

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05381

研究課題名(和文) 植物プロテアーゼによるマメ科根粒のエイジング機構の解明

研究課題名(英文) Aging mechanism of root nodule by plant proteases

研究代表者

下田 宜司 (Shimoda, Yoshikazu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：80415455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マメ科植物と根粒菌の共生器官である根粒の老化の分子メカニズムを明らかにする。そのために申請者らがマメ科変異体の解析から見出した2つの根粒特異的プロテアーゼ(アスパラギン酸プロテアーゼとシステインプロテアーゼ)を、それぞれ窒素固定活性の維持、及び老化誘導の中核因子と位置づけ、それらの機能を解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マメ科植物の根粒による窒素固定は、化成窒素肥料の代わりとなる極めて重要なシステムであるが、根粒の窒素固定活性は環境ストレスや過剰施肥などによる根粒の老化によって大幅に減少する。本研究は、2種類の根粒特異的なプロテアーゼに着目し、それらの根粒老化への関与を明らかにした。またプロテアーゼの機能発現に関わる可能性がある新規因子を同定した。これらの知見は、根粒窒素固定能の維持や向上を可能にする技術開発に活用できるものである。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the molecular mechanisms of senescence of root nodules, the symbiotic organ of legume-rhizobia symbiosis. For this purpose, two nodule-specific proteases (aspartate protease and cysteine protease) are positioned as key factors in the maintenance of nitrogen-fixing activity and induction of senescence, respectively, and their functions were analyzed to elucidate the molecular mechanisms of nodule senescence.

研究分野：植物微生物間相互作用

キーワード：マメ科植物 根粒菌 共生 老化 プロテアーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、生態系への窒素の取り込みやマメ科作物の生産において極めて重要である。しかしながら、根粒の窒素固定活性は、根粒の成熟以降、時間経過とともに減少し、また環境ストレスや窒素肥料の過剰投与によって大幅に低下する。これらの窒素固定活性の低下は、根粒の『老化』によるものであり、この老化が実際の農業現場で根粒共生が十分なパフォーマンスを発揮できない要因となっている。根粒が老化する現象は古くから知られているが、根粒の窒素固定活性がどのようにして維持され、また窒素固定活性と老化の誘導とのバランスがどのように調節されているかについては不明である。

### 2. 研究の目的

マメ科植物の共生変異体の解析から見出した2つの根粒特異的プロテアーゼ（アスパラギン酸プロテアーゼとシステインプロテアーゼ）を、それぞれ「窒素固定の維持」及び「根粒の老化誘導」の中核因子として位置づけ、それらの機能および制御ネットワークを解析することで根粒の老化の分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

以下の4つの解析をマメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いて実施した。

- (1) リアルタイムPCRを用いて、老化根粒におけるプロテアーゼ遺伝子の発現を解析する。
- (2) 形質転換植物を用いて、プロテアーゼ遺伝子の根粒老化および窒素固定への関与を明らかにする。
- (3) 共発現解析により、プロテアーゼ遺伝子の発現制御に関わると考えられる因子を探索する。
- (4) 酵母ツーハイブリッド法により、プロテアーゼと相互作用を示す因子を探索する。

### 4. 研究成果

#### (1) 根粒特異的プロテアーゼ遺伝子の発現解析

2種のプロテアーゼ遺伝子の発現と根粒老化との関係を明らかにするため、自然老化根粒（根粒菌接種後7週目）と、高濃度の窒素処理あるいは暗処理によって人為的に老化を誘導した根粒において遺伝子発現を調べた。その結果、いずれの老化条件においても、システインプロテアーゼ遺伝子の発現が顕著に誘導された。一方で、アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子は老化条件において発現が顕著に低下することが分かった（図1）。他のマメ科植物の遺伝子発現データベースを調べた結果、自然老化根粒、あるいは高濃度窒素処理条件下におけるアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の発現低下は、インゲンやタルウマゴヤシでも見られることが分かった。

