

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15426

研究課題名（和文）膜脂質が支える根粒菌感染抑制機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of rhizobium Infection mechanisms regulated by plasma membrane lipids

研究代表者

赤松 明（Akamatsu, Akira）

関西学院大学・生命環境学部・助教

研究者番号：10802225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マメ科植物のミヤコグサ（*Lotus japonicus*）と窒素固定細菌である根粒菌との共生において、ミヤコグサが細胞膜脂質の一つであるフォスファチジルイノシトールリン酸（PIP）の量を変動させることで根粒菌の感染を制御していることを明らかにした。さらに、このPIPの量の変動を担う遺伝子としてPITP-like protein (PLP)およびPhosphatidylinositol (PI) kinaseの2つを同定した。これらの遺伝子は、根粒菌感染依存的に発現量を高め、表皮細胞などで機能することで、PIPの動態を操作しており、共生のバランスを維持するために重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなったPIPによる根粒菌の感染制御は、これまで病原菌感染時に報告されてきたPIPの動態とは異なる可能性があり、マメ科植物が根粒菌との間で築いてきた特異的な応答の可能性もある。これらをより詳細に明らかにすることができれば、マメ科植物が進化の過程でどのようにして根粒菌との共生を獲得してきたかという大きな問いに迫ることができる。そして、それらによって根粒共生をはじめとする微生物を利用したこれからの農業に対して大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that in the symbiosis between *Lotus japonicus*, a legume, and rhizobium, a nitrogen-fixing bacterium, the phosphatidylinositol phosphate (PIP) is accumulated in the root and regulate the symbiosis. Furthermore, two genes, PITP-like protein (PLP) and phosphatidylinositol (PI) kinase, were identified by genetic and biochemical methods as genes responsible for this variation in PIP accumulation. These genes manipulate PIP dynamics by increasing expression levels in a rhizobial infection-dependent manner and by functioning in epidermal cells. These functions may be important for maintaining a balance of benefits between the two symbiotic species.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：根粒菌 ミヤコグサ 細胞膜脂質 フォスファチジルイノシトール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物は、根粒菌を自身の体内へ受け入れることを厳密に制御する必要がある。そのため、進化の過程で、根粒菌の「受け入れ機構」と同時に「抑制機構」を獲得してきた。「受け入れ機構」のための、宿主植物と根粒菌との間での分子のやり取りや、遺伝子発現の調整に関しては、多くの知見が得られている。また、「抑制機構」に関しても、根粒共生が誘導するシグナルが根→地上部→根へと伝わり、更なる根粒菌の感染を抑制するオートレギュレーション (Autoregulation Of Nodulation; AON) と呼ばれる機構が存在することが明らかとなっている。地上部からの AON シグナルを受けた根では、F-box タンパク質 TML が根粒共生に必須なタンパク質の分解を誘導することで、更なる根粒菌の感染を抑制すると考えられるが、最終的に根においてどのような変化が起こるのかは明らかではない。このことを明らかにすることができれば、植物が、置かれた環境や状況により微生物との相互作用を変化させる機構の解明に繋がる。

2. 研究の目的

マメ科植物にとって窒素固定細菌・根粒菌との相利共生は、窒素源を得るための重要な手段であるが、過剰な根粒菌感染は、相利共生のバランスを崩し植物の生育不良を招く。そのためマメ科植物は、過剰な根粒菌感染を抑制する能力を有している。しかし、植物細胞において、どのような変化が起こることで、更なる根粒菌の侵入が抑制されるのかは不明である。我々は、先行研究より、根粒菌感染時に発現量が上昇する遺伝子として *PITP-like protein 4 (PLP4)* を同定した。さらに、*plp4* 機能欠損変異体では、根粒菌感染が促進され過剰な感染が観察されたことから、PLP4 は、根粒菌感染に対し抑制的に機能することが明らかとなった。これまでの知見から、PLP タンパク質は、細胞膜脂質の一種であるフォスファチジルイノシトール(PI)の輸送を担っているとされている。また、細胞膜上で PI のリン酸化にも寄与し、PI のイノシトール環がリン酸化されたフォスファチジルイノシトールリン酸 (PIP や PIP2) の合成を促すと言われている。本研究では、根粒菌感染時の PI や PIP の動態と PLP4 の機能を明らかにすることで感染抑制機構において、ミヤコグサがどのように過剰な根粒菌の感染を防いでいるのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PLP4 と根粒菌感染抑制機構 AON への関与の検証

PLP4 の機能欠損変異体 (*plp4*) の解析からは、*PLP* が根粒共生に対して抑制的に機能していることが示唆されていた。そのため、PI や PIP の動態が根粒菌感染抑制システム Autoregulation of nodulation (AON) に関与することが考えられた。そこで、まずは *plp4* 変異体における根粒菌の感染抑制が AON 依存적であるのかを検証することとした。そのために、AON 変異体における PLP の発現量を qPCR により確認した。そして、AON 変異体と *plp4* との二重変異体を作製し、遺伝学的な検証も行った。

