

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03702

研究課題名(和文) 2つの遠距離シグナル物質を介した根粒形成の全身制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of systemic regulatory mechanism of nodulation through two long-distance 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)：マメ科植物は根の組織にリゾビウムを取り込むことにより、大気中の窒素を栄養源として利用できます。一方、共生窒素固定は多量の光合成産物を必要とするため、過剰な根粒の形成は宿主の生育を著しく阻害します。共生バランスを保つため、宿主植物は「葉」を介して根粒の数を最適化する仕組みを持っていることが知られています。

我々はマメ科のモデル植物ミヤコグサを用いて、葉で強く発現するマイクロRNA遺伝子 MIR2111-5を特定し、葉で合成されたmiR2111が根で機能する根粒形成抑制因子TOO MUCH LOVE (TML)を阻害することで、根粒の数を全身的にコントロールしていることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

空気中に多量に存在するN₂を、反応性の高いアンモニアに変換するために高温高压で反応させるハーバー・ボッシュ法が知られていますが、マメ科植物に共生する根粒細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ます。その際、多くの光合成産物を必要とするので、<葉による炭素同化>と<根での窒素固定>とのバランスが共生と植物の成長には極めて重要になります。私たちは葉で作られるマイクロRNAが根に作用することで根粒形成を遠隔制御していることを実証しました。

マメ科植物の窒素固定には多くのCO₂吸収が必要であることから、地球温暖化を防止する次世代の植物生産に繋がることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Legumes can incorporate rhizobia into their symbiotic organs "nodules" and use atmospheric nitrogen as a nutrient source. However, excessive nodule formation strongly inhibits host growth because N₂-fixation is a highly energy-consuming process. To optimize the number of nodules, legumes utilize a long-distance negative-feedback mechanism known as autoregulation of nodulation (AON). It is known that the host plant has a mechanism to optimize the number of nodules through "leaves" in order to maintain a symbiotic balance.

Using a model legume *Lotus japonicus*, we identified the microRNA gene "MIR2111-5" that is strongly expressed in leaves, and found that leaf-synthesized miR2111 systemically controls the number of nodules by inhibiting the nodule formation inhibitor TOO MUCH LOVE (TML), which functions in the roots.

研究分野：植物微生物共生、植物生理学、発生生物学

キーワード：ミヤコグサ 共生 窒素固定 根粒 遠距離制御 マイクロRNA オートレギュレーション

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生によって誘導される窒素固定器官・根粒は、植物の発生可塑性の研究モデルとして非常に興味深い器官である。根粒原基の誘導因子は根粒菌が分泌する Nod ファクター (リポキチンオリゴ糖) であり、これはサイトカイニンシグナリングを活性化することで根の皮層細胞をリプログラミングし、根粒原基を誘導する。一方、Nod ファクターは遠距離シグナル物質を介した全身的な制御系 (Autoregulation of Nodulation: AON) を駆動し、根粒の過剰形成を抑制する。AON は「根由来シグナル」と「シュート由来シグナル」の2つの遠距離シグナル物質より構成されていると考えられている。根粒共生と AON の分子メカニズムを明らかにするために、私たちは日本に自生するミヤコグサ *Lotus japonicus* を用いて共生変異体の大規模スクリーニングを行い、Nod ファクターシグナル伝達系や根粒形成制御に必要なとされる遺伝子座を特定してきた。

AON の構成因子

その中の HAR1 はシュートで機能し、根由来シグナルを受容する受容体キナーゼであり、シロイヌナズナの茎頂メリステム (SAM) の維持に関わる CLAVATA1 (CLV1) のオルソログである。同様にシュートで機能する KLAVER も SAM を制御する RPK2 受容体のオルソログであることが判明し、シュートから根粒形成を遠隔制御している。我々はさらに根由来シグナルの有力候補としてアラビノース修飾を受けた CLE-RS1/RS2 ペプチドを発見し、これは SAM の幹細胞数を制御する CLV3 ペプチドの成熟型ときわめてよく似た分子構造を持っていた。

シュート由来シグナルと根で機能する PLENTY, TOO MUCH LOVE (TML)

