

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450082

研究課題名(和文) マメ科植物-根粒菌共生における新しい共生経路の解明

研究課題名(英文) Characterization of a novel symbiosis pathway in legume-rhizobium symbiosis

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)・助教

研究者番号：40379285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61株の根粒共生に関わる新規遺伝子として、orf5208を同定した。orf5208は分泌タンパク質をコードすると推定され、Rj4遺伝子保有ダイズとの共生を阻害する一方、Rj4遺伝子を保有しないダイズでは、根粒形成を促進した。さらに、orf5208は、ダイズの初期共生シグナル伝達変異体への根粒形成に必須であることが判明した。以上の結果から、orf5208がコードする根粒菌タンパク質は、ダイズの初期共生シグナル伝達を介さない、新しい経路で根粒形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel gene (orf5208) in a soybean symbiont *Bradyrhizobium elkanii* which affected root nodule symbiosis with soybean. The orf5208 encoded a putative secreted protein and was shown to inhibit nodule formation on Rj4 soybean while it promoted nodule formation on non-Rj4 soybean. Furthermore, orf5208 was shown to be essential for the nodule formation on soybean mutant that had a defect in early symbiosis signaling. Taken together, orf5208 promotes nodule formation via the novel pathway that bypasses the early symbiosis signaling.

研究分野：微生物学

キーワード：マメ科植物 根粒菌 共生 III型分泌機構 エフェクター

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。これまで私達は、III型分泌機構 (Type III secretion system, T3SS) とよばれるタンパク質分泌システムを研究する中で、ダイズ根粒菌の T3SS が、ダイズとの共生を促進することを発見した。しかしながら、根粒形成に影響する分泌タンパク質 (エフェクター) やエフェクターにより活性化されるマメ科植物の共生シグナルなどについては不明な点が多く、T3SS による根粒形成促進メカニズムの全貌解明には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、(1)ダイズの共生遺伝子を活性化する根粒菌エフェクターの同定、(2)当該エフェクター破壊株のダイズ共生変異体や *Aeschynomene* 属マメ科植物との共生形質の評価を行うことで、根粒菌 T3SS を介した新しいマメ科植物-根粒菌共生経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ダイズの根粒形成シグナルを活性化する根粒菌 III型分泌タンパク質 (エフェクター) をトランスポゾン変異法によりスクリーニングする。(2)ダイズの共生変異体や *Aeschynomene* 属マメ科植物へ T3SS を破壊した根粒菌を接種し、共生形質を野生型根粒菌と比較する。

4. 研究成果

(1)根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株は、*Rj4* 遺伝子保有ダイズには根粒形成できないが、この根粒形成阻害には USDA61 株の T3SS が関与している (Okazaki et al. 2009)。USDA61 株のトランスポゾン変異株ライブラリーを作成し、*Rj4* 遺伝子保有ダイズに接種して根粒形成する変異株を分離した。当該変異株を解析したところ、トランスポゾンはシステインプロテアーゼや転写因子をコードする遺伝子など、6種類の遺伝子に挿入されていることが判明した。システインプロテアーゼ遺伝子 (*orf5208*) の上流には III型分泌タンパク質に特徴的な *tts box* とよばれる配列が存在していたことから、システインプロテアーゼが分泌タンパク質 (エフェクター) として根粒形成阻害を引き起こしている可能性が示唆された。また、残りの5遺伝子は、タンパク質分泌に関わっている可能性が示唆された。

(2)ダイズ *nfr* 変異体 (根粒菌の作る根粒形成シグナル Nod-factor の受容体 NFR の遺伝子に変異を持つダイズ) に上記システインプロテアーゼ遺伝子破壊株を接種したところ、野生型 USDA61 株では根粒がみられたが、システインプロテアーゼ遺伝子破壊株では根粒が全く形成されなかった。この結果から、システインプロテアーゼが、Nod-factor と NFR か

らなる初期シグナル伝達を介さずに、ダイズの共生遺伝子を直接活性化するエフェクターである可能性が示唆された。

Aeschynomene 属マメ科植物は、Nod-factor を作らない光合成 *Bradyrhizobium* 属細菌と共生して根粒を形成することが知られている。また、光合成 *Bradyrhizobium* 属細菌は側根の付け根から感染するという原始的な感染様式を持つことから、進化的に古い共生系であると考えられている。*Aeschynomene* 属マメ科植物に USDA61 株とその T3SS 破壊株を接種したところ、USDA61 株では根粒形成がみられたが、T3SS 破壊株では根粒が形成されなかった。この結果から、T3SS が Nod-factor に依存しない原始的な共生系と関連していることが示唆された。

