

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08149

研究課題名(和文) マメ科植物の根粒形成機構とその起源

研究課題名(英文) The origin of root nodule symbiotic organs in legumes

研究代表者

征矢野 敬 (Soyano, Takashi)

基礎生物学研究所・共生システム研究部門・准教授

研究者番号：60532819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は窒素固定細菌である根粒菌と相互作用することで根粒を形成する。この形質はマメ科植物が進化の過程で獲得した性質である。根粒原基の形成には根粒共生に特異的なNIN転写因子の下流で側根形成の初期過程に関わる因子がリクルートされていることを明らかにした。この因子はミヤコグサLBD16-1転写因子であり、NINの別の直接的な標的であるNF-Yと協調的に作用することで原基形成を誘導することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮層細胞に由来する根粒の進化的起源については1980年代以前から議論がある。しかし、諸説ある中で確固たる結論は得られていなかった。本研究では、根粒形成過程において側根の発達プログラムの一部が転用されていることを証明した。本研究は植物科学における大きな疑問の一つに回答を与えるものである。さらに、植物で一般に保存される因子が根粒共生を制御する仕組みや共生経路とこのような因子との接点を明らかにすることによって、根粒共生を多様な植物に応用活用する試みにおける具体的な手法の確立に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Legumes evolutionarily acquired the ability to produce root nodules as symbiotic organs in response to nitrogen-fixing bacteria, rhizobia. Organogenesis of root nodules is initiated by activation of a nodulation-specific NIN transcription factor. We revealed that a factor, LBD16-1, which is involved in early stages of lateral root development generally, was recruited into nodule organogenesis downstream NIN. LBD16-1 is directly targeted by NIN through an intronic cis-element conserved in leguminous orthologs. LBD16-1 positively regulates nodule primordia development together with NF-Y CAATA-box binding protein complex, of which subunit genes are also direct NIN targets.

研究分野：根粒共生

キーワード：根粒共生 植物微生物相互作用 器官形成 ミヤコグサ

## 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、根粒菌と相互作用することで共生器官である根粒を形成し、大気窒素を栄養素として利用するシステムを進化させた。根粒共生は持続的農業の展開や窒素循環システムに重要な形質である。宿主は根粒菌が分泌するNod ファクターを受容することで根粒形成の一連の過程を誘導し、根粒の形成は一部の皮層細胞が分裂を開始するところから始まる。初期情報伝達系では根粒共生に特異的な機能を獲得した因子が作用する。しかし、その下流では植物が基本的な持つ器官形成や発達に関わる因子が根粒形成、機能分化の実行因子として機能すると考えられる。しかし、マメ科植物が根粒形成能を確立するに至る過程でどのような分子ネットワークの再構築が起こったのかは分かっていない。

### 2. 研究の目的

Nodファクターによる根粒原基の誘導には、根粒共生に特異的なNIN転写因子の活性化が必須であり、この因子の過剰発現によって根粒原基様構造が誘導されることを報告した。NINは根粒共生特異的経路の最下流に位置する因子であることから、進化の過程で細胞分裂を誘導する経路をリクルートした可能性がある。実際に、NINが真核生物に普遍的な転写因子であるCCAAT box結合タンパク質NF-Yのサブユニット遺伝子を直接的に活性化し、この因子が原基形成を正に制御することを明らかにしている。しかし、NF-Y過剰発現による細胞分裂誘導活性はNINと比べて低い。そのため、NF-YのみではNINが皮層細胞分裂を誘導する仕組みを十分に説明できず、NF-Yと協調的に作用する未知のNIN下流転写因子の存在が予測された。NIN依存的に発現する転写因子群の中から、ミヤコグサNF-YA1との過剰発現によって強い細胞分裂亢進活性を示すLBD16-1を新たに同定した。この因子は非マメ科植物では側根の形成を制御する因子であり、NINの下流で側根発達経路の一部がリクルートされている可能性がある。本研究では、NINによるLBD16-1遺伝子の発現制御機構とこの因子の根粒形成における役割をNF-Yとの関連から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) LBD16-1 遺伝子の発現制御

NIN転写因子のChIP-seqから、NINはLBD16-1遺伝子のイントロンに結合すると考えられた。複数あるNIN結合部位候補をプローブに用いたゲルシフトアッセイによってNIN結合部位の同定を試み、タバコを用いた一過的発現系を用いてNIN結合部位が存在するイントロンがNINによる遺伝子発現誘導に十分であることを検証した。さらに、NIN結合配列が根粒での発現に十分であることを確かめるために、GUSレポーターを用いた。NCBIに登録されている植物ゲノム配列を用いてLBD16遺伝子のNIN結合配列の保存性を他のマメ科植物とその近縁であるバラ科などの窒素固定クレードに含まれる植物で調べた。

