

根粒形成における負の制御系

寿崎拓哉¹・西田帆那^{1,2}

¹筑波大学 生命環境系

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

²総合研究大学院大学 生命科学研究所

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

Molecular mechanisms involved in negative regulation of nodulation

Key words: Autoregulation of nodulation, legume, *Lotus japonicus*,
nodule development, root nodule symbiosis

Takuya Suzuki¹, Hanna Nishida^{1,2}

¹Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572, Japan

²School of Life Sciences, Graduate School for Advances Studies

Nishigonaka 38, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Aichi, Japan

1. はじめに

根粒は、植物が土壤細菌の根粒菌と共生する過程において形成され、2種の生物間の栄養交換の場として機能する。一般的に真核生物は、体内に大気中の窒素ガスをそのままの形で取り入れることができないのに対し、マメ科などの一部の植物は、根粒を介して根粒菌が固定した窒素ガスをアンモニウムイオンなどの水溶性の窒素源として利用することが可能である。したがって、根粒菌と共生している状態では窒素栄養の乏しい環境においても生育することができる。根粒形成は、宿主特異性が厳密に決まった根粒菌が、そのパートナーである植物に感染することによって、根の一部の組織が脱分化し、根粒原基を形成するための細胞分裂の開始などの根粒発生プログラムが誘導される。根粒形成の誘導に関わる機構（正の制御系）に関しては、過去の総説を参照されたい（Brewin 1991, Crespi & Frugier 2008, Oldroyd 2013, Suzuki & Kawaguchi 2014, 寿崎&川口 2015）。

根粒は、植物に窒素源を供給する器官として機能する一方で、根粒を形づくるための発生プロセスや、根粒内部に細胞内共生した根粒菌が行う窒素固定反応においては、それらのエネルギー源として光合成産物である炭素源が使われる。したがって、植物側からすると、根粒形成は窒素源の供給という恩恵をもたらしてくれる一方で、本来自身の成長に利用されるべきはずの炭素源が根粒形成に搾取されるというコストを伴う。植物は、根粒形成に必要以上の炭素源を消費されることなく、効率よく窒素源を獲得するために、根粒をほどよい数に保つ機構を備えていることが古くから知られている。また、土壤中に十分な窒素栄養が存在する場合は、共生を介さずに窒素源を利用することができるため、根粒形成を停止することも知られている。近年の、主としてモデルマメ科植物ミヤコグサを用いた研究の進展により、前者の根粒の数を保つ制御系の分子メ

T. Suzuki & H. Nishida-1

カニズムの理解が進んできた。本稿では、これらの根粒形成の負の制御系について紹介する。

2. Autoregulation of nodulation (AON)

AON は、根と地上部（シート）を介した長距離シグナル伝達系をその制御系の基本骨格としており、植物体あたりに着生する根粒の数をコントロールするマメ科植物に広く保存された遺伝的機構である（図 1; Caetano-Anolles & Gresshoff 1991, Oka-Kira & Kawaguchi 2006, Ferguson et al. 2010, Suzuki et al. 2015）。AON では、根粒菌が植物の根に感染すると、根由来シグナルと呼ばれるシグナル分子の産生が誘導され、根由来シグナルが導管を通り根から地上部へと移行する。地上部において根由来シグナルがその受容体によって認識されると、シート由来のシグナル分子の産生が誘導され、それが篩管を通り地上部から根へと運ばれる。根に到達したシート由来シグナルは根粒形成に抑制的に作用することで、不必要的根粒形成が行われるのを防ぐと考えられている。Suzuki らは、ミヤコグサを用いた split-root という手法により、根を文字通り 2 つに分けて、それぞれの根に時間差をおいて根粒菌を感染させ、一方の根の根粒菌感染が他方の根の根粒形成に与える影響を調べた（Suzuki et al. 2008）。その結果、少なくとも 3 日間の時間差をおくと、遅れて感染させた方の根の根粒形成の抑制がみられ始め、5 日以上の時間差をおくと、根粒形成の十分な抑制効果がみられることがわかった。この結果は、AON を介した根粒形成の抑制が目で見える形にまで現れるまでには、根粒菌の感染後 3 日ほどの日数を要することを示している。この間、根粒菌感染による根由来シグナル産生、根由来シグナルのシートへの移動、シート由来シグナルの産生と根への移動といった分子レベルの事象が起こることが推察される。

