©2024 筑波大学生物学類

硝酸に応答した根粒形成の抑制制御に関わる硝酸トランスポーター遺伝子の解析

落合　美智（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】

マメ科植物は根粒菌と共生関係を築き、根粒を形成する。この共生関係において、根粒菌は大気中に存在する窒素を固定し、植物が利用可能な形で提供する。これに対して、植物は、根粒菌へ光合成産物を提供する。この相利的な共生関係により、植物は土壌の窒素源のみに依存せず、効率的に窒素栄養を獲得することができる。その一方で、土壌に硝酸などの窒素栄養が豊富に存在する環境下では、植物は土壌から直接窒素栄養を吸収できるため、根粒菌由来の窒素栄養は不要であり、光合成産物というコストのみを支払う関係となる。このような環境条件への対応として、植物では硝酸に応答して根粒形成を抑制することが知られている。

マメ科のモデル植物であるミヤコグサ（*Lotus japonicus*）の、硝酸に応答した根粒形成抑制には、転写因子である NIN-LIKE PROTEIN 1 (LjNLP1)、LjNLP4 と硝酸トランスポーターの NITRATE TRANSPORTER 2.1 (LjNRT2.1)が機能していることが、先行研究より明らかになっている[(1)]。まず、細胞内の硝酸イオンに応答して、LjNLP1 が活性化し、*LjNRT2.1* の発現を誘導する。これによって、LjNRT2.1 が生成され、細胞膜に局在して硝酸トランスポーターとして機能することで、硝酸イオンの細胞内への取り込みが加速する。細胞内硝酸イオン濃度の上昇に応答して、LjNLP4 は細胞質基質から核へと移行し、根粒形成に関連するいくつかの遺伝子発現を制御する。このようなプロセスによって、ミヤコグサでは硝酸に応答した根粒形成の抑制が成り立っていると考えられている。その一方で、LjNLP1 は *LjNRT2.1* 以外の硝酸トランスポーター遺伝子の発現を制御する可能性も示唆されており、本制御系の分子機構の全容解明には至っていない。

シロイヌナズナなど他の植物では、NRT2.1 と同じく硝酸トランスポーターである NRT3.1 が NRT2.1 と相互作用し、協調的に機能するという知見がある[(2),(3)]。その一方で、マメ科植物では、NRT3.1 の機能は未解明である。このような背景のもと、本研究では所属研究室で作出された、*Ljnrt3.1* ノックアウト体の選抜を行い、ミヤコグサにおける *NRT3.1* 遺伝子の機能解析を行った。

【方法】

・*Ljnrt3.1* 変異体の選抜

CRISPR-Cas9 システムによって変異が導入された T_0 世代の個体をシーケンスし、*Ljnrt3.1* 変異体の探索を行った。そして、変異の入っている系統を継代し、T_1 世代のシーケンス結果と種子形成量の観点から、*Ljnrt3.1* 変異体の選抜を行った。

・硝酸応答に関する表現型観察

ミヤコグサの野生型系統である MG20、*Ljnrt2.1* 変異体、*Ljnrt3.1* 変異体と根粒菌（*Mesorhizobium loti*）を用いて実験を行った。

種子を滅菌処理後、一晩吸水させ、1%アガー培地に播種した。この培地を遮光し、2 日経過後、個体を根粒菌処理と硝酸処理をしたバーミキュライトに植え替え、栽培した。硝酸条件は、KNO_3 0 mM と 10 mM の 2 条件を設定した。そして、ポットへの植え替えから 3 週間後、根粒と地上部の表現型の観察を行った。

・トランスアクチベーションによる *LjNRT3.1* 発現制御における NLP 転写因子の関与の検討

MG20 の種子を、表現型観察と同様の方法で吸水、播種し、遮光条件で 2 日経過後、KNO_3 10 mM の硝酸処理のみをしたバーミキュライトに植え替え、根粒菌非感染条件で 2 週間栽培した。この個体から、プロトプラストを抽出し、トランスアクチベーションに用いた。

トランスアクチベーションは、エフェクターとして、LjNLP1、LjNLP4 、 GFP（対照条件）、レポーターとして LjNRT3.1pro:NanoLUC を設計し、35Spro:GUS の結果でノーマライズを行った。

【結果・考察】

・*Ljnrt3.1* 変異体の選抜

T_0 世代のシーケンスの結果、14 系統中 4 系統で変異が確認できた。これらの T_1 世代のシーケンス結果と種子形成量から、変異がホモで保存されている 1065-10 と 2 種類の変異をヘテロで持つ 1065-5#3 の 2 系統を *Ljnrt3.1* 変異体として選抜した。

硝酸応答に関する表現型観察とトランスアクチベーションの結果については、発表会にて報告する。

【展望】

Ljnrt3.1 変異体として選抜した 1065−5#3 について、2 種類の変異をヘテロで持つ変異体であることから、次代の個体を用いて、変異がホモで固定された系統の探索を行う。また、*LjNRT3.1* の誘導メカニズムについて、さらなる実験を行い、LjNLP1、LjNLP4 と *LjNRT3.1* の関係を検討したい。

これに加えて、毛状根形質転換による遺伝子の過剰発現実験などを通して、LjNRT2.1 と LjNRT3.1 の相互作用や協調的な機能の有無についても調べていきたいと考えている。

【参考文献】

(1) Misawa F. *et al.* The Plant Cell. 34, 1844-1862, (2022).
(2) Krouk G. *et al.* Plant Physiology. 142, 1075-1086, (2006).
(3) Okamoto M. *et al.* Plant Physiology. 140, 1036-1046, (2006).