

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20868

研究課題名(和文)ダイズとの共生相互作用を調節する根粒菌のタンパク質分泌機構

研究課題名(英文) Rhizobial protein secretion systems regulating symbiotic interaction with soybean

研究代表者

菅原 雅之 (Sugawara, Masayuki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90742776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒菌のRj2遺伝型ダイズに対する共生不和合性は、根粒菌の3型分泌エフェクターNopPの3つのアミノ酸残基が決定していることを明らかにした。またRj2遺伝型ダイズは、根粒形成初期に不和合性根粒菌から分泌されるNopPの特異的なアミノ酸残基を、抵抗性タンパク質を介して認識し、免疫系を活性化させることで不和合性根粒菌による根毛からの侵入を拒絶していることがわかった。ダイズ根粒菌の6型分泌系の機能については、遺伝子破壊株を用いた解析からダイズ根粒の成熟に関与する可能性が示唆された。本課題により、根粒菌のタンパク質分泌系が及ぼすダイズとの共生相互作用への機能について一定の理解が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根粒菌とマメ科植物の共生相互作用における宿主特異性に3型分泌エフェクターが関与することが知られていたが、本成果から、エフェクターとNBS-LRR型抵抗性タンパク質を介した免疫系「エフェクター誘導性免疫」が機能していることを初めて実験的に示すことができた。さらにRj2タンパク質によるNopPの認識機構が、植物と病原菌の相互作用には例のないメカニズムで制御されている可能性が考えられることから、病原菌の認識機構の理解への貢献が期待される。また本成果は、根粒共生の共進化と、優良な根粒菌を利用したダイズ増収への応用技術の開発につながる重要な知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that a rhizobial type III-secretory protein NopP is a causal factor of symbiotic incompatibility with Rj2-genotype soybean plants. The analysis of nopP mutations and variants in a culture collection reveal that three amino acid residues (R60, R67, and H173) in NopP are required for Rj2-mediated incompatibility. Complementation of rj2-soybean by the Rj2 allele confers the incompatibility induced by USDA122-type NopP. In response to incompatible strains, Rj2-soybean plants activate defense marker gene PR-2 and suppress infection thread number at two days after inoculation. These results suggest that Rj2-soybeans monitor the specific variants of NopP and reject bradyrhizobial infection via effector-triggered immunity mediated by Rj2 protein. In addition, the results of a mutational analysis suggest that the bradyrhizobial Type VI secretion system may be involved in the maturation of nitrogen-fixing nodules.

研究分野：応用微生物学

キーワード：根粒菌 タンパク質分泌系 ダイズ エフェクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の3型および6型タンパク質分泌機構(T3SSおよびT6SS)は、動物や植物細胞に対してエフェクターと呼ばれる一連のタンパク質を打ち込む分泌装置である。病原菌の3型分泌エフェクターは、宿主の免疫系を抑制させることで自身の侵入を容易にする作用がある。宿主側は病原菌に対抗するため、特異的なエフェクターに対応したNBS-LRR型抵抗性タンパク質を獲得し、さらに強力な免疫系(エフェクター誘導性免疫)を誘導し、自身を病原菌の侵入から防いでいる。つまり宿主と病原細菌の間では、その和合性と不和合性がエフェクターと宿主免疫を介した進化的なせめぎ合いのもとに決定してきたと考えられている。一方で近年の微生物ゲノム情報の蓄積により、これらT3SSおよびT6SSをコードする遺伝子が根粒菌を含む多くの植物共生細菌においても存在することが明らかとなった。根粒菌のT3SSは、宿主植物種に依存した根粒形成に関与することが知られていたが、植物共生におけるタンパク質分泌系の機能と存在意義については十分に明らかとされていない。そこで本課題では以下2点の研究背景から、ダイズ根粒菌のT3SSとT6SSの機能を明らかにする。

(1) 根粒菌3型分泌タンパク質が及ぼす共生不和合性の分子機構

ダイズの根粒形成を誘導する *Bradyrhizobium* 属根粒菌のうち、*B. diazoefficiens* USDA122株を含む特定の菌株は、*Rj2* 遺伝型ダイズ品種に対して根粒形成を誘導できない「共生不和合性」を示すことが1960代より知られている。我々の研究グループは、不和合性根粒菌株 USDA122の3型分泌系構造体をコードする遺伝子(*rhc*)を破壊することで、*Rj2*ダイズに対する共生不和合性が解除されることを報告した(Tsukui et al. 2013)。一方で、植物側の *Rj2* 遺伝子がTIR-NBS-LRRドメインを有するRタンパク質をコードすることが明らかとされた(Yang et al. 2010)。これらの知見から、植物が病原菌から身を守る手段の1つであるエフェクター誘導性免疫が共生不和合性の要因であることが推測された。しかし、30種以上のエフェクターを分泌するとされる *Bradyrhizobium* 属根粒菌から、*Rj2*ダイズに共生不和合性を誘導する原因エフェクターは同定されていないため、共生不和合性の詳細な分子機構について明らかとされていない。

