

氏 名	すぎやま あきふみ 杉 山 暁 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1697 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	根粒形成に關与するマメ科 ABC タンパク質の機能と生理的役割

論文調査委員 (主 査) 教 授 矢 崎 一 史 教 授 間 藤 徹 教 授 植 田 和 光

論 文 内 容 の 要 旨

マメ科植物は根粒菌と共生し、窒素固定を行う機能を有する。この共生関係の確立には、マメ科植物と根粒菌間でのシグナル分子を介した相互認識が必須であり、マメ科植物の根から分泌されるこのようなシグナル分子としてフラボノイドなどが同定された。植物細胞内に取り込まれた根粒菌は、固定した窒素を植物に供給するが、同時に炭素源など生育に必要な他の栄養分を植物細胞に依存するため、多くの代謝物が植物サイトソルと根粒菌（バクテロイド）間で相互に輸送される。このように共生関係の確立と維持において、物質輸送は中心的な役割を担っているが、依然多くの部分が未解明のままである。本研究では、植物輸送体の中で最大のファミリーを構成する ATP-binding cassette (ABC) タンパク質を対象とし、生化学的及び分子生物学的手法により、根粒形成におけるその機能と生理的役割を明らかにすることを目的とした。得られた成果の概要は以下の通りである。

(1) ダイズにおいて、イソフラボノイドのゲニステインやダイゼインが根粒菌へのシグナルとして同定されていることを利用し、ダイズの根からのシグナル分子の分泌機構を生化学的に解析した。窒素欠乏条件下で育成したダイズの根から細胞膜ベシクルを調製し、ゲニステイン輸送活性を測定すると、ATP 依存的な輸送活性が認められた。このゲニステイン輸送活性は、gramicidin D, nigericin, valinomycinなどのイオノフォアによっては全く影響を受けず、P 型 ATPase や ABC タンパク質の一般的な阻害剤である sodium *ortho*-vanadate によって顕著に阻害されたことから、ダイズの根によるゲニステイン分泌には ABC タンパク質が関与することが示唆された。さらに、種々のフラボノイドを用いた競合阻害実験より、本輸送体はイソフラボンのアグリコンに選択性を有することを明らかにした。

(2) 根粒形成過程や共生窒素固定に関わる ABC タンパク質の基盤情報を得ることを目的に、マメ科のモデル植物であるミヤコグサのゲノム情報を用いて、ABC タンパク質の全ゲノム的解析を行った。ミヤコグサのゲノムシーケンスから推定されるアミノ酸配列の中から、シロイヌナズナの ABC タンパク質と相同性の高いものを抽出したところ、全部で394の配列を見出した。これらのアミノ酸配列の多くは ABC タンパク質の一部分に相当する断片であったため、このような短い断片を元に ABC タンパク質の系統解析を行う“domain-based clustering analysis”を考案し、その有効性をシロイヌナズナの配列を用いて確認した。次いで、ミヤコグサ ABC タンパク質の解析を行い、ミヤコグサゲノム上に43種のフルサイズ、30種のハーフサイズ、18種の可溶型からなる91種の ABC タンパク質遺伝子を見出した。特にミヤコグサの特徴として、シロイヌナズナの AtMRP14 (multidrug resistance-associated protein 14) 及び AtPDR12 (pleiotropic drug resistance 12) と相同な遺伝子に高い重複が認められたため、これらの遺伝子について発現プロファイルを解析したところ、AtPDR12-like 遺伝子の多くが根で、それも根粒を形成した時に発現が高いことが判明した。

(3) 根粒形成への関与が推測された AtPDR12-like 遺伝子の中に、cDNA アレイ解析において著しく根粒形成初期で発現誘導される遺伝子が1種 (LjPDR1 と命名) 見出された。そこでこの ABC タンパク質に着目し、詳細な機能解析を行った。LjPDR1 は全長1,433アミノ酸からなり、シロイヌナズナやタバコにおいて感染防御応答に関与するとされる AtPDR12 や

NpPDR1と高いアミノ酸相同性（各々70%及び71%）を有した。*LjPDR1*は根で特異的に発現していたが、その発現は根粒形成やメチルジャスモン酸処理によって顕著に誘導された。*LjPDR1*プロモーターの下流に β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を連結し、毛状根を用いて組織特異的な発現解析を行ったところ、主側根の根端に近い領域の中心柱、及び根粒原基や成熟過程の根粒において強いGUS活性が認められた。また、不連続ショ糖密度勾配遠心法及び水性二層分配法による解析により、*LjPDR1*は細胞膜局在であることを明らかにした。さらに、RNAi法により *LjPDR1*の発現抑制体を作成して解析したところ、発現抑制体では根粒数や根長においては野生型と差がないものの、野生型と比べて根の下方に根粒を着生する表現型を示した。このことは、*LjPDR1*の発現抑制によって根粒着生が遅延していることを示唆している。以上より *LjPDR1*が根粒形成過程を正に調節する機能を有することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ABCタンパク質は植物において最大の輸送体ファミリーを形成し、多様な高次生理機能を担っている。作物として重要なマメ科植物は根粒菌と共生することで大気中の窒素を固定するが、この高次現象において、共生確立とその維持に多くの代謝物の輸送が関与することが指摘されているにもかかわらず、植物側のABCタンパク質の関与は全く未解明であった。本論文では、根粒形成の初発段階においてマメ科植物のABCタンパク質が重要な役割を担うことを生化学的に明らかにした上で、根粒形成過程に関与するABCタンパク質 *LjPDR1*の機能と生理的役割を生化学的及び分子生物学的手法により解析した。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

- (1) マメ科植物のシグナル分子同定以来20年以上にわたって不明であったマメ科植物の根からのシグナル分子の分泌機構を、ダイズの根の細胞膜ベシクルを用いて膜輸送を生化学的に解析し、この分泌にはABCタンパク質型の輸送体が関与することを明らかにした。また、その輸送体の生化学的諸性質を明らかにした。
- (2) マメ科のモデル植物ミヤコグサを用いたABCタンパク質遺伝子の全ゲノム解析のため、ドラフト配列上の断片的なABCタンパク質配列を解析する“domain-based clustering analysis”を考案し、その有効性をシロイヌナズナの配列を用いて実証した。次いでミヤコグサゲノム解析を行い、ミヤコグサABCタンパク質のカタログを作成し、その特徴としてAtMRP14及びAtPDR12と相同の遺伝子に高い重複性があることを明らかにした。さらにAtPDR12-like遺伝子の多くが根粒形成とリンクし、根で発現が誘導されることを明らかにした。
- (3) ミヤコグサABCタンパク質の中で根粒形成により著しい発現誘導を示す *LjPDR1*について詳細な解析を行い、*LjPDR1*の発現が根粒形成以外にもメチルジャスモン酸処理によって顕著に誘導され、根粒原基や成熟過程の根粒及び主側根の根端領域に近い中心柱で特異的に発現することを明らかにした。さらに、本タンパク質が細胞膜局在であること、また発現抑制体を用いた解析より、根粒形成を正に調節することを明らかにした。

以上のように本論文は、根粒形成の初発段階に関与するマメ科植物のABCタンパク質の生化学的性質を明らかにするとともに、マメ科モデル植物のミヤコグサにおけるABCタンパク質のカタログを作成し、さらに根粒形成を正に調節する遺伝子 *LjPDR1*の解析を行って根粒形成におけるABCタンパク質の役割について新規な知見を得たものである。このような成果は、植物生理学、植物分子生物学及び森林圏遺伝子統御学に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。