ミヤコグサの *HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HARI)* 遺伝子は、コードするタンパクが最初に特定された AON 関連遺伝子である（Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002）。*hari* 変異体では、過剰な数の根粒が着生し、植物の成長が著しく阻害される。*hari* 変異体では、根粒菌非感染時における植物の成長は比較的正常なことから、根粒菌感染時における成長阻害は、過剰な根粒形成に起因していると考えられる。野生型と*hari* 変異体を用いた接木実験により、地上部を *hari* 変異体に用いた時においてのみ根粒の過剰着生が観察されたことから、地上部において機能する *HARI* 遺伝子が根粒数の制御に関わることが考えられる。*HARI* 遺伝子は、leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) をコードしており、非マメ科植物におけるその同祖遺伝子は、シロイヌナズナでは *CLAVATA1 (CLV1)*、イネでは *FLORAL ORGAN NUMBER 1* といった茎頂分裂組織の幹細胞の恒常性維持に関わる遺伝子である（Clark et al. 1997, Krusell et al. 2002, Nishimura et al. 2002, Suzuki et al. 2004; Oka-Kira & Kawaguchi 2006）。*HARI* 遺伝子は、茎頂分裂組織ではほとんど発現しておらず、また *hari* 変異体では、茎頂分裂組織の維持に関連する表現型に顕著な異常はみられない。さらに、*HARI* 遺伝子の特定後、ダイズやタルウマゴヤシなど他のマメ科植物においても *HARI* の同祖遺伝子が、根粒数の制御に関わることが示された（Searle et al. 2003, Schnabel et al. 2005）。したがって、非マメ科植物では茎頂分裂組織の維持に働く主要制御遺伝子の1つが、マメ科植物では根粒数の制御系で働くと結論づけられる。このことは、根粒形成の進化の過程で、茎頂分裂組織の維持の主要制御遺伝子が根粒数の制御系に流用されたと言換えることができるかもしれない。