以上の結果から、USDA61 株は、T3SS によりダイズや *Aeschynomene* 属マメ科植物の共生遺伝子を直接活性化して根粒形成を誘導すること、さらに、ダイズにおいてはシステインプロテアーゼがエフェクターとして根粒形成に関与していることが明らかとなった (図1)。

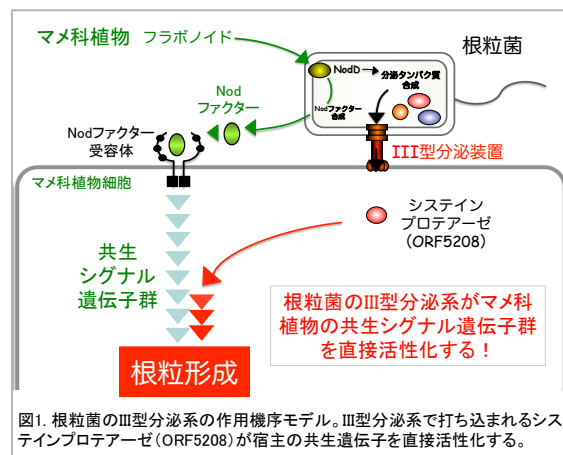


図1. 根粒菌のIII型分泌系の作用機序モデル。III型分泌系で打ち込まれるシステインプロテアーゼ (ORF5208) が宿主の共生遺伝子を直接活性化する。

本研究で同定されたシステインプロテアーゼ遺伝子 (*orf5208*) は、これまで根粒形成に必須と考えられていた根粒菌 Nod factor とマメ科植物 NFR からなる相互認証を経由せずに、マメ科植物の根粒形成シグナルを直接活性化すること示された。今後の研究により、その分子メカニズムが解明されれば、将来的にはイネやコムギなど Nod factor 受容系を持たない非マメ科植物へ根粒形成させる新たな技術開発のブレークスルーになることが期待される。

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 5 件)

- ① Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi JF, Furuta N, Miwa H, Yasuda M, Nouwen N, Teaumroong N and Giraud E.

- Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME Journal*. 10:64-74. (2016) (査読あり)
- ② Omar MF, Miwa H, Yasuda M, Fujii Y, Kaneko T, Sato S, Okazaki S. Identification of *Bradyrhizobium elkanii* Genes Involved in Incompatibility with Soybean Plants Carrying the Rj4 Allele. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6710-6717. (2015) (査読あり)
- ③ Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, Hattori M, Teamtising K, Songwattana P, Tittabutr P, Boonkerd N, Saeki K, Sato S, Uchiumi T, Minamisawa K and Teaumroong N. Genome Analysis of a Novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 Carrying a Symbiotic Plasmid. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0117392 (2015) (査読あり)
- ④ Teamtising K, Songwattana P, Noisa-Ngiam R, Piromyou P, Boonkerd N, Tittabutr P, Minamisawa K, Nantakit A, Okazaki S, Abe M, Uchiumi T and Teaumroong N. Divergent Nod-containing *Bradyrhizobium* sp. DOA9 with a megaplasmid and its host range. *Microbes and Environments*. 29: 370–376 (2014). (査読あり)
- ⑤ Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110:17131–17136 (2013). (査読あり)
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Hien Nguyen Phuoc, Faruque Omar, Hiroki Miwa, Shin Okazaki. Molecular genetic analysis of *Bradyrhizobium elkanii* mutants with altered symbiotic compatibility with *Vigna radiata*. Japan-Taiwan-Korea (JTK) International Symposium - JSME 2015. Japanese society of microbial ecology. 17-20 Oct. 2015. 土浦市亀城プラザ (茨城県・土浦市) .
- ② Hiroki MIWA, Michiko YASUDA, Sachiko MASUDA, Takakazu KANEKO, Shusei SATO, Shin OKAZAKI. *Bradyrhizobium elkanii* の 3 型分泌系によるミヤコグサ根粒形成の制御日本微生物生態学会第 30 回大会 2015 年 10 月 17-20 日. 土浦市亀城プラザ (茨城県・土浦市) .
- ③ Faruque Muhammad Omar, Michiko Yasuda, Hiroki Miwa, Yoshiharu Fujii, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, Shin Okazaki. Characterization of transposon mutants of *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 that formed effective nodule on *Rj4* soybean cv. BARC2. Japan-Taiwan-Korea (JTK) International Symposium - JSME 2015. Japanese society of microbial ecology. 17-20 Oct. 2015. 土浦市亀城プラザ (茨城県・土浦市) .
- ④ 増田 幸子, 三輪 大樹, Faruque Muhammad Omar, 安田 美智子, 岡崎 伸. *Rj4* 遺伝子保有ダイズとの非親和性を決定する根粒菌 3 型エフェクター. 日本微生物生態学会第 30 回大会. 2015 年 10 月 17-20 日. 土浦市亀城プラザ (茨城県・土浦市) .
- ⑤ Okazaki S, Teulet A, Yasuda M, Furuta N, Miwa H, Giraud E. The Nod factor-independent and T3SS-dependent nodulation in Rhizobium-legume symbiosis. Japan-Taiwan-Korea (JTK) International Symposium - JSME 2015. Japanese society of microbial ecology. 17-20 Oct. 2015. 土浦市亀城プラザ (茨城県・土浦市) .
- ⑥ Okazaki S. Rhizobial type III secretion system activates leguminous nodulation signaling in the absence of Nod factor. 19th International Congress on Nitrogen Fixation Conference, California, USA. 4-9 October 2015.
- ⑦ Hien Nguyen Phuoc, Faruque Omar, Hiroki Miwa, Shin Okazaki. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium elkanii* mutants with altered nodulation compatibility with *Vigna radiata*. 第 25 回植物微生物研究交流会 2015 年 9 月 14 日-16 日. つくば国際会議場 (茨城県・つくば市) .
- ⑧ 三輪大樹, Faruque Omar, 増田幸子, 安田美智子, 金子貴一, 佐藤修正, 岡崎伸. 根粒菌 3 型分泌系による根粒形成の制御機構. 第 25 回植物微生物研究交流会 2015 年 9 月 14 日-16 日. つくば国際会議場 (茨城県・つくば市) .
- ⑨ Miwa H, Yasuda M, Okazaki S. Cytokinin response during Nod-independent nodulation in soybean. The 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2014 October 28. – November 3. Chengdu, China.
- ⑩ Noriyuki F, Yasuda M, Okazaki S. Profiling the novel symbiotic pathway of *Bradyrhizobium* sp. ORS278 by RNA-Seq analysis. The 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2014 October 28. – November 3. Chengdu, China.
- ⑪ Faruque M. Omar, Yasuda M, Miwa H, Okazaki S. Putative type III effector proteins of *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 cause Incompatibility with *Rj4* soybean. The 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2014 October 28. – November 3. Chengdu, China.
- ⑫ Okazaki S, Faruque M. Omar, Miwa H, Kaneko T, Sato S, Yasuda M. Rhizobial type III secretion system controls host-dependent

