

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05760

研究課題名(和文)根粒菌3型分泌系と植物免疫を介した根粒共生不全の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of symbiotic incompatibility via type III secretion system and plant immunity

研究代表者

菅原 雅之 (Sugawara, Masayuki)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90742776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌3型分泌エフェクターNopPを介したマメ科植物との共生不和合性の分子機構を明らかにするため、ダイズ根における不和合性型NopPに受容による遺伝子発現の変化を調査した。その結果、酸化ストレスや細胞壁構築や維持、および複数の病原応答に関わる遺伝子の発現誘導が確認された。また本研究では、ダイズ根粒菌の3型分泌エフェクターがメドハギを含む数種のヌスビトハギ連植物との共生不和合性に関与することを明らかにした。一方でメドハギから単離した根粒菌のダイズに対する不和合性には3型分泌系以外の未知不和合性因子が関わることを示唆された。

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いて、3型分泌エフェクターと植物免疫系を介して特異性が決定される例が本研究期間内において続々と報告され、根粒菌エフェクターによる宿主特異性の決定が進化の過程で広く確立してきたことが窺える。したがって、本研究の成果は根粒菌と植物の共進化を紐解く重要な手がかりとなり学術的な意義は高い。またマメ科作物の生産性向上と環境負荷低減に寄与可能な技術の構築において、共生不和合性を応用することで優良な根粒菌の競合性を高めることが期待され、本成果は社会的にも有意義な知見を与えるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular mechanism of symbiotic incompatibility with leguminous plants mediated by rhizobial type III secretory effector NopP, we investigated changes in gene expression in soybean roots induced by incompatible NopP. As a result, the genes involved in oxidative stress, cell wall construction and maintenance, and multiple pathogenic responses were significantly upregulated. In addition, this study revealed that the type III secretion system of soybean rhizobia is involved in the symbiotic incompatibility with several species of the Desmodieae, including *Lespedeza cuneata*. On the other hand, it was suggested that unknown incompatibility factors other than the type III secretion system are involved in the incompatibility of rhizobia isolated from *Lespedeza* nodules to soybean.

研究分野：応用微生物学

キーワード：根粒菌 3型タンパク質分泌機構 エフェクター 共生不和合性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダイズはその遺伝型特異的に特定の根粒菌株との根粒形成を制限する。この「共生不和合性」を示すダイズ遺伝子 (*Rj*) の存在は 1960 年代より複数報告されていたが、その分子機構については長らく不明であった。しかし、2010 年より *Rj2*、*Rj4* 遺伝子のそれぞれが植物免疫に關与するタンパク質をコードすること、および根粒菌側の因子は 3 型タンパク質分泌装置より分泌されるエフェクターであることが明らかとされてきた。我々のグループでは *Rj2* 遺伝型ダイズとの根粒形成が制限される *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 が分泌する NopP エフェクターが、その共生不和合性の原因であることを報告した (Sugawara et al. 2018)。NopP をコードする遺伝子 (*nopP*) は *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌のゲノムに普遍的に存在するが、*Rj2* ダイズは根粒菌が分泌する NopP のわずか 3 アミノ酸残基の違いを認識し、特定根粒菌による感染を制限していることを明らかにした。以上より、根粒菌とダイズ(あるいはその祖先種)は植物病原菌に対する免疫系と同様のメカニズムで共生者を選抜してきたことが推測されるが、共生不和合性の誘導に係るダイズによるエフェクターの認識およびその応答など詳細な分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1)根粒菌 3 型分泌エフェクター NopP を介したマメ科植物との共生不和合性の分子機構の全容を明らかにすること、およびダイズ根粒菌の NopP を含む 3 型分泌エフェクターのダイズ以外のマメ科植物に対する影響とその原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122 およびその和合型 NopP 分泌変異株 122nopP₁₁₀ 株を、あらかじめ発芽させた *Rj2* 遺伝型ダイズ Hardee 幼苗に対してそれぞれ接種を行い、シードバック内で栽培した。接種 48 時間後に植物の根の接種箇所から数 cm の主根領域を切り出し、全 RNA を抽出した。これらを Novogenes 社へ RNA-Seq 解析を委託し、接種区間における遺伝子発現を比較した。

(2) *B. diazoefficiens* USDA110 株、およびその 3 型分泌装置を破壊した 110 *rhcJ* 株をそれぞれ数種のヌスピトハギ連植物に対して接種を行い、栽培 4 週から 6 週後の着生根粒数、根粒重、植物乾燥重を計測した。USDA110 のエフェクター遺伝子の破壊は、ゲノム情報から推定されていた 40 個の遺伝子を対象に相同組換えにて行った。メドハギ根粒菌は石巻専修大学の根本智行教授より分譲いただき、その III 型分泌装置遺伝子破壊株を作製した。これらはダイズに対して上記と同様に接種を行い、接種 4 週間後の根粒形成を調査した。

