

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06863

研究課題名(和文)新規根粒制御因子CAMTAは共生シグナルの混線を防止するか？

研究課題名(英文) Does the novel nodulation regulator function as a device for preventing the symbiotic signal entanglement?

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科モデル植物ミヤコグサと根粒菌との根粒共生を制御する新規制御因子CAMTAの機能解析を通じて、「CAMTAが根粒共生と菌根共生のシグナル混線を防止する」という仮説の検証を行った。根粒共生特異的に誘導される遺伝子の発現解析、二重変異体の作出によるCAMTAの遺伝学的位置の解明とその相互作用因子の探索、CAMTAによる根粒共生特異的な転写因子の発現制御機構の解明等を行った結果、CAMTAは根粒・菌根共生シグナルの混線防止装置としては機能していないが、共通共生シグナル経路の転写因子に作用して未知の根粒菌由来シグナルによる根粒形成を負に制御することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have identified CAMTA as a novel regulator of nodulation. In this project, we hypothesized that CAMTA functioned as a controller which prevented a crossing of signals between nodulation and mycorrhization and verified this hypothesis through elucidating the mechanism by which CAMTA regulated nodulation.

We determined the genetic hierarchy of CAMTA in the symbiotic signal cascade and found that the CAMTA was genetically functioning in between the symbiotic ion-channel CASTOR and the symbiotic calcium signal-decoder CCaMK. We also found that CAMTA was interacted with the symbiotic transcriptional factor CYCLOPS, which seemed to affect the expression level of the Nodule Inception (NIN) that played a central role in nodulation.

Although, an analysis of the expression level and pattern of NIN during symbioses revealed that our hypothesis was not the case, we characterized the novel nodulation regulator CAMTA and almost elucidated the mechanism how CAMTA regulated nodulation.

研究分野：植物-微生物相互作用

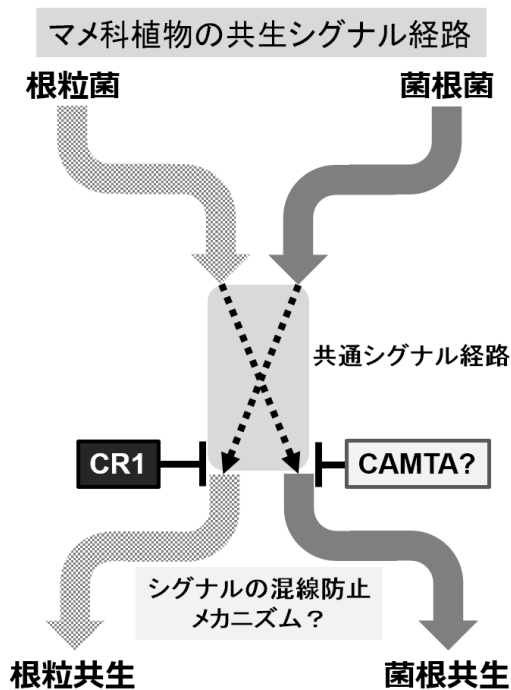
キーワード：分子生物学 根粒共生 菌根共生 相互作用 シグナル 植物生理

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は根粒菌と共生するのみならず、他の多くの陸上植物と同様にアーバスキュラー菌根菌とも共生関係を築き、双方の共生に必須な共通シグナル経路を持つ。根粒共生・菌根共生それぞれのシグナルは、共通シグナル経路の一部であるカルシウムスパイクンと呼ばれる連続的な細胞内カルシウム濃度変動を誘導するが、これまでのところ、マメ科植物が共通シグナル経路からどのように根粒共生・菌根共生それぞれに対応する宿主応答を活性化しているのか、その具体的なメカニズムは分かっていない。我々は、この当該分野における大きな謎の解明につながる、以下の予備的研究結果を得ている。

- (1) 共通シグナル経路の構成因子である CASTOR の変異体に根粒を形成する復帰変異体の原因遺伝子 *CR1* は、CAMTA (カルモジュリン結合転写活性化因子) をコードする。
- (2) *CR1* はミヤコグサの根粒形成を負に制御する。
- (3) *CR1* は菌根共生には影響しない。

CAMTA は非マメ科植物において低温や乾燥といったストレス応答に関与する<sup>1,2</sup>が、根粒形成への関与は知られていない。CAMTA による未知の根粒形成抑制機構が存在することを示す我々の予備的研究結果は、*CR1* が二つの異なる共生シグナルの混線を防ぐ根粒共生側の因子であり、菌根共生側にも同様の因子が存在する可能性を示唆している。以上から本研究が、未だ明らかになっていない「共通シグナル経路からの根粒共生・菌根共生シグナルの分岐メカニズム」を紐解く足がかりになると期待される。



