

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02860

研究課題名(和文)根粒菌エフェクターの宿主標的分子同定と共生シグナル活性化機構

研究課題名(英文) Identification of the host target of rhizobial effector and its activation of symbiosis signaling

研究代表者

岡崎 伸 (OKAZAKI, SHIN)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40379285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物の根粒形成には根粒菌のNod factor (NF)が必須であると長い間考えられてきた。しかし、申請者らは根粒菌Bradyrhizobium elkanii USDA61株がエフェクタータンパク質Bel2-5を分泌し、NF非依存的にダイズに根粒形成することを見出した。本研究では、Bel2-5の生化学的解析により、宿主タンパク質との相互作用や根粒形成誘導に関わる機能ドメインを明らかにした。また、Bel2-5と相互作用する宿主タンパク質候補を複数同定し、さらにBel2-5により発現制御される宿主側遺伝子を網羅的に解析することで、エフェクターによる根粒形成シグナルを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マメ科植物と根粒菌の共生には根粒菌のNod factor (NF)が必須であると長い間考えられていた。本研究の成果は、根粒菌のエフェクター(Bel2-5)がNF非依存的にマメ科植物の標的タンパク質と相互作用して根粒形成を誘導する機構を世界で初めて明らかにしたものである。今後Bel2-5による根粒形成シグナルの解析をさらに進め、自然界における根粒形成エフェクターの分布や多様性を明らかにすることで、マメ科植物と根粒菌の共進化の一端を明らかにできると期待される。さらに、本エフェクターは、将来的にはイネやコムギなどNF受容機構のない非マメ科植物への根粒形成に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Rhizobial Nod factors (NFs) have been long believed to be essential for legume - rhizobium symbiosis. Bradyrhizobium elkanii USDA61, however, establishes symbiosis with soybean by an effector protein Bel2-5 in the NF-independent manner. In this study, biochemical analysis of Bel2-5 revealed domains involved in interaction with host proteins and induction of nodule formation. In addition, we comprehensively identified host protein candidates that interact with Bel2-5 and host genes whose expression is regulated by Bel2-5. These results revealed the molecular basis of the NF-independent nodule formation mechanism by the effector.

研究分野：植物微生物共生

キーワード：共生 根粒菌 マメ科植物 3型分泌系 エフェクター ダイズ

## 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の窒素固定共生は、シグナル物質を介した相互認証により成立する。第一段階は、根粒菌がマメ科植物の根から分泌されるフラボノイドを感知して、Nod factor (NF) という共生シグナル物質を合成・分泌する。第二段階は、NF がマメ科植物根の細胞膜に局在する受容体 (Nod factor receptor; NFR) により受容される。NFR が NF を受容すると、共生特異的な細胞内シグナル伝達が活性化され、根粒形成が誘導される (図 1)。この NF と NFR からなる相互認証は、長い間マメ科植物-根粒菌共生に必須であると考えられていた。

このような状況の中、申請者らは根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株が、NFR の機能が欠損したダイズ *nfr* 変異体に根粒形成できること、従って NF の受容に依存することなくダイズの共生シグナル伝達系が“ON”になることを発見した (Okazaki *et al.* PNAS. 2013)。さらに、この NF 非依存的な根粒形成は、USDA61 株のタンパク質分泌機構の一つである 3 型分泌系を破壊すると起こらなくなることを発見した (図 2)。すなわち、この共生関係では 3 型分泌系によって分泌されるエフェクターが、NF 受容系をスキップして共生シグナル伝達系を駆動すると考えられた (図 1)。

動物・植物病原菌は 3 型分泌系により宿主細胞にエフェクターを注入し、宿主の防御システムを制御することで感染を促進する。申請者らはトランスポゾン変異法により、ダイズとの共生に関わる根粒菌エフェクターをスクリーニングし、新たなエフェクター候補遺伝子 *bel2-5* を発見した (Faruque *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 2015)。*bel2-5* 遺伝子破壊株 ( $\Delta bel2-5$  株) のダイズとの共生を調べたところ、 $\Delta bel2-5$  株はダイズ *nfr* 変異体への根粒形成能を失った。このことから、Bel2-5 産物は、NF と NFR

から成る相互認証過程を経由せずに根粒形成シグナルを直接活性化する根粒菌エフェクターであることが示唆された。病原菌の感染機構を考慮すると、根粒菌も Bel2-5 により宿主機能を制御していると予想されるが、Bel2-5 の生化学的作用や宿主側標的因子については明らかにならず、根粒菌エフェクターによる共生シグナル活性化の分子機構は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、根粒菌 3 型エフェクター Bel2-5 の生化学的機能の解析と宿主標的因子の同定により、Bel2-5 が誘導する根粒形成シグナル経路を解明し、根粒菌エフェクターによるマメ科植物-根粒菌共生経路の分子機構解明を目的とした。