4. 研究成果

(1) 不和合性型 NopP によるダイズの応答機構を明らかにするため、根粒菌を接種後 48 時間後のダイズ根における遺伝子発現を RNA-Seq により網羅的に調査した。その結果、酸化ストレスや細胞壁構築や維持に關わる遺伝子の発現が不和合型 NopP に応答して特に高く誘導されていた。またフラボノイド生合成に關わる遺伝子、および複数の病原応答に關わる遺伝子の発現誘導が確認された。特に抵抗性タンパク質と協調して免疫活性を發動することが知られる 1 つの遺伝子の不和合性型 NopP に応答した発現誘導が認められた。本成果により、*Rj2* ダイズに対する根粒菌 NopP を介した共生不和合性の免疫応答機構の一端を明らかにすることができ、不和合性型 NopP と *Rj2* タンパク質との相互作用機構に本研究により特定した遺伝子がコードするタンパク質が關与する可能性が示唆された。

(2) ダイズ根粒菌 USDA110 株の 3 型タンパク質分泌機構が及ぼすダイズ以外の植物種に対する共生能への影響を調査するため、野生株と *rhcJ* 遺伝子破壊株の接種試験を行った。調査した 7 種のヌスピトハギ連植物において、USDA110 野生株接種により窒素固定活性を示す有効根粒を形成しなかった。一方で、3 型分泌系によるエフェクター分泌機能を欠損させた遺伝子破壊株では、メドハギ、マルバヤハズソウに対して有意に多くの有効根粒を形成した。したがって、ダイズ根粒菌 USDA110 の 3 型分泌エフェクターがダイズ以外の特定植物において共生不和合性を誘導していることが示唆された。またメドハギに対する共生不和合性は全てのメドハギに対する影響ではなく、そのエコタイプに依存する現象であることも明らかにした。

次に不和合性の原因エフェクターを同定するため、USDA110 株の *nopP* 遺伝子変異株、およびゲノム情報から推定されていた 40 個のエフェクター遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を作製し、メドハギに対して接種した。その結果、*nopP* 変異株も含めていずれのエフェクター変異株においてメドハギに対する共生不和合性の打破は認められなかった。したがって、USDA110 のメドハギに対する不和合性は USDA110 ゲノム情報からは同定されなかった未知のエフェクターが誘導している可能性と、既知の複数のエフェクターが關与して誘導されることが考えられた。

またメドハギから単離した USDA110 株と系統的に極めて近縁な根粒菌を、メドハギおよびダイ

ズに接種した。その結果、メドハギには有効根粒を形成した一方で、ダイズ品種エンレイに対しては有効根粒の形成が観察されなかった。メドハギ根粒菌の3型分泌装置破壊株を作製し、ダイズに対して接種した結果、調査した6植物体中2植物体のみで3個程度の有効根粒を形成した。この結果から、メドハギ根粒菌のダイズへの不和合性は3型分泌機構の部分的な関与が認められたものの、それ以外の不和合性因子が主に関与することが示唆された。

以上の成果より、根粒菌 NopP を介した共生不和合性の分子機構の一端を明らかにし、またエフェクターを介した新規の共生不和合性系を明らかにした。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植物免疫系を介して特異性が決定される例が本研究期間内において続々と報告され、根粒菌エフェクターによる宿主特異性の決定が進化の過程で広く確立してきたことが窺える。したがって、本研究の成果は根粒菌と植物の共進化を紐解く重要な手がかりとなると考えられる。また共生不和合性を応用することで優良な根粒菌の競合性を高めることが期待され、本成果はマメ科作物の生産性向上と環境負荷低減に寄与可能な技術の構築につながる知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugawara Masayuki, Umehara Yosuke, Kaga Akito, Hayashi Masaki, Ishimoto Masao, Sato Shusei, Mitsui Hisayuki, Minamisawa Kiwamu	4. 巻 14
2. 論文標題 Symbiotic incompatibility between soybean and Bradyrhizobium arises from one amino acid determinant in soybean Rj2 protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222469	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 菅原雅之
2. 発表標題 根粒菌エフェクタータンパク質により誘導されるダイズとの共生不和合性
3. 学会等名 農芸化学会北海道支部第1回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayuki Sugawara, Yosuke Umehara, Satoko Takahashi, Akito Kaga, Masaki Hayashi, Masao Ishimoto, Shusei Sato, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa
2. 発表標題 Symbiotic incompatibility via effector-triggered immunity between soybean Rj2-genotype and bradyrhizobial NopP: Rj2 allele distribution in soybean resources.
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Sugawara, Yuki Konno, Yoshiyuki Ohtsubo, Masaya Kajiwara, Tomoyuki Nemoto, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa
2. 発表標題 Identification of the host specificity determinant of bradyrhizobia based on genomic comparison
3. 学会等名 21st International Congress on Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Sugawara
2. 発表標題 Symbiotic incompatibility between soybean and Bradyrhizobium via effector-triggered immunity
3. 学会等名 2022 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iori Imamura, Yuki Konno, Masayuki Sugawara, Hisayuki Mitsui, Kiwamu Minamisawa
2. 発表標題 Symbiotic incompatibility between Bradyrhizobium diazoefficiens USDA 110 and the tribe Desmodieae including Lespedeza cuneata via Type III secretion system (T3SS)
3. 学会等名 21st International Congress on 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〕

-

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
研究協力者	南澤 究 (Minamisawa Kiwamu)	東北大学・大学院生命科学研究科・教授 (11301)	
研究協力者	今野 勇希 (Konno Yuki)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	
研究協力者	今村 伊織 (Imamura Iori)	東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生 (11301)	

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
---------	---------