

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14824

研究課題名（和文）マメ科植物の農業形質改良に資する根粒形成遺伝子スイッチング機構の構造基盤解明

研究課題名（英文）Structural insight into the regulation of genes controlling the legume nodule for improving agricultural traits in crops

研究代表者

野崎 翔平（Nosaki, Shohei）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20850910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：マメ科植物は窒素栄養が豊富な土壌にて根粒共生を自ら抑える機構をもつが故に、農業上において望ましい“根粒共生と窒素肥料による窒素栄養の獲得の両立”が困難となっている。本研究では、栄養豊富な土壌環境下でも根粒共生できるマメ科植物の開発も見据え、鍵転写因子群が司る根粒形成制御機構を物理化学的な側面から解明することに取り組んだ。2年間の研究期間において、根粒形成制御ならびに窒素栄養応答の根幹をなす転写制御システムの理解が深まったのみならず、根粒共生を制御する転写因子NINが窒素栄養応答の制御因子NLPからどのような分子変遷を辿り根粒共生獲得を駆動したのかという点についても新知見を得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マメ科植物を代表とする根粒共生植物の根粒形成ならびに窒素栄養応答を制御する転写制御システムの理解を飛躍的に高めたといえる。また、根粒共生植物を制御する転写因子が窒素栄養応答の制御因子からどのような分子変遷を辿り根粒共生獲得を駆動したのかという点について新たな知見をもたらすことができた。将来的にダイズなどの農業上重要なマメ科植物の中で眠る潜在能力を最大限に引き出すための基盤知見になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Because legumes have a mechanism to suppress root nodule symbiosis by themselves in soils rich in nitrogen nutrients, it has been difficult to achieve the desired agricultural traits of both root nodule symbiosis and the acquisition of nitrogen nutrients through fertilizers. In this study, we aimed to develop leguminous plants that can coexist with root nodules even in nutrient-rich soil environments, and attempted to elucidate the mechanism by which nodule formation is controlled by the key transcription factors from a physical and chemical perspective. During the two-year research period, we deepened our understanding of the transcriptional control system that underlies the basis of nodule formation control and nitrogen nutrient response. In addition, new findings were also obtained regarding the molecular transition between the transcription factor NIN, which controls nodule symbiosis, and the nitrogen nutrient response regulator NLP during the acquisition of nodule symbiosis.

研究分野：応用生物化学

キーワード：転写因子 構造生物学 マメ科植物 根粒形成 窒素栄養応答

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物を代表とする根粒共生植物は、根粒菌との共生器官である根粒を形成し、土壤中の窒素栄養源が乏しい環境でも、大気中の窒素を栄養源として利用できる。その一方で、土壤中に窒素栄養が豊富に存在する場合、マメ科植物は根粒共生に伴う余剰なエネルギー消費を抑えるため、自ら根粒共生を抑制する機構を備える。しかし、この巧みな節約機構が障壁となり、農業上で望ましい“根粒共生と窒素肥料による窒素栄養の獲得の両立”が困難となっている。そのため、二つの窒素栄養獲得を両立させた有用マメ科植物の開発が長らく待たれているが、いまだ画期的な成功例はない。本研究では、以上の課題解決につながる鍵を握る“根粒形成制御の鍵転写因子 NIN と典型的 NLP”に焦点を当てた。NIN と典型的 NLP は同一ファミリーに属する転写因子である。まず、NIN は根粒共生シグナルに応答する転写促進因子であり、根粒形成に絶対不可欠な因子である。一方、典型的 NLP は土壤中の窒素栄養に応答して、適切な代謝や生長の管理に加え、根粒形成の抑制にはたらく。

この典型的 NLP による根粒形成抑制の分子機構は長らく謎に包まれていたが、申請者らは最近、NIN と典型的 NLP はそれぞれホモ二量体として転写を促進する一方で、NIN と典型的 NLP は DNA 上でヘテロ二量体を形成して根粒形成遺伝子を抑制することを見出している (Nishida, Nosaki et al., 2021, Plant Cell)。この分子機構こそが、窒素栄養環境に応じて根粒形成スイッチングを司る中枢基盤であると同時に、先述した“根粒共生と窒素肥料による窒素栄養の獲得の両立”を妨げるメカニズムであると云える。申請者は、この NIN/NLP が司る根粒形成遺伝子の制御機構の改変が、“マメ科植物の農業形質改良”の扉を開く鍵になると考える。なぜなら、NIN または典型的 NLP の特定の amino 酸残基を改変し、NIN-NLP ヘテロ二量体による転写抑制のみを選択的に欠失させることができれば、マメ科植物の根粒形成や適切な代謝・生長管理に悪影響を及ぼすことなく、豊富な窒素栄養下でも根粒形成できる可能性を強く示唆しているからである。しかしながら、NIN/NLP 分子を適切かつ合理的に改変する上で必要不可欠な情報、すなわち、根粒形成遺伝子のオン・オフ制御における各 amino 酸残基の物理化学的な役割は全くわかっていない。

