

氏 名 Liu, Meng

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2119 号

学位授与の日付 2019 年 9 月 27 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 Investigation of the role of the AP2/ERF transcription factor  
ERN1 in the root nodule symbiosis signaling network of *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 上田 貴志  
特任准教授 吉田 聡子  
奈良先端科学技術大学院大学

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 Liu, Meng

論文題目 Investigation of the role of the AP2/ERF transcription factor ERN1 in the root nodule symbiosis signaling network of *Lotus japonicus*

(根粒共生の情報伝達ネットワークにおけるミヤコグサ AP2/ERF 転写因子 ERN1 の役割)

Legumes engage in symbiosis with nitrogen-fixing soil bacteria, collectively called rhizobia. Host legumes produce *de novo* root lateral organs, termed root nodules, to accommodate rhizobia. Endosymbiotic bacteria convert atmospheric dinitrogen into ammonium, which is usable by plants, in exchange for photosynthetic products. Root nodule formation requires two synchronized processes: rhizobial infection from the root epidermis and nodule primordium formation in the root cortex. In the model legume *Lotus japonicus*, rhizobia penetrate root tissues through infection thread (IT), a tubular invagination of the host cell wall and plasma membrane developed from infection foci of curled root hairs. IT formation is a critical step for establishment of the symbiotic relationship.

IT formation is regulated by symbiotic signal transduction in host roots. Nodulation factors (Nod factors) secreted by rhizobia are perceived by host receptors, including NFR1 on the plasma membrane, and thereby evokes  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in the nucleus. This  $\text{Ca}^{2+}$  signal is decoded by a protein kinase, CCaMK, which phosphorylates the transcription factor (TF), CYCLOPS, to activate its transcriptional activity. In a current model, CYCLOPS forms a large protein complex with DELLA, NSP1, and NSP2. CYCLOPS directly activates expression of two TF genes, *NODULE INCEPTION (NIN)* and *ERF REQUIRED FOR NODULATION1 (ERN1)*. These three TFs constitute a

network regulating gene expression. I characterized the phenotype of two allelic lines of *ern1* mutants. The mutants were defective in IT progression similar to that of *cyclops* and *nin* mutants, and exhibited a swollen root hair tip upon infection, which was not observed in *cyclops* and *nin*. Thus, ERN1 might play roles beyond the CYCLOPS–NIN/ERN1 transcription circuit. In this study, I explored the interplay among *CYCLOPS*, *ERN1*, and *NIN*, and how these genes coordinately contribute to IT formation.

I generated *cyclops-3 ern1-1* double mutant to investigate the genetic relationship between these TFs. The double mutant displayed a symbiotic root hair phenotype more severe than that of each single mutant, suggesting that although *ERN1* is a direct transcriptional target of *CYCLOPS*, *ERN1* also has independent roles in root hair deformation and IT formation.

The independent role of *ERN1* was also observed in *NIN* expression in response to rhizobial infection. *NIN* expression was induced in wild-type roots within one day after rhizobial infection. qRT-PCR analysis of *NIN* expression showed that this induction was attenuated in *cyclops-3*, consistent with a previous report. In addition, *NIN* expression was decreased in *ern1-1* and further declined in *cyclops-3 ern1-1*. These results suggest that ERN1 and CYCLOPS additively regulate *NIN* expression. Moreover, *ERN1* overexpression led to induction of *NIN* expression in *ern1-1* and *cyclops-3 ern1-1* in the presence of rhizobia. Thus, ERN1 has a capability to increase *NIN* expression upon infection in a CYCLOPS-independent manner. However, *ERN1* overexpression failed to induce *NIN* expression in *nfr1-3*, *ccamk-3*, and *nsp1-1* mutants (deficient in perception of Nod factors, transduction of Ca<sup>2+</sup> signals, and transactivation of symbiotic gene expression, respectively) suggesting that Nod factor signaling and NSP1 are necessary for ERN1 to influence *NIN* expression.

To investigate the functional relationship among the three TF genes in IT development, I conducted complementation tests using *cyclops-3*, *ern1-1*, and *nin-2*

mutants. Ectopic expression of *ERN1* and *NIN* suppressed the IT-deficient phenotype of *cyclops-3*. However, *ERN1* overexpression did not confer ITs in the *nin-2* roots. Hence, *ERN1* and *NIN* are sufficient for conferring ITs on *cyclops-3*. These results are consistent with the notion that *ERN1* and *NIN* are expressed downstream of *CYCLOPS* and *NIN* expression is regulated by *ERN1* in addition to *CYCLOPS*. However, the IT-defectiveness of *ern1-1* was not rescued by the *NIN* ectopic expression. *NIN* may require *ERN1* or its downstream genes to promote IT formation.