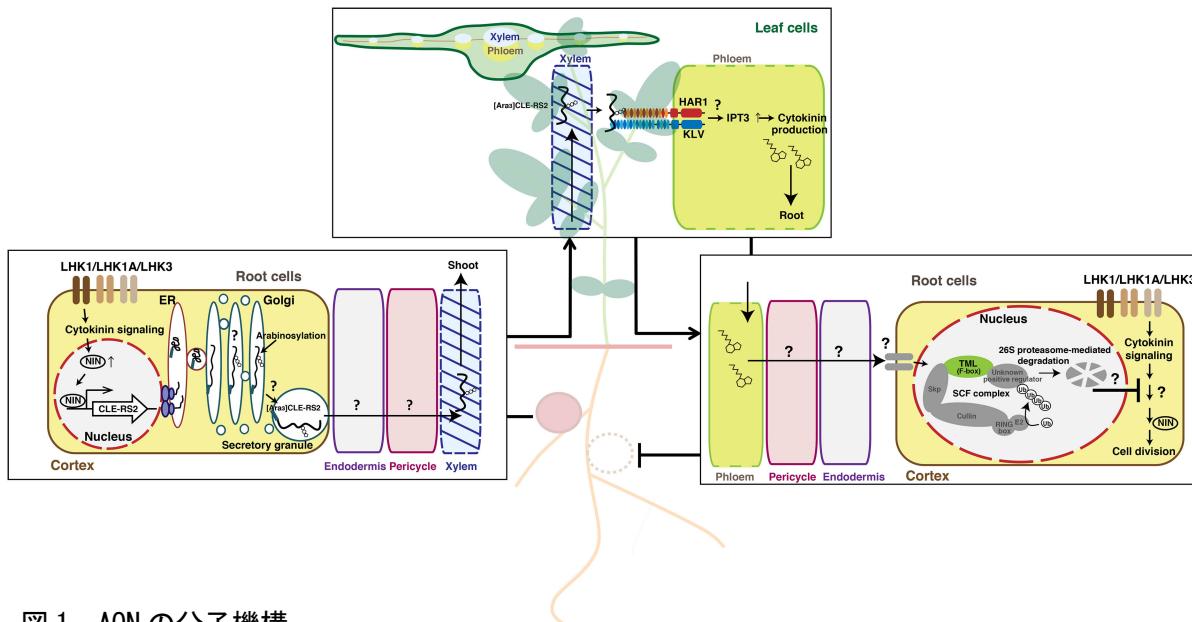


図1. AONの分子機構

シロイヌナズナでは、CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE) ファミリーに属する低分子ペプチドである CLV3 が CLV1 のリガンドとして機能することが知られている (Ogawa et al. 2008)。CLV3 と CLV1 は茎頂分裂組織において、それぞれ幹細胞領域およびその下層の細胞群で発現し、CLV シグナル伝達系を介した細胞間コミュニケーションが幹細胞の維持に必須な機能を担う (Clark et al. 1997, Fletcher et al. 1999)。HAR1 遺伝子が特定された時分では、既に CLV1 と CLV3 の遺伝的な相互関係がある程度判明していたため、HAR1 のリガンド候補として CLE ファミリーに着目するのは AON 研究の必然的な流れであったと思われる。Okamotoらは、ミヤコグサのゲノム中から39種の CLE 遺伝子を同定し、根粒菌感染に応答した発現パターンを網羅的に調べた (Okamoto et al. 2009)。その結果、*CLE-ROOT SIGNAL 1 (CLE-RS1)*, *CLE-RS2* と名付けた2つの CLE 遺伝子の発現が、根粒菌感染特異的に誘導されることを突き止めた。毛状根形質転換系によって、この2つの遺伝子をそれぞれ構成的に発現させると、いずれの遺伝子においても形質転換根だけでなく非形質転換根の根粒形成が著しく抑制されることがわかった。このことは、*CLE-RS1/2* の構成的発現による根粒形成の抑制がシステム的に作用することを示している。*CLE-RS1/2* による根粒形成の抑制は、*har1* 変異体の背景ではみられないことから、*CLE-RS1/2* は HAR1 を介して機能することが示唆された。また、その後の研究により、CLE ドメイン由来の12アミノ酸から成るアラビノース化された糖ペプチドが活性型の CLE-RS2 ペプチドであることが判明し、さらにそれが HAR1 と結合することも明らかとなった (Okamoto et al. 2013)。さらに、*CLE-RS2* を根において構成的に発現させた植物の導管液から、活性型の CLE-RS2 ペプチドが検出されたことから、CLE-RS2 ペプチドが根からショートヘッド実際に移動し得ることが示され、CLE-RS2 が根由来シグナルの有力候補であることが示唆された。HAR1 遺伝子は葉の節部組織で発現することから (Nontachaiyapoom et al. 2007)、葉の節部組織において CLE-RS2 と HAR1 の相互作用が起こると考えられる。現在のところ、*CLE-RS1* については、活性型の構造は決定されておらず、導管液中に存在する可能性も未解明であるが、活性型の CLE-RS2 ペプチドを構成する CLE ドメイン由来の12アミノ酸の配列が CLE-RS1 と -RS2 は同

一であること、各遺伝子の構成的発現の表現型が非常に類似していることから、*CLE-RS1* も *-RS2* と同様に根由来シグナルとして機能する可能性が高い。

CLE-RS1/2 の発現誘導機構についても、近年理解が進んできた。RWP-RK タイプの転写因子である NODULE INCEPTION (NIN) は、根粒形成の正の制御因子として機能する一方で、*CLE-RS1* および *CLE-RS2* のプロモーター領域に直接結合し、これら 2 つの遺伝子の発現を誘導する働きをもつことが示されている (Schäuser et al. 1999, Soyano et al. 2013, Soyano et al. 2014)。したがって、NIN は標的遺伝子を使い分けることにより、根粒形成の正と負の両方の制御を仲介することが考えられる。今後は、NIN が時空間的に具体的にどのようなメカニズムにより、根粒形成の正負両方の制御を可能にしているのかが解明されることを期待したい。

