

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03283

研究課題名(和文) 遠距離シグナルによる根粒形成の全身制御機構の全容解明

研究課題名(英文) Elucidation of systemic control mechanism of nodule development via long-distant mobile signals

研究代表者

川口 正代司 (Kawaguchi, Masayoshi)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・教授

研究者番号：30260508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌との相利共生を維持するために、根とシュートを介したシグナル伝達系を利用している。ミヤコグサの葉では、根由来の糖修飾CLEペプチドがHAR1受容体に結合し、根粒の過剰形成を抑制するシグナルが産生されると考えられていたが、その分子機構は完全に解明されていなかった。我々は「葉」から「根」に伝達される遠距離シグナル因子を探るために、「葉」で発現する全RNAを高精度アセンブル手法を駆使して、世界の研究者が見落としていたマイクロRNAの前駆体遺伝子MIR2111-5を発見し、ゲノム編集技術を用いての欠失と接ぎ木実験により、葉で産生されるmiR2111の機能とシステム的な作用を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素固定の手法としてハーバー・ボッシュ法が知られているが、マメ科植物に共生する根粒菌は常温常圧で効率よく窒素分子をアンモニアに変換することができる。その際、光合成による炭素同化産物を多く必要とするので、炭素同化と窒素固定とのバランスが植物の成長には極めて重要になる。根からの情報を「葉」でHAR1受容体が感知し、マイクロRNAの発現を制御することで、根粒形成を制御できることを見出した。

また、以上の受容体とマイクロRNAを介した根粒形成の全身制御モデルを動物の腫瘍に適用することができれば、腫瘍の初期形成を全身的に感知して、その発生と数を抑制することが可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：Legumes utilize a shoot-mediated signaling system to maintain a mutualistic relationship with rhizobia. In *Lotus japonicus*, shoot-to-root transfer of microRNA miR2111 that targets TML acting in roots has been proposed as a signaling factor for the systemic regulation of nodulation. However, the role of shoot-accumulating miR2111s has not been clearly shown. We showed that *L. japonicus* has seven miR2111 loci, including those mapped through RNA-seq. MIR2111-5 expression in leaves is the highest among miR2111 loci and clearly repressed after rhizobial infection depending on HAR1 receptor. MIR2111-5 knockout mutants show significantly decreased nodule numbers and miR2111 levels. Furthermore, grafting experiments using transformants demonstrate scions with altered miR2111 levels influence nodule numbers in rootstocks in a dose-dependent manner. Therefore, miR2111 accumulation in leaves through MIR2111-5 expression is required for HAR1-dependent systemic regulation of nodulation.

研究分野：植物生理学

キーワード：根粒形成 ミヤコグサ 全身制御 マイクロRNA 窒素固定 HAR1受容体 シュート

1. 研究開始当初の背景

窒素はすべての生物に必須の元素であるが、大気中の窒素分子を直接利用できる真核生物は存在しない。一方、マメ科植物は根粒菌を細胞内に取り込むことで、常温常圧下で窒素分子をアンモニアに変換し利用することができる。この根粒共生は、宿主植物の成長を促進するだけでなく、地球規模の窒素循環にも大きな影響を与えている。

根粒菌が分泌する Nod ファクターは、サイトカイニンシグナル伝達を介して根の皮層組織に根粒原基を誘導する。一方、Nod ファクターは、遠隔シグナル因子を介して、全身的な根粒形成の制御系である Autoregulation of Nodulation (AON) を駆動する (図 1)。

根粒共生および AON の分子機構を解明するため、マメ科モデル植物であるミヤコグサを用いた共生変異体の大規模スクリーニングを行い、根粒形成および制御に必要な HAR1 など 29 の遺伝子座を同定してきた。AON では、糖修飾された 2 つの CLE ペプチド (CLE-RS1 と CLE-RS2) を根由来シグナルの有望候補として同定した。次に、根粒形成のマスターレギュレーターである NIN が、CLE-RS1 および CLE-RS2 遺伝子を直接転写活性化し、全身制御を駆動することを見出した。さらに、糖修飾 CLE-RS ペプチドが実際に HAR1 受容体の細胞外ドメインに結合することを実証した。

次に CLE-RS ペプチドを受容する HAR1 が「シュート由来のシグナル」を合成していると推測される。我々は、サイトカイニン合成遺伝子 IPT3 の発現が HAR1 依存的に葉で誘導されること、地上部から供給されるサイトカイニンが根粒形成をシステム的に抑制することを見出していたが、ごく最近、葉で発現する miR2111 が根で機能する F-box タンパク質 TML を介して根粒菌の感染をシステム的に促進することが報告された (Tsikou et al. Science 2018)。

