

氏 名 西田 帆那

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2013 号

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Molecular genetic studies on autoregulation of nodulation
and nitrate-induced control of root nodule symbiosis in
Lotus japonicus

論文審査委員 主 査 教授 長谷部 光泰
教授 川口 正代司
教授 重信 秀治
教授 大山 卓爾 東京農業大学 応用生物
科学部

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Legumes establish symbiotic relationships with nitrogen-fixing rhizobia through the formation of root nodules. Endosymbiotic rhizobia inhabiting nodules supply host plants with ammonia converted from atmospheric dinitrogen, whereas host plants provide photosynthetic products for symbionts as energy sources. Because the root nodule symbiosis is an energy-consuming activity, plants have developed two strategies to balance the benefits and costs associated with the symbiosis. One strategy involves optimizing nodule number through negative regulation, which utilizes autoregulation of nodulation (AON), systemic long-range signaling between roots and shoots. In a model legume *Lotus japonicus*, two CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE) peptides, encoded by *CLE-ROOT SIGNAL 1 (CLE-RS1)* and *CLE-RS2*, act as putative root-derived signals in AON, which transmit signals that further inhibit nodule formation by interacting with a shoot-acting receptor-like kinase, HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HAR1). Another strategy involves the control of nodulation in response to nitrogen availability in the soil. Host plants can control several events during root nodule symbiosis under high conditions of nitrate, a major form of inorganic nitrogen in the soil. However, the underlying mechanism of the latter strategy is poorly understood.

To elucidate the genetic mechanisms involved in the nitrate-induced control of root nodule symbiosis, I conducted mutant screening using EMS-treated *L. japonicus* M₂ seeds and isolated novel mutant lines, designated as *nitrate unresponsive symbiosis 1 (nrSYM1)*. The mutants formed mature nodules even under nitrate-sufficient conditions. In the wild type, high concentrations of nitrate negatively regulated rhizobial infection, nodule number, nodule size, and nitrogen fixation activity. In contrast, these inhibitory effects were suppressed by the *nrSYM1* mutation, indicating that NRSYM1 mediates the pleiotropic control of root nodule symbiosis by nitrate. Then, I identified the *NRSYM1* as the responsible gene with a map-based cloning employing a genome-resequencing approach; this gene encodes a NIN-LIKE PROTEIN transcription factor. It is known that mutants involved in AON form nodules under high conditions of nitrate, in addition to the formation of an increased number of nodules. Moreover, expression of *CLE-RS2* is strongly induced by rhizobial infection as well as nitrate treatment. These previous studies suggest that the mechanism for nitrate-induced control of nodulation shares common elements with the AON. Detailed examination of the effects of nitrate on nodulation in AON-related mutants suggested that AON is involved in the inhibition of nodule number by nitrate, while other nitrate-affected processes are controlled through an AON-independent mechanism. The *nrSYM1* mutation affected nitrate-inducible *CLE-RS2* expression. Moreover, chromatin immunoprecipitation-qPCR and electrophoretic mobility shift assay showed that NRSYM1 directly bound specific-DNA motifs on the *CLE-RS2* promoter in a nitrate-dependent manner. The expression of *NRSYM1* was not induced by nitrate, suggesting post-translationally

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

regulation of NRSYM1. Furthermore, immunostaining of Myc-tagged NRSYM1 showed that this protein was predominantly localized in nuclei in the presence of nitrate. In contrast, NRSYM1 was barely detected in nuclei under nitrate-free conditions. Overall, these results indicate that NRSYM1 is activated by a nitrate-dependent nuclear localization mechanism and directly regulates the production of CLE-RS2, thereby triggering the negative regulation of nodule number through AON. In addition to the nitrate response during nodulation, NRSYM1 was shown to mediate a general nitrate response.

Second, novel *LjCLE* genes were identified that may influence nodulation through AON. A BLAST search using the amino acid sequence of a CLE domain from CLE-RS1 as a query found five new CLE peptides in *L. japonicus*. Among them, the expression of two *CLE* genes, named *CLE-RS3* and *LjCLE40*, was induced in roots inoculated with rhizobia. While *CLE-RS1* and *CLE-RS2* was expressed immediately and transiently after inoculation, *CLE-RS3* and *LjCLE40* expression was relatively delayed and sustained during nodulation. In addition, I found that *CLE-RS3* and *LjCLE40* expression was also responsive to nitrate. *CLE-RS3* was expressed at earlier nodulation stages than *LjCLE40*. As AON is known to occur during the early nodulation stages, the potential involvement of *CLE-RS3* in AON was examined. Constitutive expression of *CLE-RS3* in *L. japonicus* hairy roots significantly reduced nodule number in both transformed and untransformed roots, indicating systemic inhibition of nodulation. Conversely, the inhibitory effect by *CLE-RS3* was masked in the AON-related mutants such as *har1* and *too much love*. Thus, these results suggest that *CLE-RS3* is a novel component of AON in *L. japonicus* and acts as a potential root-derived signal in AON.