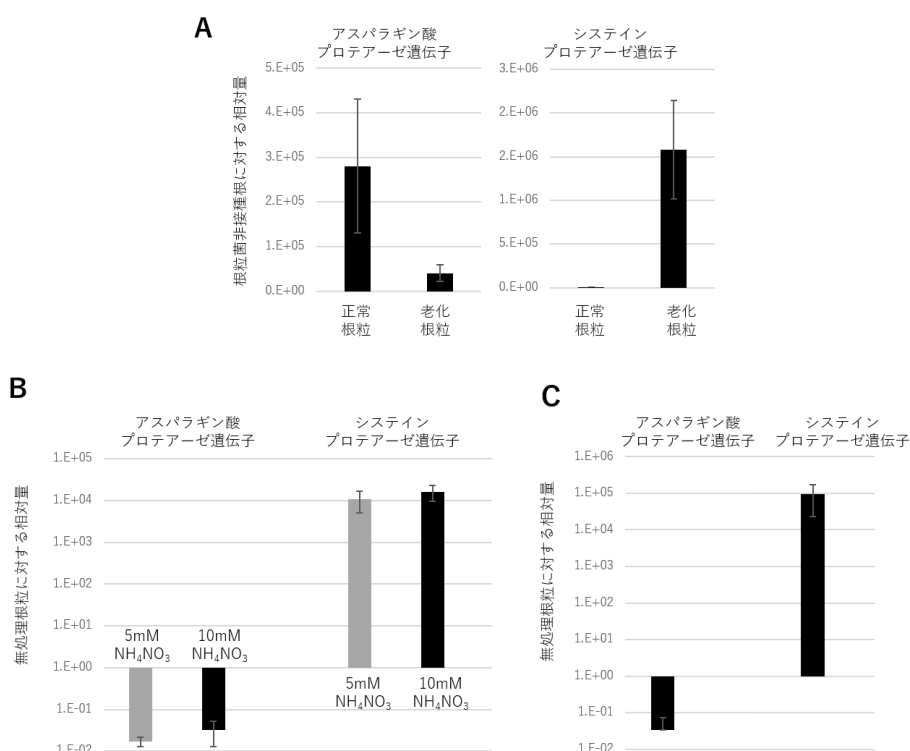


図1 老化根粒におけるプロテアーゼ遺伝子の発現  
(A) 自然老化根粒、(B) 高濃度窒素処理、(C) 暗処理

## (2) プロテアーゼ遺伝子の根粒老化および窒素固定への関与

### ① システインプロテアーゼの根粒老化への関与

システインプロテアーゼの根粒老化への関与を明らかにするため、毛状根形質転換によりシステインプロテアーゼ遺伝子を過剰発現し、根に形成させる根粒の表現型を解析した。過剰発現は35Sプロモーターと根粒特異的に発現するレグヘモグロビン遺伝子(Lb3)のプロモーターを用いた。その結果、空ベクターのコントロールに比べ、システインプロテアーゼ遺伝子を過剰発現した根では、正常な根粒の数が優位に減少することが分かった(図2)。以上の事から、システインプロテアーゼは根粒老化の誘導因子であることが示唆された。

