

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05959

研究課題名(和文) 宿主共生経路と既存経路のコミュニケーションによるマメ科植物の根粒発達制御

研究課題名(英文) Regulation of leguminous nodule development by communication between host symbiosis pathway and existing pathways

研究代表者

征矢野 敬 (Soyano, Takashi)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・准教授

研究者番号：60532819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物における根粒形成の空間的制御を明らかにするために、根粒原基形成の側方抑制に関わるミヤコグサPUCHI遺伝子に着目した。PUCHI遺伝子の過剰発現による表現型と遺伝子発現プロファイルなどから、PUCHIはNIN宿主共生遺伝子の発現を制御する正のフィードバック経路で作用しており、NIN遺伝子のサイトカイニン応答に必要なプロモーター上の部分領域を介して発現を誘導することが分かった。また、根粒原基形成を抑制する拡散性の因子であるエチレンとPUCHIとの関係を解析し、PUCHIが根粒菌接種時に誘導されるエチレン合成酵素の発現を正に制御することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根粒共生は既存の様々な経路を流用しながら進化したと考えられている。側根の発達にも作用するPUCHI遺伝子が根粒の発達に影響することを明らかにし、先行研究で提唱した側根発達経路の根粒形成への流用といった考え方を補完する結果が得られた。さらにPUCHIが根粒形成を直接的に制御する遺伝子の発現を誘導したことから、共生経路が単に側根発達経路に働きかけているだけでなく、双方向に相互作用していることが分かり、これまでの考え方をさらに発展させた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the spatial regulation of nodule formation in legumes, we focused on Lotus japonicus PUCHI gene as being involved in the lateral inhibition of nodule primordium formation and found that it acts in a positive feedback pathway to regulate NIN transcription factor gene that is essential for nodule formation based on phenotypes and gene expression profiles in roots overexpressing PUCHI. This regulation was mediated by the NIN promoter region required for its cytokinin response. We also analyzed the relationship between ethylene, a diffusible factor that suppresses nodule primordium formation, and PUCHI and found that PUCHI positively regulates the expression of an ethylene synthesis gene, which is induced by rhizobia.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根粒共生 根粒進化 器官形成 遺伝子発現制御 ミヤコグサ

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は大気窒素を窒素源として効率的に利用できる。これは窒素固定細菌と相利共生の関係を築いた結果である。この能力はマメ科植物と系統的に近縁な極一部の植物群のみに見られ、共生器官である根粒の進化学的獲得と密接な関係にある。宿主植物は根粒という形態で根粒菌に共生の場を提供する。それと同時に、窒素固定菌を根粒に封じ込めて過剰な共生を避けている。一般に、根粒過剰着生の宿主変異体は共生菌との間で栄養交換のバランスが崩れて生育が抑制されると考えられており、根粒原基の形成を誘導する仕組みと調節する機構は共生の確立や維持の根幹に関わる。

本研究では、マメ科植物がどのように根粒を形成する能力を獲得してきたのか、その分子機構を進化学的背景とシグナルネットワーク再構築の観点から明らかにする。これまでに、根粒共生に特異的な転写因子である *NIN* が側根原基の形成を正に制御する *ASL18a* を介して根粒の形成に関わることを報告した。本研究で着目する *PUCHI* 遺伝子は、変異体を用いた表現型解析から根粒原基形成の側方抑制に関わると考えられ、根粒の分布を制御する因子の一つと考えられる。また、シロイヌナズナなどの研究から *PUCHI* 遺伝子は側根原基の形成過程にも作用することが分かっており、ミヤコグサの *puchi* 変異体においてもシロイヌナズナと同様な側根表現型が観察された。*PUCHI* 遺伝子は進化学的観点からも根粒共生に特異的な制御経路と側根経路の結びつきを理解するために重要な遺伝子である。

2. 研究の目的

本研究は、根粒原基の形成領域や数を制限する機構の解明を目的とする。ミヤコグサ *NIN* は根粒共生に特異的な転写因子であり、根粒原基の形成に必須であるばかりか *NIN* を過剰発現させた根では根粒菌の接種なしでも自発的に原基様構造を形成する。したがって、*NIN* は根粒原基の形成を誘導する宿主因子の一つである。通常ミヤコグサ根粒は球状の瘤であるが、*NIN* 過剰発現の原基様構造は根の基部-先端軸方向に帯状に広がる。この形質は *NIN* 過剰発現に特徴的であり、*NIN* の発現を直接的に制御する上流共生遺伝子の過剰発現では球状の根粒様構造が形成される。この時の *NIN* の発現様式は根粒菌を接種した場合と同様であったことから、*NIN* の空間的発現制御が根粒を正しく形づくるために必須と考えられる。