また、これまでの根粒共生を含めた植物-微生物共生の研究分野では、タンパク質の構造解析は Nod ファクター (根粒菌が産生するシグナル伝達物質) の受容体など極僅かな事例が報告されているのみである。根粒形成を司るマスター転写因子の構造解明に挑む本研究の成功は、当該研究分野に新機軸を打ち出すと考える。例えば、構造情報に基づき NIN/NLP の部位特異的な変異体をデザインできるようになれば、既存の機能欠失変異体とは異なる遺伝子発現パターンや形質を示すマメ科植物を創出可能である。そのような新規の植物変異体は、根粒形成機構の理解を飛躍的に促すためのツールとして利用でき、当該研究分野のさらなる活性化にも繋がる。このような背景のもと、本提案では“マメ科植物の根粒形成を司る転写因子 NIN と典型的 NLP はどのような物理化学的な原理に基づいて根粒形成遺伝子の発現スイッチングを制御することができるのか？”を学術的「問い」に掲げて研究を行った。



図1. NIN/NLP転写因子による根粒形成の制御機構

2. 研究の目的

本研究では、根粒共生と窒素肥料による窒素栄養獲得を両立させたマメ科植物の開発を見据え、マメ科植物の根粒形成を司る遺伝子発現スイッチング機構の構造基盤を解明することを目的とする。特に、転写因子 NIN/NLP 上のどの amino 酸がどのような物理化学的原理に従い、根粒形成遺伝子のオン・オフを決定づけるのかを原子分解能レベルで理解することを具体的な達成目標に掲げる。また、変異体解析を通じて、マメ科植物の根粒形成を司る転写制御パターンを適切かつ合理的に改変し農業形質を改良するための糸口を探る。

3. 研究の方法

本研究では、マメ科植物の根粒形成促進遺伝子の制御機構を明らかにするために、遺伝子の発現を“促進する NIN-NIN ホモ二量体-DNA 複合体”、“関与しない典型的 NLP-NLP ホモ二量体-DNA 複合体”、“抑制する NIN-NLP ヘテロ二量体-DNA 複合体”に着目した。生化学・構造生物学的なアプローチを駆使することで、“複合体形成様式”や“DNA の構造変化”における違いを見出し、遺伝子発現制御の分子構造基盤を考察する。さらに、レポーター遺伝子アッセイによる変異体実験を通じて、構造的な知見の妥当性を評価するとともに、転写制御を改変するための足掛かりを得る。上記の目標を達成するための主に次の3項目の研究内容を実施した。

- (1) NIN と典型的 NLP の機能を隔てるアミノ酸配列モチーフの同定
- (2) 根粒形成遺伝子の制御機構に対する構造生物学的考察
- (3) 根粒共生獲得に至るまでの NIN/NLP の分子変遷

4. 研究成果

- (1) NIN と典型的 NLP の機能を隔てるアミノ酸配列モチーフの同定

課題代表者らはまず、NIN の幅広い DNA 結合選択性 (Nishida, Nosaki et al, 2021, Plant Cell) に着目し、NIN 特有の性質をもたらす NIN-specific motif (NSM) の同定を試みた。根粒共生生物における NIN/NLP ファミリーのアミノ酸配列保存性に注目しつつ、NIN と典型的 NLP のキメラ体を作成し、ゲルシフトアッセイ等のタンパク質-DNA 相互作用実験を行った。その結果、既知の DNA 結合ドメイン (RWP-RK ドメイン) に隣接する NIN のみで保存される領域が、DNA 結合選択性の幅を決定する NSM 配列であることが示唆された。また同じく生化学的解析より、NSM 配列は DNA 結合時に RWP-RK ドメイン間の二量体化を促進することが示唆された。そして、植物細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ (トランスアクチベーション実験) を共同研究ベースで実施したところ、根粒形成遺伝子の活性化には (1) で見出した NSM 配列を有することが鍵になっていることが示唆された。具体的には、NSM 配列を取り外した NIN は根粒形成遺伝子の活性化能が減少した一方で、NSM 配列を取り付けた典型的 NLP は根粒形成遺伝子の活性化能が増強された。したがって、NSM 配列こそが NIN を NIN たるアミノ酸領域であることが強く示唆された。