(2) ダイズ根粒菌6型分泌機構の共生相互作用における働き

系統的に幅広く、植物との親和性が高いとされる *Bradyrhizobium* 属のうち、ダイズと共生する根粒菌種は共通してT6SS遺伝子がゲノム上に保存されている。T6SSは一般的に真核細胞への病原性に加え、他の細菌種を殺す作用が知られているため、ダイズ根粒菌においては宿主植物との共生相互作用や土壌における生存競争にT6SSを利用している可能性がある。

2. 研究の目的

本課題では *Bradyrhizobium* 属根粒菌のダイズとの共生相互作用におけるT3SSとT6SSの機能に明らかにすることを目的とし、(1) *Bradyrhizobium* 属根粒菌と *Rj2* 遺伝型ダイズとの共生不和合性を誘導する3型分泌エフェクターの同定と、宿主Rタンパク質を介した宿主免疫系が共生不和合性の誘導に関わるか否かの検証、及び(2)ダイズ根粒菌T6SSの、ダイズへの根粒形成能の評価と、他の微生物に対する殺菌作用について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 根粒菌3型分泌タンパク質が及ぼす共生不和合性の分子機構

USDA122株の共生不和合性を克服する突然変異株は、USDA122株をHardeeに接種した際に低頻度で形成された根粒から単離した。突然変異株ゲノム上の変異箇所の特定は、イルミナMiSeqを用いたドラフトゲノム配列をUSDA122の完全長ゲノム配列(Sugawara et al. 2017)と比較して行った。特定した変異箇所は、PCRとサンガーシーケンスにより別途確認した。エフェクターをコードする根粒菌遺伝子破壊株、および点変異株は自殺ベクターpK18mob、およびpK18mobsacBを利用した相同組換えにより構築した。根粒菌のダイズあるいは他のマメ科植物種に対する共生能は、パーミキュライトに播いた種子に対して根粒菌培養液を接種し、4週間栽培後の根における根粒着生数、着生根粒重、およびアセチレン還元法による窒素固定活性測定を行い調査した。根粒菌の感染過程の追跡には、GUS標識根粒菌を接種したダイズ苗をグロースポーチ内で栽培し、X-Gluc染色を施した2~7日間後の根を顕微鏡にて観察した。植物防御マーカー遺伝子の発現は、根粒菌接種後2~7日間栽培した根よりRNAを抽出し、定量逆転写PCR法により調査した。

(2) ダイズ根粒菌6型分泌機構の共生相互作用における働き

Bradyrhizobium 属細菌のT6SS遺伝子の破壊株は自殺ベクターpK18mobsacBを利用した相同組換えにより構築した。根粒菌のダイズに対する共生能は、上記と同様に種子に対して根粒菌培養液を接種し、栽培4週間後の根における根粒着生を調査して評価した。根粒菌T6SSによる大腸菌K12株に対する殺菌機能は、根粒菌と大腸菌を寒天プレート上で競合培養を行い、数時間から数日後の大腸菌の生育菌数をコロニーカウントにより計測した。