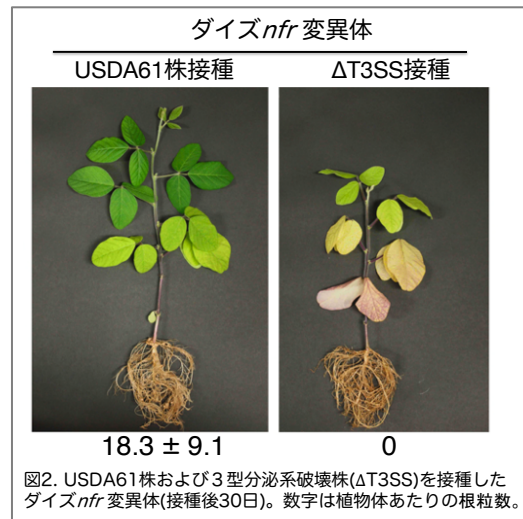
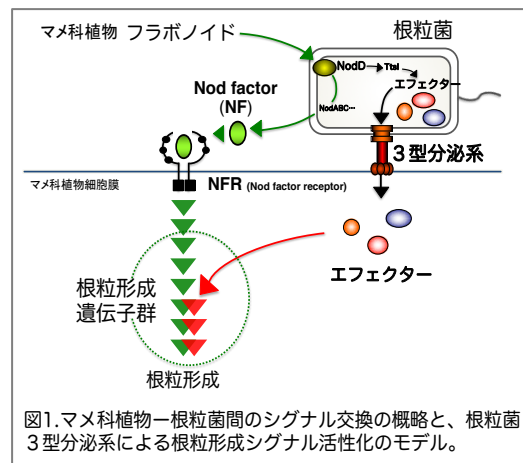
## 3. 研究の方法

### (1) 根粒菌 3 型エフェクター Bel2-5 の機能ドメイン解析

根粒菌エフェクター *bel2-5* 遺伝子は、1,328 アミノ酸からなる産物をコードし、反復配列 (repeat domain 1 および repeat domain 2)、核局在シグナル (Nuclear Localization Signal)、EAR モチーフ (Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif)、ULP1-like ドメイン (Ubiquitin-like-specific protease domain) など、複数の機能ドメインを保持している。これらの機能ドメインを欠失、またはアミノ酸置換により不活化した根粒菌変異株を作成し、*nfr* 変異ダイズに接種して根粒形成への影響を調査する。

### (2) 根粒菌エフェクターと相互作用する宿主標的因子の検索

根粒菌エフェクターと相互作用するダイズ標的タンパク質を Yeast Two-hybrid 法により検索す



る。ダイズの根から RNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成し、Bel2-5 タンパク質と相互作用するダイズタンパク質をスクリーニングする。スクリーニングで得た相互作用タンパク質候補については、Pull down assay など原理の異なる方法で再確認する。さらに、再確認できたダイズタンパク質は、Bel2-5 の基質として分解や修飾を受けるか、生化学的解析を行う。

### (3) 根粒菌エフェクターにより活性化される宿主側遺伝子の網羅的解析

根粒菌エフェクターにより宿主側に引き起こされる遺伝子発現を RNA-Seq 解析により網羅的に解析する。USDA61 株と *bel2-5* 遺伝子破壊株 ( $\Delta bel2-5$ ) のそれぞれを接種したダイズの根を回収、RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行う。USDA61 株接種と  $\Delta bel2-5$  株接種とで発現量に変動がみられた遺伝子については、定量 RT-PCR により結果の再確認を行う。これによって、根粒菌エフェクターが如何なる経路で共生シグナルを活性化するかを解析する。また、マメ科植物の共生遺伝子経路にある個々の遺伝子の発現変動とともに、(2) で同定する根粒菌エフェクターと相互作用するダイズタンパク質の情報を合わせて考察し、エフェクター-Bel2-5 によるマメ科植物共生シグナルの活性化経路を明らかにする。

