

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18559

研究課題名(和文)根粒形成の正の制御に関わる宿主因子の解析

研究課題名(英文)Studies on host plant factors required for root nodulation

研究代表者

寿崎 拓哉 (SUZAKI, Takuya)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40575825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミヤコグサ-根粒菌共生では、根粒菌の宿主植物細胞への侵入は共生時特異的に形成される感染糸と呼ばれるトンネル状の構造によって担われている。本課題では、根粒形成が顕著に遅延するユニークな表現型を示すミヤコグサ late nodulation (lan) 変異体を用いて、根粒菌の侵入を制御する宿主植物側の機構を研究した。まず、lan変異体の根粒共生の表現型、既知の共生遺伝子とLANの遺伝的関係を明らかにした。また、lan変異体の原因遺伝子を特定し、その機能を明らかにするための解析を推進した。これらの結果を総合し、根粒形成のシグナル伝達系におけるLANのおおまかな作用点を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In Lotus japonicus-Rhizobium root nodule symbiosis, rhizobia enter host cells through an intracellular invasion system that depends on the formation of a root-hair infection thread (IT). While IT-mediated intracellular rhizobia invasion is thought to be the most advanced and dominant invasion system, our understanding of the underlying genetic mechanisms relevant to IT formation is incomplete. In this study, we identify a *L. japonicus* nodulation-deficient mutant, with a mutation in a novel locus designated as LATE NODULATION (LAN), in which nodulation is significantly delayed. LAN encodes a putative component involved in transcriptional regulation. These results suggest that the predominant role of LAN-mediated gene transcription is to establish swift and efficient production of functional nodules by promoting intracellular rhizobial accommodation.

研究分野：植物発生分子遺伝学

キーワード：根粒 共生 ミヤコグサ 転写制御 感染糸

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は根に根粒と呼ばれる側生器官を形成し、その中で窒素固定細菌の根粒菌を細胞内共生(根粒共生)させている。根粒共生では、植物は根粒を介して根粒菌が固定した窒素栄養であるアンモニアを受け取り、一方で光合成産物の炭素源を根粒菌へと提供する相利共生関係が実現している。窒素固定活性を有する機能的な根粒の形成には、「根粒菌の感染」と「根粒の発生」が同調的に進行する必要があることが知られている。根粒共生の研究材料として広く用いられているマメ科植物のミヤコグサ、タルウマゴヤシ、ダイズでは、植物が感染系と呼ばれるトンネル状の構造を共生時特異的に形成し、根粒菌は根毛を起点として形成された感染系を通り、宿主細胞へと侵入する。感染系は細胞の中を貫通する構造であることから、感染系を介した根粒菌の侵入様式は「細胞内侵入」と定義されている。その一方で、他のマメ科植物の中には、明確な感染系構造をつくらず、根粒菌は根の表皮上の傷などを起点として宿主細胞の間を通り、宿主根の内層へと侵入することが知られており、この侵入様式は「細胞間侵入」と定義されている。根粒共生の進化の論じる際には、細胞間侵入系を基礎にして、複雑な感染系を介した細胞内侵入系が進化したと一般的に考えられているが、それを説明する分子レベルでの知見は乏しい。

また、感染系を介した細胞内侵入が優先的に起こるミヤコグサにおいても、根粒形成のシグナル伝達経路に働く一部の遺伝子に変異が生じると、細胞内侵入が行われずに、細胞間侵入により根粒菌が宿主根へと侵入することが示されている。しかしながら、細胞内侵入系から細胞間侵入系への切り替えに関わる分子機構の理解は進んでいない。根粒菌の侵入様式を制御する宿主植物側の機構を明らかにすることは根粒形成の分子機構

や根粒共生の進化基盤の理解につながる重要な課題と考えられる。研究代表者はこれまで、ミヤコグサを用いて根粒形成に関わる新規な突然変異体をいくつか単離してきた。そのなかで、*late nodulation (lan)*と名付けた変異体が根粒菌の侵入様式の制御に関わることを示す予備的な知見を得た。

2. 研究の目的

根粒共生における根粒菌の宿主根への侵入様式の制御に関わる植物側の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

ミヤコグサ新規突然変異体 *lan* を用いた分子遺伝学的な解析を行う。具体的には、(1) *lan* 変異体の表現型解析、(2) *LAN* 遺伝子の特定と機能解析、を行う。

4. 研究成果

(1) *lan* 変異体の表現型解析

ミヤコグサ *lan* 変異体では、感染系の形成を伴わずに根粒菌との共生が成立する。このことは、ミヤコグサが *LAN* を介して根粒菌の侵入様式を決定していることを示唆する。しかし、その具体的な分子機構については、従来ほとんど知見がない。そこで、まず、*LAN* を介した根粒菌の侵入様式決定機構について知見を得ることを目的とし、*LAN* と根粒共生における既知の主要な遺伝子との関係性を分析することで、遺伝学的な観点から *LAN* を根粒共生の分子機構に位置づけることを目指した。根粒共生は主に「根粒菌の感染」と「根粒の器官形成」の二大イベントからなり、両者が協調的に進行することで共生が成立する。これに基づき、本研究では根粒菌感染と器官形成の双方に必須の遺伝子である *CCaMK*、その下流で主に根粒菌感染に働く *CYCLOPS*、器官形成に働く *LHK1* の三因子に着目し、*LAN* との関係性を分析した。*LAN* と *CCaMK* の関係を分析するにあたり、*CCaMK*

