

窒素固定にตอบสนองしてシュートで発現する miRNA の同定と機能解析

深谷 夢夏（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・目的】

硝酸やアンモニアなどの窒素栄養は生体内で同化されタンパク質の合成に用いられる。特に植物ではクロロフィルの構成要素ともなり生育には欠かせないものである。ダイズやミヤコグサで知られるマメ科植物は、窒素固定を行う根粒菌と共生関係を築くことで低窒素土壌下でも生育に十分な窒素栄養を得ることができる。マメ科植物と根粒菌の間でみられるこの関係を根粒共生という。

植物は根粒菌から窒素栄養をもらう見返りとして、光合成で産生した炭素栄養を根粒菌に与えている。このギブアンドテイクの関係が植物にとって不利益に働かないよう、すなわち、窒素栄養が必要ない状況なのに根粒菌にむやみに炭素栄養を与えることがないよう、マメ科植物は窒素栄養にตอบสนองした根粒共生の制御機構を持つとされている[1]。根粒菌からの窒素栄養が必要でない状況とは、高窒素土壌下において植物自身で十分な窒素栄養を供給できる場合や根粒菌からもらう窒素栄養が十分に足りている場合などがあり、植物では体外と体内の窒素栄養にตอบสนองした制御が行われていると考えられる。

移動ができない陸上植物が変動する周りの環境にตอบสนองして生育するためには、地上部と根のコミュニケーションが必要不可欠である。植物体内では mRNA、転写因子や低分子ペプチドなどのシグナル因子が器官間を移動することで情報を共有しており、根粒形成においても遠距離シグナルによる根と葉を介した根粒共生制御システムが知られている。根粒菌感染にตอบสนองして働くシグナル因子の1つとして、miRNA である miR2111 が知られている[2]。miRNA の中には師管を介して全身へ輸送されるものがあり、移動先の器官や組織で標的とする遺伝子の発現を直接制御する。miR2111 はシュートで発現して根に移動し、根粒形成抑制因子 TML の発現を抑制することで、根粒形成を促進している。移動性低分子の miRNA はあらゆる生物で様々な生物学的プロセスを制御する機能が確認されており、miR2111 以外の miRNA が根粒共生の全身的な制御に関与している可能性は高い。

この研究では、体内の窒素栄養にตอบสนองしてシュートで発現し、根粒共生を制御する miRNA の発見を目指した。これにより、根粒共生における新たな遠距離シグナル制御機構を解明することを目的とした。

【材料・方法】

ミヤコグサ *Lotus japonicus* wild-type MG-20

根粒菌 ・ *Mesorhizobium loti* wild-type (以下 WT 株とする)

・ Fix-mutant Δ NifH (以下 Δ NifH 株とする)

Δ NifH 株はニトロゲナーゼが機能しないため、根粒は形成するが窒素固定を行わない根粒菌である。植物に WT 株を感染させたときと Δ NifH 株を感染させたときで、根粒形成に関与する因子はどちらの場合も働くが、根粒菌由来の窒素栄養にตอบสนองして共生を制御する因子は WT 株を感染させた場合でのみ働くと考えられる。

非感染、WT 株感染、 Δ NifH 株感染の3つの条件でミヤコグサを11日間栽培し、その後、地上部全体をサンプリングして RNAseq および Small RNAseq 解析を行った。3条件のうち WT 株感染でのみ発現が変化する miRNA を同定した。

RT-PCR

上記、解析によって同定した miRNA について、WT 株の根粒菌を感染させたミヤコグサを経過ごとにサンプリングして RT-PCR を行い、継続的な発現パターンを調べた。

また、根粒菌非感染で硝酸またはアンモニアを処理した土壌で栽培したミヤコグサをサンプリングして RT-PCR を行い、窒素栄養にตอบสนองした発現パターンを調べた。

過剰発現体の作成

解析候補の miRNA について毛状根形質転換法により過剰発現体を作成した。この過剰発現体を様々な条件で栽培し、根粒形成の様子や植物体の生育度合いなどの表現型を観察した。

機能喪失体の作成

解析候補の miRNA について CRISPR-Cas9 システムを用いた機能喪失体の作成を試みた。

【結果・考察】

RNAseq および Small RNAseq 解析の結果、WT 株感染でのみ発現が増加する miRNA と発現が減少する miRNA をそれぞれ同定した。そのうち1つについては、機能喪失体の作成に成功した。

結果の詳細は当日報告する。

【展望】

今後は、同定した miRNA の詳細な機能解析を進めるとともに、miRNA が直接制御する標的遺伝子の同定を行うことで、miRNA が関与する一連の制御機構を解明していきたい。さらに、miRNA の移動性や器官ごとの機能を調べるために接木実験を行ってきたい。また、今回解析対象としなかった miRNA の中でも、未知の遠距離シグナル機構に関わり共生を制御するものが存在するかもしれない。今回とは異なる指標から候補を絞り、根粒共生における miRNA の関与と機能を追究していきたい。

根粒共生は低窒素環境下での植物の生育を可能にすることから、幅広い植物に適用することができれば農業に大きな利益をもたらすと考えられる。共生の制御機構に関わる因子の発見は、農業利用の実現に向けた大切な1歩だと考えている。

【参考文献】

[1] Misawa et al. The Plant Cell, 34, 1844-1862(2022)

[2] Okuma et al. Nature communications, 11, 5192(2020)