ミヤコグサでは、これまでのところ、*har1* 変異体に加えて *klavier (klv)* と *too much love (tml)* と名付けられた 2 つの根粒過剰着生変異体が単離されている (Oka-Kira et al. 2005, Magori et al. 2009)。*har1* 変異体とそれぞれの 2 重変異体の解析から、*KLV* および *VML* はともに *HAR1* と同一の経路で働くことが示されている。また、接木実験の結果、*KLV* はショットにおいて機能し、*VML* は根のしかも *HAR1* の下流において機能することも判明した。*KLV* は LRR-RLK をコードし、シロイヌナズナにおける *KLV* 同祖遺伝子 *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2)* は茎頂分裂組織の維持に関わる (Kinoshita et al. 2010, Miyazawa et al. 2010)。*klv* 変異体では、*CLE-RS1/2* による根粒形成阻害がみられず、また、*KLV* と *HAR1* は物理的な相互作用をすることが示されている。したがって、*CLE-RS1/2* は *HAR1* と *KLV* を構成因子とする受容体複合体によって認識される可能性が考えられる。*klv* 変異は非共生時にも多面的な異常を呈し、帶化を引き起こす茎頂分裂組織の維持の異常、葉脈の形態異常、花成の遅延などが観察される (Oka-Kira et al. 2005)。これらの表現型は *har1* 変異体ではみられないことから、*KLV* は発生過程に応じて相互作用するタンパク質を変えて働く可能性が推察される。*VML* 遺伝子は、Kelch リピートをもつ F-box タンパク質をコードする (Takahara et al. 2013)。一般的に、F-box タンパク質は、SKP1, CULLIN, E3 ユビキチンリガーゼから構成される SCF 複合体の構成因子として機能し、標的タンパク質の分解に関わると考えられている。*VML* を含む SCF 複合体の標的タンパク質の特定は、AON の分子メカニズムの理解に大きく貢献する可能性がある点で、今後の重要な課題といえる。

AONにおいて機能することが想定されているショット由来の根粒形成抑制物質 (Shoot-derived inhibitor; SDI) の産生が *CLE-RS1/2-HAR1* のシグナル伝達系の制御下にあると仮定すると、*har1* 変異体では SDI の産生が抑えられ、逆に *CLE-RS1/2* の構成的発現では SDI の産生が促進されることが予想される。Sasaki らは、*har1* 変異体、*CLE-RS1* または *-RS2* の構成的発現体を用いて、地上部の植物ホルモンを網羅的に定量し、サイトカイニン合成系の中間産物である iPRPs の量が、*har1* 変異体では減少し、逆に *CLE-RS1* または *-RS2* の構成的発現体では増加することを発見した (Sasaki et al. 2014)。また、合成サイトカイニンであるベンジルアデニンを子葉の切り口から投与したところ、濃度依存的な根粒形成の抑制がみられた。*tml* 変異体において同様のサイトカイニン投与実験を行っても根粒形成の抑制がみられなかったことから、サイトカイニンが作用するためには *VML* が必要であることが示唆された。さらに、標識したサイトカイニンが、実際にショットから根端まで長距離移動し得ることも明らかとなった。サイトカイニン生合成経路では、isopentenyltransferase (IPT) が iPRPs の合成に重要な役割を担うことが知られている。ミヤコグサ

では、根粒菌感染依存的にシートにおいて *IPT3* の遺伝子の発現が誘導されることもわかつた。これらの結果は、CLE-RS1/2-HAR1 の下流において、サイトカイニンの合成が促進され、それが SDI 様の機能をもつことを示唆している。

SDI の特定が長らくの重要課題であった AON 研究において、本研究はサイトカイニンが SDI の分子実体の 1 つである可能性を提示した点でインパクトのある成果をもたらしたと思われる。その一方で、未解決の重要な課題を残している。というのも、根粒形成研究のごく初期から様々な研究によりサイトカイニンは根粒形成の正の制御因子として働くことが明確に示されており (Suzaki et al. 2013)、本研究結果はこれらの先行研究結果と矛盾する。サイトカイニンが根粒形成に正に作用することを示した例として、サイトカイニンが直接添加された根や、サイトカイニンシグナル伝達系を構成的に活性化させるような遺伝的背景では、根粒発生プログラムが自発的に誘導され、根粒様の構造が形成されることが知られている (Tirichine et al. 2007, Heckmann et al. 2011)。また、サイトカイニン受容体の多重変異体では、根粒形成が完全に抑圧されることから、サイトカイニンシグナリングの活性化は根粒形成に必要十分と理解されている (Held et al. 2014)。