- (2) 根粒形成遺伝子の制御機構に対する構造生物学的考察

NIN の幅広い DNA 結合性および NIN/NLP を介した遺伝子発現制御スイッチングの背景のある仕組みを詳細に理解するために三次元構造解析を試みた。しかし、NIN/NLP 組み換えタンパク質は極めて不安定であり収量も十分ではなかったため、研究期間中には X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡・単粒子解析の成功には至らなかった。しかし、可溶化促進タグや二量体促進タグを同時に付加したコンストラクトで収量や安定性が改善しつつあるため、今後も構築したコンストラクトを基盤として原子分解能レベルの構造決定を進めていく。一方で、高精度予測プログラム AlphaFold を用いて二量体として予測したところ、DNA 結合タンパク質として、または二量体タンパク質として極めて妥当な予測構造が得られた。そして、(1) の生化学解析から予想されたように、NIN の幅広い DNA 結合性を生み出す NSM 配列が RWP-RK ドメイン間の二量体界面に位置しており、二量体構造を安定化することによって、苦手な塩基配列をもつ DNA に対しても結合を強固にしていることが示唆された。さらに NSM 配列に相当する領域は、ファミリー間での干渉性ヘテロ二量体を形成するか、もしくは、ヘテロ二量体を形成せずに DNA 結合をめぐる競争するか、の違いを生み出していることも考察された。また、根粒形成遺伝子の活性化能が弱い NIN-NLP ヘテロ二量体については、幅広い DNA 結合性を保持し根粒形成遺伝子プロモーターには結合できるものの、プロモーターの構造変化を誘起できない可能性が示唆されており、FRET アッセイと変異体タンパク質群を用いた DNA 構造変化の確認実験も引き続き進めている。