To explore the function of *ERN1*, I transcriptionally profiled wild-type plants and *ern1-6*. In total, 2554 differentially expressed genes were up-regulated in the wild type after infection. Among these genes, 260 genes were negatively affected in *ern1-6*. By comparing the RNA-seq data with publicly available transcriptome data for *nin-2* mutants, I determined that 46% of the differentially expressed genes in *ern1-6* were also *NIN*-dependent. This result was compatible with the notion that *ERN1* expression is upstream of *NIN* in *L. japonicus*, and suggests that their targets overlap.

Taken together, the results suggested that *CYCLOPS*, *ERN1*, and *NIN* operate in a transcriptional network that regulates gene expression and IT formation. *ERN1* performs functions independently of the *CYCLOPS*-mediated transcriptional regulation to induce *NIN* expression and to promote root hair deformation. *ERN1* and *NIN* have overlapped and different downstream genes. In addition, *ERN1* functions in parallel with *NIN*, as revealed by functional complementation. *ERN1* connects the infection signal with the *CYCLOPS*–*NIN* network for downstream gene expression.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 Liu, Meng

論文題目 Investigation of the role of the AP2/ERF transcription factor ERN1 in the root nodule symbiosis signaling network of *Lotus japonicus*

マメ科植物は共生器官である根粒に窒素固定細菌を内部共生させて大気窒素を利用する。この共生は根粒共生として知られ、根粒菌は初めに根毛に感染し、感染糸と呼ばれるチューブ様構造を介して根粒原基を形成する皮層細胞へ侵入する。この感染過程は共生関係の効率的な確立に必須であり、複雑な転写ネットワークによって制御される。出願者はミヤコグサ Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation 1 (ERN1) 転写因子が CYCLOPS、Nodule Inception (NIN) 転写因子とどのように関係しながら感染過程を制御しているのかを明らかにすることを目的とした。

既往研究によって、CYCLOPS が NIN あるいは ERN1 を正に転写制御する経路が提唱されていた。*cyclops*、*nin*、*ern1* 機能欠失変異体では共通して感染糸形成が不全となるが、根粒菌を捕らえるために起こる根毛の形態変化において異なる表現型を示す。そのためこれらの因子の転写ネットワークは単純な直線関係ではないと予想された。先ず出願者は *cyclops ern1* 二重変異体を作成した。二重変異体はそれぞれの単独変異体より著しい感染糸不全を示したことからこれらの因子がそれぞれ独立に感染糸形成を制御する可能性を見出した。

さらに出願者は根粒菌の感染によって誘導される NIN の発現が CYCLOPS 依存的であると同時に ERN1 にも依存することを明らかにし、ERN1 過剰発現が *cyclops ern1* 二重変異体において感染依存的に NIN の発現を上昇させたことから、ERN1 は CYCLOPS とは独立に NIN の発現を正に制御しうると結論付けた。

また、感染糸形成における機能的依存性を調べるため、それぞれの変異体で各転写因子を発現誘導した。*cyclops* の感染糸形成不全は ERN1 あるいは NIN を発現させた時に回復した。このことから、両因子が CYCLOPS を介した感染糸形成を代替しうることが示された。また、*nin* の感染糸形成不全は ERN1 の発現誘導では回復しなかった。これらの結果は ERN1 と NIN が CYCLOPS によって誘導されるとともに、NIN が ERN1 によって誘導されることを示している。しかし、NIN は *ern1* 表現型を抑圧できないことから、ERN1 は NIN 以外の因子も制御することが示唆された。

そこで、*ern1* と *nin* 変異体の各々と野生型とのトランスクリプトーム比較から、感染時に ERN1 が発現制御する遺伝子群のうち、46%しか NIN が発現制御する遺伝子と重複しないことを発見した。そして、NIN とは独立に ERN1 が発現を制御する 90 個の遺伝子を同定した。これらの中には expansin、formin や RhoGEF など細胞壁や細胞骨格の動態制御への関与が知られる因子が含まれており、これらの因子が ERN1 の制御を受け根毛の形態変化や感染糸形成に影響している可能性が考えられた。

以上の結果より、出願者は ERN1 による NIN の正の発現制御を明らかにするとともに、ER1 と NIN それぞれ独自の感染糸形成遺伝子群を推定した。このことは、ER1、CYCLOPS、NIN が従来のモデルよりも複雑な転写ネットワークを形成し、根毛を介した根粒菌の感染プロセスを制御していることを示している。本研究は根粒菌による感染過程転写ネットワークをより詳細に明らかにすることで、共生過程の分子機構解明における新しい局面を切り拓くものである。従って、本審査委員会では本博士論文について博士学位授与に十分値し合格であると判定した。