

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780068

研究課題名（和文）根粒菌 3 型分泌系によるマメ科植物共生シグナルの活性化機構

研究課題名（英文）Activation of the legume symbiosis signaling by rhizobial type III secretion system

研究代表者

岡崎 伸 (OKAZAKI SHIN)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：40379285

研究成果の概要（和文）：網羅的遺伝子発現解析により、根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* の 3 型分泌タンパク質候補として *nopP* 等を含む複数の遺伝子を同定した。3 型分泌系がダイズ根に誘導する遺伝子発現を解析した結果、*ENOD40* や *NIN* など既知の共生遺伝子を含む 29 遺伝子の発現上昇と、カロース合成遺伝子や Chalcone synthase などの防御応答遺伝子を含む 36 遺伝子の発現低下がみられた。以上の結果から、マメ科植物との共生において、根粒菌 3 型分泌系は、共生シグナル活性化と、防御応答遺伝子抑制の二つの役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Transcriptome analysis identified several type III effector candidate genes including *nopP* in *Bradyrhizobium elkanii*. The type III secretion system of *B. elkanii* induced 29 soybean genes including symbiosis genes *ENOD40* and *NIN*, while 36 genes including defense-related genes such as Chalcone synthase were down-regulated, indicating the dual function of the rhizobial type III secretion system in the interaction with host legumes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：植物微生物相互作用

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：根粒菌、共生窒素固定、ダイズ、3 型分泌系、マメ科植物

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。第一に、根粒菌は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 という共生シグナル物質を合成・分泌する。第二に、Nod factor は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 Nod factor 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 (Ferguson et al. 2010)。

Nod factor と NFR 以外に、根粒形成を調節するダイズの遺伝子として、非根粒着生の遺

伝子(*rj1*, *rj5*, *rj6*)が知られている。*rj1* 遺伝子は、根粒を着生せず窒素固定できない個体から発見された(Williams et al. 1954)。この遺伝子を持つダイズでは、殆どの根粒菌は根粒を形成できないが、*Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株など一部の菌株は根粒を形成することができる (Devine et al. 1988)。しかしながら、*rj1* 遺伝子保有ダイズとの共生に必要な根粒菌側の因子については、長い間不明であった。

このような状況の中、我々は根粒菌の 3 型分泌系 (Type III secretion system) と呼ばれるタンパク質分泌システムが、*rj1* 遺伝子保有ダイズへの根粒形成に必須であることを明らかにした(Okazaki et al. 2009)。さらに、ダイズ

品種エンレイの *nfr1* 変異体 En1282 への根粒形成にも 3 型分泌系が必須であることを明らかにした (論文投稿中)。これらの結果から、根粒菌 3 型分泌系は、これまでマメ科植物-根粒菌共生に必須と考えられていた Nod factor と NFR から成る相互認証過程を経由せずに、根粒形成を誘導することが示唆された。しかしながら、3 型分泌系で分泌される根粒菌タンパク質 (エフェクター) の実体や、マメ科植物側の遺伝子発現変動などは未解明であり、共生シグナル活性化の分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ダイズの共生シグナルを活性化する根粒菌 3 型分泌タンパク質 (エフェクター) の同定、(2) 根粒菌 3 型分泌系により活性化される宿主側遺伝子の網羅的解析を行い、根粒菌 3 型分泌系によるマメ科植物共生シグナル活性化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ダイズの共生シグナルを活性化する根粒菌 3 型分泌タンパク質 (エフェクター) の同定: ダイズの根粒形成シグナルを活性化する根粒菌エフェクターの候補遺伝子を、RNA-Seq 解析により同定した。USDA61 株と 3 型分泌系のアクティベーター遺伝子 *ttsI* の遺伝子破壊株 (Δ ttsI 株) からそれぞれ RNA を抽出し、Illumina GAIIX 等による RNA-Seq 解析を行い、2 試料間で発現量に差がある配列を同定した。発現量が USDA61 株と比較して Δ ttsI 株で発現量が著しく低下するものをエフェクター候補遺伝子とした。なお、RNA-Seq 解析と結果の情報学的処理には、文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」の御支援をいただいた。