本研究では原基形成の空間的制御に関わる因子として *AP2/ERF* 転写因子であるミヤコグサ *PUCHI1* とそのパラログである *PUCHI2* に着目する。この転写因子は *NIN* 下流因子として同定され、*puchi1 puchi2* 二重変異体で *NIN* 上流因子を発現させると、*NIN* 過剰発現と似た帯状の原基が形成された。また、*puchi1 puchi2* 二重変異体に根粒菌を接種すると成長した根粒の周辺に新たな原基が形成される結果として根粒クラスターが観察され、また、通常はフィードバック阻害が起こる根の若い領域においても根粒原基が過剰に形成された。*PUCHI1* と *PUCHI2* は *NIN* の下流で不都合な原基形成を抑制していると仮定される。その一方で、*puchi1 puchi2* 及び一過剰的 *PUCHI1* 過剰発現の RNA-seq 解析から、*PUCHI1* と *PUCHI2* が *NIN* を介して共生経路に働きかけている可能性が示された。本研究では *NIN* の空間的発現制御における *PUCHI1/2* の役割、*PUCHI1/2* が原基形成にどのように影響するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ *puchi1 puchi2* 二重変異体は *LORE1* レトロトランスポゾンの挿入系統より、そ

それぞれの変異体を取得し、ホモ個体を単離して表現型を確認した後に、交配することで作成した。また、野生型ミヤコグサとしてはLORE1挿入系統がGifu B-129に由来するためこの系統を主に用い、*nin*変異体はGifu B-129を背景とするものを用いた。*har1*、*tml*、*daphne*変異体は野生型系統MG-20から単離されたため、対照実験にはMG-20を野生型系統として用いた。

(2) ミヤコグサ遺伝子の機能解析やプロモーターGUSによる発現解析に用いた組換え遺伝子は、毛状根形質転換法によって、本来の根を切り落とした胚軸から生じた毛状根に導入し、形質転換マーカーであるGFPの発現が認められた根を用いて形質や発現の解析を行なった。ASC遺伝子のゲノム編集はCRISPR/Cas9を用いた一般的な手法によって行い、胚軸を用いて形質転換した後に組織培養によって個体を再生し、T0世代で*acs*ヘテロ個体を選別した後に、T2世代に相当するホモ変異体を実験に用いた。

(3) qRT-PCRによる遺伝子発現解析にはミヤコグサの根を用い、total RNAより合成したcDNAを鋳型に各遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて、mRNAレベルを定量した。発現量の比較にはpolyubiquitinのmRNA量を内部標準とした。

4. 研究成果

(1) 非マメ科植物*PUCHI*遺伝子の根粒共生に関連した機能保存性

*puchi1 puchi2*二重変異体の表現型から推測される*PUCHI*の機能が、マメ科植物に特徴的であることを調べるために、マメ科と同じ窒素固定クレードであるが根粒共生しない2倍体イチゴ (*Fragaria vesica*)から*PUCHI* オーソログのプロモーターを含む遺伝子領域をクローニングし、ミヤコグサ*puchi1 puchi2*二重変異体に導入したところ、部分的に表現型が抑圧されたことから、根粒原基の形成過程における*PUCHI*の機能は非マメ科植物においても保存されていると考えられた。

(2) ミヤコグサ*PUCHI*遺伝子と根粒共生に特異的な*NIN*遺伝子との関係

根粒原基が形成される前の根粒菌接種による初期応答では*PUCHI1*は*NIN*依存的に発現が上昇し、qRT-PCRのレベルでは*puchi1 puchi2*の二重変異は*NIN*の発現誘導に影響しなかったため、*PUCHI1*は*NIN*の下流と考えられた。その一方で、*PUCHI1*過剰発現では*NIN*とその下流遺伝子の発現量が増加したことから、*PUCHI*遺伝子は*NIN*発現を制御する正のフィードバック経路で作用すると考えられる。そこで、*PUCHI1*過剰発現の根粒共生に関連する表現型を調査したところ、*NIN*の場合と同様に根粒原基様の構造が誘導された。その一方で、根粒菌接種による根粒形成は抑制され、この表現型も*NIN*過剰発現と一致していた。