地上部由来のサイトカイニンがどのような作用機構により根粒形成を負に制御するのかは全く不明である。地上部由来のサイトカイニンによって誘導される二次的な因子が実際の SDI として働く可能性も考えられる。続報の発表を期待したい。

3. 窒素栄養による根粒形成の抑制

土壤中に窒素栄養の 1 つである硝酸イオンが過剰に存在すると、根粒共生が阻害されることが古くから知られている。高濃度の硝酸イオンは根粒形成の様々な側面に作用し、根粒発生の開始、根粒の肥大成長、窒素固定活性などを阻害し、根粒の老化を促進する (図 2)。本現象は、ダイズを用いて生理学的な解析が進められており、日本語でわかりやすく書かれた総説が発表されているので参照していただきたい (大山ら 2006)。これらの阻害は可逆的な作用であり、培地に硝酸イオンを添加した場合、根粒の肥大成長や窒素固定活性は急速に抑制され、無窒素条件に戻すと速やかに回復することが明らかにされている (Fujikake et al. 2002)。

硝酸イオンによる根粒共生の抑制は、「局所的阻害」と「全身的阻害」に大別される。局所的阻害は、硝酸イオンに直接接觸している根や根粒で強く起こり、根に硝酸イオンが高濃度に蓄積することや、根粒表皮から吸収された硝酸イオンが皮層に集積することによりもたらされると考えられている (Ohyama et al. 1993, Mizukoshi et al. 1995)。一方、全身的阻害は根粒着生部位とは異なる根に与えられた硝酸イオンによって引き起こされる間接的な阻害である。Yashima らは、ダイズを用いた二重ポット実験を行い、根を上下二つのポットに分けて、それぞれに無窒素または 5 mM 硝酸培地を与えた。下部ポットに硝酸培地を処理した場合、上部ポットには直接硝酸イオンを与えていないのにも関わらず根粒共生の抑制が観察された。このことから、硝酸イオンに接觸していないとも根全体の窒素栄養状態を感じし十分な量の硝酸イオンが供給されている場合には根粒共生が抑制されることが示唆されている (Yashima et al. 2003)。また、硝酸イオンの添加によって根粒に分配される光合成産物量が減り、代わりに側根への分配量の増加が観察されることなどから、硝酸イオン添加による光合成産物の根粒への供給低下が共生阻害に関与する可能性が示されている (Fujikake et al. 2003)。さらに、グルタミンやアスパラギンといった硝酸イオンの同

化産物によるフィードバック阻害や、根粒内への酸素供給量の低下など、本現象の理解に向けた種々の作業仮説が提唱されている (Schuller et al. 1988, Vessey et al. 1988, Bacanamwo & Harper 1997, Neo & Layzell 1997, Gordon et al. 2002)。