一方、HAR, KLV は CLE-RS1/RS2 ペプチドを受容することによって、「シュート由来シグナル」の合成を促進すると考えられる。最近我々は HAR1 の下流でサイトカイニン合成遺伝子 *IPT3* の発現が誘導され、根に移動するとともに根粒抑制活性を持つことから、**サイトカイニンがシュート由来シグナルの1つとして機能するモデルを提唱した**。さらに、HAR1 の上流や下流に位置する根のレギュレーターである PLENTY や TML を発見するとともに、**根粒の発生に必須の転写因子 NIN が CLE-RS1/RS2 遺伝子の転写を直接活性化し、全身制御を駆動することを明らかにしている**。しかしながらこれらの知見は依然として断片的であり、サイトカイニンが根粒形成において正負の相反する2つの機能を持つなど、全身制御機構は未知の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、AON のシュートから根への遠距離シグナリングを中心に解析し、AON の各構成因子の機能を明らかにする。特に HAR1 の新規下流因子の特定を試みる。またミヤコグサにおける AON の構成因子は茎頂メリステム (SAM) の形成のみならず、根の伸長等にも関わっている知見が得られている。根系の成長に着目した解析から、AON の新たな発生制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

A シュートから根への遠距離シグナル伝達の分子機構の解明

根からシュートへの遠距離シグナル物質である糖修飾 CLE ペプチド (CLE-RS1, CLE-RS2) を HAR1 レセプターキナーゼ (Arabidopsis CLV1 オルソログ) が受容すると、サイトカイニン合成の鍵遺伝子 *IPT3* の発現が葉で誘導されることを明らかにしている。葉で合成されるサイトカイニン、あるいはその下流因子がシュート由来シグナルの分子の実体であると考えられる。そこで、HAR1 が機能するシュートの師部で *IPT3* を構成的に発現させた形質転換体を作成し、根粒形成の遠隔制御を検証するとともに、サイトカイニンの下流で発現変動する転写産物を RNA-seq 解析によって特定する。

B シュートシグナルを受け根で機能する TML の分子機能の解明

AON の構成因子 TML は Kelch-repeat を持つ F-box タンパクであり、HAR1 が合成するシュート由来シグナルを受けて、根で機能する。TML の基質となる根粒形成促進因子を特定するために、GFP タグをつけた TML をミヤコグサ毛根で高発現させ、結合する蛋白質を LC-MS/MS 解析で検出する。さらに結合タンパク質候補の中から、実際に TML と結合し根粒形成を誘導する因子を選抜する。

C AON の構成因子と根系成長の共通制御システムの解明

AON において、PLENTY は根で機能し、根からシュートへの遠距離シグナル物質である CLE-RS1, CLE-RS2 ペプチドのアラビノース修飾に関わると思われる。一方で *plenty* 変異体は根粒菌の非感染時において、側根形成や主根伸長に異常が認められることから根系の形成にも機能している

ことが示唆されている。*plenty*及び *plenty har1*二重変異体を用いた解析からPLENTYの根粒と側根形成の両者における役割を明らかにする。

4. 研究成果

A シュートから根への遠距離シグナル伝達の分子機構の解明

ミヤコグサの野生株MG-20と*har1*根粒超着生変異体を用いて、HAR1依存的なIPT3の発現をqRT-PCRで経時的に解析するとともに、IPT3プロモーター-GUSによって発現部位を解析した。その結果、根粒菌感染及び硝酸処理後わずか1日でIPT3はシステミックに葉で発現誘導されることを新たに明らかにした。更に、IPT3の誘導は成熟葉のみで起こり、未熟葉や茎では起こらないことを発見した。これらの知見をもとに、シュート由来シグナルが最も誘導されていると推定される成熟葉「成熟葉」を材料とし、RNA-seqによりHAR1依存的に発現変動するリードをミヤコグサゲノム上にマップした。DEGのUpSetPlotにより、感染、硝酸処理、HAR1依存性、HAR1非依存性を示す約200の遺伝子を特定することに成功した。発現変動遺伝子の中には、HAR1依存性が顕著なmiRNA前駆体遺伝子が含まれていた。GO解析から根粒の遠隔制御とは異なるHAR1の新たな機能が見えてきた。

