

氏 名 後藤 崇支

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2425 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 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 Auxin methylation during establishment and evolution of root
nodule symbiosis

論文審査委員 主 査 上田 貴志
基礎生物学専攻 教授
川口 正代司
基礎生物学専攻 教授
重信 秀治
基礎生物学専攻 教授
林 謙一郎
岡山理科大学 生命科学部 生物科学科 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Goto, Takashi

論文題目 Auxin methylation during establishment and evolution of root nodule symbiosis

(根粒共生の成立過程と進化におけるオーキシンメチル化)

Leguminous plants attract nitrogen-fixing bacteria called rhizobia, which are accommodated in root nodules. Rhizobia supply ammonium to host plants, and the host provide a home and photosynthates to rhizobia. This relationship called “root nodule symbiosis” is evolutionarily acquired in the nitrogen-fixing clade, and highly conserved in the legumes. Root nodule symbiosis involves organogenesis, through a combination of rhizobial infection in root epidermis and subsequent primordium formation in root cortex. In epidermis, attached rhizobia are entrapped in infection chambers of deformed root-hairs. Rhizobia then penetrate tissues, through infection threads (ITs, plant-derived intracellular tube-like structures). Concomitantly, in cortex, developmental reprogramming is initiated. Cortical cell division occurs to form nodule primordium and also provides an indispensable scaffold for IT progression from epidermis to cortex. Cortical cell division occurs just below the site of rhizobial infection in epidermis. Spatiotemporal coordination across epidermis and cortex is needed for establishment of root nodule symbiosis, but little is known about the molecular mechanism.

A symbiotic mutant “*daphne*”, isolated from the model legume *Lotus japonicus*, has uncoupled symbiotic events in epidermis and cortex, in that it promotes excessive IT formation in epidermis but does not produce nodule primordia in cortex. Therefore, *daphne* should be useful for exploring unknown mechanisms and signals that coordinate these different events across tissues. Here, I firstly conducted a time-course

transcriptome analysis of non-inoculated and post inoculated *daphne* roots, and identified genes that showed differential expression patterns in *daphne* and wild-type. Secondly, I focused on *IAMT1*, *IAA carboxyl methyltransferase 1 (IAMT1)*, one of the most differentially expressed gene (DEG), and analyzed *IAMT1* and auxin methylation in root nodule symbiosis.

Hierarchical clustering of 1,076 genes extracted from the transcriptome analysis revealed four subgroups, based upon expression patterns: In cluster I (473 genes), transcript levels increased at 1 day after inoculation (DAI) in wild-type but increased to a greater extent and more transiently in *daphne*. In cluster II (204 genes), transcription was activated at 1 DAI in *daphne* whereas, in wild-type, transcription was unchanged or attenuated. Cluster III included 222 genes that were more highly up-regulated in wild-type than *daphne*. Cluster IV grouped 177 genes that displayed temporal up-regulation in wild-type but for which expression was not altered in *daphne*. Genes associated with epidermal infection, such as those involved in IT formation and/or those acting from infected epidermis to cortex, may be included in clusters I and III, which show increased expression in wild-type. In addition, genes involved in excessive epidermal infection in *daphne* are most likely to be included in cluster I.

I focused on *Lj2g3v3222870*, which encodes IAMT1, one of the most differentially expressed DEGs in cluster I. IAMT1 is an enzyme that converts auxin (IAA) into its methyl ester (MeIAA). Phylogenetic analysis suggested that *IAMT1* is duplicated in the legume lineage, and two paralogs were named *IAMT1a* and *IAMT1b*. *IAMT1a* was induced by rhizobial infection, and mainly expressed in root epidermis. *IAMT1a* knockdown by RNAi inhibited cortical events such as nodule and its primordium formation, but not epidermal infection. The finding that *IAMT1a* was mainly expressed in epidermis but its function is critical in cortex suggests that *IAMT1a*

may be involved in coordinated epidermal and cortical regulation. LC/MS-MS successfully detected MeIAA in roots infected with rhizobia, with higher amounts in *daphne* than wild-type. Constitutive expression of MeIAA demethylase gene inhibited nodule formation. In addition, exogenous MeIAA induced expression of *NIN* gene, a key regulator of cortical cell division, without rhizobia. These data indicate the importance of auxin methylation in root nodule development and its evolution.

