

氏 名 大熊 直生

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2250 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Studies on the mechanisms of shoot-mediated control of root
nodule symbiosis in *Lotus japonicus*

論文審査委員 主 査 長谷部 光泰
基礎生物学専攻 教授
川口 正代司
基礎生物学専攻 教授
上田 貴志
基礎生物学専攻 教授
大山 卓爾
東京農業大学 応用生物科学部 教授

(様式 3)

博士論文の要旨

氏 名 大熊 直生

論文題目 Studies on the mechanisms of shoot-mediated control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*

(ミヤコグサにおける根粒共生の地上部を介した制御機構に関する研究)

Leguminous plants engage in symbiosis with rhizobia, soil nitrogen-fixing bacteria in specialized organs, termed root nodules. In this symbiotic interaction, rhizobia fix atmospheric N₂ and provide the host plant with ammonium. In return, host plants supply photosynthates to rhizobia. This symbiosis enables legumes to thrive under nitrogen-limiting conditions. However, since N₂-fixation is a highly energy-consuming process, excess nodule formation is detrimental to the host growth. Legumes, therefore, tightly control nodule numbers using a root-shoot-root, long-distance signaling mechanism: autoregulation of nodulation (AON). In *Lotus japonicus*, the initial step of AON is the synthesis of root-derived mobile signals, CLV3/ESR-related (CLE) ROOT SIGNAL 1, 2, and 3 (CLE-RS1, 2, and 3) peptides, in response to either rhizobial infection or high nitrate concentrations in the roots. These CLE peptides are translocated into the shoot through xylem vessels and are perceived by a shoot-acting HYPERNODULATION ABERRANT ROOT1 (HAR1) receptor-like kinase. Consequently, TOO MUCH LOVE (TML) F-box/kelch repeat protein, expressing in roots, inhibits nodulation downstream of HAR1. *har1* and *tml* mutants produce excessive number of nodules, thereby those factors are necessary to restrict nodule numbers.

In this signaling system, the detailed regulatory mechanism of nodulation by the shoot in AON remains unclear. A microRNA, miR2111, that targets *TML* mRNA, is the most plausible shoot-derived factor in AON. Since the promoter activity of one miR2111 gene, *MIR2111-3*, is detected predominantly in leaves, the shoot-to-root translocation of miR2111 has been postulated to explain the shoot-mediated control of nodulation. However, whether *MIR2111-3* is a responsible locus for AON remains unclear. Moreover, the role of shoot-accumulating miR2111s in the systemic regulation of nodulation is unproven thus far.

Besides, it remains unknown what responses HAR1 triggers in the shoot, other than generation of shoot-derived factors controlling nodulation, through the perception of root-derived signals. Since the mutants of HAR1 and its orthologue of soybean show the

pleiotropic shoot phenotype such as smaller leaf size and leaf cell numbers, HAR1 in the shoots may have overlooked roles.

Herein, I firstly focused on the function of shoot-accumulated miR2111 to clarify the regulatory mechanism of nodulation from the shoot. Secondly, I searched genes regulated by HAR1 in leaves by RNA-seq and estimated their function to totally understand the functions of shoot-mediated signaling for AON.

Three miR2111 loci (*MIR2111-1*–*MIR2111-3*) have been reported in *L. japonicus*. To identify the loci responsible for AON, I first searched additional potential miR2111 genes and found four new miR2111 loci, *MIR2111-4*–*MIR2111-7*, on the *L. japonicus* genome through hairpin structure prediction by combining BLAST search and RNA-seq-based gene prediction. Of the seven miR2111 genes, *MIR2111-2*, *MIR2111-4*, *MIR2111-5*, and *MIR2111-7* were expressed in leaves, and the accumulation levels of these transcripts decreased after rhizobial inoculation in a HAR1-dependent manner. In contrast, the expression of *MIR2111-3* was below detectable level in my RNA-seq data. Although promoter activity of *MIR2111-3* is detectable in *L. japonicus* leaves, *MIR2111-3* may not strongly contribute to the production of miR2111 in leaves. *MIR2111-2* and *MIR2111-5* overexpression in hairy roots suppressed *TML* mRNA accumulation and significantly increased nodule numbers, whereas that of *MIR2111-4* did not influence nodulation. Of the seven miR2111 loci, *MIR2111-5* showed the highest levels of its primary transcripts in leaves. Thus, I hypothesized that *MIR2111-5* significantly contributes to the accumulation of mature miR2111s in leaves and roots. Using *MIR2111-5* promoter GUS assays, I found that *MIR2111-5* was expressed predominantly in the phloem of leaves. *mir2111-5* mutants reduced mature miR2111 levels in both leaves and roots to < 50% of those observed in the wild-type, and significantly decreased the nodule and infection thread numbers compared to those in the wild-type. Furthermore, grafting experiments demonstrated that wild-type rootstock grafted with *MIR2111-5*-overexpressing scion showed increased nodules and mature miR2111s and lower *TML* mRNA levels. The production of mature miR2111s in leaves by *MIR2111-5* is therefore necessary for the systemic control of nodulation and mature miR2111 levels in roots. Taken together, this study clearly showed the systemic effect of shoot-accumulating miR2111 on nodulation and determined that *MIR2111-5* is a highly contributing locus for AON.