しかしながら、(1) HAR1 と miR2111 をコードする前駆体遺伝子関係は十分理解されておらず、(2) TML がどのように根粒形成を制御しているのかの分子メカニズムも不明である。一方、(3) そもそもなぜマメ科植物が根粒菌の感染情報をシュートに伝達するかについての根本問題は全くわかっていない。

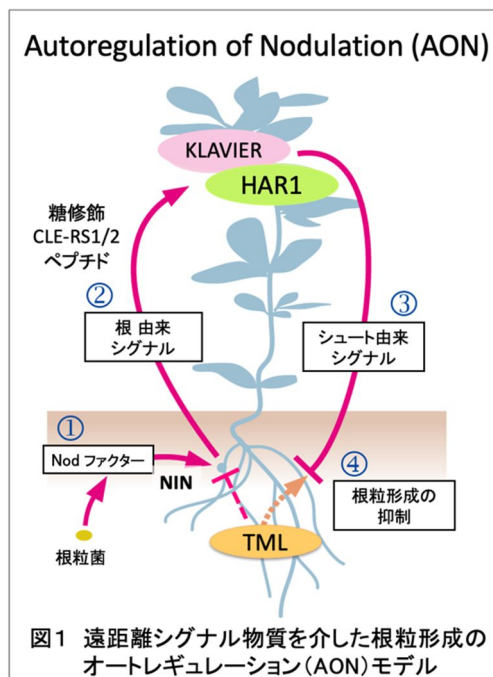


図1 遠距離シグナル物質を介した根粒形成のオートレギュレーション(AON)モデル

2. 研究の目的

本研究では、シュート由来のシグナルとその下流因子に着目し、AONの全容を解明する。また、AONとは異なる HAR1 受容体の新たな機能を探ることで、シュートが制御する未知のメカニズムに光を当てていくことを目指す。

具体的には、以下の3項目を実施する。

- (1) シュートから根への遠距離シグナリングの解明
- (2) シュート由来のシグナルを受けて根で機能する TML の分子機構の解明
- (3) HAR1 受容体を介したシュート制御の新規役割の探索

3. 研究の方法

(1) シュートから根への遠距離シグナルの解明

miR2111 をコードする新規前駆体遺伝子 *MIR2111* の特定と発現解析

ミヤコグサの葉における、転写産物の網羅的解析データを用いて、ミヤコグサゲノムに含まれる全ての *MIR2111* 遺伝子と染色体上の位置を特定する。根粒菌を根に感染させた「葉」の RNA-seq 解析により、HAR1 受容体依存的に発現制御される *MIR2111* を絞り込む。野生型、*har1* などの AON 変異体、CLE-RS1/2 過剰発現体を用いた qRT-PCR により、根粒菌感染に反応した *MIR2111* の発現を確認し、葉や根における *MIR2111* の発現様式、AON 関連遺伝子の発現への影響を検討する。また、プロモーター-GUS を用いて *MIR2111*

のシュートにおける発現部位を組織化学的に同定し、根粒菌感染による野生型および *har1* 変異体の GUS 活性の変動を比較する。

新規 *MIR2111* を全体に過剰発現させた形質転換体の接ぎ木試験

新規 *MIR2111* 遺伝子の過剰発現システムを作成し、そのシュートを野生型の根に接ぎ木することで、シュートに蓄積した *miR2111* が根における *TML* 転写産物の蓄積に与える影響と、根粒形成に与える影響を解析する。また、*har1* および *tml* 変異体と *MIR2111* 過剰発現体を接ぎ木することで、*miR2111* が AON 関連遺伝子と同じ経路で機能することを遺伝学的に検証する。

CRISPR/Cas9 を用いた新規 *MIR2111* 遺伝子のノックアウトシステムの作出

AON における新規 *MIR2111* 遺伝子の機能を明らかにするため、ゲノム編集によりこれらのノックアウト株を作製する。ノックアウト株は、2 つの異なる gRNA を用いた CRISPR/CAS9 コンストラクトを用いて作製し、ホモ接合体を選択する。ノックアウトシステムの根粒形成や感染系形成における表現型を解析する。

(2) シュート由来シグナルを受け根で機能する *TML* の分子機構の解明

TML の相互作用因子の探索

TML は Kelch モチーフを持つ F-box タンパク質である。*TML* の基質を特定するため、F-box ドメイン欠き Kelch モチーフを持つ *TML* の N 末に GFP と核局在シグナル NLS を持つコンストラクト GFP-NLS-*TML*dN を作成する。*Agrobacterium rhizogenes* を介してミヤコグサ *tml* 変異体に導入し毛状根を誘導する。毛状根からタンパク質を抽出し共免疫沈降法 Co-IP と質量分析により *TML* と相互作用する因子を同定する。