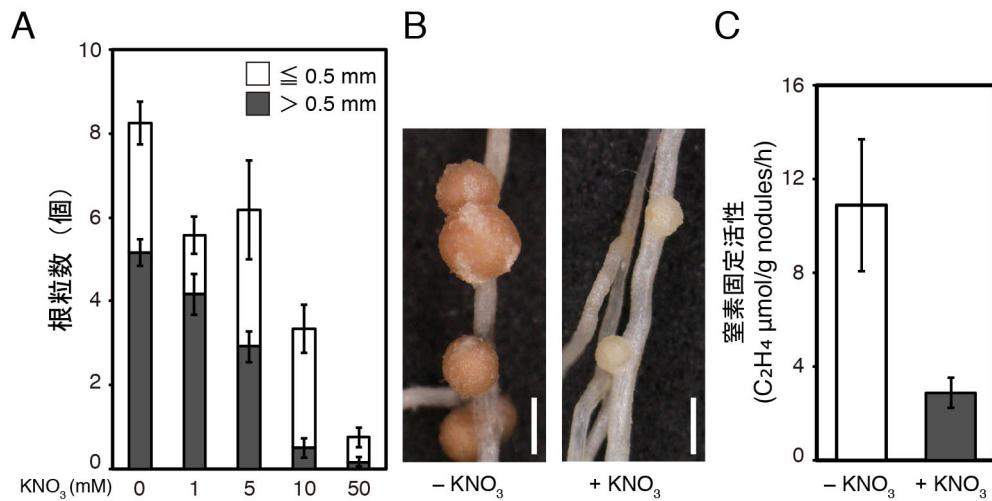


図2. 硝酸が野生型ミヤコグサ (MG-20) の根粒共生に与える影響.

(A) 根粒数, (B) 根粒サイズ, (C) 窒素固定活性. (A), (B) 根粒菌感染と同時に KNO₃ (B では 10 mM の KNO₃) を処理後 21 日目の表現型. (C) 成熟根粒形成後 10 mM の KNO₃ を 24 時間処理し、窒素固定活性を測定. Scale bars = 1 mm.

現代の農法における農作物の生産時には多量の窒素肥料が使用されており、窒素肥料の生成時に多くの化石燃料が消費されることによって多量の二酸化炭素が排出され、また、過剰に施肥された窒素肥料が河川や地下水に流れ込み環境汚染を引き起こしている。大気中の窒素を利用する共生窒素固定作用は、環境保全型の作物生産にとって重要な生物的機能となり得る。しかしながら、共生窒素固定のみで安定的に多収量を確保することが困難なため、化学態の窒素肥料に依存したマメ科作物の栽培が行われているのが現状である。そこでは、窒素肥料に含まれる硝酸態窒素は根粒共生を抑制するため、生物的な窒素固定作用のメリットを活かすことができない。窒素栄養による根粒共生抑制の機能解明と知見の利用によって共生窒素固定能力を活用した低窒素肥料施肥農法が可能になれば、持続可能な農業実現の一助となることが期待される。

3-1. 硝酸による根粒形成の抑制における AON の関与

窒素栄養による根粒形成の抑制については、前述のように生理学研究の歴史的経緯がある。具体的な分子メカニズムという点では、理解は非常に乏しいものの、本現象と AON の接点が示唆されている。AON に関わる遺伝子の突然変異体は根粒過剰着生が顕著な表現型として観察される。その一方で、高濃度の硝酸存在下でも根粒形成数の減少が起こらない、つまり硝酸耐性を示すことも知られている (Magori et al. 2009)。実際に、サイズの根粒過剰着生の突然変異体が *nitrate-tolerant symbiotic (nts)* と名付けられていることからも推測されるように、そもそもそれらの変異体は高濃度の硝酸イオン存在下でも根粒形成を行うサイズ変異体スクリーニングによって単

離されている (Carroll et al. 1985)。後に、*nts* 変異体の 1 つの原因遺伝子は *HAR1* の同祖遺伝子として LRR-RLK をコードすることが判明し、*nodule autoregulation receptor kinase (nark)* 変異体と改名されている (Searle et al. 2003)。また、根粒菌感染誘導性の *CLE-RS2* 遺伝子は、硝酸を与えただけでも発現誘導を受けることがわかっている (Okamoto et al. 2009)。これらの点から、硝酸に応答して AON を介して根粒形成を抑制する制御系の可能性が示唆されている。根粒数のコントロールが主たる機能である AON によって本現象の一側面を説明できる可能性がある一方で、AON に依存した研究のみでは多面的に作用する本現象の全容を理解するのは困難と思われる。

