

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07103

研究課題名（和文）維管束を介した全身的な共生窒素固定制御機構の解明

研究課題名（英文）Systemic regulation of symbiotic nitrogen fixation by a signal compound transported via vascular bundles

研究代表者

菅沼 教生（SUGANUMA, Norio）

愛知教育大学・その他部局等・理事・副学長

研究者番号：40179114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：マメ科植物に共生した根粒菌による共生窒素固定活性を制御する、維管束を經由して地上部から地下部に輸送される、全身的なシグナルを解明するために、小胞輸送に関するSNAREタンパク質遺伝子に変異が生じたミヤコグサのsyp71変異体の解析を行った。その結果、Daidzeinにsyp71変異体の植物体重量と根粒重量を有意に増大させる効果が認められた。また、共生窒素固定に必須の新たな遺伝子を明らかにするために、ミヤコグサ変異体の解析を行った結果、ヌクレオポリンの一種GLE1タンパク質が根粒菌の共生プロセスに関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

20世紀初頭に人工的に窒素肥料を合成することが可能になり、食糧生産は増大し、安定して収量を確保できるようになった。しかし、人工的に窒素肥料を合成するために、多大の化石エネルギーが消費される。また、施肥された窒素肥料は海洋の富栄養化の一因となっている。マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定作用は、こうした窒素肥料がもたらす課題を解決し、持続可能な環境保全型の作物生産を実現するために利用価値の高い生物的機能である。本研究は、そのための基盤となる学術的な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：A one of Lotus japonicus Fix- mutants, syp71 in which SYP71 gene coding for a SNARE protein is mutated, was analyzed to reveal a systemic signal compound transported from the shoot to the root via vascular bundles that controls nitrogen fixation activity of rhizobia in the nodules. Daidzein was appeared to be significantly effective for recovering weights of plants as well as nodules depressed in the syp71 mutant. In addition, analysis of a Lotus japonicus mutant uncovered that a nucleoporin GLE1 is involved in symbiotic association with rhizobia.

研究分野：植物生理学

キーワード：マメ科植物 根粒菌 共生 根粒 窒素固定 変異体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は根粒菌と共生し、根に根粒と呼ばれる特殊な器官を形成する。根粒では、共生した根粒菌が空中窒素を固定する。宿主である植物は根粒菌によって固定された窒素を利用することができるため、マメ科植物は化合態の窒素がなくても旺盛に生育することができる。このようなマメ科植物と根粒菌の共生は、根粒という器官の形成と窒素固定という機能の発現の大きく2つのステージに分けることができる。器官形成においては、宿主植物から分泌されるフラボノイド化合物を根粒菌が認識すると、根粒形成遺伝子群の発現が誘導され、その結果合成される根粒形成シグナル化合物オリゴキトサッカライドを宿主植物が受容すると受容シグナルが一連の遺伝子群に伝達されることで根粒形成に至る分子機構の全貌が明らかにされた。ところが、根粒菌の窒素固定遺伝子は同定されているが、根粒菌が内部共生した後、根粒菌の窒素固定機能の発現が宿主植物によってどのように制御されているのかという機能発現の分子機構には不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

マメ科のモデル植物ミヤコグサの窒素固定活性に異常をきたした Fix 変異体を解析することで、根粒菌の窒素固定機能の発現に必須の宿主植物遺伝子が同定されてきている。これまでに、ミヤコグサでは *SST1*、*FEN1*、*IGN1*、*SEN1*、*SYP71* の5種類の遺伝子が明らかにされた。このうち、*SYP71* は、SNARE タンパク質の一種をコードし、小胞による物質輸送に関与すると考えられている。さらに、*SYP71* は、維管束で発現すること、さらに、*SYP71* の変異体の地下部に野生型の地上部を接ぎ木すると、根粒の変異形質が部分的に回復することから、維管束を介して地上部から地下部に小胞によって輸送される窒素固定活性を制御する全身的なシグナルが存在することが示唆されている。そこで、本研究は、マメ科植物に共生した根粒菌が発揮する共生窒素固定活性を制御する維管束を介した宿主植物由来の全身的なシグナルを解明することを目的に行った。併せて、新規のミヤコグサの Fix 変異体を解析することで、共生窒素固定活性を制御する新たな遺伝子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) *syp71* 変異体では、小胞が正常に輸送されないために、小胞内の物質を生産する代謝経路に何らかの影響が生じていると予想される。そこで、野生型に加えて他の Fix 変異体 *sen1* 及び *fen1* に比べて、小胞輸送が阻害されたことで *syp71* 変異体において特異的に変動が生じた代謝経路を、リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現を解析することで明らかにする。