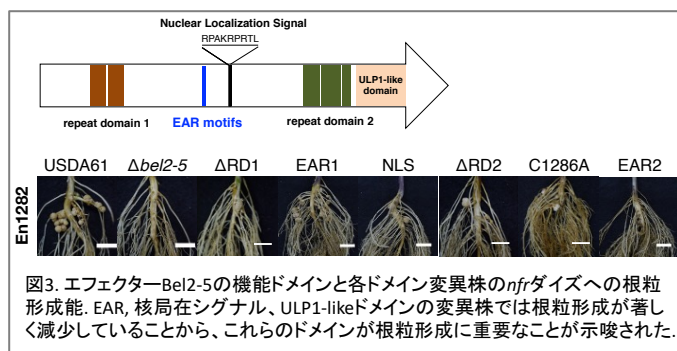
### (4) 根粒菌エフェクターを発現する形質転換ダイズ作出と根粒形成評価

宿主細胞内で根粒菌エフェクター-Bel2-5 を発現させることで根粒形成シグナルが誘導されて根粒が形成されるかを検討するために、Bel2-5 を発現するダイズ形質転換毛状根を作出し、宿主遺伝子発現および根粒形成を検討する。エフェクター遺伝子 *bel2-5* を形質転換用ベクター pUB-GFP に組み込み、*Agrobacterium rhizogenes* へ導入して、ダイズ根に接種して形質転換毛状根を誘導する。形質転換根における根粒形成の観察および根粒形成関連遺伝子の発現解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 根粒菌 3 型エフェクター-Bel2-5 の機能ドメイン解析

根粒菌エフェクター-Bel2-5 に予測された機能ドメインを欠失、またはアミノ酸置換により不活化した根粒菌変異株を作成し、*nfr* 変異ダイズに接種して根粒形成への影響を調査した (図 3)。その結果、野生型 Bel2-5 を保持する USDA61 株とは異なり、各変異株では根粒形成数が減少し、特に repeat domain 1 や NLS、ULP1-like ドメインの変異では根粒形成がほぼ消失した。これらの結果から、Bel2-5 は複数の機能ドメインを有しており、そのいずれもが根粒形成に重要であることが推察された。NLS は核局在シグナルである



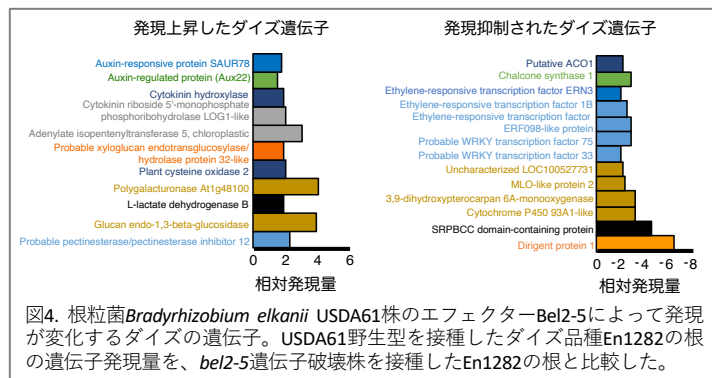
ことから、Bel2-5 はダイズ細胞内の核に局在すること、反復配列によりダイズの標的タンパク質と相互作用すること、ULP1-like ドメインにより相互作用した標的タンパク質を修飾することが示唆された。

### (2) 根粒菌エフェクターと相互作用する宿主標的因子の検索

根粒菌感染初期根、初期根粒、成熟根粒などから cDNA ライブラリーを構築し、Yeast Two-hybrid 法により Bel2-5 と相互作用するダイズ側因子の検索を行なった。一次スクリーニングの結果、多数の陽性クローンが得られたが、確認実験および塩基配列を精査した結果、相互作用に十分なタンパク質をコードしていないクローンや、Bel2-5 なしで (単独で) 相互作用活性を示すものなど擬陽性クローンが多く存在した。現在、可能性ある残りの候補クローンについて確認実験を進めている。

### (3) 根粒菌エフェクターにより活性化される宿主側遺伝子の網羅的解析

Bel2-5 により宿主側に引き起こされる遺伝子発現を網羅的に同定するため、*bel2-5* 遺伝子破壊株と野生型 USDA61 株をそれぞれダイズに接種し、ダイズの根の遺伝子発現を RNA-Seq 法により解析した。その結果、*bel2-5* 遺伝子によるサイトカニン合成系遺伝子の発現上昇、エチレン合成系遺伝子、WRKY 転写因子、Chalcone synthase など防御応答関連遺伝子の発現抑制が検出された (図 4)。



サイトカイニンは細胞分裂を促進するなど、根粒形成においても重要な植物ホルモンである。エフェクターBel2-5 がサイトカイニン合成系遺伝子の発現上昇を誘導するということから、根粒菌は Bel2-5 を分泌してダイズ根のサイトカイニン合成を促し、根粒形成を促進している可能性が示唆された。

一方、エチレン生合成遺伝子、WRKY 転写因子、Chalcone synthase など防御応答関連遺伝子の発現は、Bel2-5 により抑制されることが明らかとなった。このことから、根粒菌は Bel2-5 を分泌してダイズ根の防御応答を抑制し、自らの感染を促進していることが示唆された。