Taken together, in this study, I identified a key transcription factor involved in the nitrate-induced pleiotropic control of the root nodule symbiosis and a new candidate for root-derived signals acting in AON. These data will contribute to our understanding on the molecular framework describing how legumes respond to rhizobia and fluctuating nitrate environments to achieve proper plant growth.

マメ科植物は、窒素固定細菌である根粒菌を根粒と呼ばれる器官に細胞内共生させることで、安定的に窒素源を得ている。根粒器官形成や根粒菌による窒素固定反応には多くの光合成産物が消費されるため、植物は根粒共生に関する2つの負の制御系を用いて、根粒共生に付随する利益と損失のバランスを保つことが知られている。まず、Autoregulation of nodulation (AON)と呼ばれる根と地上部を介した全身的なシグナル伝達系を用いて、植物体あたりに着生する根粒数を成長に応じて適切に制御している。また、土壌中に硝酸などの窒素栄養が十分量存在するときには、根粒共生を止めることで根粒共生にともなう炭素源の流出を防いでいる。この、硝酸に応答した根粒共生の抑制は、古くから知られている現象である一方で、その制御に関わる分子機構の理解はあまり進んでいない。出願者はマメ科のモデル植物ミヤコグサを用いて、硝酸に応答した根粒共生抑制の制御機構の遺伝的解明を試みた。次に、AONに関わる新規因子の探索を試みた。

まず、出願者は硝酸が豊富に存在する土壌でも根粒を形成するような突然変異体のスクリーニングを行い、新規変異体 *nitrate unresponsive symbiosis 1 (nrsym1)* を単離した。*nrsym1* 変異体は、窒素栄養を含まない土壌では野生型と同様の根粒共生を示した。高濃度の硝酸を添加した場合、野生型の植物では根粒菌感染、根粒数、根粒発達、窒素固定活性が多面的に抑制されるのに対し、*nrsym1* 変異体はこれらすべての過程に耐性を示した。したがって、*NRSYM1* 遺伝子は、高濃度の硝酸に応答して引き起こされる根粒共生の多面的な抑制制御に関わることが判明した。次に、*nrsym1* 変異体の原因遺伝子を特定し、NIN-LIKE PROTEIN (NLP) と呼ばれるタイプの転写因子をコードすることを明らかにした。先行研究から、根粒数を制御する機構であるAONは、窒素栄養に応答した根粒共生の抑制にも関わっている可能性が示唆されている。野生型植物では、AONにおいて根粒菌の感染を根から地上部へ伝えるための根由来シグナルをコードする *CLE-RS2* 遺伝子の発現が、根粒菌の感染だけでなく硝酸によっても強く誘導される。一方、*nrsym1* 変異体では、硝酸を添加しても *CLE-RS2* 遺伝子の発現は誘導されないため、硝酸に応答した *CLE-RS2* 遺伝子の発現を *NRSYM1* が制御している可能性が示唆された。そこで、出願者は、*CLE-RS2* 遺伝子が *NRSYM1* の直接の標的遺伝子であるかを検証した結果、*NRSYM1* は硝酸に応答して *CLE-RS2* 遺伝子の発現を直接誘導し、AONと同様の機構を用いて全身的に根粒の数を制御していることを明らかにした。さらに、硝酸に依存した *NRSYM1* の細胞内局在を解析し、無窒素条件では核の外にいる *NRSYM1* が、硝酸に応答して核へ移行することを見出した。

次に、出願者は *in silico* スクリーニングにより、新たなミヤコグサ *CLE* 遺伝子を同定した。その中で、*CLE-RS3* と *LjCLE40* は根粒菌感染によって発現が誘導されることを発見した。また、毛状根形質転換法を用いて *CLE-RS3* を構成的に発現させると、*CLE-RS3* の構成的発現がシステミックに作用し、根粒数の著しい抑制現象が引き起こされることを見出した。*CLE-RS3* の構成的発現の影響は、*CLE-RS2* の受容体である *HAR1* などのAON因子に依存的であることも明らかにした。これらの結果から、*CLE-RS3* がAONにおいて機能する新たな根由来シグナルである可能性が示唆された。出願者による *NRSYM1* 転写因子の発見およびその機能解明は、長年未解明であった窒素栄養に応答した根粒共生の制御機構の

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

理解を大きく前進させるものである。CLE-RS3 の同定および機能解明は、AON を介した根粒数の制御の理解を深める成果と考えられる。以上より、本博士論文は、学位博士(理学)授与に相応しいと審査委員全員が一致して判断した。