(2) *syp71* 変異体において特異的に変動が見られた遺伝子の発現を抑制した場合、*syp71* 変異体と同様な変異形質が観察されれば、その遺伝子は *SYP71* が関与する小胞輸送によって輸送される物質の代謝に関わっていると考えられる。そこで、毛状根形質転換法により、当該遺伝子の発現を抑制した根粒を作製し、表現型を解析する。

(3) *syp71* 変異体に物質を投与することで、変異形質が回復すれば、当該物質がシグナル化合物である可能性がある。そこで、*syp71* 変異体において特異的に変動が生じた代謝経路に関わる前駆体及び生成物を *syp71* 変異体に投与し、変異形質に及ぼす影響を調べる。

(4) 新規と予想される Fix 変異体を解析することで、共生窒素固定活性を制御する新たな遺伝子を同定することができる。そこで、原因遺伝子が未同定の Fix 変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングにより同定する。

### 4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析によって、*syp71* 変異体の実生における遺伝子発現を野生型と比較したところ、野生型に比べ変異体において79個の遺伝子の発現が増大し、91個の遺伝子の発現が減少していた。これらの遺伝子のうち、物質代謝に関与すると予想された遺伝子について、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて、他の Fix 変異体 *sen1* と *fen1* と比較した結果、isoflavone 7-O-methyltransferase をコードする遺伝子の発現が *syp71* 変異体で特異的に増大していることが明らかになった(図1)。

これは、isoflavone 7-O-methyltransferase の前駆体が小胞によって正常に輸送されないために、前駆体が蓄積され、過剰に蓄積された前駆体を分解するために遺伝子発現が増大した可能性が考えられる。あるいは、isoflavone 7-O-methyltransferase の生成物が小胞によって正常に輸送されないために、より多く生成物を生成するために遺伝子発現が増大した可能性が考えられる。

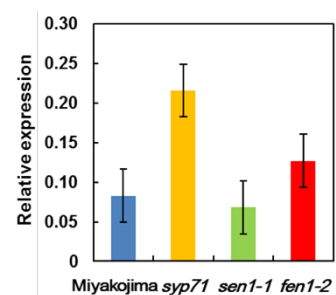


図1 野生型と Fix 変異体の実生における isoflavone 7-O-methyltransferase 遺伝子の発現

(2) ところで、毛状根形質転換系を用いて、RNAi により isoflavone 7-O-methyltransferase の発現を抑制した形質転換根粒を作製し、表現型を検討した。その結果、窒素固定活性に影響は見られなかった。これらの結果は、isoflavone 7-O-methyltransferase が関与する代謝系の物質が地上部から地下部に輸送される窒素固定活性を制御するシグナル物質である可能性が低いことを示している。ところが、地下部のみを形質転換する毛状根形質転換系では、*SYP71* 遺伝子の発

現を RNAi により抑制した根粒の窒素固定活性の減少はわずかであり、全身で発現する遺伝子の機能を地下部のみを形質転換する毛状根形質転換系で解析することに限界あると考えられた。

(3)次に、isoflavone 7-O-methyltransferase が関与するイソフラボノイドの生合成経路の前駆体及び生成物で入手可能な Liquiritigenin、Naringenin、Daidzein、Genistein 及び Prunetin を *syp71* 変異体に投与し、変異形質に及ぼす影響を検討した。最初にこれらの物質を植物を育成する培養液に加えて影響を調べたが、いずれも影響は見られなかった。次に、地上部から地下部に輸送される窒素固定活性を制御するシグナル物質は、維管束を經由して地上部から地下部に移動すると予想されることから、植物の第一葉の葉を切除し、葉柄にこれらの物質を含む寒天片を差し込む、あるいは、これらの物質を含む溶液を満たしたマイクロチューブのフタに穴をあけ、穴から葉柄を差し込む方法により行った。その結果、寒天片を用いた場合、Daidzein に *syp71* 変異体の植物体重量と根粒重量を有意に増大させる効果が認められた (図 2)。

