

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650089

研究課題名(和文) TypeIII分泌系を介した根粒菌-宿主相互作用に関与する宿主遺伝因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic factors involved in interaction between rhizobium and host plant through type III secretion system

研究代表者

佐藤 修正 (Sato, Shusei)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70370921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：3型分泌系(T3SS)を介した根粒菌とマメ科植物の相互作用に関する基盤情報を整備することを目的として、実験系の整備が進められているミヤコグサとダイズ根粒菌Bradyrhizobium elkaniiの組み合わせを用いて解析を行った。ミヤコグサ実験系統を用いた接種実験により、T3SSエフェクターを介した相互作用に従来知られていた菌の侵入を阻害する反応に加え、侵入後の菌の増殖阻害の反応があり、それらが異なるエフェクターにより誘導されていることを明らかにした。また、ミヤコグサリソースを活用したアプローチによりそれらの防御反応に関与すると考えられる複数の遺伝子座を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to accumulate the information on the interaction between rhizobium and legume plants mediated by type III secretion system (T3SS) effectors, we conducted molecular genetic analyses using a model legume Lotus japonicus and Bradyrhizobium elkanii. As the results of infection analysis and Tn5 mutant screening, we identified that two types of immune responses, block of infection and prevention of nodule maturation, induced by different effectors. Based on the QTL analysis using RILs and GWAS using wild accessions of L. japonicus, we detected multiple candidate loci related to the responses caused by T3SS effectors.

研究分野：ゲノム構造機能学

キーワード：根粒菌-宿主相互作用 TypeIII分泌系 エフェクタータンパク質 ミヤコグサ 組換え近交系統 ナチュラルバリエーション

1. 研究開始当初の背景

根粒菌はマメ科植物との間で共生関係を成立させ、マメ科植物の根に根粒の形成を誘導し、根粒の細胞内で窒素固定を行う。この根粒菌とマメ科植物の共生関係は、シグナル物質を介した相互認識により成立する。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認識して、Nod ファクターと呼ばれるキチンオリゴマーを基本としたシグナル物質を合成し、分泌する。分泌された Nod ファクターはマメ科植物の根の細胞膜上にある受容体により識別され、共生相手となる根粒菌の Nod ファクターを受容した場合にのみ、細胞内のシグナル伝達経路が活性化され、根粒形成につながる。

近年、この Nod ファクターを介した相互認識の成立後も、根粒菌と宿主のマメ科植物との間での認識過程が存在することが明らかとなってきた。その認識反応に関与する要素の一つが、多くの根粒菌のゲノム上の共生アイランドと呼ばれる共生窒素固定に関与する遺伝子が集中している領域に遺伝子が保存されている 3 型分泌系 (TypeIII secretion system: T3SS) である。

ダイズ根粒菌の一種である

Bradyrhizobium elkanii USDA61 株 (以下 *B. elkanii*) は、ダイズの根粒形成調節 (*Rj*) 遺伝子のうち *Rj4* 遺伝子を持つダイズ系統には根粒を形成できない (Vest and Caldwell, *Crop Sci.* **12**: 692-693, 1972) 一方で、Nod ファクター受容体の変異のため通常のダイズ根粒菌が根粒を形成できない *rj1* 遺伝子を持つダイズ系統に根粒を形成できる (Devine et al. *Crop Sci.* **28**: 939-941, 1988) という特徴を持つ。我々は、研究協力者である岡崎伸らと共同で、このいずれの現象にも T3SS による分泌タンパク質 (エフェクター) の宿主植物細胞への導入が関与していることを明らかにした (Okazaki et al., *PNAS* **110**: 17131-17136, 2013)。この *B. elkanii* が示す宿主との相互作用は、エフェクターを介したマメ科植物-根粒菌の相互作用解明の糸口になると考えられる。

B. elkanii は広い宿主域を持つ根粒菌として知られており、我々が解読した *B. elkanii* のゲノム配列解析情報からも、この特徴を裏付ける多様な Nod ファクターの修飾に関わる遺伝子の存在が確認された。そこで、*B. elkanii* をマメ科のモデル植物として利用されているミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に接種してみたところ、実験系統でゲノム配列解析が進められている MG-20 系統には根粒を形成することができたが、別の実験系統の Gifu 系統に対しては根粒を形成することができなかった。