さらに、*NIN*による根粒形成の抑制効果は全身応答的であり、*NIN*の下流で発現するペプチドがシグナルとして作用する。*PUCHI1*の過剰発現においても同じペプチド遺伝子の発現が上昇していたことから、*PUCHI1*過剰発現による根粒抑制効果が全身応答的である可能性を調べた。毛状根形質転換法によって*PUCHI1*を過剰発現する根を形成させ、根粒着生数をGFPマーカーが発現する形質転換根とマーカーの発現が見られない根のそれぞれでコントロールベクターを導入した場合と比較したところ、*PUCHI1*を過剰発現させた場合には形質転換根及び非形質転換根の両方で根粒着生数の減少が確認され、且つこの全身的抑制はペプチドを介した全身応答経路の主要遺伝子である*HAR1*や*TML*の変異体では抑圧されたことから、*PUCHI1*過剰発現は*NIN*と同様にペプチドを介した経路を経て根粒抑制することがわかった。

以上の結果から、*PUCHI1*と*NIN*過剰発現による共生表現型は酷似しており、*PUCHI1*による*NIN*の正のフィードバック制御が過剰発現の表現型からも示唆された。

puchi1 puchi2 二重変異体は*nin*変異体と異なり、感染系や根粒の形成は誘導される。このことは、*NIN*発現を制御するフィードバックの考え方と矛盾しない。*PUCHI1*が*NIN*の発現を誘導する作用機序を明らかにする目的で、*NIN*のフレームシフト変異体と*NIN*プロモーターに変異を持つ*daphne*変異体で*PUCHI1*とグルココルチコイド受容体 (GR)の融合タンパク質を発現させ、デキサメタゾン (Dex)処理で*PUCHI1*-GRを活性化させた時の*NIN*とその下流遺伝子の発現を調べた。野生型ミヤコグサの根では、*PUCHI1*-GRを発現させてDEXで処理すると*NIN*及び*NIN*下流遺伝子の発現が速やかに誘導された。フレームシフトを持つ*NIN*のnull変異体では、*NIN*変異型遺伝子の発現は上昇したが、下流遺伝子の発現は見られなかった。*PUCHI1*過剰発現による*NIN*下流遺伝子の誘導が*NIN*を介していることが裏打ちされる結果を得た。一方、*daphne*変異体では*NIN*及び*NIN*下流遺伝子の発現は誘導されなかった。*daphne*変異体では*NIN*遺伝子のサイトカニン応答に必要とされる部位を含むプロモーター領域を欠損しており、感染系は形成されるがサイトカニン経路の活性化が必要とされる根粒原基の形成は起こらない。*PUCHI1*はこの欠損したプロモーター領域を介して*NIN*の発現を調節すると考えられた。このプロモーター領域は*NIN*自身による正のフィードバックに必要なことも分かっており、*PUCHI1*による正のフィードバックの考え方と一致する。しかし、その一方で*puchi1 puchi2*二重変異体においても*daphne*変異体で見られる根粒着生不全は起こらないことから、根粒原基形成時における*PUCHI1*を介したフィードバック制御は根粒原基の成長には限定的であると推察される。

プロモーターGUSを用いて*puchi1 puchi2* 二重変異体における*NIN*遺伝子の発現を調査した。野生型背景の根粒原基では表皮からの感染系の侵入が認められる原基中心部及びその周辺においても強いGUSの発現が検出された。一方、*puchi1 puchi2* 二重変異体ではGUSの発現は原基の中央部のみにおいて強く検出された。*puchi1 puchi2*二重変異体ではクラスター状に根粒が形成されるため、原基を含めた根粒総数は野生型と比較して増加する。しかし、根粒の発達が遅れる傾向にあり、野生型よりも小さな根粒が多く形成される。今後、この*NIN*の発現パターンの違いが*puchi1 puchi2*二重変異体で観察された根粒の発達抑制やクラスター状根粒の形成に関係するのかを詳しく調べる必要が残されている。