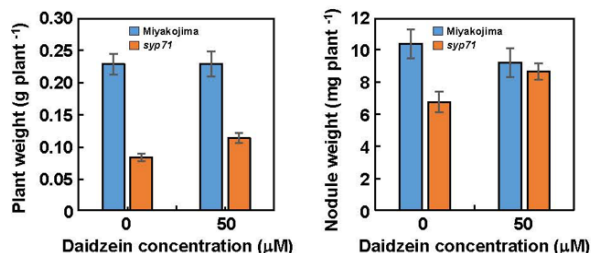


図 2 *syp71* 変異体の変異形質に及ぼす Daidzein の影響

これらの結果は、根粒菌の共生窒素固定活性を制御する維管束を介して地上部から地下部に輸送される全身的なシグナル物質は、Daidzein である可能性を示している。フラボノイド化合物は、根粒菌の根粒形成遺伝子の発現を誘導する物質として知られている。フラボノイド化合物が根粒形成のみならず、窒素固定活性にも関わっていると興味深い。しかしながら、効果が小さいことから、シグナル物質が Daidzein であることを証明するためには、さらに検討が必要である。

(4)原因遺伝子が未同定の Fix<sup>-</sup>変異体 F34、F39、F53、F54、F62 及び F176 の原因遺伝子の解析を行った。その結果、F34 と F39 変異体は同座の変異体であり、原因遺伝子は *SST1* 遺伝子であることが示された。

F62 変異体 (図 3) では、原因遺伝子はヌクレオポリンの一種 GLE1 をコードする遺伝子であることが明らかになった (図 4 と 5)。F62 変異体は、根粒の窒素固定活性が野生型の 3 分の 1 程度であり、根粒菌との共生状態で植物体の生育は野生型よりも劣ることから、Fix<sup>-</sup>変異体であると予想してきた。しかしながら、F62 変異体に硝酸態窒素を添加しても植物体の生育は部分的にしか回復しないこと、また、F62 変異体の根粒細胞に共生した根粒菌の形態は、多くの Fix<sup>-</sup>変異体で見られる形態と異なることから、根粒菌の共生プロセスに変異が生じた変異体であると判断された。いくつかのヌクレオポリンがマメ科植物と根粒菌の共生に決定的な役割を果たすことが報告されている。メッセンジャーRNA を核から細胞質に輸送する役割を果たす、これまでの報告とは異なるタイプのヌクレオポリンの一種 GLE1 タンパク質が根粒菌の共生に関与することが示され、今後新たな展開が期待される。



図 3 野生型 Miyakojima (左) と F62 変異体 (右)

図 4 空ベクター(-)あるいは *GLE1* 遺伝子(+)を導入した野生型 Miyakojima と F62 変異体の毛状根形質転換体

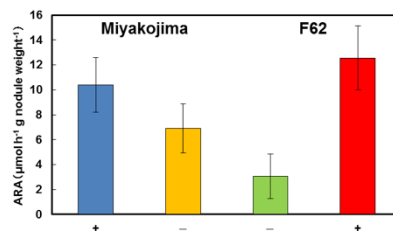


図 5 空ベクター(-)あるいは *GLE1* 遺伝子(+)を導入した野生型 Miyakojima と F62 変異体の毛状根形質転換体の窒素固定活性

また、F53、F54 及び F176 変異体では、これまで行ってきた連鎖解析の結果に基づいて、次世代シーケンサーを用いて変異体のゲノム塩基配列を解析したが、原因遺伝子を同定するには至らなかった。これら 3 つの変異体は、野生型と交配した種子の後代の野生型と変異型の分離比が 3 対 1 に合致しないことから、単一の遺伝子による変異体ではないと考えられる。今後は原因遺伝子が存在する可能性のある領域を広げて原因遺伝子の探索を行う必要がある。

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 Yano K, Aoki S, Liu M, Umehara Y, Suganuma N, Iwasaki W, Sato S, Soyano T, Kouchi H, Kawaguchi M	4. 巻 24
2. 論文標題 Function and evolution of a Lotus japonicas AP2/ERF family transcription factor that is required for development of infection threads	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 DNA Research	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 Imai A, Ohtani M, Nara A, Tsukakoshi A, Narita A, Hirakawa H, Sato S, Suganuma N	4. 巻 168
2. 論文標題 The Lotus japonicus nucleoporin GLE1 is involved in symbiotic association with rhizobia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 590-600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppl.12996	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木章弘、江上由佳、河野里実、中尾隆寛、千々岩 諒汰、中島菜摘、原田克哉、河津英紀、渡邊啓史、穴井豊昭、菅沼教生
2. 発表標題 マメ科植物の窒素固定関連遺伝子 SEN1 の多型と表現型
3. 学会等名 第28回植物微生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木章弘、江上由佳、河野里実、中尾隆寛、千々岩諒汰、中島菜摘、原田克哉、河津英紀、渡邊啓史、穴井豊昭、菅沼教生、有馬進
2. 発表標題 マメ科植物における窒素固定関連遺伝子SEN1の多型と表現型
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----