

硝酸に応答した根粒形成初期過程の制御機構

鈴木 瑛 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 壽崎 拓哉 (筑波大学 生命環境系)

【背景及び目的】

窒素は生物にとって必須な無機栄養源である一方で、ほとんどの真核生物は大気中の窒素をそのまま栄養として取り入れることができない。マメ科植物は、窒素固定能力を持つ土壌細菌である根粒菌と共生を行うことで、窒素栄養を得ることができる。根粒共生過程では、植物は光合成産物を根粒菌に供給する必要があるため、土壌中に十分な窒素源がある場合は、植物は共生を抑制することで共生に伴うコストの流出を防いでいる。窒素栄養に応答した共生抑制は、根粒菌感染、根粒形成数、根粒発達および窒素固定活性を含む共生の成立に不可欠な過程を多面的に制御する。その制御に関わる分子機構は長年未解明であったが、近年当研究室の西田らの研究により、ミヤコグサの *NITRATE UNRESPONSIVE SYMBIOSIS 1 (NRSYM1)* 遺伝子が、窒素栄養の1つである硝酸に応答して *CLE-RS2* ペプチドの誘導を介して根粒形成数を抑制することが明らかとなった (Nishida *et al.* Nature Communications, 2018)。NRSYM1 は NLP と呼ばれるタイプの転写因子をコードする。さらに、当研究室の研究により、根粒共生における硝酸応答に関わる新規因子 NRSYM2 が NRSYM1 とは異なる NLP 転写因子をコードすることもわかっている (Nishida *et al.* unpublished data)。このように、硝酸に応答した根粒共生の抑制は、分子機構の理解に一定の進展がみられているが、その制御の詳細は未解明な点が多い。本研究では、硝酸に応答した根粒形成初期過程の制御を理解することを目的として、NRSYM1 及び NRSYM2 と根粒形成初期過程に関わる遺伝子の制御関係を調査した。

【材料】

本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を実験材料として使用した。また、高濃度硝酸条件下でも根粒を形成する *nrsym1*、*nrsym2* 変異体は、以前に当研究室の西田らによって単離された突然変異体である。

【結果】

● *nrsym1*、*nrsym2* 変異体及び *nrsym1 nrsym2* 二重変異体の表現型解析

本研究で着目する根粒形成初期過程では、根粒菌の通り道である感染糸の形成が行われる。感染糸は、根粒菌が感染した際に植物によって形成されるトンネル状の構造であり、根粒菌は感染糸を通じて根に侵入する。硝酸の添加により、野生型植物では感染糸の形成が抑制されるのに対し、調べた全ての変異体においてその抑制が緩和されていることがわかった。

● NRSYM1 及び NRSYM2 の標的遺伝子候補の発現解析

上記の感染糸形成過程に関わる遺伝子である *NF-YA*、*NF-YB*、*NPL*、*EPR3* は、NODULE INCEPTION (NIN) 転写因子によって、根粒菌感染依存的に発現が誘導されることが知られている。NRSYM1 は NIN と共通した標的遺伝子をもつことがこれまでの

研究により知られている (Nishida *et al.* Nature Communications, 2018)。そこで、NRSYM1 と NRSYM2 が、*NF-YA* などの発現を硝酸依存的に制御し得るかを調べた。

野生型、*nrsym1*、*nrsym2* 変異体及び *nrsym1 nrsym2* 二重変異体をそれぞれ、1)根粒菌非感染、2)根粒菌感染、3)根粒菌感染+硝酸、の3つの異なる条件で72時間生育させた後、根をサンプリングし、RNA を抽出した。合成した cDNA を用いて、*NF-YA* などの発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果、野生型において、根粒菌感染により遺伝子発現は強く誘導されたが、硝酸存在下では根粒菌感染による遺伝子発現が抑制されることがわかった。一方、変異体では、硝酸による遺伝子発現の抑制は野生型と比べて緩和されていた。これらの結果から、NRSYM1 及び NRSYM2 は硝酸に応答して、根粒菌感染による NIN の標的遺伝子の発現誘導を抑制する働きをもつと考えられる。

● NRSYM1 及び NRSYM2 と標的遺伝子候補の相互作用

次に、NRSYM1 や NRSYM2 がこれらの標的遺伝子候補の DNA に *in vitro* において結合するかを、AlphaScreen によって調査した。AlphaScreen は、異なる標的分子を補足したビーズ同士の距離が近接したときにのみ起こる化学エネルギー移動を発光により検出することで、標的分子間の相互作用を定量する手法である。AlphaScreen に用いる NRSYM1、NRSYM2 タンパク質はコムギ無細胞系により合成した。また、標的遺伝子候補のプロモーター上に存在する NBS と呼ばれる NIN が結合するシス配列をビオチンによりラベルし、AlphaScreen に用いる DNA とした。AlphaScreen の結果、NRSYM1 及び NRSYM2 は、実験に用いた DNA 配列に特異的に結合することが明らかになった。

【考察】

本研究により、NRSYM1 及び NRSYM2 は硝酸に応答して *NF-YA*、*NF-YB*、*NPL*、*EPR3* のプロモーター上に存在する NIN が結合する配列に直接結合することがわかった。リアルタイム PCR の結果と合わせて考えると、この NRSYM1/2-NIN 標的遺伝子の相互作用は、NIN による標的遺伝子の発現誘導を阻害する作用を持つ可能性が考えられる。これらの結果は、NRSYM1 及び NRSYM2 が、硝酸に応答して、どのように根粒形成初期過程を抑制するか、その機構の一端を説明するものである。今後の分子レベルでの詳細な解析により、その制御の全容が解明されることが期待される。

【謝辞】

リアルタイム PCR は、当研究室の西田帆那博士の多大な協力を得て行った。AlphaScreen は、名古屋大学遺伝子実験施設の野元美佳博士、多田安臣博士との共同研究により行った。