3-2. 硝酸による根粒形成の抑制に関する遺伝的機構

我々は、窒素栄養に応答した根粒形成抑制の分子メカニズムを理解することを目的に、最近、高濃度の硝酸存在下においても根粒形成を行うミヤコグサ突然変異体のスクリーニングに着手し、*nitrate tolerant (nit)* と名付けた新規な硝酸耐性変異体を単離している (図 3)。根粒を過剰に形成する AON 変異体とは異なり、正常な数の根粒が形成されることが本変異体の特徴である。*nit* 変異体を用いることにより、硝酸による根粒形成の抑制の様々な側面にアプローチすることが可能であると考えられる。将来的には、得られた知見や作成した材料を利用して、窒素肥料施肥と共生窒素固定を併用した農法が実現する可能性を期待している。

4. おわりに

本稿では、根粒形成を負に制御する機構に焦点を当てて近年得られている知見を概説した。AON に関しては、この数年の研究の進展によって、根由来シグナル、その受容機構、SDI (の候補)、関連因子が示され、分子基盤を理解する上で役者が揃ってきた印象がある。AON は、植物の遠距離シグナル伝達系のわかりやすい例といえるので、分野外からも注目されるような研究成果が今後ももたらされることを期待したい。その一方で、窒素栄養による根粒形成の抑制は、分子レベルでわかっていることは少ない。筆者らが単離した *NIT* 遺伝子の機能解析の研究が、そのメカニズムの解明の一助となることを期待して研究を進めていきたい。

5. おわりに

本稿で紹介した筆者らの研究は、基礎生物学研究所・川口正代司教授の協力を得て行われたものです。この場を借りて感謝いたします。

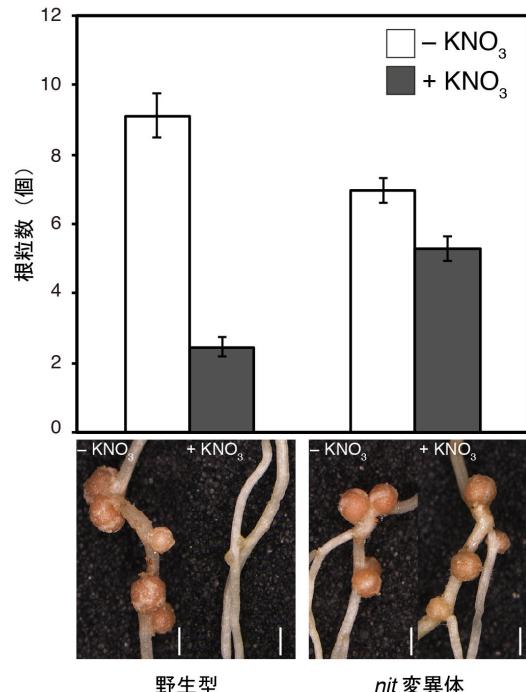


図 3. *nit* 変異体の表現型.

根粒菌感染と同時に 10 mM の KNO₃

を処理後 21 日目の表現型.

Scale bars = 1 mm.

引用文献

- Bacanamwo, M., & Harper, J.E. 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100: 371-377.
- Brewin, N.J. 1991. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 191-226.
- Caetano-Anolles, G., & Gresshoff, P.M. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 345-382.
- Carroll, B.J., McNeil, D.L., & Gresshoff, P.M. 1985. Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4162-4166.
- Clark, S.E., Williams, R.W., & Meyerowitz, E.M. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.
- Crespi, M., & Frugier, F., 2008. De Novo organ formation from differentiated cells: root nodule organogenesis. *Sci. Signal.* 1: re11.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., & Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61-76.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., & Meyerowitz, E.M. 1999. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.
- Fujikake, H., Yashima, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. 2002. Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N₂ fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 211-217.
- Fujikake, H., Yamazaki, A., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Matsuhashi, S., Ito, T., Mizuniwa, C., Kume, T., Hashimoto, S., Ishioka, N.S., Watanabe, S., Osa, A., Sekine, T., Uchida, H., Tsuji, A., & Ohyama, T. 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J. Exp. Bot.* 54: 1379-1388.
- Gordon, A.J., Skøt, L., James, C.L., & Minchin, F.R. 2002. Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *J. Exp. Bot.* 53: 423-428.
- Heckmann, A.B., Sandal, N., Bek, A.S., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M.W., Tirichine, L., & Stougaard, J. 2011. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1385-1395.
- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M.S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L., & Szczyglowski, K. 2014. *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell* 26: 678-694.
- Kinoshita, A., Betsuyaku, S., Osakabe, Y., Mizuno, S., Nagawa, S., Stahl, Y., Simon, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Fukuda, H., & Sawa, S. 2010. RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development* 137: 3911-3920.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata,