TML 相互作用因子候補の機能解析

上記 *TML* と Co-IP により特定された相互作用因子候補の中から、シクロフィリン様遺伝子等を中心に、ゲノム編集による機能解析を行う。表現型解析は根粒形成のみならず、感染プロセスについても行う。

tml 変異体の植物ホルモン感受性の解析

トマトの *diageotropica* やイネの *lateral rootless 2* など植物のシクロフィリン変異体はオーキシン感受性の異常や側根数の低下が報告されている。ミヤコグサ *tml* 変異体のオーキシン等の植物ホルモンに対する応答を解析する。

(3) HAR1 を介したシュートにおける AON の新規役割の探求

RNA-seq 解析により、根粒菌の感染と硝酸処理に応答し、かつ葉で HAR1 と CLE-RS ペプチド依存的に変動する遺伝子を同定する。根粒形成の制御とは異なる遺伝子に着目し、それに関連する表現型解析を行う。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサの「葉」における転写産物の網羅的解析データを用いて、ゲノム上に新たに 4 つの *miR2111* の前駆体遺伝子が存在することを見出し、計 7 つの前駆体遺伝子を特定した。すべての前駆体遺伝子は、マイクロ RNA の前駆体に特有のヘアピン構造をとることを確認した。そのうち 4 つの遺伝子は葉で機能する HAR1 受容体に依存して、発現のオン、オフが明確に制御されていた。先行研究では、*miR2111* は根で発現する根粒形成抑制因子 *TML* の mRNA を分解することで、根粒の数を増やす機能を持つことが示唆されている (Tsikou et al. Science 2018)。私たちが新たに見出した葉で最も顕著に発現していた *MIR2111-5* 遺伝子について解析を行った。*MIR2111-5* を過剰発現させると、個体内の *miR2111* 量が増加し *TML* mRNA が減少するとともに、根粒の数が顕著に増加することが示された。一方、*MIR2111-5* を CRISPR/CAS9 を用いて欠失させた変異体では、根における *miR2111* の蓄積量と根粒の数が顕著に減少することがわかった。プロモーター GUS 解析の結果、*MIR2111-5* の発現はほとんど葉の維管束でしか見られないことから、葉で合成される *miR2111* が根に蓄積する *miR2111* の由来であり、根粒形成の全身的な制御に関わっていることが示唆された。

シュートからはスクロースなど多くの物質が根に輸送されるので、それらの転流物質によって *miR2111* が根で合成される可能性も考えられる。そこで、葉で作られた *miR2111* が根における *miR2111* の蓄積と根粒数の増加をもたらしていることの実験的な証拠を得るために、*miR2111* の蓄積量を変化させた形質転換体を用いて接ぎ木試験を行った。*MIR2111-5* 過剰に蓄積する形質転換体を穂木にした場合、野生型の台木では *miR2111* の蓄積量が増加し根粒の数も増加した。一方、*miR2111* の蓄積が抑制された形質転換体の穂木は、野生型の台木における根粒の数を減少させた。これらの結果から、葉で作られた *miR2111* がシステム的に根粒の数を制御する機能を持つことが明らかとなった。以

上の成果を論文として報告した (Okuma et al. Nature Communications 2020)。

miR2111 の葉から根への遠距離移動を直接捉えるため、miRNA のメチル化修飾に関与する *HEN1* 遺伝子の in frame 変異株、2 系統を単離した。変異株の種子を採取し、表現型解析を行なった。調べた変異株は、複葉や花器官の形態において興味深い表現型を示したが、十分な数の種子が得られず、個体ごとのバラツキが大きかったため、miR2111 の修飾異常や根粒形成における影響を調べるには至らなかった。

(2) シュート由来シグナルを受け根で機能する TML の分子機構の解明

GFP-NLS-TMLdN を導入した毛状根から多くの相互作用因子候補を特定することができた。そのリストの中に、既知の Nod factor シグナリングに関わる根粒形成因子は存在しなかった。着目するシクロフィリン様遺伝子はミヤコグサ MG-20 のゲノムに 3 コピー存在することが判明した(第 1 染色体に 1 コピー、第 3 染色体にタンデムに並ぶ 2 コピー)。CRISPR によるゲノム編集を行い、各変異系統の単離を行った。その結果、第 1 染色体上のシクロフィリン遺伝子のノックアウトラインにおいて感染係数の減少が確認された。また、タンデムに並ぶ 2 遺伝子の欠失変異系統では、側根数の減少が確認された。しかし、いずれのラインも根粒形成には影響しなかった。さらに、*tml* 変異体のオーキシン感受性を調べたところ、*tml* のオーキシン感受性は野生型と変わらなかった。次に、TML 相互作用因子をある植物ホルモン存在下で Co-IP 解析したところ、ホルモン依存的に相互作用する因子が見出された。そこで、*tml* 変異体の主根伸長における植物ホルモン応答を調べたところ、*tml* 変異体は低濃度のその植物ホルモンに対して感受性が高いことが示された。