(2) 根粒菌感染時の PI および PIP の動態解析

PLP4 は、細胞内の PI や PIP の量を調節することで根粒共生に寄与していることが予想されたため、根粒菌感染時のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根を使用したトランスクリプトーム解析をもとに、細胞膜成分を制御する遺伝子群の発現変動を解析した。一方で、根粒菌感染時の PI および PIP の量の変動を明確化するために LC-MS 解析によって検証を行った。さらに、PLP の機能をより明確化するために、PLP と細胞膜脂質の相互作用の検証を行った。検証には、大腸菌内で作製したタンパク質と、細胞膜脂質をスポットした膜を用いた PIP-strip 解析を用いた。さらに、細胞内において PLP が機能する場所を明らかにするために、蛍光タンパク質を用いた細胞内局在解析も行った。

(3) 根粒共生時の PIP2 合成を担う *PI4P5K* の同定

LC-MS 解析での PIP の定量では、根粒菌感染時に PIP2 の蓄積量が上昇することが明らかとなった。そこで、トランスクリプトーム解析の情報をもとに、発現量が上昇する *PI4P5K* に着目し、CRISPR/Cas9 による変異体を作製し、PLP4 と同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) PLP4 と根粒菌感染抑制機構 AON への関与の検証

PLP による根粒共生の抑制が、既知の根粒共生抑制機構である AON と関与するものかどうかを検証するために、AON 変異体である *tml* における根粒菌感染依存的な *PLP4* の発現量を測定した。その結果、*tml* 変異体では、依然として *PLP4* の発現が誘導されていた。さらに、この *tml* 変異体と *plp4* 変異体との二重変異体に対し、根粒菌を感染させたところ、相加的な根粒菌感染が見られたため、PLP4 を介した根粒菌感染抑制経路は、AON 非依存的な応答であると考えた。近年、

AON とは独立した転写因子 NIN を介した抑制機構の存在が示唆されている。そこで、*nin* 変異体での *PLP4* の発現を測定したところ、*PLP4* の発現が完全に抑制されていたため、*PLP4* による根粒共生の抑制は、*NIN* を介したものであることが示唆された。

(2) 根粒菌感染時の PI および PIP の動態解析

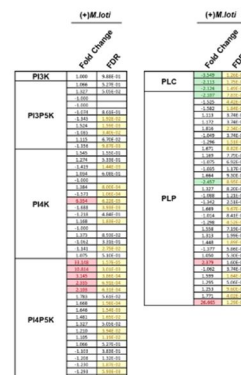
PITP-like protein をコードする *PLP4* は、PI や PIP を介したシグナル伝達に関与する可能性が高いため、根粒菌感染時のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) のトランスクリプトーム解析により、根粒菌感染依存的に PI 関連遺伝子が発現するかどうかの確認を行った。その結果、PI4K と PI4P5K をコードする遺伝子に強い発現上昇が見られた。一方で、リン脂質のグリセロールとリン酸との間のエステル結合を加水分解する酵素 PLC をコードする遺伝子は、強く発現が抑制されていることが明らかとなった (図 1)。

これらのことから、根粒菌感染時に PI4K や PI4P5K により合成される PI4P や PI(4,5)P₂ の需要が高まることが強く示唆された。また、PLC が強く抑制されることも、PIP が根粒共生において重要な役割を果たしていることを示唆している。

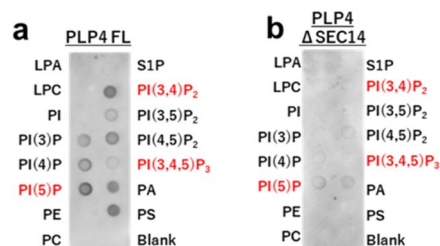
根粒菌感染時のミヤコグサ根 PI の定量を LC-MS 解析によって検証したところ、根粒菌感染依存的に *PLP* を介して PI や PIP、PIP₂ の蓄積量が上昇することが明らかとなった。また、*plp4* を使用した同様の解析では、PI や PIP₂ の蓄積量に変動がなかったため、根粒菌感染依存的な PI や PIP₂ の増加は *PLP* を介したものであることが明らかとなった。

PLP4 の細胞内での機能部位を調査するため、Venus 蛍光タンパク質を *PLP4* の N 末端側に融合したものをミヤコグサ根で発現させ、細胞内局在解析を行った。その結果、*PLP4* の細胞内局在は、表皮細胞とそれよりも内部の皮層細胞内とは異なる傾向を示した。皮層細胞では、主にドット状の局在が観察されたが、主に細胞膜局在であることが分かった。ドット状の構造は、主に ER マーカーである tdTomato-CTT と一致し、そのほかに、わずかながらトランスゴルジネットワーク (TGN) マーカーやゴルジ体マーカーとも一致した。しかし、Late Endosome (LE) マーカーとは一致しないものであった。これらのことから、皮層細胞などの内部組織と表皮細胞では *PLP4* は異なる機能を有していることが考えられた。この *PLP4* が、どの PI や PIP と結合するかを PIP-strip 解析により確認した。ここでは、6xHIS-*PLP4* 全長 (FL) と、Sec14 ドメインを削除した ΔSEC14 を HIS タグにより精製したタンパク質を使用した (図 2)。

