

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05327

研究課題名（和文）小胞輸送の制御因子LjSYP132sの根粒形成および種子形成の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of LjSYP132s, a regulator of vesicular transport, in nodule and seed formation.

研究代表者

野村 美加（Nomura, Mika）

香川大学・農学部・教授

研究者番号：50294749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、LjSYP132sのスパイスバリエーションに着目し、それぞれの細胞内局在性と機能相補性を調べ、選択的スプライシングに重要なシス領域を決定することで未だその制御機構が不明な選択的スプライシングの実体についてその全容を解明することを目的とした。LjSYP132b LORE1変異体を利用して解析した結果、LjSYP132bの発現が減少するとLjSYP132aの発現が増加することが明らかとなった。またFLAG-タグを付加した細胞内局在性を確認した結果LjSYP132aもLjSYP132bも局在は変化しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題では、LjSYP132sのスパイスバリエーションに着目し、それぞれの細胞内局在性と機能相補性を調べ、選択的スプライシングに重要なシス領域を決定することで未だその制御機構が不明な選択的スプライシングの実体についてその全容を解明することを目標としている。根粒形成と花粉管伸長の共通性が明らかになれば、根粒形成メカニズムの進化のルーツを解き明かすことができると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we focused on the splice variants of LjSYP132s and investigated their subcellular localization and functional complementation, and determined the cis region important for selective splicing, aiming to elucidate the whole picture of selective splicing, whose regulatory mechanism is still unknown. The results of the analysis using the LjSYP132b LORE1 mutant showed that the expression of LjSYP132a increased when the expression of LjSYP132b decreased. The localization of LjSYP132a and LjSYP132b in FLAG-tagged cells was also confirmed, indicating that neither LjSYP132a nor LjSYP132b changes localization.

研究分野：植物栄養学

キーワード：SNARE Nodule Legume nitrogen fixation Lotus japonicus

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) タンパク質は小胞輸送における受容タンパク質であり、植物の成長やシグナル伝達において重要な働きをしている。SNARE は保存されているアミノ酸配列から Q-SNARE と R-SNARE に分類され、オルガネラ膜側の Q(Qa, Qb, Qc)-SNARE と相対する輸送小胞側の R-SNARE が2つの膜上で複合体を形成し、これが形成されることで小胞側とオルガネラ膜が互いに引き寄せられ膜融合が起き、分泌タンパク質がオルガネラ内に特異的に輸送される。本研究では、マメ科植物ミヤコグサの根粒形成に関わる SNARE タンパク質を明らかにするために、Qa-SNARE である *LjSyp132* について、発現解析や毛状根形質転換体を用いた機能解析を行った。

2. 研究の目的

申請課題は、根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定における重要な役割を持つ *LjSYP132s* 遺伝子のスプライズバリエーション (*LjSYP132a* および *LjSYP132b*) の機能と選択的スプライシングの制御機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