2. 研究の目的

上記のような背景を基に、本研究は、T3SS エフェクターを介した宿主植物との特徴的な相互作用を行う *B. elkanii* とマメ科のモデル

植物として実験系の整備が進められているミヤコグサの組み合わせを用いて、接種実験の表現型に差が認められた実験系統間の交配で作製された組換え近交系 (RILs) を用いた QTL 解析と、ミヤコグサ野生系統を用いたゲノムワイド関連解析を行うことにより、根粒菌-宿主植物の相互作用に関する基盤情報を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. elkanii* の野生株と T3SS 遺伝子破壊株を用いた接種実験

B. elkanii の接種によるミヤコグサの表現型の系統間差の要因が T3SS を介した相互作用であることを確認する目的で、T3SS の遺伝子を破壊した *B. elkanii* 株 ($\Delta rhcJ$ 株) を用いた接種実験を行い、*B. elkanii* 野生株との比較を行った。宿主には MG-20 系統、Gifu 系統に加えて、実験系統として利用されているパキスタン原産の類縁種の *L. burttii* を用いた。また、*B. elkanii* の感染状況を確認する目的で蛍光標識した *B. elkanii* 野生株、 $\Delta rhcJ$ 株を用いた接種実験を行った。

(2) ミヤコグサの防御反応誘導に関連するエフェクターの探索

B. elkanii とミヤコグサの相互作用に関連する T3SS エフェクターを同定することを目的として、トランスポゾン Tn5 を用いて作製した *B. elkanii* の挿入変異株ライブラリを *L. burttii* に接種することによりスクリーニングを行った。*L. burttii* に形成された有効根粒から変異株を回収し、Tn5 の挿入箇所の配列を解析し、破壊されている遺伝子の情報を収集した。解析した変異株のうち、T3SS エフェクターと予測される遺伝子に挿入が確認された株について、*L. burttii* と Gifu 系統に対して再度接種実験を行い、根粒形成の表現型を確認した。

(3) RILs を用いた宿主関連因子の同定

B. elkanii の接種による根粒形成の表現型に差が確認された MG-20 系統と Gifu 系統を親株として構築された組換え自殖系統 (Recombinant Inbred Lines: RILs) を宿主として、*B. elkanii* 野生株の接種実験を行うことにより、根粒形成表現型情報を収集し、整備を進めている RILs の遺伝子型情報を用いた QTL 解析を行った。同様に、Gifu 系統と *L. burttii* を親株として構築された RILs を用いた QTL 解析も行った。

(4) ミヤコグサ野生系統を用いたゲノムワイド関連解析

ナショナルバイオリソースプロジェクトで収集が進められているミヤコグサ野生系統に対して *B. elkanii* 野生株の接種実験を行うことにより、根粒形成表現型情報を収集した。得られた表現型情報を用いて、ゲノムワイド関連解析を行った。

4. 研究成果

(1) *B. elkanii* の野生株と T3SS 遺伝子破壊株を用いた接種実験

ミヤコグサの3種類の実験系統に *B. elkanii* 野生株を接種した結果、MG-20 系統では直径が 1 mm を超え、レグヘモグロビンの発現により赤色化する有効根粒が形成される表現型 (Nod+)、Gifu 系統では根粒の形成が認められない表現型 (Nod-) となり、先行実験の結果が確認された (図 1 左上段)。また、*L. burttii* には直径が 1 mm 以下で白色の無効根粒が多数形成されるといふ表現型を示した (これは窒素固定活性に影響のある変異体が示す表現型と類似するため Fix-表現型と分類した) (図 1 中央上段)。一方で、T3SS の遺伝子を破壊した *B. elkanii* 株 ($\Delta rhcJ$ 株) を接種した場合には、3 種類の実験系統のいずれにも、有効根粒が形成された (図 1 下段)。この結果から、*B. elkanii* とミヤコグサの相互作用において、T3SS エフェクターは Gifu 系統、*L. burttii* に対して阻害反応を誘導することが示唆された。Ds-Red で蛍光標識した *B. elkanii* 野生株を接種した結果、Gifu 系統では感染糸が形成される根毛からも、わずかに形成される根粒原基の盛り上がりからも根粒菌の蛍光シグナルは観察されず根粒菌の侵入を阻害する反応が誘導されていると考えられた (図 1 左上段)。一方、*L. burttii* では、形成される無効根粒の内部から蛍光シグナルが観察され根粒菌の宿主細胞内への侵入は起こっていることが確認されたが、蛍光シグナルの分布が、有効根粒を形成する MG-20 系統と比べると限定的であることから、侵入した根粒菌の増殖を抑え、根粒菌の成熟を阻害する反応が誘導されていると考えられた (図 1 中央上段)。