4. 研究成果

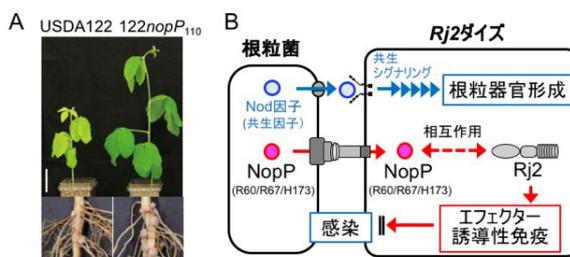
(1) 根粒菌3型分泌タンパク質が及ぼす共生不和合性の分子機構

Rj2 サイズ品種 Hardee と共生不和合性を示す原因となる *Bradyrhizobium* 属根粒菌 USDA122 株の 3 型分泌エフェクターを同定するため、共生不和合性を克服する USDA122 の突然変異株を 8 株取得した。そのうち 6 株のゲノム上には T3SS をコードする *rhc* 遺伝子の変異が認められ、T3SS の機能を失っていた。一方で、残りの 2 株には *rhc* 遺伝子への変異は認められず、3 型分泌エフェクターをコードする *nopP* への変異が認められた。USDA122 の *nopP* 破壊株 (122 Δ *nopP*) を新たに作製したのち Hardee に接種を行った結果、USDA122 野生株と比べて明らかに多くの成熟根粒の形成が認められた。また、USDA122 株が NopP エフェクターを T3SS 依存的に細胞外へ分泌することを、抗 NopP 抗体を使用したウエスタンブロット解析により明らかとした。以上より、USDA122 のエフェクター-NopP が *Rj2* サイズとの共生不和合性を誘導する因子であることが明らかとなった。

nopP 遺伝子は、ゲノム情報がデータベースに蓄積されているほぼ全ての *Bradyrhizobium* 属 *Rj2* サイズ根粒菌のゲノム上に存在していた。しかし共生不和合性を示す USDA122 と、正常に根粒形成を示す近縁株 USDA110 の間には、NopP のアミノ酸 277 残基中 4 残基に違いが認められた。そこで、両菌株間で *nopP* を交換した根粒菌変異株を作製したところ、USDA110 の *nopP* を USDA122 型遺伝子に交換した株 (110*nopP*₁₂₂) は Hardee に対して共生不和合性を示し、一方で USDA122 株の *nopP* を USDA110 型遺伝子に交換した変異株 (122*nopP*₁₁₀) は正常に根粒形成を誘導した(図 A)。したがって USDA122 の *Rj2* サイズに対する共生不和合性は、NopP エフェクターの特異的なアミノ酸残基によることが明らかとなった。また、根粒菌カルチャーコレクション菌株の NopP アミノ酸配列と Hardee に対する共生表現型解析を行ったところ、USDA122 の USDA110 と違いが見られた 4 残基のうち、R60、R67、H173 を NopP に含む根粒菌が共生不和合性を示すことがわかった。これは USDA122 のアミノ酸残基置換点変異株の解析からも同様の結果が得られた。以上より、USDA122 型 NopP タンパク質の R60、R67、H173 残基が、*Rj2* サイズとの共生不和合性を決定していることが明らかとなった。

NopP により誘導される共生不和合性が、宿主の *Rj2* タンパク質を介しているか否かを検証した。アグロバクテリウムを介して *Rj2* 遺伝子を導入した *rj2* サイズの毛状根は、USDA122 の接種によって根粒を着生せず、和合性菌株 122*nopP*₁₁₀ は有意に根粒形成を誘導した。同様に *rj2* 遺伝子を導入した *Rj2* サイズ毛状根にはいずれの菌株を接種しても根粒形成が認められた。本結果は、NopP による不和合性が *Rj2* タンパク質を介して引き起こされることを示すものである。さらに、*Rj2* サイズは不和合性菌株に应答した防御応答マーカー遺伝子 *PR2* の発現上昇を示し、加えて、根粒菌の根毛からの侵入を示す「感染系」の形成数が和合性菌株に比べて著しく低下していた。

以上の結果より、*Rj2* サイズは根粒菌の 3 型エフェクター-NopP の特異的なアミノ酸残基の違いを、*Rj2* を介して認識し、植物病原応答と同様の免疫系(エフェクター誘導性免疫)を用いて共生する根粒菌を選抜していることが示唆された。本成果は、根粒菌とマメ科植物の共生相互作用において、3 型分泌エフェクターと NBS-LRR 型抵抗性タンパク質を介した免疫が作用していることを示す初めての実験的な知見であること、及び根粒共生の共進化と *Rj2* 増収への応用技術の開発につながる重要な知見である。本成果をまとめた論文は Nature Communication 誌に掲載された (Sugawara *et al.* 2018)。



(A) 不和合型 *nopP* を持つ根粒菌 (USDA122) と、その遺伝子を和合型 *nopP* に交換した根粒菌 (122*nopP*₁₁₀) を接種した *Rj2* サイズ。
(B) 根粒菌と *Rj2* サイズの共生不和合性メカニズム。