(2) 根粒菌 3 型分泌系により活性化される宿主側遺伝子の網羅的解析: 3 型分泌系によりマメ科植物に引き起こされる遺伝子発現を網羅的に解析するために、マイクロアレイ解析を行った。USDA61 野生株または 3 型分泌系破壊株 (Δ T3SS 株) を接種したダイズの根をそれぞれ回収し、RNA を抽出してマイクロアレイによる発現解析を行った。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った。

4. 研究成果

(1) ダイズの共生シグナルを活性化する根粒菌 3 型分泌タンパク質 (エフェクター) の同定: RNA-Seq 解析により USDA61 株と Δ ttsI 株で発現する mRNA の配列を解読し、USDA61 株ゲノムにマッピングした。FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments) を指標に、発現量に差がある遺伝子

を抽出した。USDA61 株と比較して Δ ttsI 株で発現量が著しく低下するものをエフェクター候補とした。その結果、既に他の根粒菌で報告のある *nopA* や *nopP* 等を含む複数の遺伝子がエフェクター候補として検出された (表 1)。*nopA* 遺伝子は、3 型分泌装置の繊毛部分を構成するタンパク質であると報告されているが、*nopP* 遺伝子は、根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 株で特定のマメ科宿主との共生に影響を与えることが報告されており (Skorpiel et al. 2005)、USDA61 株でもエフェクターとして機能している可能性が高い。また、Opacity protein と相同性の高い遺伝子が 2 個検出された。Opacity protein は *Neisseria* などが宿主の上皮細胞に感染する時に重要な働きをするタンパク質であり、根粒菌共生における報告は未だされていない。現在、これらのエフェクター候補遺伝子の破壊株を作成中であり、今後遺伝子破壊株の共生形質を検討することで、根粒形成シグナルを活性化するエフェクターの同定を行う予定である。

表 1. RNA-Seq 解析により検出された USDA61 株のエフェクター候補遺伝子

候補遺伝子	FPKM 値	
	USDA61 株	Δ ttsI 株
<i>nopA</i>	23242	13
Opacity protein and related surface antigens	11050	9015
<i>nopP</i>	2527	1
Porin subfamily	2338	1600
Opacity protein outer-membrane protein	2324	1837
Signal peptide	1595	1361
FOG: WD40 repeat protein	1495	1224
Signal peptide	1161	953
Bacterial nucleoid DNA-binding protein ihfA	926	864
DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE	804	581

* FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments) が USDA61 株と比較して Δ ttsI 株で有意に低下する遺伝子をエフェクター候補遺伝子とした

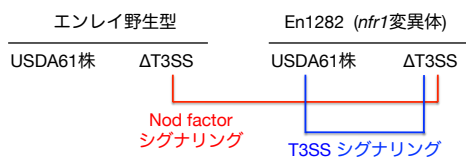
(2) 根粒菌 3 型分泌系がダイズ根細胞に誘導する遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。ダイズ品種エンレイの野生型と *nfr1* 変異ダイズ En1282 に対し、根粒菌 USDA61 株 (野生株) と Δ T3SS 株を接種した根の遺伝子発現を比較解析することにより、Nod factor シグナリングと T3SS シグナリングで発現誘導されるダイズ遺伝子をそれぞれ検出した (図 1A)。

発現上昇した遺伝子としては、Nod factor シグナリングでは 173 遺伝子、T3SS シグナリングでは 29 遺伝子検出され、そのうち 16 遺伝子が共通であった (図 1B)。この共通遺伝子の中には *ENOD40* や *NIN* など、既知の共生関連遺伝子が含まれていた (表 2)。

一方、発現低下した遺伝子は、Nod factor シグナリングでは 991 遺伝子、T3SS シグナリングでは 36 遺伝子であり、そのうち 12 遺伝子が共通であった (図 1C)。T3SS シグナリングにより発現低下する 36 遺伝子の中には、カロース合成遺伝子や Chalcone synthase など、