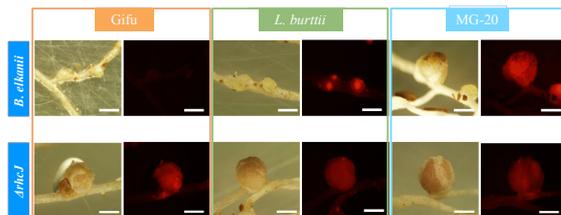


図1. ミヤコグサ実験系統への *B. elkanii* 野生株および T3SS 遺伝子破壊株 ($\Delta rhcJ$) の接種結果。実体顕微鏡像 (左) とその蛍光画像 (右: DsRed 標識した根粒菌による蛍光が観察される) スケールバー: 1 mm

(2) ミヤコグサの防御反応誘導に関連するエフェクターの探索

T3SS によるミヤコグサの防御反応誘導に関与するエフェクタータンパク質の同定を目的として、無効根粒形成 (Fix-) の表現型を示す *L. burttii* を宿主として、Tn5 の挿入により作製した *B. elkanii* 挿入変異ライブラリのスクリーニングを行った。その結果、*L. burttii* に有効根粒を形成した変異体の中から、T3SS エフェクターと予測される遺伝子に Tn5 の挿入がある株を 4 種同定した。得られた変異株を *L. burttii* に再接種した結果有効根粒の形成が確認されたが、根粒形成が認められない (Nod-) 表現型を示す Gifu 系統にこれらの変異株を接種しても、表現型の回復は認められな

かった (図 2)。これらの結果から、*B. elkanii* の T3SS により誘導されるミヤコグサの防御反応には、根粒菌の侵入を防ぐ反応 (Nod-表現型) と侵入した根粒菌の増殖を抑える反応 (Fix-表現型) の 2 つがあり、それぞれが、別のエフェクタータンパク質で制御されていることが示された。

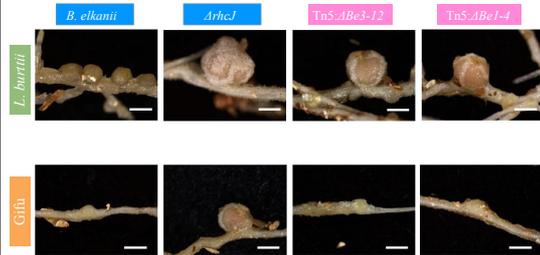


図2. エフェクター遺伝子に Tn5 の挿入が確認された変異株の接種結果。実体顕微鏡像 (スケールバー: 1 mm) *L. burttii* に有効根粒が形成され表現型が回復しているが、Gifu には根粒を形成できない

(3) RILs を用いた宿主関連因子の同定

MG-20 系統と Gifu 系統を親株とする RILs (MG 系統) と Gifu 系統と *L. burttii* を親株として構築された RILs (GB 系統) からそれぞれ 10 系統を選抜し、*B. elkanii* 接種試験を行った。その結果、MG 系統は Nod- の表現型を示す系統、Nod+ の表現型を示す系統、Fix-様の表現型を示す系統に分離し、有効根粒数を指標とした QTL 解析により 3 番染色体に関連する遺伝子座を検出することができた。一方、GB 系統については Nod- の表現型を示す系統と Fix-様の表現型を示す系統に大別されたが、Fix-様の表現型を示す系統に根や根粒が黒くなる表現型を示すものが検出され、明確に表現型を評価することが難しい状況となった。そのため QTL 解析で有為なピークを検出することができなかった。

