

令和 元年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0276

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（国際共同研究強化）

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

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)・准教授

研究者番号：40379285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,600,000円

渡航期間：2.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：マメ科植物と根粒菌の共生には根粒菌が作るNod factor (NF)が必須であると長い間考えられていたが、根粒菌Bradyrhizobium sp. STM6978株は宿主マメ科植物にNF非依存的に根粒形成することが判明した。本研究ではSTM6978株の分泌タンパク質ET-NodがNF非依存的な根粒形成に必須であること、宿主植物根で発現させた場合、根粒様組織を誘導することから、ET-NodがNF非依存的な共生シグナルを活性化する本体であることを明らかにした。以上の結果は、NF以外の根粒菌側因子が単独でマメ科植物の根粒形成シグナルを起動できることを示した初めての事例である。

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が作る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、この教科書的な概念を覆し、根粒菌の分泌タンパク質（ET-Nod）が単独でマメ科植物の根粒形成シグナルを起動できることを示した初めての事例である。今後ET-Nodの宿主植物側標的や宿主細胞内での生化学的機能、NFシグナリングとの相違点を解明することで、マメ科植物と根粒菌の共進化を細かく重要な知見となることが期待される。また、本エフェクターを利用することで、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）：Rhizobium-derived Nod factors (NFs) have been long believed to be essential for legume - rhizobium symbiosis. Bradyrhizobium sp. STM6978, however, establish symbiosis with legumes in the NF-independent manner. In this study, we first identified a secreted protein ET-Nod in STM6978 which can induce nodulation in the NF-independent manner. Besides, when expressed in host root cells, ET-Nod could induce the development of nodule-like structures. These results indicated that ET-Nod is responsible for activating the NF-independent nodulation signaling. This is the first finding that rhizobial factor except for the NF can trigger the leguminous nodulation signaling.

研究分野：植物微生物共生

キーワード：根粒菌 マメ科植物 III型分泌系 エフェクター 共生

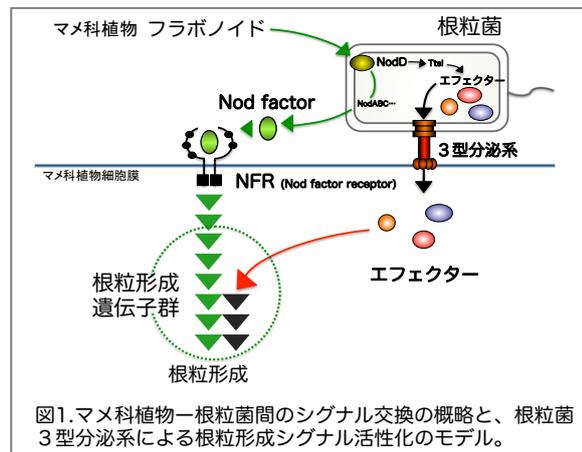
様式 F-19-2

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 (NF) というシグナル物質を分泌する。第二に、NF 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、これがシグナルとなり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が、2007年、フランス農業開発研究国際協力センターの Giraud 教授らにより、NF を作らない根粒菌 (ORS278 株) とマメ科植物クサネム (*Aeschynomene indica*) との共生が発見された (Giraud et al., Science 2007)。この発見はそれまでの常識を覆し、根粒菌は NF 以外にも根粒形成誘導シグナルを持つことが初めて証明された。

一方、申請者らは細菌の3型分泌系と呼ばれるタンパク質分泌システムを研究する中で、根粒菌の3型分泌系がダイズとの共生を劇的に変化させることを発見した (Okazaki et al. 2009)。さらなる研究により、根粒菌の3型分泌系が、NF と 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、を明らかにした (図1, Okazaki et al. PNAS 2013)。

2015年、申請者と Giraud 教授のグループは、クサネムと共生する *Bradyrhizobium* sp. STM6978 株が3型分泌系依存的に根粒形成することを発見した (Okazaki et al. ISME Journal. 2015)。この発見は、根粒菌が3型分泌系によりエフェクターを分泌し、NF 非依存的な根粒形成シグナルを活性化していることを示唆している。しかしながら、現在までのところエフェクターやその根粒形成シグナル活性化機構については全く分っていない。



2. 研究の目的

本研究では、Giraud 教授のグループと共同してクサネム共生菌の NF 非依存的な根粒形成を司る根粒菌エフェクターの同定を目指す。同定したエフェクターについては、植物細胞内での局在やマメ科植物根での発現実験により根粒形成シグナル活性化能力について検討する。本研究により NF に依存しない根粒形成機構が解明されれば、根粒共生の進化を紐解く鍵となると同時に、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。

3. 研究の方法

(1) マメ科植物クサネムの根粒形成を促進する根粒菌エフェクターの検索

フランス農業開発研究国際協力センターに滞在し、Giraud 博士らと共同して情報学的解析を行い、STM6978 株ゲノムからエフェクター候補遺伝子を検索する。候補遺伝子について、申請者と Giraud 博士らで分担して、遺伝子破壊株を作製する。遺伝子破壊株はクサネムに接種して根粒形成能を評価し、根粒共生に必要なエフェクターを同定する。