2. 研究の目的

本研究の背景と予備的研究結果から、「CAMTA が根粒共生シグナルと菌根共生シグナルそれぞれを特異的に抑制することで共生シグナルの混線を防止する」という新たなモデルを提唱し、我々が発見した新規根粒制御因子 *CR1* の機能解析を通じて本モデルの検証を行う。提唱するモデルが正しくないことを示唆するデータが得られた場合でも、新規根粒形成制御因子である *CR1* の機能解析を行うことで、マメ科植物の共生システムを理解する上で重要な知見を得ることができる。

- (1) *CR1* による共生シグナルの混線防止について、*cr1* 変異体に菌根菌を接種した際の根粒共生特異的な遺伝子発現を調べることで検証する。
- (2) *CR1* が根粒共生シグナルを抑制することにより菌根共生シグナルとの混線を防ぐとすれば、逆方向の混線を防ぐために菌根共生を抑制する CAMTA が存在すると考えられる。ミヤコグサが持つ複数の CAMTA の中に菌根共生に関与する CAMTA が存在するかどうか調べる。
- (3) *CR1* の機能と性状について、「*CR1* の遺伝的ヒエラルキー」、「*CR1* の細胞内局在と時空間的発現パターン」、「*CR1* の作用機序」等の観点から解析する。

3. 研究の方法

(1) [*CR1* の機能・性状解析]

- ① 既知のミヤコグサ共生変異体で *CR1* の RNAi を行い、*CR1* の遺伝的ヒエラルキーを明らかにする。
- ② *CR1* に蛍光タンパク質を融合し、ミヤコグサにおける *CR1* の局在を明らかにする。また、*CR1* プロモータで  $\beta$ -グルクロニダーゼを発現するコンストラクトをミヤコグサに導入し、*CR1* の時空間的発現パターンを明らかにする。
- ③ *CR1* の遺伝的ヒエラルキーに基づいて、*CR1* と共通共生経路の CcMK、CYCLOPS との相互作用について検討する。

(2) [共生シグナル混線防止装置としての CAMTA の機能解析]

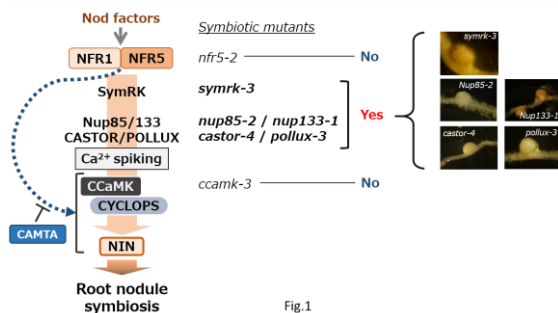
*CR1* が共生シグナルの正常な分岐に「混線防止装置」として機能しているならば、*cr1* 変異体では根粒共生シグナルと菌根共生シグナルとが混線していることが予想される。そこで、*cr1* 変異体に菌根菌を感染させ、根粒共生特異的に誘導される遺伝子の発現変動を調査する。また、提唱するモデルから予想される「菌根共生シグナルを抑制する CAMTA」について、*castor* 変異体の菌根共生能の復帰を指標に探索する。

4. 研究成果

(1) <*CR1* の遺伝的ヒエラルキー>

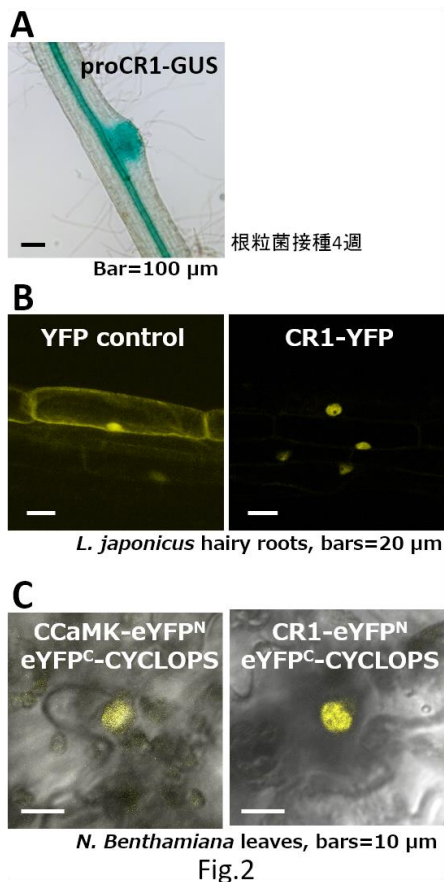
ミヤコグサの共通共生経路変異体と根粒共生シグナル Nod 因子受容体の変異体で *CR1* の RNAi を行い根粒共生表現型を調べたところ、カルシウムスパイクンより上流の共通