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。そのうち4つの遺伝子は葉で機能するHAR1受容体キナーゼ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は根で機能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。私たちが発見した最も顕著に発現していた*MIR2111-5*を過剰発現させると、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。植物のシュートからはスクロースなどの物質が根に輸送されるため、そのような転流物質によりmiR2111が根で合成される可能性が残っている。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を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がシステミックに根粒の数を制御することが明らかとなった。以上の成果を論文として取りまとめ、2020年10月Nature Communications誌に報告した。

B シュートシグナルを受け根で機能するTMLの分子機能の解明

全身的制御の最終段階であるTMLの相互作用因子を同定するために、ミヤコグサ感染根から免疫沈降を試みた。TMLはkelchリピートを持つF-boxタンパク質であるが、全長を用いた免疫沈降からは有力な基質を特定するに至っていない。そこでF-boxドメイン領域を欠きkelchリピートよりなるTMLdNを作成し、自身のプロモーターを用いて毛状根で発現させた。TMLdNにはGFPを融合しており、発現部位のモニターと同時に免疫沈降のタグとして用いた。発現解析の結果、TMLdN:GFP、根粒原基と根端メリステムでGFPの蛍光が観察された。また、ウェスタンブロット解析によってGFP-TMLdNと考えられるバンドが検出されたことから、このコンストラクトを用いた生化学実験が可能であると判断した。しかしながらTML相互作用因子候補の生化学的解析は難航した。うまくいかなかった原因としてTMLの細胞内局在を見誤っていた可能性が浮上した。実験計画を再検討する必要性が出てきた。

C AONの構成因子と根系成長の共通制御システムの解明

名大松林教授らとの共同研究により、PLENTYがペプチドを基質としてアラビノース修飾活性を有することを明らかにした。また、*plenty har1*二重変異体の解析から、PLENTYは根粒共生においてHAR1と別経路でも機能すること、主根の伸長制御については同一経路で機能することを明らかにした。これらの成果は、Journal of Experimental Botany誌に発表した。

HAR1を介した側根形成の遠隔制御 側根の成長は低濃度の硝酸で促進されるのに対し高濃度では抑制される。ミヤコグサの根粒過剰着生変異体である*har1*は、非感染条件下では、主根が短く側根数が多い表現型を示す。HAR1と窒素窒素に応じた側根形成制御の関連を知るために、野生型MG-20と*har1*で硝酸応答性を調べた。その結果、MG-20では低濃度硝酸処理により側根形成は誘導され、高濃度では抑制されることが示された。一方*har1*は高濃度硝酸による側根抑制効果が低下していた。接ぎ木実験を行ったところ、HAR1は側根形成をシステミックのみならず、ローカルにも制御していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoro E, Nishida H, Ogawa-Ohnishi M, Yoshida C, Suzaki T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M.	4. 巻 70
2. 論文標題 PLENTY, a hydroxyproline O-arabinosyltransferase, negatively regulates root nodule symbiosis in <i>Lotus japonicus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Bot.	6. 最初と最後の頁 507-517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/ery364.	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 Yoro E, Suzaki T, Kawaguchi M.	4. 巻 33
2. 論文標題 CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne Mutant of <i>Lotus japonicus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Plant Microbe Interact.	6. 最初と最後の頁 320-327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-08-19-0223-R	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 Yano, K., Aoki, S., Liu, M., Umehara, Y., Suganuma, N., Iwasaki, W., Sato, S., Soyano, T., Kouchi, H., and Kawaguchi, M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Function and evolution of a <i>Lotus japonicus</i> AP2/ERF family transcription factor that is required for	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA Res.	6. 最初と最後の頁 193-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsw052.	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, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., Betsuyaku, S., Miura, K., Soyano, T., Kawaguchi, M., and Suzaki, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in <i>Lotus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-02831-x.	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., Suzuki 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 Lotus japonicus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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