LjSYP132a および *LjSYP132b* の細胞内局在性の解析

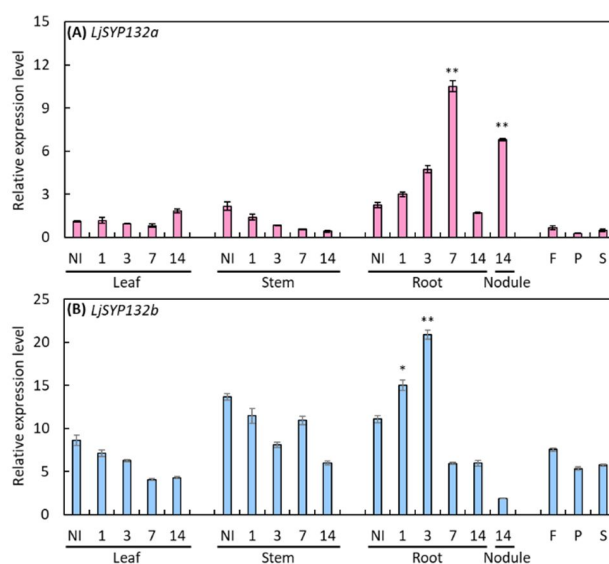
FLAG-Tag を用いた細胞内局在性の解析

LjSYP132a の根粒形成における役割の解明と変異体を用いた解析

4. 研究成果

(1) 発現解析

根粒形成に関与する Q-SNARE を検索した。マイクロアレイ解析から Q-SNARE の *LjSYP132* が根粒で強く発現していることが明らかとなった。*LjSYP132* のゲノム解析結果から1つの遺伝子から2つの遺伝子が合成されるスプライズバリエーションが起きていることが予測された。それぞれを *LjSYP132a* と *LjSYP132b* と名付けた。特異的プライマーを作成し、それぞれの遺伝子発現を確認した結果、*LjSYP132a* は根粒で発現が誘導し、*LjSYP132b* は根粒を含むどの器官でも恒常的に発現しているが根粒菌感染初期の根ではその発現が誘導することが明らかとなった。両者の遺伝子は第13エキソンのみ異なっていた。13エキソンの領域で特異的ペプチド抗体を作成したが残念ながら互いに認識することはできなかったが、共通配列のペプチド抗体を作成し、イムノプロット解析を行った結果、*LjSYP132* はシンビオゾーム膜に局在することが明らかとなった。



根粒菌接種後各時期のミヤコグサ各組織でのqRT-PCRによる*LjSYP132a*(A)、および*LjSYP132b*(B)の発現解析を示す。内部標準にはコピキチンの発現量を用いた。横軸の数字は根粒菌接種後の日数を示す。F: Flower, P: Pod, S: Seed. P* < 0.05, P** < 0.001.

(2) 変異体を用いた表現型解析

遺伝子発現を抑制した RNAi-*LjSYP132a* と RNAi-*LjSYP132b* の形質転換体の作成を行った。その結果、RNAi-*LjSYP132a* は成熟できない小さな根粒を形成した。このことから *LjSYP132a* は根粒が成熟するのに必要な物質輸送に関与しているのではないかと推測した。一方、*LjSYP132b* は未成熟の根粒すら確認できなかった。蛍光顕微鏡で観察した結果、RNAi-*LjSYP132b* の根毛では感染糸形成が確認できたが、それに続く根の皮層細胞での感染糸あるいはシンビオゾーム膜形成が抑制されていた。この結果から *LjSYP132b* は根の皮層細胞における感染糸あるいはシンビオゾーム膜形成の段階で必要な Q-SNARE として機能していると推測した。

(3) 種子形成における LjSYP132 解析

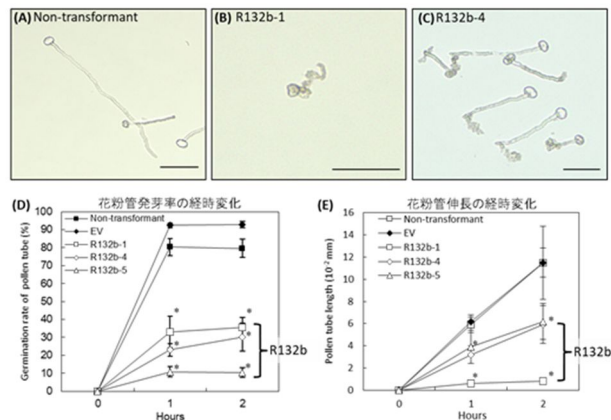
さらに RNAi-LjSYP132b は、種子形成が阻害された。RNAi-LjSYP132b の花は野生株と同程度咲いたため開花直後の花を採取し経時的に花粉管の伸長を観察すると、著しく抑制されていた。