PLP4 FL は PI(4,5)P₂ と比較的強く、また PI4P や PI3P とも結合する可能性が示唆された (図 2a)。また、これらの結合は、ΔSEC14 では喪失したことから、ΔSEC14 を介した結合であることが示された (図 2b)。



(図 1) RNA-Seq解析による根粒共生時のPI関連遺伝子の発現変動



(図2) *PLP4*タンパク質と細胞膜脂質との結合性の確認
植物に存在するPI(4,5)P₂、PI(3)P、PI(4)Pに対し、*PLP*タンパク質が結合していることが分かる。(注)赤字の脂質は、植物には存在しない。(a) *PLP4*全長を使用 (b) *PLP4*のSEC14ドメインを削ったものを使用

(3) 根粒共生時の PIP₂ 合成を担う *PI4P5K* の同定

トランスクリプトーム解析により発現上昇が確認された 5 つの *PIP5K* 遺伝子のなかで、発現変動が大きな遺伝子 *PIP5K6* に着目した。発現量解析から、*nin* および *cyclops* 変異体において、根粒菌感染依存的な *PIP5K6* の発現上昇を喪失することが明らかとなった。また、*PIP5K6* の ATG 上流 3kb を 3xVenus と融合させたベクターを用いて発現解析を行ったところ、根毛細胞や皮層細胞において発現が見られた。細胞内局在解析では、表皮細胞において *PIP5K6* は、*PLP4* と共存することが明らかとなった。CRISPR/Cas9 により *PIP5K6* の機能欠損体を作製し、根粒菌感染に対する応答の検証を行った。その結果、*pip5k6* において感染系数に上昇が見られ、根粒数では野生型と比べ変動はなかった。これらの結果は、*plp4* の変異体で観察された表現型とも大部分で一致するため、*PLP4* と *PIP5K6* が協調的に *NIN* を介したローカルな感染抑制に対して機能している可能性が示唆された。

現時点では、どのように PI や PIP が根粒菌感染を抑制するのか？や感染系形成時の PI や PIP のダイナミックな変化に対して *PLP* がどのように寄与するのか？などの疑問が残っている。今後は、このようなことに着目して研究を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akamatsu Akira, Nagae Miwa, Takeda Naoya	4. 巻 -
2. 論文標題 The CYCLOPS Response Element in the NIN promoter is Important but not Essential for Infection Thread Formation During Lotus japonicus-Rhizobia Symbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-10-21-0252-R	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 Kana Miyata, Moe Hosotani, Akira Akamatsu, Naoya Takeda, Jiang Wendi, Taisei Sugiyama, Ryou Takaoka, Kotarou Matsumoto, Satsuki Abe, Naoto Shibuya, Hanae Kaku	4. 巻 64
2. 論文標題 OsSYMRK Plays an Essential Role in AM Symbiosis in Rice (Oryza sativa)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 378-391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad006	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 Akira Akamatsu, Masayuki Fujiwara, Satoshi Hamada, Megumi Wakabayashi, Ai Yao, Qiong Wang, Ken-Ichi Kosami, Thu Thi Dang, Takako Kaneko-Kawano, Fumi Fukada, Ko Shimamoto, Yoji Kawano	4. 巻 62
2. 論文標題 The Small GTPase OsRac1 Forms Two Distinct Immune Receptor Complexes Containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant & cell physiology	6. 最初と最後の頁 1662-1675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab121	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤松明、武田直也	
2. 発表標題 フォスファチジルイノシトール輸送タンパク質が調整する根粒菌感染機構の解明	
3. 学会等名 第63回 日本植物生理学会	
4. 発表年 2022年	

1．発表者名 新保佐知、 川口佳紀、近藤聡、 米倉円佳、 赤松明、 武田直也
2．発表標題 アーバスキュラー菌根共生を促進する物質の探索と機能解析
3．学会等名 第4回 日本共生生物学会
4．発表年 2020年

1．発表者名 田中寛人、石川寿樹、河野洋治、武田直也、赤松明
2．発表標題 フォスファチジルイノシトールが操作する微生物の侵入
3．学会等名 第31回 植物微生物研究会
4．発表年 2022年

1．発表者名 Akihiro Yamazaki, Yozo Okazaki, Yasuhiro Higashi, Kazuki Saito, Akira Akamatsu, Naoya Takeda, Yosuke Umehara, Makoto Hayashi
2．発表標題 Sterol acyltransferase is involved in the regulation of root nodule symbiosis
3．学会等名 第62回 日本植物生理学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 Daniela Romero Montero, Mayu Kawasaki, Akira Akamatsu, Naoya Takeda
2．発表標題 Relationship between the plant cell wall and the symbiotic microbes in the infection process, focusing on COBRA genes in Lotus japonicus
3．学会等名 第64回 日本植物生理学会
4．発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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