- (3) 根粒共生獲得に至るまでの NIN/NLP の分子変遷

根粒共生植物のみならず、あらゆる植物がもつ NIN/NLP ホモログ群のアミノ酸配列を網羅的に調べてみたところ、予想外なことに双子葉類 (非根粒共生植物) における一部の非典型的 NLP も NSM 配列を有していることが判明した。生化学的解析を実施してみたところ、やはりをもつ非典型的 NLP も NIN と同様に幅広い DNA 結合性を示すことがわかった。したがって、根粒形成遺伝子を制御するために不可欠な NSM 配列は根粒共生獲得と同時に NIN が独自に獲得したわけではなく、根粒共生獲得以前に双子葉類における一部の非典型的 NLP がすでに NSM 配列を獲得し、その幅広い DNA 結合性を根粒形成制御システムへ転用させたという分子変遷が考察された。また、双子葉類 (非根粒共生植物) においても NSM 配列が高度に保存されていたことから、重要な未知機能を有する可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tachibana Ryo, Abe Susumu, Marugami Momo, Yamagami Ayumi, Akema Rino, Ohashi Takao, Nishida Kaisei, Nosaki Shohei, Miyakawa Takuya, Tanokura Masaru, Kim Jong-Myong, Seki Motoaki, Inaba Takehito, Matsui Minami, Ifuku Kentaro, Kushiro Tetsuo, Asami Tadao, Nakano Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-44492-5	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 Ito Momoyo, Tajima Yuri, Ogawa-Ohnishi Mari, Nishida Hanna, Nosaki Shohei, Noda Momona, Sotta Naoyuki, Kawade Kensuke, Kamiya Takehiro, Fujiwara Toru, Matsubayashi Yoshikatsu, Suzaki Takuya	4. 巻 15
2. 論文標題 IMA peptides regulate root nodulation and nitrogen homeostasis by providing iron according to internal nitrogen status	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-44865-4	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 Misawa Fumika, Ito Momoyo, Nosaki Shohei, Nishida Hanna, Watanabe Masahiro, Suzuki Takamasa, Miura Kenji, Kawaguchi Masayoshi, Suzaki Takuya	4. 巻 34(5)
2. 論文標題 Nitrate transport via NRT2.1 mediates NIN-LIKE PROTEIN-dependent suppression of root nodulation in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1844 ~ 1862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac046	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 Nosaki Shohei, Mitsuda Nobutaka, Sakamoto Shingo, Kusubayashi Kazuki, Yamagami Ayumi, Xu Yuqun, Bui Thi Bao Chau, Terada Tohru, Miura Kenji, Nakano Takeshi, Tanokura Masaru, Miyakawa Takuya	4. 巻 8(12)
2. 論文標題 Brassinosteroid-induced gene repression requires specific and tight promoter binding of BIL1/BZR1 via DNA shape readout	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-022-01289-6	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14件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Nosaki Shohei
2. 発表標題 Molecular and structural mechanism underlying the brassinosteroid-responsive transcriptional regulation by the master transcription factor BIL1/BZR1
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Tachibana, Susumu Abe, Momo Marugami, Ayumi Yamagami, Shohei Nosaki, Takuya Miyakawa, Takehito Inaba, Minami Matsui, Kentaro Ifuku, Ryouichi Tanaka, Tetsuo Kushiro, Tadao Asami, Takeshi Nakano
2. 発表標題 Analysis for molecular mechanism of chlorophyll biosynthesis regulation via BPGs, novel brassinosteroid signaling factors
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野崎 翔平, 野田 桃菜, 三浦 謙治, 壽崎 拓哉
2. 発表標題 根粒形成に必要な不可欠な鍵転写因子の生化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2023年度大会(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Momoyo Ito, Yuri Tajima, Mari Ogawa-Ohnishi, Hanna Nishida, Shohei Nosaki, Momona Noda, Naoyuki Sotta, Kensuke Kawade, Takehiro Kamiya, Toru Fujiwara, Yoshikatsu Matsubayashi, Takuya Suzuki
2. 発表標題 A nitrogen-induced peptide mediates nutrient-dependent regulation of root nodule symbiosis
3. 学会等名 15th European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nosaki Shohei, Noda Momona, Miura Kenji, Suzaki Takuya
2. 発表標題 A novel motif of NIN determines its different DNA-binding specificity from NLPs
3. 学会等名 15th European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷 朋之, 梅北 葵衣, 岩佐 碧, 野崎 翔平, 杉本 貢一, 近藤 侑貴, 笠原 賢洋
2. 発表標題 ゼニゴケにおいて配偶子器発生を制御する非典型 BZR転写因子のオーソログの分子機能比較解析
3. 学会等名 日本植物学会 第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野崎 翔平, 野田 桃菜, 三浦 謙治, 壽崎 拓哉
2. 発表標題 NIN 転写因子の特異的配列に基づく遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 植物微生物研究会 第32回研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nosaki Shohei
2. 発表標題 "Shaping" gene regulations for the second green revolution
3. 学会等名 TSUKUBA CONFERENCE 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古谷 朋之, 野崎 翔平, 近藤 侑貴, 笠原 賢洋
2. 発表標題 BZR/BES転写因子の3つのサブグループの機能比較解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野崎 翔平, 野田 桃菜, 小野田 浩宜, 三浦 謙治, 壽崎 拓哉
2. 発表標題 転写ファミリー内での比較解析から根粒共生獲得の軌跡を探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 創立100周年記念大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野崎 翔平
2. 発表標題 これから100年の農芸化学研究を展望する "食の未来に資する植物タンパク質研究"
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 創立100周年記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野崎 翔平, 野田 桃菜, 三浦 謙治, 壽崎 拓哉
2. 発表標題 根粒形成を促進する鍵転写因子のDNA結合特性に関する研究
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 伊藤 百代, 番場 大, 陳 漢謀, 野崎 翔平, 田島 由理, 三浦 謙治, 佐藤 修正, 壽崎 拓哉
2. 発表標題 硝酸態窒素による根粒形成制御に関わる自然変異の同定
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 立花 諒, 阿部 晋, 丸上 萌々, 山上 あゆみ, 野崎 翔平, 宮川 拓也, 稲葉 丈人, 松井 南, 久城 哲夫, 伊福 健太郎, 浅見 忠男, 中野 雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイド新規シグナル伝達因子BPG4によるクロロフィル生合成制御を介した葉緑体恒常性維持メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【プレスリリース】植物の生長を促す植物ホルモンの遺伝子発現調節機構の新しい仕組み https://www.tsukuba.ac.jp/journal/pdf/p20221228140000.pdf

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

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