(4) 細胞内局在性解析

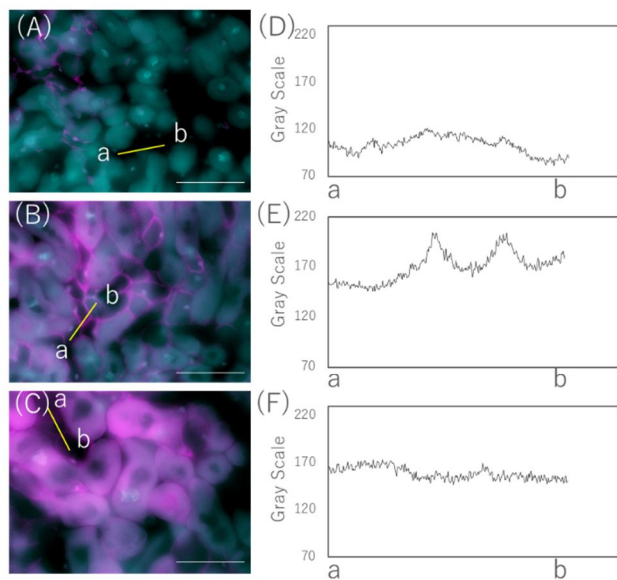
FLAG タグを用いて細胞内局在性を調べた結果、LjSYP132a、LjSYP132b いずれも同じ局在を示すことが明らかとなった。

(5) LORE 1 変異体を用いた表現型解析

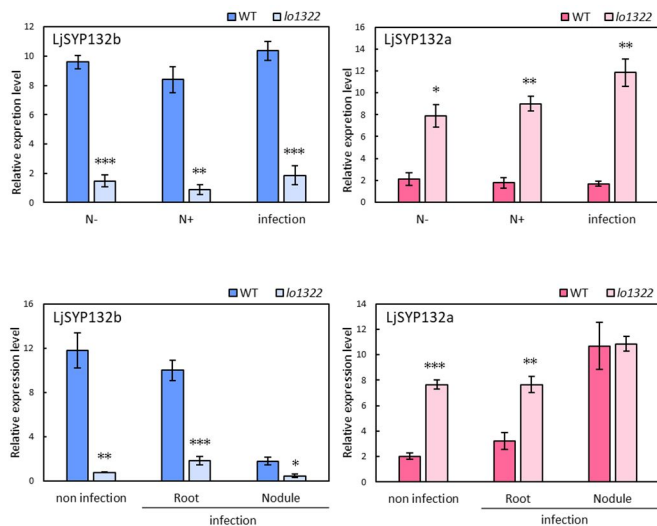
LjSYP132b の発現レベルによって LjSYP132a の発現を制御しているのではないかと考え、LjSYP132b の変異体 (*lo1322*) を用いて検証することとした。*lo1322* は LjSYP132 の第 13 エキソンに LORE1 (Lotus Retrotransposon 1) が挿入された変異体である。*lo1322* の各器官における発現を調べた結果、LjSYP132b の発現量は野生型と比較して *lo1322* の根と根粒において有意に減少したが、LjSYP132a の発現量は *lo1322* の根において有意に増加していた。一方で、野生型の根粒において強く発現していた LjSYP132a の発現量は、*lo1322* の根粒においても変化が見られなかった。これらの結果から、選択的スプライシングにより LjSYP132b が減少すると LjSYP132a の発現が増加することが明らかとなった。また、LjSYP132a の発現最大量はコントロールされており、ある値以上の増加はないことが明らかとなった。さらに、ゲノムデータの結果から、第 14 エキシソンのアンチセンス鎖に *lncRNA* (*lncRNA132* と命名) が存在することが明らかとなった。そこで、*lncRNA132* による LjSYP132 の選択的スプライシングへの可能性を検討した。発現解析の結果、根において *lncRNA132* の発現量は感染後 3 日目に増加してその後減少した。この結果は、LjSYP132b の発現パターンと一致した。このことから、*lncRNA132* は LjSYP132 のスプライスバリエーションの発現様式をコントロールしていることが示唆された。今後は、*lncRNA132* の過剰発現および RNAi 毛状根形質転換体を作製し、LjSYP132s の発現解析を行う必要がある。