(3) HAR1 を介したシュートにおける AON の新規役割の探求

シュートの中でも HAR1 がより強く発現する葉を特定するために *proHAR1:GUS* をミヤコグサに導入した形質転換体を作成した。HAR1 は発達途上の若い葉ではあまり発現しておらず、葉面積が最大になる頃の葉において強い発現を示した。そのようなステージの葉を集め、RNA-seq 解析を行った。葉での発現は、根粒菌 *Mesorhizobium loti* 接種区、*CLE-RS1* 及び *CLE-RS2* 過剰発現ライン、及び 5 mM KNO₃ 処理区で行った。その結果、光化学系 II の構成因子や気孔分化を誘導する因子、さらにはオルガネラ分裂に関わる因子等が HAR1 依存的に発現変動することを見出した。そこで、野生型と *har1* 変異体における光合成特性を PAM により調べたところ、*har1* 変異体では Fv/Fm 比が顕著に低下していた。このことは、HAR1 が光障害の抑制に関与している可能性を示唆している。一方、*har1* 変異体における気孔数、気孔 index、葉緑体数を調べたところ、野生型と有意な差はなかった。

上記以外にも HAR1 依存的に変動する遺伝子が検出され、AON とは異なる「葉」制御の新たな生物学的機能が見えてきた。この点は今後の重要な課題である。

その他の発見

HAR1 受容体を介した根粒形成の全身制御は根粒形成のマスターレギュレーターである転写因子 NODULE INCEPTION (NIN) が *CLE-RS1*, *CLE-RS2* 遺伝子を直接転写活性化することによって誘導される (Soyano et al. PNAS 2014)。NIN の発現を誘導する根粒菌由来の因子としては Nod factor、植物ホルモンとしてはサイトカイニンが有名であるが、新たな因子としてジベレリン (Akamatsu et al. Plant Journal 2021) とメチル化オーキシン (Goto et al. PNAS 2022) がそれぞれ NIN の発現を誘導することを発見した。特にメチル化オーキシン (MeIAA) は IAA の不活性型と古くから考えられていたため、これは予想外の展開であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okuma Nao, Kawaguchi Masayoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Systemic Optimization of Legume Nodulation: A Shoot-Derived Regulator, miR2111	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 682486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.682486	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 Nishida Hanna, Nosaki Shohei, Suzuki Takamasa, Ito Momoyo, Miyakawa Takuya, Nomoto Mika, Tada Yasuomi, Miura Kenji, Tanokura Masaru, Kawaguchi Masayoshi, Suzaki Takuya	4. 巻 33
2. 論文標題 Different DNA-binding specificities of NLP and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2340 ~ 2359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab103	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 -
1. 著者名 Akamatsu Akira, Nagae Miwa, Nishimura Yuka, Romero Montero Daniela, Ninomiya Satsuki, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Sakakibara Hitoshi, Kawaguchi Masayoshi, Takeda Naoya	4. 巻 105
2. 論文標題 Endogenous gibberellins affect root nodule symbiosis via transcriptional regulation of NODULE INCEPTION in Lotus japonicus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15128	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 Okuma N, Soyano T, Suzaki T, Kawaguchi M.	4. 巻 11
2. 論文標題 MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19037-9	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 Goto Takashi, Soyano Takashi, Liu Meng, Mori Tomoko, Kawaguchi Masayoshi	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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 -

[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 川出健介、杉浦大輔、及川彰、川口正代司
2. 発表標題 根粒の着生を抑えるシグナル伝達のミヤコグサにおける生理的な意義
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤崇支、征矢野敬、Liu Meng、森友子、川口正代司
2. 発表標題 根粒共生におけるオーキシンのメチル化
3. 学会等名 植物微生物研究会 第 31 回研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川出健介、杉浦大輔、及川彰、川口正代司
2. 発表標題 ミヤコグサにおける根粒の着生制限と水分管理
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤崇文、川口正代司
2. 発表標題 根粒共生に関わるシス-トランス異性化酵素
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>葉で合成されるマイクロRNAが根の根粒の数を全身的に制御することを証明 https://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2020/10/16.html</p> <p>オーキシンのメチル化が根粒共生の成立を導くことを発見；共生研究が切り拓くオーキシン代謝の新展開 https://www.nibb.ac.jp/press/2022/03/08.html</p>

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	大熊 直生 (Okuma Nao)		

6. 研究組織（つづき）

	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	征矢野 敬 (Soyano Takashi)		
研究協力者	寿崎 拓哉 (Suzaki Takuya)		
研究協力者	りう めん (Liu Meng)		
研究協力者	後藤 崇支 (Goto Takashi)		
研究協力者	赤松 朗 (Akamatsu Akira)		
研究協力者	武田 直也 (Takeda Naoya)		
研究協力者	川出 健介 (Kawade Kensuke)		
研究協力者	森 智子 (Mori Tomoko)		

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