#### (2) LBD16-1 とNF-Yとの相互作用

LBD16-1 とNF-Yとの相互作用実験はタバコの葉とミヤコグサの根を用いたBiFCと精製した組換えタンパク質を用いたPull downアッセイによって行った。さらに、NF-Yのみ、LBD16-1のみ、NF-YとLBD16-1を同時にミヤコグサの根で過剰発現させた場合の遺伝子発現に対する影響をRNA-seqによって調査した。

#### (3) LBD16-1 遺伝子の根粒形成における機能

優勢阻害効果を狙って、人工的転写抑制ドメインであるSRDXをLBD16-1に付加してミヤコグサの根で過剰発現させた。CRISPRを用いたゲノム編集技術によってミヤコグサLBD16-1の突然変異

体を作成した。さらに、*lbd16-1*変異体と*nf-y*変異体との多重変異体を作成し遺伝学的な相互作用を解析した。

#### (4) LBD16-1 とNF-Yの細胞分裂誘導活性

LBD16-1 とNF-Yをミヤコグサの根で過剰発現させて側根と皮層細胞分裂に対する影響を調査した。さらにトマトの根でも同様な実験を行った。ミヤコグサ *daphne* 変異体は *NIN* 遺伝子の上流で転座が起きている。そのために皮層での *NIN* の発現が抑制されており、根粒原基が形成されない。LBD16-1、NFY-A1、NF-YB1を共発現させることで *daphne* 表現型の抑制を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) LBD16-1 遺伝子の発現制御

ゲルシフトアッセイによって *NIN* が生化学的に *LBD16-1* イントロンに結合することを実証し、*NIN* 結合部位を同定した。タバコの葉を用いた一過的発現系において *NIN* が *LBD16-1* イントロンの *NIN* 結合部位依存的にレポーター遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。GUSレポーターを用いた組織化学染色によって、LBD16-1は側根原基と根粒原基で発現することが分かった。側根原基での発現はプロモーターに依存していた。側根誘導活性があるオーキシンの処理は *LBD16-1* の発現を誘導した。オーキシン処理による *LBD16-1* の発現誘導もプロモーターに依存した。*nin* 変異体においてもオーキシン処理によって *LBD16-1* の発現が上昇したことから、この応答に *NIN* は介在しないことが分かった。根粒原基ではイントロンのみでも発現に十分であったが、プロモーターのみでも根粒原基での発現が認められた。イントロンのこの活性は、*NIN* 結合部位に変異を導入すると顕著に減少したことから、*NIN* の結合が発現に必須であると考えられた。以上の結果から、根粒原基での *LBD16-1* の発現はプロモーターとイントロンによって正に制御されており、当初、イントロンが *LBD16-1* の発現に関与するかは懐疑的であったが、複数の実験によってイントロンの機能を確認できた。さらに、*NIN* 結合部位とその周辺のDNA配列はミヤコグサを含む今回調査したマメ亜科12種全てにおいて保存されており、マメ科の残りの亜科であるジャケツイバラ亜科、ネムノキ亜科においても配列の保存性が見られる種が確認できた。マメ科 *LBD16* 遺伝子にある *NIN* 結合配列は少なくとも現存するマメ科植物の共通先祖で獲得したと考えられ、この配列の獲得がマメ科における根粒形成能に影響した可能性がある。

### (2) LBD16-1 とNF-Yとの相互作用

BiFCおよびpull downアッセイによってLBD16-1とNF-Yサブユニットが相互作用することが分かった。RNA-seqによって、LBD16-1とNF-YA1、NF-YB1を同時に発現させた時に発現が誘導される遺伝子群が確認されたことから、これらの転写因子が協調的に作用することで遺伝子発現を制御することが示唆された。

### (3) *LBD16-1* 遺伝子の根粒形成における機能

ミヤコグサの根でLBD16-1-SRDXを過剰発現したところ、側根の形成が抑制され且つ根粒の形成数も減少した。このことから、非マメ科植物のLBD16と同様にミヤコグサLBD16-1は側根を正に制御する遺伝子の発現を制御しており、さらにミヤコグサでは根粒原基形成を正に制御することが示唆された。また、*lbd16-1* 変異体においても野生型ミヤコグサに対して側根数が減少しており、この遺伝子の側根形成における機能が遺伝学的にも確認できた。その一方で、*lbd16-1* 変異体の根粒発達への影響は弱く、硝酸添加によって部分的に根粒形成を抑制した条件において野生型と比較して根粒数と根粒サイズの減少が確認された。ミヤコグサにはLBD16パラログが存在しており、この遺伝子もイントロンに *NIN* 結合配列を持つことなどから、機能重複する因子