そこで、QTL 解析により 3 番染色体に関連する遺伝子座を検出することができた MG 系統の解析について解析を進め、3 番染色体の候補領域の組換えがある系統を追加して表現型情報の収集を行った結果、最終的にパイロット試験で検出した 3 番染色体のピークに加えて 6 番染色体にピークを検出することができた。別プロジェクトで RILs のリシーケンスを行った結果、高密度の一塩基多型 (SNP) マーカーが得られたため、検出した候補領域を 3 番染色体で 124 kb、6 番染色体で 679 kb の領域に絞り込むことができた (図 3)。

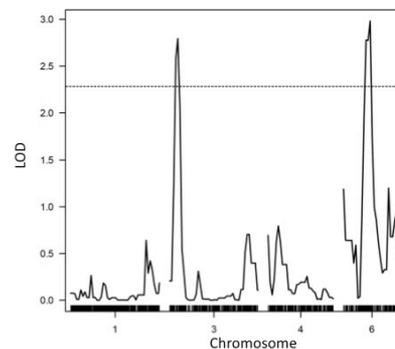


図3. MG-20 x Gifu の RILs を用いた *B. elkanii* 接種による根粒形成表現型の QTL 解析結果。横軸は染色体上のマーカーの位置を表し、縦軸は表現型とマーカーの遺伝子型との関連性を表している。

(4) ミヤコグサ野生系統を用いたゲノムワイド関連解析

ミヤコグサの実験系統で検出された *B. elkanii* 野生株の接種による根粒形成表現型の系統間差がミヤコグサ国内野生系統でも確認できれば、リシークエンスにより整備が進められているミヤコグサ国内野生系統の遺伝子型情報を用いて、全ゲノムをカバーする SNP 情報と、形質との相関関係を網羅的に検索し、形質と関連する SNP を統計的に抽出する方法であるゲノムワイド関連解析 (GWAS) により *B. elkanii* の T3SS エフェクターを介した相互作用に関連する遺伝子座の探索が可能となる。そこで、30 系統で構成されるミヤコグサ野生系統のコア系統について *B. elkanii* 野生株の接種実験を行った。その結果、表現型は実験系統で確認された、Nod⁻、Fix⁻、Nod⁺ の 3 タイプに分離し、この表現型情報を用いた GWAS 解析が可能であることが確認された。そこで、解析系統数を 67 系統まで増やして根粒形成の表現型情報の収集を行った。GWAS を行うためには、野生系統の表現型情報を数値情報に置き換える必要があるため、様々な指標を用いて数値化を行い GWAS を実施した結果、最終的に Nod⁻ の系統グループを 1 点、Fix⁻ の系統グループを 3 点、Nod⁺ の系統グループを 5 点とするスコアリングを行うことにより、表現型と関連する 3 つの遺伝子座を検出することができた (図 4)。

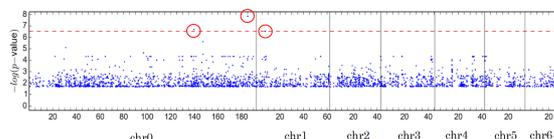


図4. *B. elkanii* 接種による根粒形成の表現型情報を用いたゲノムワイド関連解析の結果。横軸はゲノム上SNPの位置を表し、縦軸は表現型とSNPの遺伝子型との関連性を表している。丸印は表現型との関連があると検出された遺伝子座

このように、ミヤコグサ野生系統と RILs を用いたアプローチにより T3SS エフェクタータンパク質を介した防御反応の誘導に関与すると考えられる複数の宿主因子の遺伝子座が同定され、エフェクタータンパク質の解析で明らかにした 2 段階の防御反応を裏付ける結果が得られたと考えられる。

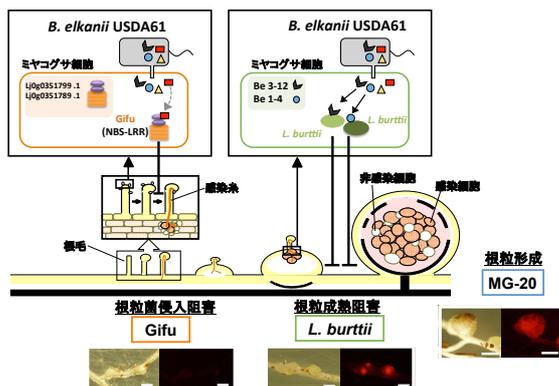


図5. 本研究で同定したT3SSエフェクターを介した宿主-根粒菌相互作用と関連因子のまとめ

本研究により、マメ科植物と根粒菌との T3SS エフェクターを介した相互作用について、従来知られていた菌の侵入を阻害する反応に加え、侵入後の根粒菌の増殖を阻害する反応があり、それぞれが異なるエフェクターにより誘導されていることを明らかにした (図 5)。また、ミヤコグサリソースを活用したアプローチにより、それらの防御反応に関与すると考えられる複数の遺伝子座を同定することができ、T3SS エフェクターを介した相互作用の解明に向けての基盤を整備することができた (図 5)。