(3) *PUCHI*の下流因子候補としてのエチレン関与の検証

*PUCHI1*の局所的な根粒形成抑制を仲介する因子を探索するために、RNA-seq解析によって抽出した10個の候補遺伝子を野生型ミヤコグサで過剰発現させたところ、エチレン生合成酵素であるACC synthase (ACS)とACC oxidase (ACO)をコードする2つの遺伝子において根粒形成の抑制効果が観察された。RT-PCRでこれらの遺伝子の発現様式を確認したところ、ACS遺伝子の発現は*PUCHI1 PUCHI2*依存的に根粒菌接種によって誘導され、*PUCHI1*過剰発現でも発現量が上昇することが確認された。また、系統的に標的ACS遺伝子と極めて近い別の遺伝子ではこのような応答は見られなかったことから、根粒菌接種による発現誘導は、標的ACS遺伝子に特異的であることがわかった。これらのことから、ACS遺伝子が*PUCHI*の下流で局所的に根粒の形成を抑制する有力な候補と考えられた。一方、ACO遺伝子は*puchi1 puchi2*二重変異体においても根粒菌接種によって発現が誘導されたことから、*PUCHI*の標的遺伝子の候補から除外した。

遺伝学的解析などからエチレンは先に述べた全身応答的な経路とは独立に根粒の着生数を抑制することが知られており、エチレン情報伝達に関わる遺伝子の変異体では根粒が過剰に増加する。また、*PUCHI1*過剰発現による根粒抑制は形質転換根においては*har1*や*tml*変異体において

もその効果を抑圧できなかったことから、*PUCHI*遺伝子の下流では根粒形成の全身応答的な抑制とは別の経路も作用すると考えられた。そこで、*ACS*遺伝子を*puchi1 puchi2*変異体の根粒クラスターの原因となる有力な候補と考えてこの遺伝子の機能解析を進めた。

*ACS*遺伝子のプロモーター-GUSを作成して、根粒菌接種後の発現部位を調べたところ、GUSの発現は*PUCHI1 PUCHI2*遺伝子のような根粒原基基部での強い発現は見られなかったものの根粒原基の基部からその周縁で広範囲に検出された。根粒の形成過程における*ACS*遺伝子の機能を解析するために2つの実験を行った。まず、*PUCHI1*プロモーターを用いて*ACS*遺伝子を*puchi1 puchi2*二重変異体で発現させた。このコンストラクトが、*puchi1 puchi2*の表現型を抑圧することを期待したが、そのような効果は見られなかった。また、以上の実験と並行して、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によってミヤコグサ*acs*変異体を作成した。この変異体の共生表現型を解析したが、野生型と比べて大きな差は見られず、さらに*ACS*の反応生成物であるACCを*puchi1 puchi2*二重変異体に投与したが、表現型を抑圧する効果は観察できなかった。

以上の結果から、遺伝子ネットワークの観点から*ACS*は*PUCHI*の下流で発現が制御される遺伝子であり、根粒共生の初期応答に影響すると考えられるが、根粒形成過程における*PUCHI*機能との関連性は見られないと結論付けた。

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 Goto T, Soyano T, Liu M, Mori T, Kawaguchi M.	4. 巻 119
2. 論文標題 Auxin methylation by IAMT1, duplicated in the legume lineage, promotes root nodule development in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2116549119 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2116549119	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 Soyano Takashi, Liu Meng, Kawaguchi Masayoshi, Hayashi Makoto	4. 巻 59
2. 論文標題 Leguminous nodule symbiosis involves recruitment of factors contributing to lateral root development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 102000 - 102000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbi.2020.102000	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 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Soyano
2. 発表標題 Root nodule formation controlled by host molecular networks in response to nitrogen-fixing bacteria in <i>Lotus japonicus</i>
3. 学会等名 新学術領域 植物の周期と変調「From Cellular Dynamics to Morphology II」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 征矢野敬, 川口正代司, 林誠
2. 発表標題 ミヤコグサPUCHIの根粒形成過程における役割
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Soyano
2. 発表標題 Transcriptional regulatory pathways of nodulation processes in Lotus japonicus
3. 学会等名 Virtual Seminars in Symbiosis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 征矢野敬、林誠、川口正代司
2. 発表標題 ミヤコグサ PUCHIの根粒形成過程における役割
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	川口 正代司 (Kawaguchi Masayoshi)		

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