(2) *Rj2* サイズ根粒菌新規 6 型分泌機構の共生相互作用における働き

6 型分泌系構造体をコードする遺伝子 (*imp*) を、NCBI Genbank データベースに蓄積されている *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノム情報から探索した。その結果、本属の *Rj2* サイズ根粒より単離されたほとんどの株から *imp* 遺伝子群が見出され、光合成細菌や非根粒菌ゲノムには見出されなかった。次に主要な *Rj2* 菌種である、*B. diazoefficiens*、*B. japonicum* および *B. elkanii* における *imp* 遺伝子の破壊をそれぞれ行い、*Rj2* サイズ品種エンレイに対して接種試験を行った。その結果、栽培 4 週間後の着生根粒数には野生株と比べて目立った違いは見出されなかったが、一部の菌種においては着生した根粒のサイズに違いが見受けられた。したがって、T6SS はエンレイに対する感染初期段階には影響しないものの、根粒の成熟に影響を及ぼしている可能性が考えられた。次に、他の細菌に対する殺菌作用について検討するため、根粒菌と大腸菌 K12 株の共培養を行った。その結果、共培養開始 4 時間後、24 時間後における K12 株の生存数は、野生株および変異株のどちらの株との共培養においても有意な差は認められなかった。したがって、少なくとも大腸菌 K12 株に対する根粒菌 T6SS による殺菌作用はないことが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Sugawara M, Takahashi S, Umehara Y, Iwano H, Tsurumaru H, Odake H, Suzuki Y, Kondo H, Konno Y, Yamakawa T, Sato S, Mitsui H, Minamisawa K. Variation in bradyrhizobial NopP effector determines symbiotic incompatibility with *Rj2*-soybeans via effector-triggered immunity. *Nature Communications*, 査読有, 2018,9:3139
DOI: 10.1038/s41467-018-05663-x.

Sugawara M, Tsukui T, Kaneko T, Ohtsubo Y, Sato S, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Minamisawa K. Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122, a Nitrogen-Fixing Soybean Symbiont. *Genome Announcements*, 査読有, 2017.5:e01743-16
DOI: 10.1128/genomeA.01743-16.

〔学会発表〕(計11件)

Masayuki Sugawara, Symbiotic incompatibility via effector-triggered immunity between soybean *Rj2*-genotype and bradyrhizobial NopP: *Rj2* allele distribution in soybean resources, 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 2019

Masayuki Sugawara, Symbiotic incompatibility via effector-triggered immunity between soybean *Rj2*-genotype and bradyrhizobial NopP, International Plant & Animal Genome XXVII, 2019

菅原雅之, エフェクター誘導性免疫によるダイズ遺伝型特異的な根粒共生不全, 植物・微生物相互作用ワークショップ, 2018

菅原雅之, *Bradyrhizobium* 属根粒菌における共生不和合性の決定機構. 植物微生物研究会第28回研究交流会, 2018

菅原雅之, *Rj2*ダイズと根粒菌の共生不和合性決定機構, 日本土壌肥料学会2018年度大会, 2018

菅原雅之, 根粒菌エフェクター NopPの変異が*Rj2*ダイズとの共生不和合性を決定する, 植物微生物研究会第27回研究交流会, 2017

菅原雅之, *ダイズとの共生不和合性を引き起こす根粒菌3型分泌エフェクターの機能解析,* 環境微生物系学会合同大会2017, 2017

菅原雅之, *ダイズと *Bradyrhizobium diazoefficiens* との共生不和合性を誘導する根粒菌3型分泌エフェクター,* 2017

Masayuki Sugawara, A rhizobial effector protein inducing the symbiotic incompatibility between *Bradyrhizobium diazoefficiens* and soybean plants. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, 2017

菅原雅之, *ダイズと *Bradyrhizobium diazoefficiens* との共生不和合性を誘導する根粒菌エフェクター,* 植物微生物研究会第26回研究交流会, 2016

Masayuki Sugawara, Rhizobial effector protein inducing the symbiotic incompatibility between *Bradyrhizobium diazoefficiens* and soybean plants. 4th Asian Conference Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/08/press20180808-Rhizobia.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 南澤 究

ローマ字氏名: (MINAMISAWA, Kiwamu)

研究協力者氏名: 梅原 洋佐

ローマ字氏名：(UMEHARA, Yosuke)

研究協力者氏名：鈴木 悠太

ローマ字氏名：(SUZUKI, Yuta)

研究協力者氏名：岩野 裕也

ローマ字氏名：(IWANO, Hiroya)

研究協力者氏名：高橋 智子

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Satoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。