

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06305

研究課題名(和文)植物ステロールによる根粒共生の制御

研究課題名(英文)Regulation of nodulation by phytosterols

研究代表者

山崎 明広 (Yamazaki, Akihiro)

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

研究者番号：50752953

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)：植物と微生物との共生によって窒素固定を行うマメ科植物の根粒共生において、新たな制御因子PSATを発見した。植物ステロールの恒常性維持に機能することが知られている因子だが、脂質分析を行ったところ、共生におけるPSATの機能は、脂質におけるそれとは異なることが分かった。PSATは一部の共生関連因子とのみ強い遺伝学的な相関を示し、根粒共生における未知のシグナル経路の存在を示唆するなど、根粒共生のより深い理解に繋がる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで報告の少ない「植物-微生物共生における負の制御機構」について、本研究で新たな因子PSATを同定した。PSATの遺伝学的上位性や細胞内局在等の結果は未知の共生シグナル経路の存在を示唆しており、当該分野に新たな知見を加えることができた。根粒共生の分子生物学的な理解をより深めることで、根粒共生能のマメ科以外の植物への賦与といった、SDGsに直結する課題解決への礎として、今後の研究への応用、発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified PSAT as a novel regulatory factor in root nodule symbiosis (RNS), in which legume plants and symbiotic microorganisms fix atmospheric nitrogen. PSAT functions in the sterol homeostasis in Arabidopsis. We found that the function of PSAT in RNS can be uncoupled from that in the sterol homeostasis. PSAT represented a strong genetical correlation with a small subset of symbiotic genes. Together with its mysterious subcellular localization, our data imply the existence of novel signaling cascades in RNS. The results we obtained through this study add novel information to the field of plant-microbe symbiosis to help deeper understanding of RNS in the views of genetics and molecular biology.

研究分野：植物科学

キーワード：植物生理 共生 分子生物学 植物微生物相互作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と微生物との共生機構の解明は、分子育種や非マメ科植物への共生窒素固定能の賦与などを通じて、人類社会の目標の一つである「持続可能な食糧生産」に貢献し得る。マメ科植物は共生菌からのシグナルを受け取ると、根粒・菌根共生双方に必須な共通共生経路を活性化し、それぞれの共生に必要な遺伝子の発現を制御する。これまで、主に順遺伝学的なアプローチによって共通共生経路等を構成する因子がいくつか発見されている。一方、共生を負に制御する因子については、地上部を介して根粒数を制御するペプチドホルモンとその受容体を除いてほとんど報告がない。申請者は、根粒共生変異体背景で根粒共生を復帰する復帰変異体を得ており、根粒共生の負の制御因子として植物ステロールの恒常性維持に機能する PSAT を同定した。PSAT の機能解析を通じて新たな共生制御機構の解明に挑む。

2. 研究の目的

申請者が予備的研究で同定した根粒共生復帰変異体の原因遺伝子 PSAT は、シロイヌナズナではステロールの恒常性維持に寄与する。本研究では、PSAT の機能欠損が共生変異体に根粒を形成させた原因について、植物ステロールに着目して未知の根粒共生制御物質の同定を試みる。また、根粒共生における PSAT の遺伝学的な位置を明らかにし、復帰変異体や psat 変異体の詳細な解析を行うことで、その作用機序を解明する手がかりを得る。

機能性成分として注目される植物ステロールだが、植物-微生物共生機構に機能するという報告はない。また、形態形成や老化、耐病性など、ステロールが制御する植物の様々な事象がどのように引き起こされるのか、そのメカニズムの詳細は不明である。PSAT による根粒共生の新奇制御機構を明らかにするとともに、植物ステロールと根粒共生との関係を紐解く本研究は当該分野においてユニークであり、マメ科植物の共生機構をより深く理解するためのみならず、より広い学術分野における植物ステロールの作用機序解明に繋がる重要な知見を得ることができる。

3. 研究の方法

(1) 質量分析装置を用いて、PSAT の有無による脂質の組成を比較する。予備実験において、シロイヌナズナで同定されたほぼすべての脂質がミヤコグサから検出されたことから、ミヤコグサにおいても脂質プロファイルの測定・比較は可能である。

(2) PSAT の有無に相関して検出量に違いのあるステロールあるいはその誘導体を発見し、それが根粒共生に影響するかを調べる。標品が入手可能な場合は標品を利用し、そうでない場合は合成を試みる。

(3) 復帰変異体の表現型や PSAT の性情を解析する。PSAT の発現レベル、蛍光ラベルした根粒菌を用いた共生表現型解析、またプロモーターレポーター解析や PSAT の局在解析を行う。

(4) 共生シグナル経路における PSAT の遺伝学的上位性を調べる。共生シグナル経路のさまざまな変異体と PSAT 変異体との二重変異体を作成し、根粒共生表現型を調査する。