(A-C): 花粉管伸長培地中でのインキュベーション2時間後の花粉管伸長の観察を示す。(A): 野生型ミヤコグサの花粉管伸長、(B): RNAi-LjSYP132b-1および(C): RNAi-LjSYP132b-4 形質転換植物の花粉管伸長観察画像。(D): 各形質転換植物の花粉管発芽率、(E): 各形質転換植物における花粉管伸長を示す。(D, E): $P < 0.001$ 。



蛍光抗体による根粒内部の細胞の局在毛状根形質転換によって、目的遺伝子を Flag tag と融合させた感染後9週目の根粒細胞。(A-C) Flag抗体による標識蛍光(magenta) (D-F) 非感染細胞上の任意部位(yellow bar)の蛍光強度をグラフに表した。計測した蛍光強度には DAPIの蛍光(cyan)は含まれない。(A, D) 非形質転換体 (B, E) Flag-SYP132a形質転換体 (C, F) Flag-SYP132b形質転換体 Bar=100 μ m



*lo1322*変異体における LjSYP132s の遺伝子発現解析
根粒菌感染後3日目(上)と19日目(下)の *lo1322*-WT327、-M326の根と根粒における LjSYP132s の遺伝子発現解析の結果。WT: 野生型, M: ホモ接合体, n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tongnunui Prasert, Kuriya Yuki, Murata Masahiro, Sawada Hideki, Araki Michihiro, Nomura Mika, Morioka Katsuji, Ichie Tomoaki, Ikejima Kou, Adachi Kohsuke	4. 巻 16
2. 論文標題 Mangrove crab intestine and habitat sediment microbiomes cooperatively work on carbon and nitrogen cycling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0261654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chungopast Sirinapa, Yodying Preecha, Nomura Mika	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Cellulolytic Bacteria on Nitrogen-Fixing Bacteria, 16S rRNA, nifH Gene Abundance, and Chemical Properties of Water Hyacinth Compost	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 768 ~ 779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42729-020-00399-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kotona Hatano, Haruka Uetsuji, Issei Takahashi, Naoki Yamaji, Jian Feng Ma, Mitutaka Fukudome, Mika Nomura
2. 発表標題 Expression and localization of SNARE genes, LjSYP132a and LjSYP132b in Lotus japonicus nodule
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics Environmental and Resource Genomics and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nanami Kuwahara, Mitutaka Fukudome, Mika Nomura
2. 発表標題 Effect of iron for the growth and symbiosis in Lotus japonicus nodule
3. 学会等名 Kagawa International Forum on Advanced Genomics Environmental and Resource Genomics and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安井博昭, 諸隈正裕, 野村美加, 水田圭祐, 豊田正範, 堀口亨平, 横山正
2. 発表標題 微生物資材「ゆめバイオ」が畑作物の生育及び収量に及ぼす影響
3. 学会等名 作物学会関西支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原七実, 福留光拳, 野村美加
2. 発表標題 鉄濃度変化がミヤコグサ根粒形成と側根形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoi Sogawa, Issei Takahashi, Masaharu Kyo, Haruko, Imaizumi-Anraku, Shigeyuki Tajima, Mika Nomura
2. 発表標題 Requirement of Qa-SNARE LjSYPs for nodulation and seed development in Lotus japonicus
3. 学会等名 14th European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋一成, 十川蒼, 上野陽菜, 野村美加
2. 発表標題 LjSYP132aとLjSYP132bの根粒形成及び、種子形成への関与
3. 学会等名 植物微生物研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秦野琴菜, 諸隈正裕, 横山正, 見城貴志, 小島克洋, 堀口享平, 野村美加
2. 発表標題 「夢バイオ」バイオ肥料を用いたイネ成長促進の検証
3. 学会等名 日本土壌肥料学会関西支部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

香川大学農学部野村研究室
<https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/nomura/>
 植物ゲノム遺伝子源解析センター
<chrome-extension://efaidnbmnmnibpcajpcglclefndmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.ag.kagawa-u.ac.jp%2Fphytogene%2FAgarie.pdf&cLen=167950&chunk=true>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関