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 4 件)

① Faruque OM, Miwa H, Yasuda M, Fujii Y, Kaneko T, Sato S, Okazaki S. Identification of Bradyrhizobium elkanii genes involved in Rj4 soybean incompatibility. Appl Environ Microbiol. 81:6710-6717. (2015) (査読あり) doi: 10.1128/AEM.01942-15

② Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, Hattori M, Teamtisong K, Songwattana P, Tittabutr P, Boonkerd N, Saeki K, Sato S, Uchiumi T, Minamisawa K, Teaumroong N. Genome analysis of a novel Bradyrhizobium sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. PLoS One. 10: e0117392. (2015) (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0117392

③ Suzaki T, Ito M, Yoro E, Sato S, Hirakawa H, Takeda N, Kawaguchi M. Endoreduplication-mediated initiation of symbiotic organ development in Lotus japonicus. Development. 141:2441-2445. (2014) (査読あり) doi: 10.1242/dev.107946

④ Held M, Hou H, Miri M, Huynh C, Ross L, Hossain MS, Sato S, Tabata S, Perry J, Wang TL, Szczyglowski K. Lotus japonicus cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. Plant Cell. 26:678-694. (2014) (査読あり) doi: 10.1105/tpc.113.119362

[学会発表] (計 6 件)

① Shohei Kusakabe, Takakazu Kaneko, Michiko Yasuda, Hiroki Miwa, Shin Okazaki, Shusei Sato. : Analysis of type III effector proteins of Bradyrhizobium elkanii USDA61 which cause effector triggered immunity response in Lotus japonicus. 第 57 回日本植物生理学会、岩手大学 (岩手県盛岡市)、2016. 3.18-20.

② Shusei Sato, Niraj Shah, Mikkel Heide Schierup, Shohei Kusakabe, Hideki Hirakawa, Jens Stougaard, Stig Uggerhøj Andersen. : Re-sequencing of recombinant inbred lines of *Lotus japonicus* toward upgrading of genome information. 第 57 回日本植物生理学会、岩手大学 (岩手県盛岡市)、2016. 3.18-20.

③ 日下部 翔平、金子 貴一、安田 美智子、三輪 大樹、岡崎 伸、佐藤 修正 : *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株との III 型分泌系を介した相互作用に関与する因子の解析. 植物微生物研究会 第 25 回研究交流会、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)、2015. 9. 14-16.

④ 日下部 翔平、金子 貴一、安田 美智子、三輪 大樹、岡崎 伸、佐藤 修正 : *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株のエフェクターに対するミヤコグサ系統間差の解析. 第 56 回 日本植物生理学会、東京農業大学 (東京都世田谷区)、2015. 3.16-18.

⑤ Shusei Sato. : Establishment of the *Lotus japonicus* genomic information toward functional genomics. 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (Invited), New International Convention & Exposition Center (Chengdu, China), 2014. 10. 28-30.

⑥ 日下部 翔平、金子 貴一、安田 美智子、三輪 大樹、岡崎 伸、佐藤 修正 : *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株接種に対するミヤコグサ系統間差の解析. 植物微生物研究会 第 24 回研究交流会、佐賀大学 (佐賀県佐賀市)、2014. 9. 19-21.

[図書] (計 2 件)

① Shusei Sato, Stig U. Andersen. Springer, The *Lotus japonicus* genome (Chapter 4. Genome sequencing), 2014, 267 (35-40)

② Niels Sandal, Shusei Sato. Springer, The *Lotus japonicus* genome (Chapter 3. Genetic linkage maps, synteny and map-based cloning), 2014, 267 (21-31)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 修正 (SATO, SHUSEI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号 : 70370921

(2) 研究分担者

金子 貴一 (KANEKO, TAKAKAZU)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号 : 8037092