固定を行うため、植物は大気中の  $N_2$  に由来する窒素源を利用できる。

NODULE INCEPTION (NIN) は、根粒形成能をもつ植物だけに存在し、根粒菌感染直後に根で発現する転写因子である。NIN 転写因子は根粒形成を開始する際、「根粒菌の感染」と「細胞分裂 (器官形成)」の両方に関してさまざまな遺伝子の発現を制御する鍵転写因子として機能する。さらに、NIN 転写因子は根粒形成過程の初期に限らず、窒素固定を行う成熟した根粒内部でも発現し続けている。しかし、論文等でこれまで報告されているほとんどの *nin* 変異体では根粒が全く形成されないため、根粒の成熟過程や窒素固定といった根粒内部における NIN 転写因子の役割には不明な点が多い。

当研究室ではマメ科のモデル植物ミヤコグサ *Lotus japonicus* を用いて、根粒を形成する新たな *nin* 変異体 (以後 *partial nin*) を単離した。*partial nin* では、約 900 アミノ酸 (900 aa) からなる NIN 転写因子のうち、既知の機能ドメインに含まれない 104 aa がフレームシフトを起こすことなく欠失している。野生型の成熟した根粒が植物のレグヘモグロビンによってピンク色を呈するのに対し、*partial nin* は窒素固定活性のない白い根粒を形成する。このように、*partial nin* では根粒形成は開始するが、成熟しないことから、*partial nin* で欠失した領域内に根粒内部での NIN 転写因子の機能に重要な部分があると予想される。

NIN 転写因子の新たな機能、特に根粒内部における役割の解明を目指し、まずは *partial nin* の表現型解析を行った。次に、*partial nin* で欠失した 104 aa のうち、根粒の成熟に必要な NIN 転写因子の機能に関わる領域を絞り込むための相補実験を行った。

## 【材料】

ミヤコグサ *Lotus japonicus* MG-20 (野生型) および *partial nin* 根粒菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF 303099)

## 【結果・考察】

1. *partial nin* の表現型

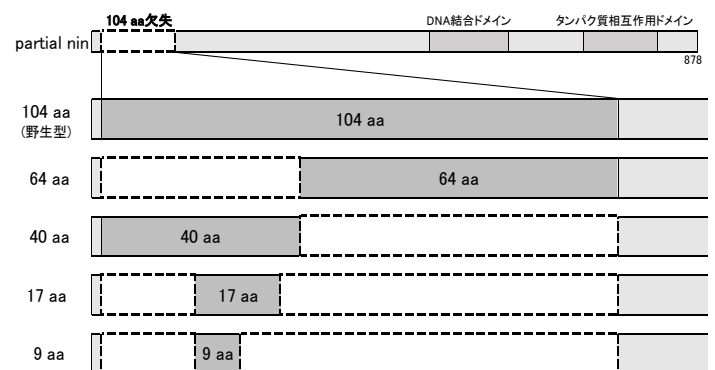
GFP を発現する根粒菌を接種して *partial nin* の根粒菌の感染状態を調べた結果、根粒菌接種 5 日後 (5 dai) では *partial nin* でも野生型と同様に根粒菌が植物内に感染するための通路である感染糸が根毛に形成されていた。しかし、*partial nin* の 14 dai の根粒には根粒菌がほとんど存在しなかった。よって、*partial nin* では感染糸形成以降の感染糸から根粒内部の細胞への根粒菌の放出や感染細胞内での根粒菌の増殖に問題がある可能性が考えられた。

次に、遺伝子発現から *partial nin* の根粒の状態を理解するために 14 dai の根粒の RNA シークエンスを行った。*partial nin* と野生型で発現に差があった遺伝子は 6000 を超えた。このうち約 4 割は根粒菌感染特異的に発現量が変化する遺伝子だった。

NIN について、*partial nin* でも mRNA のスプライシングに異常はなく、発現量は野生型と同様だった。また、根粒形成の初期に発現し、NIN の標的遺伝子である *NF-YB* や *NF-YA* は *partial nin* でも発現が誘導されていた。したがって、*partial nin* において NIN 転写因子の機能は完全には失われていないことがわかった。一方、成熟した根粒で発現することが知られる *Lbs* や *SEN1*、*SST1* などは *partial nin* ではほとんど発現していなかった。さらに、野生型では根粒菌の感染に伴う発現量の変化が起きない老化関連遺伝子 (*CYP1*、*NAC094*) が *partial nin* では顕著に発現していた。ゆえに、*partial nin* では根粒が成熟する前に老化が始まっていると考えられた。

## 2. 相補実験

*partial nin* で欠失した 104 aa の全部または一部が野生型のように翻訳される NIN (図 1) が NIN プロモーターによって発現するコンストラクトを 5 種類作成した。これらのコンストラクトを毛状根形質転換法によりアグロバクテリウムを介して *partial nin* に導入した。形質転換根をもつ植物に根粒菌を接種し、形成される根粒を観察した。その結果、欠失領域の後半にあたる 64 aa を補った NIN 以外で成熟した根粒が形成された。したがって、欠失した 104 aa のうち、特に 9 aa に *partial nin* で失われた根粒の成熟に必要な NIN の機能に関わる部分が含まれるとわかった。



(図 1) 相補実験に用いた NIN の模式図

## 【展望】

*partial nin* の表現型を踏まえ、感染糸からの根粒菌の放出や根粒菌の増殖に関わる遺伝子の候補を探索し、NIN による制御が行われているか調べる。

また、相補実験より *partial nin* で欠失した 104 aa のうち 9 aa に未知の NIN の機能に関わるアミノ酸が存在すると示唆された。9 aa から更なる絞り込みを行い NIN 転写因子の機能にどのように関わるのか明らかにする。