共生経路変異体はCR1 ノックダウンによって根粒共生が復帰した (Fig. 1)。一方、カルシウムスパイクングのデコーダーである CCaMK、その下流で機能する CYCLOPS の変異体背景で CR1 をノックダウンしても根粒共生は復帰しなかった (Fig. 1)。一部の共通共生経路変異体については *cr1* 変異体との二重変異体を作成し、根粒共生表現型が CR1 ノックダウンと一致することを確認した。以上から、遺伝学的には CR1 はカルシウムスパイクングと CCaMK・CYCLOPS との間で機能すると考えられるが、Nod 因子受容体変異体である *nfr5* は CR1 ノックダウンで根粒共生が復帰しなかった (Fig. 1) ことから、CR1 はカルシウムスパイクングをバイパスする未知のシグナル経路で機能することが示唆された。



## (2) <CR1 の性状>

CR1 プロモータで GUS 遺伝子を発現させたところ、根粒原基で強い活性が観察された (Fig. 2A)。また、CR1 を YFP との融合タンパ



ク質としてミヤコグサの根で発現させると、核に局在した (Fig. 2B)。これらの結果から、CR1 は根粒形成の初期から核で機能していることが示唆された。本研究課題で明らかにした CR1 の遺伝的ヒエラルキーに基づいて CR1 と CCaMK、CCaMK の直接の相互作用因子である CYCLOPS との相互作用を調べたところ、CR1 は CYCLOPS と核で相互作用することが分かった (Fig. 2C)。Yeast two hybrid assay を行ったところ、CR1 の TIG ドメインが CYCLOPS

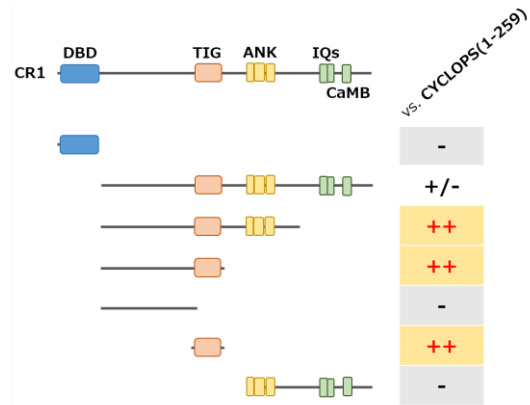


Fig.3

との相互作用に重要であり、C 末端の CaM 結合領域が自身の制御に関与する可能性があることが示唆された (Fig. 3)。以上から、CR1 は核で CYCLOPS と相互作用することで根粒形成を負に制御していることが強く示唆された。

## (3) <菌根シグナル伝達に関わる CAMTA>

*castor* 復帰変異体は菌根共生表現型が復帰しないが、*castor* 変異体で CR1 ノックダウンを行うと菌根共生能が一部復帰した (Fig. 4A)。この時の CAMTA ファミリーの

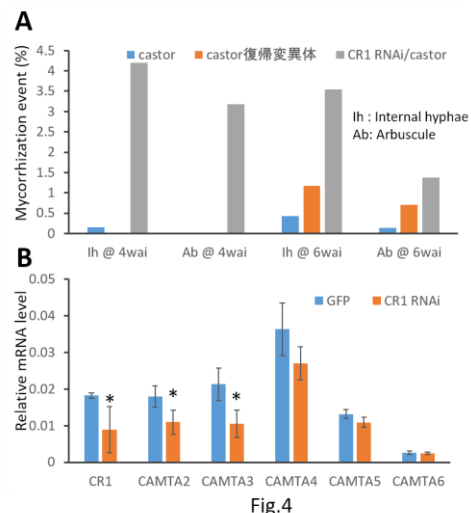


Fig.4

発現量を調べると、CR1 ノックダウンでは CR1 に加えて CAMTA2, CAMTA3 の mRNA 量が減少していた (Fig. 4. B)。そこで、CAMTA2, CAMTA3 それぞれを *castor* 変異体で特異的にノックダウンさせて (Fig. 5A) 菌根菌を感染させたが、どちらの RNAi も菌根共生が復帰しなかった (Fig. 5B)。以上から、菌根共生には複