の機能獲得型変異であるCCaMKT265Dに着目した。これは根粒菌非存在下において、植物の根に根粒様構造である自発的根粒を誘導することが知られており、*lan*の変異が自発的根粒形成に与える影響を分析することで両因子の関係を分析した。*lan*変異体にCCaMKT265Dを導入したところ、野生型(MG-20)と同様に自発的根粒の形成が確認された。このことはLANがCCaMKT265Dによる自発的根粒形成に必要とは言えないことを示す。LANとLHK1の関係については、LHK1の機能獲得型変異を持つ植物系統である*snf2*を用いて分析した。*snf2*は根粒菌非存在下で自発的根粒を形成することが知られており、これに*lan*の変異が与える影響を調べた。*lan snf2*二重変異体では*snf2*同様自発的根粒が見られ、この結果はLANが*snf2*における自発的根粒形成に必須ではないことを示す。

以上の結果はLANが根粒の器官形成にあまり寄与しないことを示唆する。加えて、LANとCYCLOPSの関係を分析した。*cyclops*変異体では、根粒菌接種に際し根粒菌の感染は成立しないものの、未熟な根粒が形成されることが知られている。この根粒菌に応じた根粒形成の表現型について*lan*の変異が与える影響を調べたところ、*lan cyclops*二重変異体では根粒の形成が全く抑制されることが明らかになった。これは各一遺伝子の変異体とは異なる表現型であり、LANとCYCLOPSが根粒の器官形成の過程で分岐して働くことを示唆する。ここまででLANは器官形成に寄与しない、という結果と重要である、という矛盾する結果が得られており、さらなる検証が求められた。そこで本研究ではLANとCYCLOPSの関係について、根粒菌感染の表現型に着目した調査を行った。

野生型のミヤコグサでは、根毛に根粒菌が付着すると根毛先端部が変形し、根粒菌をトラップする。その後細胞内に感染糸を形成し、根粒菌を内部へ導く。*cyclops*変異体では根粒

菌に応じた根毛の変形は起こるものの、感染糸の形成が起こらないことが知られている。

*lan*および*lan cyclops*変異体における根毛変形の表現型を調べ、LANとCYCLOPSの関係を分析した。DsRedで蛍光標識した根粒菌を接種したところ、*lan*では根粒菌に応じた根毛の変形が観察されたのに対し、*lan cyclops*では根粒菌が付着した根毛でも変形が見られなかった。この結果はLANとCYCLOPSが根粒菌感染、とくに根毛の変形の過程でも分岐して働くことを示唆する。根粒菌に応じた根毛の変形は「根粒菌と植物の相互認識」という根粒共生最初期の現象であり、これが抑制されていると、下流で起こるような根粒共生の現象も起こらないことが想定される。すなわち、*lan cyclops*における根粒形成の抑制は根毛の変形に由来するものと解釈することができ、この結果はLANが根粒の器官形成に直接重要な働きをすることを示すものとは言えない。以上の形態的な観察に加え、遺伝子発現の観点からも*lan cyclops*における根粒共生の抑制について検証した。根粒共生誘導性のマスター遺伝子*NIN*の発現をqRT-PCRで測定したところ、*lan cyclops*では根粒菌接種に応じた*NIN*の発現誘導が見られなかった。このことは*lan cyclops*で根粒菌感染・根粒の器官形成ともに抑制されている、という表現型の観察結果を支持する。

結論として、*lan cyclops*二重変異体の解析からLANとCYCLOPSが、特に根粒菌に応じた根毛変形の過程で分岐して働くことが示唆された。またLANは主に根粒菌感染に働き、根粒の器官形成には直接働かないと考えることが整合的であると言える。本研究の結果はLANおよびLANを介した根粒菌の侵入形式決定機構を根粒共生の分子機構に位置づけるうえで重要なものと言える。

(2) LAN遺伝子の特定と機能解析

ポジショナルクローニングおよび次世代

シーケンサーを併用して、*Ian* 変異体の原因遺伝子を特定した。その結果、*LAN* は転写制御に関わる複合体の構成因子をコードしていることを明らかにした。根粒共生における *LAN* 遺伝子のプロモーター活性は、感染糸形成がみられる表皮細胞および分裂中の皮層細胞でみられることがわかった。また、トランスポゾンのタグラインや CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術により、*Ian* のアレルの解析を進め、*LAN* の機能に必要なタンパク質領域を特定した。これらの結果と前述の *Ian* 変異体の表現型解析の結果を総合すると、*LAN* を含む転写制御系は根粒菌の感染糸を介した細胞内侵入を司る中枢的な働きをもつことが示唆される。今後の研究により、*LAN* の相互作用因子を特定することで、この転写制御系の実体解明に迫っていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Cui, S., Suzaki, T., Tominaga-Wada, R. and Yoshida, S. Regulation and functional diversification of root hairs. *Semin. Cell Dev. Biol.* in press, 2018, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

星野元泉、西田帆那、寿崎拓哉 “ミヤコグサ新規遺伝子 *LAN*～根粒菌の侵入形式を決定し、既知の制御系とパラレルに働く因子～” 植物微生物研究会第27回研究会、2017年

寿崎拓哉 “根粒形成における共生菌の宿主細胞への侵入様式を制御する遺伝的機構” 日本植物学会第80回大会、2016年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寿崎 拓哉 (SUZAKI, Takuya)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40575825