nodulation on soybean. The 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2014 October 28. – November 3. Chengdu, China.

- ⑬ Okazaki S. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. 11th European Nitrogen Fixation Conference, Tenerife, Spain. 7-10 September 2014.
- ⑭ Faruque M. Omar and Shin OKAZAKI. Molecular analysis of nodulation incompatibility between *Rj4* soybean and *Bradyrhizobium elkanii*. 日本土壤肥料学会 2014 年度大会. 2014 年 9 月 9-11 日. 東京農工大学小金井キャンパス (東京都・小金井市) .
- ⑮ 岡崎伸、飯塚真貴、元坤、及川洋征、木村園子ドロテア、藤井義晴. ヘアリーベッチ前作によるハッシュウマメの生育促進機構の解析. 日本雑草学会第 53 回大会 2014 年 3 月 28-30 日. 法政大学小金井キャンパス (東京都・小金井市) .
- ⑯ Shin Okazaki, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, Kazuhiko Saeki. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. October 14–18, 2013. フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県・宮崎市) .
- ⑰ Michiko YASUDA, Shin OKAZAKI. The type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* mediates symbiotic incompatibility with *Rj4* soybean. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. October 14–18, 2013. フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県・宮崎市) .
- ⑱ Faruque Muhammad Omar, Michiko Yasuda, Shin Okazaki. Isolation and characterization of Tn5 mutants of *Bradyrhizobium elkanii* with altered compatibility with *Rj4*-soybean and *Vigna radiata*. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. October 14–18, 2013. フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県・宮崎市)
- ⑲ 岡崎伸. III 型分泌機構による根粒菌の新規感染機構とその応用. 日本土壤肥料学会 2013 年度大会 2013 年 9 月 11 日-13 日. 名古屋大学東山キャンパス (愛知県・名古屋市) .
- ⑳ Faruque Muhammad Omar, Shin Okazaki. Molecular analysis of nodulation incompatibility between *Rj4* soybean and *Bradyrhizobium elkanii* USDA61. 日本土壤肥料学会 2013 年度大会 2013 年 9 月 11 日-13 日. 名古屋大学東山キャンパス (愛知県・名古屋市) .

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Nakagawa T, Okazaki S, Shibuya N. Genes Involved in Pathogenesis and Defense

Responses. In: The *Lotus japonicus* Genome, pp. 163-169, Tabata and Stougaard eds. Springer (2014).

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