数の CAMTA が関与する可能性が考えられる。

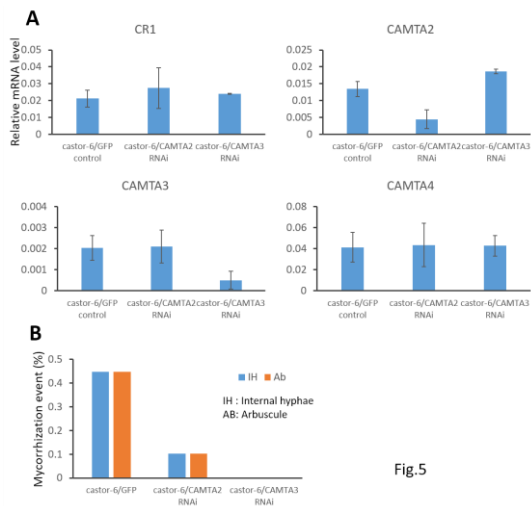


Fig.5

(4) <CR1 による共生シグナルの混線防止>

CR1 が根粒共生と菌根共生のシグナル混線の防止に機能するかについて、根粒共生特異的な転写因子 NIN の発現パターン等を指標に検証した。cr1 において NIN のプロモータで GUS を発現させ菌根菌を感染させたところ、樹枝状体が形成されている細胞で NIN のプロモータ活性が観察された (Fig. 6)。ところが、同様のプロモータ活性が野生株でも観察されており (Fig. 6)、この現象は CR1 依存적ではなかった。CR1 の変異体に菌根菌を感染させても根粒共生特異的な遺伝子の発現が起こらなかったことから、CR1 はマメ科における根粒共生と菌根共生のシグナル防止装置として機能しているわけではないことが分かった。

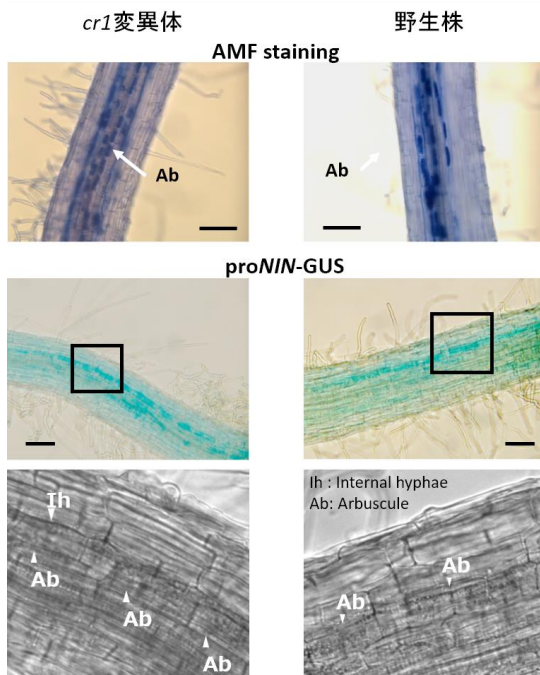


Fig.6

Bars=100 μm

本研究課題によって、新規根粒制御因子 CR1 が共通共生経路の構成因子 CYCLOPS と核で相互作用し、カルシウムスパイク非依存的に根粒形成を制御することが強く示唆された。CR1 は根粒形成に負に作用することから「CR1 が根粒共生と菌根共生のシグナル防止に機能する」仮説を提唱し、その検証を行ったところ、CR1 はシグナル混線防止装置としては機能していないということが分かった。一方、菌根共生に関与する CAMTA の存在が示唆されたことから、根粒形成制御を行う CR1 は、菌根共生に関与する CAMTA から派生した可能性が考えられる。本研究課題で得られた成果等に基づいて CAMTA による共生システムの制御をより詳細に解明することで、共生メカニズムの理解を深めることができると考える。

<引用文献>

1. Doherty et al., Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* (2009) 21:972-984.
2. Galon et al., Calmodulin-binding transcription activator 1 mediates auxin signaling and responds to stresses in Arabidopsis. *Planta* (2010) 232:165-178.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山崎明広、カルモジュリン結合転写因子による根粒形成制御、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日~18 日、鹿児島大学 (鹿児島)
- ② Akihiro Yamazaki, A novel interactor of symbiotic RLKs is involved in nodulation in *Lotus japonicus*, IS-MPMI XVII congress, 2016 07. 17-21, Portland, OR, USA.

[図書] (計 1 件)

- ① 大野博司(編) 山崎明広 他、化学同人、共生微生物、2017、281 (171-187)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：

### (4) 研究協力者

なし