Secondly, to elucidate functions of HAR1 in the shoot other than the production of shoot-derived factors controlling nodulation, I searched for upregulated genes that depended on HAR1 using RNA-seq analysis of *L. japonicus* leaves. Only two potential HAR1

downstream factors, miR2111, and *IPT3* encoding cytokinin biosynthetic enzyme, has been reported. I found that 261 genes were upregulated in leaves due to *CLE-RS1/2* overexpression as well as rhizobial inoculation or nitrate treatment in a HAR1-dependent manner. I have estimated function of these genes and these results could shed light on a new role of HAR1 in the leaves that is distinct from the control of nodulation.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名

大熊 直生

Title
論文題目

Studies on the mechanisms of shoot-mediated control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*

マメ科植物は窒素固定細菌である根粒菌と共生することで、大気中の窒素を利用することができる。この共生関係は宿主植物に極めて有益である一方、窒素固定には多くの光合成産物が消費されるため、過剰な根粒の形成は宿主植物の成長を著しく阻害する。宿主植物は共生バランスを保つため、根粒形成のオートレギュレーション (AON) とよばれる機構で根粒の数を最適化している。AON は「葉」を介した遠距離フィードバック制御となっており、モデルマメ科植物のミヤコグサでは、根粒菌の感染や硝酸処理によって誘導される CLE-RS1、CLE-RS2 ペプチドが根から葉に伝達されるとそれを HAR1 が受容し、次に HAR1 が根にシグナル因子を伝達することで根粒の数を制御するモデルが提唱されている。しかしながら、AON における葉由来の遠距離シグナル因子の実体や作用機作並びに葉を介して全身的に根粒形成を制御する意義などは明らかにされていない。近年、根で根粒形成を負に制御する TML の mRNA を標的とするマイクロ RNA 「miR2111」が、葉から根への遠距離シグナル因子として提唱された。しかし、葉に蓄積した「miR2111」が全身的に根粒形成を制御しうるのは、根粒制御に寄与する「miR2111」の前駆体遺伝子は何かについては不明であった。

出願者は、AON の分子機構を明らかにするために「miR2111」を介した葉からの根粒形成制御機構の解明を試みた。先行研究により、ミヤコグサにおいては、3 つの *MIR2111* 遺伝子 (*MIR2111-1*~*MIR2111-3*) が報告されていた。出願者は、BLAST と RNA-seq による遺伝子予測と BLASTn による類似性検索により未知の *MIR2111* 遺伝子を探索し、さらにミヤコグサのゲノム上に新たに 4 つの新規 *MIR2111* 遺伝子 (*MIR2111-4*~*MIR2111-7*) を特定した。これら 7 つの遺伝子のうち、*MIR2111-2*、*-4*、*-5*、*-7* は葉で発現しており、根粒菌の感染によって成熟型「miR2111」の蓄積量は HAR1 依存的に顕著に減少した。またそのうちの *MIR2111-5* は葉で最も強い発現レベルを示し、プロモーター-GUS アッセイにより、葉の篩部で主に発現している一方、根での発現は検出されなかった。次に、ゲノム編集技術を用いて *MIR2111-5* の欠失を試みた。欠失系統 (*mir2111-5*) では、葉と根の両方で成熟型「miR2111」の蓄積量が野生型の 50% 以下に低下した。更に欠失系統では、野生型と比較して根粒数と感染糸数が有意に減少した。「miR2111」の葉からの影響を調べるため、接ぎ木試験により、*MIR2111-5* を過剰発現させた穂木を接ぎ木した。その結果、野生型の台木では、根粒数と成熟型「miR2111」量が増加し、TML の mRNA 量が減少することがわかった。以上の結果から、葉での *MIR2111-5* による成熟型「miR2111」の産生が、根の成熟型「miR2111」の蓄積に反映され根粒形成をシステム的に制御することが示された。以上、出願者は地上部に蓄積する「miR2111」の根粒形成制御に対するシステム的な効果を証明し、

*MIR2111-5*が AON に寄与する主要遺伝子座であることを明らかにした。

続いて、葉を介して全身的に根粒形成を制御する意義を明らかにするために、ミヤコグサの葉の RNA-seq 解析によって HAR1 に依存して発現誘導される遺伝子を探索した。これまで、葉での発現が HAR1 によって制御されている遺伝子は、*MIR2111* とサイトカニン生合成遺伝子 *IPT3* のみだった。出願者は、新たに 261 の遺伝子が HAR1 に依存して葉で発現誘導されていることを見出した。特定したこれら遺伝子群の機能推定から、根粒形成の制御が何故葉を介して行われるかの手がかりを得た。本研究は遠距離シグナル伝達を介した根粒形成制御をより詳細に明らかにすることで、共生維持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値し合格であると判定した。