(5) 共生復帰変異体とその親株である共生変異体の RNA-seq を行い、遺伝子の発現解析から PSAT の作用を探る。

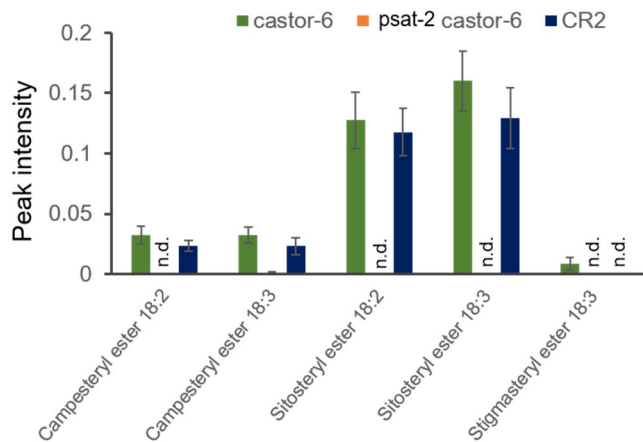
4. 研究成果

(1) 「PSAT の機能欠損はミヤコグサのステロール組成をどう変えるか」

脂質分析の結果、psat 変異体の一つである psat-2 (レトロエレメント挿入による機能欠損) はステロールエステルをほとんど生産せず、野生株とは大きく異なる脂質プロファイルを示した。共生に関与する物質を絞り込む目的で、psat 変異体の別アレルである psat-1 (アミノ酸点変異) と共生変異体 castor-6 との二重変異体である CR2 を利用して脂質の解析を行った。CR2 は castor 復帰変異体のスクリーニングで選抜された変異体であり、根粒共生が復帰する。この CR2 の脂質プロファイルは、親株である castor-6 とほとんど変わらないものであった。psat-1 では検出されなかったステロ-

ルエステルも親株と同じレベルで検出されたこと（図1）から、psat-2 は PSAT のアシルトランスフェラーゼ活性を保持しており、しかし共生における抑制的な機能は失っていることが強く示唆された。この結果を受け、当初予定していた「ステロールあるいはその誘導体による根粒共生の制御」の調査を変更し、ステロール恒常性維持ではない PSAT による共生制御について調査を行うこととした。

図1. 共生復帰変異体におけるステロール誘導体の比較

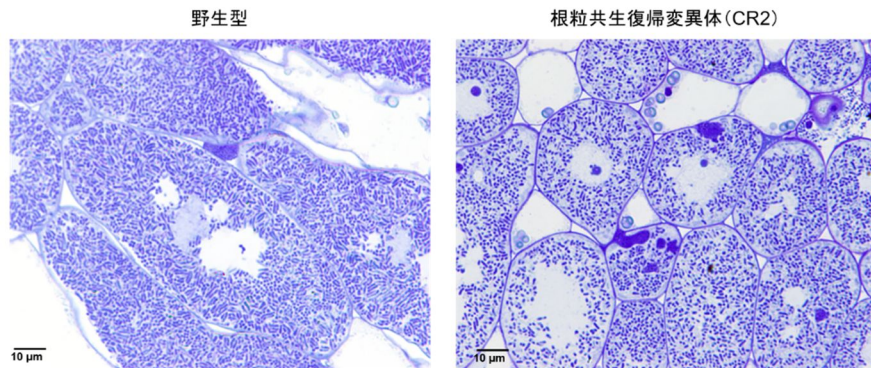


（2）「復帰変異体の根粒共生表現型の解析」

根粒形成の Kinetics を野生株と psat 変異株とで比較したところ、psat 変異株は野生株よりも成熟根粒が少ないこと、復帰変異体は根粒形成のタイミングが野生株よりも遅く、成熟根粒はさらに少ないことが分かった。psat 変異株と二重変異体の地上部生育は野生株よりも共生変異株に近く、着生した根粒がほとんど窒素固定活性を示さないことが示唆された。psat 変異株と野生株とでは差が見られなかった表皮における感染イベントは、接種後 4 週間経っても二重変異体では観察されず、psat の機能欠損は castor の感染イベントの復帰に作用するのではないことを明らかにした。

図2. 根粒内部の根粒菌

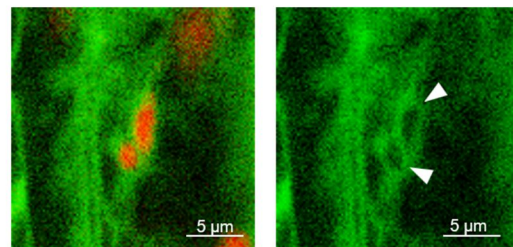
超薄切片を作成し根粒菌を染色したところ、バクテロイドの密度にやや差異が見られたものの、二重変異体においても感染細胞が観察されたことから（図2）、二重変異体でも根粒形成とその感染メカニズムは起動していた。