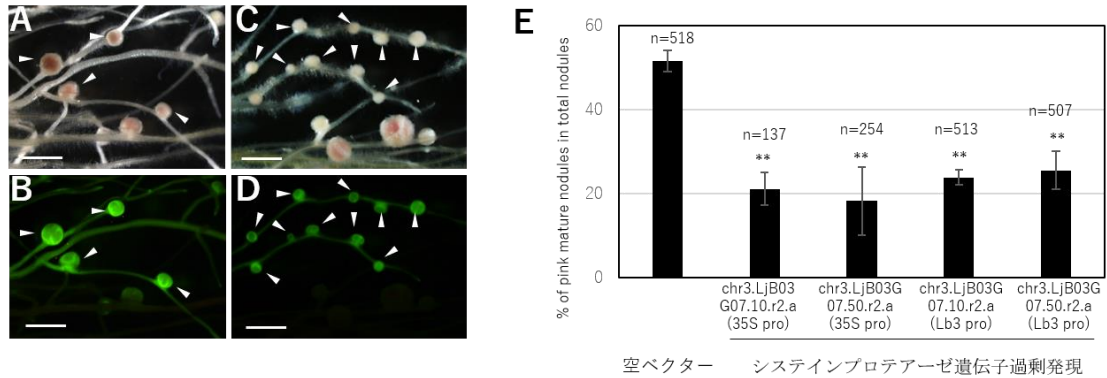


図2 システインプロテアーゼ遺伝子を過剰発現した根にできた根粒の表現型

(A, B) 空ベクター、(C, D) システインプロテアーゼ遺伝子過剰発現。A, C は明視野、B, D は蛍光視野。矢印は形質転換根にできた根粒。(E) 形質転換根にできた正常根粒の割合。n は解析根粒数。\*\*  $P < 0.01$ 。

### ② アスパラギン酸プロテアーゼの窒素固定への関与

アスパラギン酸プロテアーゼの窒素固定への関与を明らかにするため、アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子を過剰に発現する形質転換ミヤコグサの作出を行った。形質転換には野生型のミヤコグサを用い、野生型および活性中心に変異を導入したアスパラギン酸プロテアーゼをユビキチンプロモーターの制御下で高発現するコンストラクトを導入した。T0世代の地上部を用いて、遺伝子の導入および発現を確認したところ、野生型のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子を発現するものを18系統、変異型を発現するものを16系統得ることができ、いずれの系統も空ベクターを導入したものとは比べ、植物の成長に顕著な違いは見られなかった。導入したアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の発現レベルが高く、多くの形質転換種子が得られた系統を以降の実験に用いた。

得られた形質転換体を用いて、高濃度窒素処理時の窒素固定活性を解析した。その結果、野生型および変異型のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子を導入した形質転換体は、いずれも高濃度の窒素処理により、窒素固定活性の低下が認められた(図3A)。野生型のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子を導入したいくつかの系統において、空ベクターに比べ高い窒素固定活性を示すものがあつたが、導入したアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の発現量との相関は認められなかった。また根粒菌接種後9週目の自然老化根粒における窒素固定活性を調べたが、空ベクター、野生型および変異型のアスパラギン酸プロテアーゼ形質転換体の間で顕著な活性の違いは認められなかった(図3B)。その後の調査の結果、内生のアスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の発現量が高いために、遺伝子を過剰発現した効果が明確に表れなかった可能性が示唆された。