#### (4) 根粒菌エフェクターを発現する形質転換ダイズ作出と根粒形成評価

エフェクター遺伝子 *bel2-5* をバイナリーベクターpUB-GFP に組み込み、*Agrobacterium rhizogenes* へ導入して、ダイズ根に接種して形質転換毛状根を誘導した。その結果、約 25%の形質転換植物において、毛状根上に根粒様構造や細胞分裂、根粒原基のような膨らみが認められた(未発表)。これらの構造体はベクターのみで形質転換した毛状根では観られなかったことから、エフェクターBel2-5 の活性により誘導されたものであると判断された。しかしながら、これらの構造体は植物体あたり 1 箇所程度という、非常に低い頻度で発生していた。この低頻度の原因が Bel2-5 の活性によるダイズ根細胞への悪影響なのか、または形質転換効率の低さやプロモーター強度の影響によるものなのか、現状では判断がつかかっている状況である。今後、発現量の異なるプロモーターや誘導性プロモーターにより *bel2-5* 遺伝子の発現を検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ratu Safirah Tasa Nerves, Teulet Albin, Miwa Hiroki, Masuda Sachiko, Nguyen Hien P., Yasuda Michiko, Sato Shusei, Kaneko Takakazu, Hayashi Makoto, Giraud Eric, Okazaki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Rhizobia use a pathogenic-like effector to hijack leguminous nodulation signalling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81598-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Hien P, Miwa Hiroki, Obirih-Opareh Jennifer, Suzaki Takuya, Yasuda Michiko, Okazaki Shin	4. 巻 96
2. 論文標題 Novel rhizobia exhibit superior nodulation and biological nitrogen fixation even under high nitrate concentrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsec/fiz184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Teulet Albin, Busset Nicolas, Fardoux Joel, Gully Djamel, Chaintreuil Clemence, Cartieaux Fabienne, Jauneau Alain, Comorge Virginie, Okazaki Shin, Kaneko Takakazu, Gressent Frederic, Nouwen Nico, Arrighi Jean-Francois, Koebnik Ralf, Mergaert Peter, Deslandes Laurent, Giraud Eric	4. 巻 116
2. 論文標題 The rhizobial type III effector ErnA confers the ability to form nodules in legumes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 21758 ~ 21768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904456116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nguyen Hien P., Ratu Safirah T. N., Yasuda Michiko, Teamroong Neung, Okazaki Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Bradyrhizobium elkanii USDA61 Type III Effectors Determining Symbiosis with Vigna mungo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 474 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11050474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu, Christian Oliver Kalaw, Michiko Yasuda, and Shin Okazaki
2. 発表標題 The rhizobial type III effector Bel2-5 plays a dual role in symbiosis with soybean
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting Japanese Society of Plant-Microbe Interaction (Online conference: <a href="http://jspmi.brc.miyazaki-u.ac.jp/blog/30th-annual-meeting-2021">http://jspmi.brc.miyazaki-u.ac.jp/blog/30th-annual-meeting-2021</a> )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu, Christian Oliver Kalaw, Michiko Yasuda, and Shin Okazaki
2. 発表標題 Type III effector of Bradyrhizobium elkanii USDA61 Bel2-5 possesses multiple domains determining symbiotic efficiency with soybeans
3. 学会等名 14th European Nitrogen Fixation Conference (Online conference: <a href="https://events.au.dk/enfc2021/conference">https://events.au.dk/enfc2021/conference</a> ) (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡崎 伸
2. 発表標題 マメ科植物-根粒菌共生における新規共生経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会【BBB連携シンポジウム】(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu, Christian Oliver Kalaw, Michiko Yasuda, Shin Okazaki
2. 発表標題 Functional analysis of rhizobial pathogenic-like effector hijacking soybean nodulation signaling
3. 学会等名 International Conferences on Agriculture and Biological Sciences 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 OKAZAKI SHIN
2. 発表標題 Rhizobium utilizes a pathogenic effector to hijack leguminous nodulation signaling
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis & Nitrogen Fixation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Safirah Tasa Nerves Ratu, Hien P. Nguyen, Michiko Yasuda, Shin Okazaki
2. 発表標題 Bel2-5, a type III effector of Bradyrhizobium elkanii hijacking soybean nodulation signaling
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis & Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物微生物研究室 (岡崎研究室) <a href="http://web.tuat.ac.jp/~okazaki/">http://web.tuat.ac.jp/~okazaki/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田淵 光昭 (Tabuchi Mitsuaki) (00294637)	香川大学・農学部・教授  (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下田 宜司  (Shimoda Yoshikazu)  (80415455)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員    (82111)	
研究分担者	林 誠  (Hayashi Makoto)  (30291933)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー    (82401)	
研究分担者	箱山 雅生  (Hakoyama Tsuneo)  (60422804)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員    (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関