既知の防御応答遺伝子が含まれていた。

A マイクロアレイによる比較解析



B 発現上昇した遺伝子



C 発現低下した遺伝子

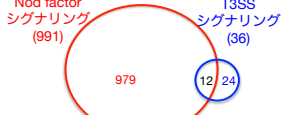


図1. 根粒菌Nod factorと3型分泌機構(T3SS)シグナルがダイズ根細胞に誘導する遺伝子発現。A. マイクロアレイ解析の比較処理区。B. ダイズ根中で発現上昇した遺伝子。C. ダイズ根中で発現低下した遺伝子。

以上の結果から、根粒菌3型分泌系は、マメ科植物の共生シグナルの活性化と、防御応答遺伝子抑制の二つの役割を担うことが明らかとなった。

表2. 根粒菌Nod-factor/3型分泌機構(T3SS)シグナル両方で発現変動したダイズ遺伝子

遺伝子名
発現上昇した遺伝子
Root nodule extensin
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
Subtilisin-like protease
F-box/kelch-repeat protein
CASP-like protein N24-like protein
Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like protein
F-box/kelch-repeat protein
Nodule inception protein (nin).
Cytochrome P450 71A1-like protein
ENOD40-2
Early nodulin GmN36a
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
Indole-3-acetate O-methyltransferase 1-like protein
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
発現低下した遺伝子
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
Tryptophan aminotransferase-related protein
Callose synthase 9-like, transcript variant
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
<i>Glycine max</i> mRNA induced by salicylic acid
<i>Glycine max</i> cDNA clone Gm-c1069-4006
17.9 kDa class II heat shock protein
Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2-like protein
Chlorophyll a-b binding protein
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein
Myb-related protein 306-like transcription factor
NAC domain-containing protein 8-like protein
<i>Glycine max</i> uncharacterized protein

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件) (いずれも査読あり)

- ① Kasai-Maita H, Hirakawa H, Nakamura Y, Kaneko T, Miki K, Maruya J, Okazaki S, Tabata S, Saeki K, Sato S. (2013) Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains. *Microbes and Environments* 28 (2): 275-278
- ② Tsukui T., Eda S., Kaneko T., Sato S., Okazaki S. 他6名. (2013) The Type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 Mediates Symbiotic Incompatibility with *Rj2* Soybean Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1048-1051.

[学会発表] (計8件)

- ① 岡崎伸、マメ科植物との共生を決定づける根粒菌 III 型分泌機構. 第86回日本細菌学会総会ワークショップ (2013年3月18日 幕張メッセ、千葉県)
- ② Okazaki S, Genome sequence of a novel *Bradyrhizobium* strains isolated from *Aeschynomene americana*. The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2012年10月28-31日 (Phuket, Thailand)
- ③ 岡崎伸、エダウチクサネムから分離した新規 *Bradyrhizobium* 属細菌のゲノム配列、植物微生物研究会第22回研究交流会プログラム 2012年09月25-27日 (神戸大学、兵庫県)
- ④ Okazaki S, Saeki K, Activation of the Host Symbiosis Signaling by Rhizobial Type III Secretion System. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012年7月29日-8月2日 (京都国際会議場、京都府)
- ⑤ Okazaki S, Saeki K, Hijacking the host nodulation signaling by rhizobial type III secretion system, The 17th International Congress on Nitrogen Fixation. 2011 Nov. 27-Dec.1 (Fremantle, Australia)
- ⑥ 岡崎伸、根粒菌の III 型分泌機構はマメ科植物の共生シグナルを活性化する. 第5回ゲノム微生物学会若手の会. 2011年9月29日-30日 (ろうきん研修所富士センター、静岡県)
- ⑦ 岡崎伸, 佐伯和彦, 根粒菌 III 型分泌系によるマメ科植物共生シグナルの活性化機構、植物微生物研究会第21回研究交流会. 2011年9月20日-22日 (岡山大学、岡山県)
- ⑧ 岡崎伸、マメ科植物と共生する根粒菌の III 型分泌機構、第5回細菌学若手コロッセウム、2011年8月8日-10日 (高知大学、高知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 伸 (OKAZAKI SHIN)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：40379285