（3）「PSAT の性情解析」

PSAT プロモータは根の維管束で強い活性を示し、感染部位や根粒原基などで誘導されることはなかった。またミヤコグサ PSAT はシロイヌナズナで報告されているように細胞内の小顆粒に局在した。タバコの葉でシロイヌナズナの PSAT を発現させると小胞体に局在するという報告がされたことから（Shimada 2019）、ER マーカーと PSAT との局在を観察したが、ミヤコグサの根では PSAT は小胞体には局在しなかった（図3）。PSAT タンパク質も根粒菌接種で局在や量が変化することはない。（4）で示すように PSAT と CASTOR には強い遺伝学的な繋がりが見られたが、CASTOR は核膜あるいは色素体に局在することから（Imaizumi-Anraku 2005）、PSAT と CASTOR との物理的な相互作用は考えにくい。間接的な関連があると示唆される。

図3. ミヤコグサの根におけるPSATと小胞体の局在



緑: 小胞体マーカー
赤: PSAT

（4）「共生における PSAT の遺伝学的上位性」

根粒共生におけるシグナル経路は、根粒共生シグナルである Nod 因子の受容体から下流に向けて、受容体キナーゼである NFR1/NFR5、SymRK、カルシウムスパイクの起動に必要な CASTOR/POLLUX、カルシウムスパイクのデコーダであるタンパク質キナーゼ CcCaMK、CcCaMK によって活性化される転写因子 CYCLOPS から成る。これらの変異体と

psat 変異体との二重変異体を作成し、その共生表現型を調べた。その結果、psat 変異体は castor 変異体背景でのみ、根粒共生を復帰することが明らかになった。psat 変異体による根粒共生の復帰は、点変異である castor-6 のみならず、null 変異体である castor-4 でも観察された。これまでカルシウムスパイクの起動に必要とされてきた、イオンチャネル CASTOR と POLLUX だが、psat 変異株背景ではこれらイオンチャネルの機能を分離できることが分かった。今後、CASTOR と POLLUX の機能解析の進展につながる可能性が考えられる。

(5) 「共生における PSAT の機能」

(1) で実施した脂質プロファイルの解析から、根粒共生における PSAT の機能はステロールの恒常性維持とは分離されることが示唆された。そこで、共生復帰変異体である CR2、その親株である castor-6、castor-6 と psat-2 の二重変異体に根粒菌を接種し、非接種と接種 1 週、2 週でサンプリングした RNA-seq のデータを解析した。castor-6 と比較して、CR2 と二重変異体に共通して発現変動する遺伝子を抽出した。既知の共生因子に加え、アクアポリン、防御応答関連因子、受容体やキナーゼなど、29 遺伝子を得た。しかしながら、これら遺伝子の既知の情報では、PSAT と CASTOR とを繋ぐシグナルを特定するには至らなかった。

<引用文献>

Shimada et al. HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis. *Nature Plants* (2019) 5:1154-1166.

Imaizumi-Anraku et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* (2005) 433:527-531.

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 1件）

1. 著者名 Sogawa Aoi, Yamazaki Akihiro, Yamasaki Hiroki, Komi Misa, Manabe Tomomi, Tajima Shigeyuki, Hayashi Makoto, Nomura Mika	4. 巻 9
2. 論文標題 SNARE Proteins LjVAMP72a and LjVAMP72b Are Required for Root Symbiosis and Root Hair Formation in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2018.01992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Yamazaki, Kai Battenberg, Yoshikazu Shimoda, Makoto Hayashi	4. 巻 Accepted
2. 論文標題 NDR1/HIN1-like protein 13 interacts with symbiotic receptor kinases and regulates nodulation in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 Accepted
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山崎 明広
2. 発表標題 Sterol acyltransferase is involved in the regulation of root nodule symbiosis
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro, Yamazaki
2. 発表標題 CAMTA1: a novel regulator of nodulation
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 明広
2. 発表標題 ステロールの恒常性に寄与するAcyl transferaseによる根粒共生の制御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 明広
2. 発表標題 A novel regulator of root nodule symbiosis
3. 学会等名 第28回 植物微生物研究会 研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Yamazaki
2. 発表標題 A calmodulin-binding transcriptional activator controls nodule organogenesis
3. 学会等名 13th European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 明広
2. 発表標題 A novel regulation of nodulation by a calmodulin-binding transcriptional activator
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 植物共生研究チーム
http://www.riken.jp/research/labs/csrs/plant_symb/

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	下田 宣司 (Shimoda Yoshikazu) (80415455)	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 (82111)	

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