- S., de Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., & Stougaard, J. 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420: 422-426.
- Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., Tanaka, A., Sato, S., Tabata, S., & Kawaguchi, M. 2009. *TOO MUCH LOVE*, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 259-268.
- Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G.J., Sato, S., Hayashi, M., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, K., Sawa, S., Fukuda, H., & Kawaguchi, M. 2010. The receptor-like kinase KLAVIER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development* 137: 4317-4325.
- Mizukoshi, K., Nishiwaki, T., Ohtake, N., Minagawa, R., Ikarashi, T., & Ohyama, T. 1995. Nitrate transport pathway into soybean nodules traced by tungstate and $^{15}\text{NO}_3^-$. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41: 75-88.
- Neo, H.H., & Layzell, D.B. 1997. Phloem glutamine and the regulation of O_2 diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113: 259-267.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., & Kawaguchi, M. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429.
- Nontachaiyapoom, S., Scott, P.T., Men, A.E., Kinkema, M., Schenk, P.M., & Gresshoff, P.M. 2007. Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 769-780.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., & Matsubayashi, Y. 2008. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319: 294.
- Ohyama, T., Nicholas, J.C., & Harper, J.E. 1993. Assimilation of $^{15}\text{N}_2$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ by partially nitrate-tolerant nodulation mutants of soybean. *J. Exp. Bot.* 44: 1739-1747.
- 大山卓爾, 伊藤小百合, 大竹憲邦, 末吉邦 2006. 硝酸イオンによるダイズ根粒の肥大生長と窒素固定活性の阻害機構. 化学と生物 44: 752-759.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K.-i., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., & Kawaguchi, M. 2005. *klavier (klv)*, a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J.* 44: 505-515.
- Oka-Kira, E., & Kawaguchi, M. 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 496-502.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., & Kawaguchi, M. 2009. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50: 67-77.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. 2013. Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat. Commun.* 4: 2191.
- Oldroyd, G.E.D. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic

- associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 252-263.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. 2014. Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat. Commun.* 5: 4983.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402: 191-195.
- Schnabel, E., Journet, E.-P., Carvalho-Niebel, F., Duc, G., & Frugoli, J. 2005. The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* 58: 809-822.
- Schuller, K.A., Minchin, F.R., & Gresshoff, P.M. 1988. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soyabean cv. Bragg and a supernodulating mutant: effects of nitrate. *J. Exp. Bot.* 39: 865-877.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., & Gresshoff, P.M. 2003. Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299: 109-112.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & Hayashi, M. 2013. NODULE INCEPTION directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* 9: e1003352.
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. 2014. NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 14607-14612.
- Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y., & Hirano, H.-Y. 2004. The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* CLAVATA1. *Development* 131: 5649-5657.
- Suzaki, T., Ito, M., & Kawaguchi, M. 2013. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.* 4: 42.
- Suzaki, T., & Kawaguchi, M. 2014. Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 16-22.
- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316: 111-158.
- 寿崎拓哉, 川口正代司 2015. 根粒初期発生における細胞リプログラミング機構. *BSJ Review* 6A: 63-71.
- Suzuki, A., Hara, H., Kinoue, T., Abe, M., Uchiumi, T., Kucho, K.-i., Higashi, S., Hirsch, A.M., & Arima, S. 2008. Split-root study of autoregulation of nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* 121: 245-249.
- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takeda, N., Suzaki, T., & Kawaguchi, M. 2013. TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 54: 433-447.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., &

- Stougaard, J. 2007. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315: 104-107.
- Vessey, J.K., Walsh, K.B., & Layzell, D.B. 1988. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean. *Physiol. Plant.* 74: 137-146.
- Yashima, H., Fujikake, H., Sato, T., Ohtake, N., Sueyoshi, K., & Ohyama, T. 2003. Systemic and local effects of long-term application of nitrate on nodule growth and N₂ fixation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 49: 825-834.