IAMT1 has previously been reported to serve an important function in shoot development of *Arabidopsis*. A gene duplication of *IAMT1* in the legume lineage may have resulted in the evolutionary acquisition of auxin methylation in roots and its involvement in nodule symbiosis. Legumes have developed epidermal infection systems to escort rhizobia in the process of acquiring the current nodulation systems. In parallel, legumes may have acquired a coordinated epidermal and cortical regulation system, which might have helped to combine the epidermal infection system acquired by the legume with the developmental program that acquired in the nitrogen-fixing clade. My study provides a new molecular and evolutionary basis for the coordination of infection and development in the establishment of root nodule symbiosis.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 後藤 崇支

Title
論文題目 Auxin methylation during establishment and evolution of root nodule symbiosis

マメ科植物は、共生微生物である根粒菌を誘引し、根に窒素固定器官「根粒」を形成することで、窒素栄養の乏しい環境に適応することができる。「根粒共生」と呼ばれるこの関係は、ブナ目、バラ目、ウリ目、マメ目よりなる窒素固定クレードにおいて進化的に獲得されたが、特にマメ科植物において広く維持されていることが特徴である。

マメ科植物の根粒共生成立過程では、根の表皮への根粒菌感染と、根の皮層での原基形成とが組み合わされて共生器官が形成される。皮層での細胞分裂は根粒菌が感染した表皮の直下で見られること等から、共生の過程で表皮-皮層の時空間的連携が行われていると推測されるが、そのシグナル伝達機構は明らかにされていない。

出願者は、表皮での根粒菌感染と皮層での器官発生をつなぐシグナル伝達の探索を試みた。マメ科モデル植物ミヤコグサの共生変異体 *daphne* は、表皮での根粒菌感染は過剰に生じるが、皮層での発生イベントが進行しない変異体である。つまり *daphne* は表皮-皮層間の共生現象が不連続な変異体であり、表皮-皮層の時空間的連携に関わるシグナル伝達を探索する上で *daphne* は有用な実験材料となると考えた。

まず、出願者はミヤコグサの野生型と *daphne* とを用いた時系列 RNA-seq を行い、共生過程での遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、オーキシンメチル化酵素 (*IAMT1*) が野生型と *daphne* の根で異なる発現動態を示すことを見出した。また分子系統学的解析によりマメ科系統において *IAMT1* の遺伝子重複が起こっていること、重複遺伝子のうちの片方 (*IAMT1a* と命名) が根粒菌感染後に根で誘導されることを明らかにした。

次に出願者は *IAMT1a* の機能解析を行なった。RNAi 法を用いて *IAMT1a* の発現を抑制すると、根粒形成が強く抑制され、*daphne* と同様に根粒菌が皮層へと侵入できず表皮で停滞している様子が観察された。これまで、オーキシン (indole-3-acetic acid: IAA) のメチル化は、細胞内のオーキシンを減らす“不活化プロセス”であると考えられてきたが、根粒共生の初期過程において、IAA methyl ester (MeIAA) は表皮から皮層へと働きかけることが示唆された。そこで、LC-MS/MS 解析により、オーキシンのメチルエステル体である MeIAA が、実際に感染根で作られているかを調べた。その結果、根粒菌の過剰な感染が見られる *daphne* の根で MeIAA が野生型より多く蓄積していることを検出することに成功した。さらに、MeIAA をミヤコグサの根に投与すると、根粒菌が存在しない状況でも、根粒形成の鍵遺伝子である *NIN* 遺伝子の発現が有意に誘導された。

本研究により、表皮での感染と皮層での発生という異なる現象をつなぐ新たなシグナル伝達と分子が見えてきた。シロイヌナズナの研究では *IAMT1* が葉や茎の偏差成長に関与することが報告されているが、マメ科植物の系統における *IAMT1* の遺伝子重複は、根におけ

るオーキシンメチルエステル化の機能や根粒共生に寄与した可能性がある。今後 *IAMT1* の遺伝子重複の起源や、MeIAA を起点としたシグナル伝達を解明することで、根粒共生成立の分子機構と進化の解明が進むと期待される。また本研究は、これまで一括りに不活化プロセスと見なされていたオーキシンの二次代謝に新たな光を当てる成果である。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、合格であると判断した。