の存在が示唆される。硝酸添加時に見られた *lbd16-1* 変異体の根粒抑制は、CaMV 35Sminimalプロモーターと連結したイントロンを含む *LBD16-1* で抑圧された。 *LBD16-1* イントロンが根粒の形成時に機能することがこの実験からも確認された。また、 *lbd16-1* と *nf-ya1* あるいは *nf-ya1 nf-yb1* との多重変異体では、 *nf-y* 変異体に見られた根粒原基の発達抑制が亢進された。この影響は原基形成の初期過程から観察された。これらのことから、 *LBD16-1* が *NF-Y* と遺伝学的に相互作用すること、根粒原基形成過程の早い段階から発達に作用していることが明らかとなった。また、 *nf-ya1 nf-yb1* 二重変異体の側根数は野生型ミヤコグサと同程度であり、これらの変異は *lbd16-1* 変異体の側根形成抑制を亢進しなかった。 *LBD16-1* と *NF-Y* の遺伝学的相互作用は根粒原基においてのみ見られた。

#### (4) *LBD16-1* と *NF-Y* の細胞分裂誘導活性

*LBD16-1* と *NF-Y* サブユニットを同時にミヤコグサの根で過剰発現したところ、それぞれの単独の過剰発現では観察されなかった側根密度の上昇や異所的な細胞分裂の誘導が皮層や内鞘で観察された。 *LBD16-1* は側根形成を正に作用すること、 *NF-Y* と協調的に作用することで細胞分裂を正に制御することが分かった。この結果は、先に述べたタンパク質結合および遺伝学的相互作用の考え方と合致しており、これらが複合体を形成して根粒原基形成時に細胞分裂を誘導することが示唆された。さらにトマトの根を用いた場合でも皮層細胞分裂を誘導する効果が確認されたことから、 *LBD16-NF-Y* 複合体が作用する経路は非マメ科植物においても保存されていることが示唆された。また、これらの因子を同時にミヤコグサ *daphne* 変異体で発現させたところ、5%の個体で根粒が形成された。この結果から、 *LBD16-NF-Y* 複合体による細胞分裂の誘導が根粒原基形成時にも起きていることが示唆された。

以上の解析結果から、マメ科植物の根粒原基の形成には *NIN* を介して側根形成を制御する因子がリクルートされており、 *LBD16* 遺伝子の *NIN* 結合部位の獲得がマメ科植物における新たな機能獲得に貢献した可能性が考えられた。遺伝子発現制御における *LBD16-1* と *NF-Y* の役割や関係性の理解が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soyano Takashi, Shimoda Yoshikazu, Kawaguchi Masayoshi, Hayashi Makoto	4. 巻 366
2. 論文標題 A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aax2153	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12件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takashi Soyano, Makoto Hayashi, Masayoshi Kawaguchi
2. 発表標題 Regulation of nodule development through factors involved in lateral root development
3. 学会等名 Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 征矢野敬、下田宜司、川口正代司、林誠
2. 発表標題 マメ科植物の根粒原基と側根の形成は共通した因子によって制御される
3. 学会等名 植物微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Soyano
2. 発表標題 Co-option of factors involved in lateral root development into leguminous nodule organogenesis
3. 学会等名 International Congress on Nitrogen Fixation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Soyano
2. 発表標題 Root nodule symbiosis integrated into regulatory systems of host legumes
3. 学会等名 Imaging and Quantitative Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Soyano, Makoto Hayashi, Masayoshi Kawaguchi
2. 発表標題 Transcription factors involved in lateral root development may function downstream of NODULE INCEPTION to regulate nodule development
3. 学会等名 European Nitrogen Fixation Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 征矢野敬、林誠、川口正代司
2. 発表標題 マメ科植物の根粒と側根の形成に共通して関わる宿主因子
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 征矢野敬、林誠、川口正代司
2. 発表標題 ミヤコグサASL18/LBD16はNF-Yと結合して根粒の発達を正に制御する
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 征矢野 敬、林 誠、川口正代司
2. 発表標題 根粒の発達に必須なミヤコグサ NN の下流で作用する転写因子
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 征矢野 敬、林 誠、川口正代司
2. 発表標題 根粒共生特異的転写因子 NIN の下流で作用する側根形成関連因子
3. 学会等名 植物微生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 征矢野 敬、林 誠、川口正代司
2. 発表標題 根粒共生特異的NIN転写因子の下流で作用する側根形成関連因子
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 征矢野敬, 川口正代司, 林誠
2. 発表標題 マメ科植物の根粒器官形成機構とその起源
3. 学会等名 日本植物学会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 征矢野敬, 川口正代司, 林誠
2. 発表標題 根粒の発達に必須なミヤコグサ NN の下流 で作用する転写因子
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2017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
研究協力者	川口 正代司  (Kawaguchi Masayoshi)		
連携研究者	林 誠  (Hayashi Makoto)  (30291933)	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・チームリーダー  (82401)	