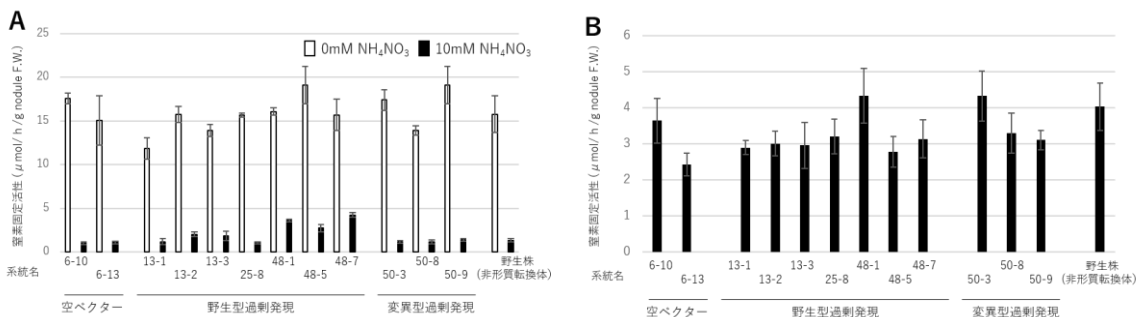


図3 アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子過剰発現体における窒素固定活性

(A) 高濃度窒素処理時の窒素固定活性、(B) 自然老化根粒における窒素固定活性

### (3) 共発現解析によるプロテアーゼ遺伝子の発現制御に関わる因子の探索

窒素固定に異常をきたすミヤコグサ変異体の RNA-seq 解析のデータを用いて、根粒老化時に発現誘導されるシステインプロテアーゼ遺伝子と共発現する遺伝子の探索を行った。プロテアーゼ遺伝子の発現制御に関わる因子を同定するため、転写因子に注目して探索を行った所、2つのホメオボックス転写因子を比定した。これらの転写因子はミヤコグサのゲノム上でタンデムに存在し、シロイヌナズナの PDF2 (PROTODERMAL FACTOR 2) と類似していた。2つホメオボックス転写因子はいずれも、RNA-seq 解析に用いたのとは別の3つの窒素固定不全変異体の根粒においても発現が誘導されることが分かった。一方、類似するミヤコグサのホメオボックス転写因のホモログ(4遺伝子)は窒素固定不全変異体の根粒では発現誘導されないことが分かった。今後、共発現解析から比定した2つホメオボックス転写因子について、システインプロテアーゼ遺伝子との機能的な関連を解析する予定である。

### (4) 酵母ツーハイブリッド法によるプロテアーゼの相互作用因子の探索

根粒特異的なアスパラギン酸プロテアーゼと相互作用を示す植物因子を探索するため、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。スクリーニングにはミヤコグサの根粒 EST 由来のライブラリーと根粒菌接種根の cDNA をもとに作成したライブラリーを用い、Bait として野生型および活性中心に変異を導入したアスパラギン酸プロテアーゼを用いた。スクリーニングの結果、zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein, Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein, TIME FOR coffee-like protein の3つが相互作用因子の候補として得られた。これらの因子はいずれも、野生型および変異型アスパラギン酸プロテアーゼの両方のスクリーニングから得られたことから、活性非依存的な相互作用であると考えられた。また得られた候補因子の遺伝子発現を調べたところ、zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein をコードする遺伝子は、野生型植物の根粒(10日目)では発現が低下するが、アスパラギン酸プロテアーゼ遺伝子の変異体の根粒では低下しないことが分かった。今後、得られた候補因子について、アスパラギン酸プロテアーゼとの機能的な関係について解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shimoda Yoshikazu, Nishigaya Yuki, Yamaya-Ito Hiroko, Inagaki Noritoshi, Umehara Yosuke, Hirakawa Hideki, Sato Shusei, Yamazaki Toshimasa, Hayashi Makoto	4. 巻 117
2. 論文標題 The rhizobial autotransporter determines the symbiotic nitrogen fixation activity of <i>Lotus japonicus</i> in a host-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1806 ~ 1815
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1913349117	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 箱山雅生, 廣田敦子, 山崎祥子, 久下修平, 辻井快, 下田宜司, 山崎明広, 林誠
2. 発表標題 ミヤコグサ根粒菌 <i>Mesorhizobium loti</i> トランスポゾン挿入変異体の挿入位置決定
3. 学会等名 植物微生物研究会 第29回研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 箱山雅生, 廣田敦子, 下田宜司, 林誠
2. 発表標題 遺伝子共発現ネットワーク解析によるミヤコグサとミヤコグサ根粒菌の遺伝子間相互作用の解明
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箱山 雅生, 下田 宜司, 林 誠
2. 発表標題 遺伝子共発現ネットワークを用いたALB1タンパク質のリガンドの探索
3. 学会等名 植物微生物研究会 第28回研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 箱山 雅生, 廣田 敦子, 下田 宜司, 林 誠
2. 発表標題 遺伝子共発現ネットワークに基づくミヤコグサとミヤコグサ根粒菌の共生成立過程における遺伝子間相互作用
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	箱山 雅生  (Hakoyama Tsuneo)  (60422804)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究セン ター・研究員   (82401)	

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
---------	---------