(2) 根粒菌エフェクターを発現するクサネム形質転換毛状根の作出と根粒形成能の評価

根粒菌エフェクターがクサネムとの共生成立を決定するスイッチとなるかを検証するために、エフェクターを発現するクサネム形質転換毛状根を作出し、その根粒形成を検討する。毛状根形質転換ベクター-pJCV51 に ET-Nod 遺伝子を導入し、*Agrobacterium rhizogenes* ARqual 株に導入した。Bonaldi (2010)らの方法によりクサネム *Aeschynomene indica* の根に毛状根を誘導した。形質転換根は pJCV51 上の赤色蛍光タンパク質 DsRED の蛍光により判別した。形質転換後3週間栽培したのちに形質転換根を観察し、ET-Nod 遺伝子導入による影響を調査した。

(3) 根粒菌エフェクターの植物細胞内における局在解析

同定した根粒菌エフェクターが植物細胞内のどこに局在するかを *Nicotiana benthamiana* における一過的発現系を用いて解析する。根粒菌エフェクター遺伝子を PCR 増幅して pB7FWG2.0 に導入し、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) と融合する。これを *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 に導入して *Nicotiana benthamiana* の葉に注入し、24 から 48 時間後に蛍光顕微鏡で観察して GFP の局在を観察する。

4. 研究成果

(1) マメ科植物クサネムの根粒形成を促進する根粒菌エフェクターの検索

情報学的解析によりクサネム根粒菌 STM6978 株ゲノム中でエフェクター遺伝子を検索し、約 35 遺伝子候補を検出した。これらの遺伝子の破壊株をフランス側と分担して作成し、クサネムへ接種して共生形質を評価した。その結果、3 型分泌タンパク質をコードすると予想される遺伝子 ET-Nod の破壊株では、野生株よりも顕著に根粒形成が低下していることが判明した。この結果から、ET-Nod がクサネムの根粒形成シグナルを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。

ET-Nod はシステインプロテアーゼと相同性を有しており、3 型分泌系を制御する転写因子 TtsI により転写が制御されていた。また、3 型分泌装置を破壊した変異株では ET-Nod の分泌が検出されなかったことから、ET-Nod は 3 型分泌系で分泌されるタンパク質であることが判明した。

一方、代表者らはダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株で同定したエフェクター Bel2-5 がダイズとの共生において NF 非依存的な根粒形成を司ることを明らかにしていた。Bel2-5 と ET-Nod のアミノ酸配列を比較したところ、互いの相同性は低いものの、どちらもシステインプロテアーゼと相同性を有していた。この 2 つのエフェクターが、宿主植物の根粒形成において同様の機能を保持するか遺伝的相補試験により調査した。STM6978 株は NFR 変異ダイズへ根粒着生できなかったが、Bel2-5 を相補した STM6978::Bel2-5 株は根粒を着生した。一方、クサネムとの共生能力については、STM6978 株とほぼ同様であった。この結果は Bel2-5 がダイズで機能するがクサネムでは機能しないことを示しており、エフェクターが宿主植物との共進化の中で特異的機能を獲得してきたことを示唆するものであった。

(2) 根粒菌エフェクターを発現するクサネム形質転換毛状根の作出と根粒形成能の評価

毛状根形質転換法によりクサネム *Aeschynomene indica* の根に ET-Nod 遺伝子を導入した結果、DsRED 蛍光を示す形質転換根において、根に根粒様組織の形成が観察された。ベクターのみ (ET-Nod 遺伝子を含まない) アグロバクテリウムで形質転換した場合は根粒様組織は観察されなかった。根粒様組織の詳細な観察は今後の課題であるが、この根粒様組織は活発に分裂・肥大する細胞から形成されており、根の皮層細胞が細胞分裂を繰り返して形成されたものである可能性が考えられた。この結果から、ET-Nod がクサネム細胞内において、根粒形成シグナルを直接活性化することが示唆された。

(3) 根粒菌エフェクターの植物細胞内における局在解析

ET-Nod が植物細胞内のどこに局在するかを *Nicotiana benthamiana* の一過的発現系を用いて解析した。アグロバクテリウムを注入して 48 時間後に葉を蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP の蛍光が植物細胞の核周辺に強く観られた。ET-Nod は中心部に核局在シグナルと推定されるアミノ酸配列 (RPAKRQRTL) を保持しており、植物細胞に注入されてから核に移行することが示唆された。

以上のように、本研究ではフランス農業開発研究国際協力センター Eric Giraud 博士と共同研究を行い、クサネムの NF 非依存的な根粒形成を司る根粒菌エフェクター ET-Nod を同定することに成功した。ET-Nod は 3 型分泌系で分泌されること、植物細胞 (*Nicotiana benthamiana*) の核に局在すること、クサネムの根部に遺伝子導入した場合、根粒様組織を誘導することを明らかにした。以上の結果は、根粒菌エフェクターが単独でマメ科植物の根粒形成シグナルを起動できることを示した初めての事例であり、植物と微生物の共進化を紐解く鍵となる重要な知見と考えられる。また、本エフェクターを利用することで、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。上記クサネム共生菌のエフェクターについては、原著論文にまとめ国際誌に投稿した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nguyen HP, Ratu STN, Yasuda M, Gottfert M, Okazaki S. (2018) InnB, a novel type III effector of *Bradyrhizobium elkanii* USDA61, controls symbiosis with Vigna Species. *Frontiers in Microbiology* 9:3155; doi: 10.3389/fmicb.2018.03155. (査読あり)
- ② Nguyen HP, Miwa H, Kaneko T, Sato S, Okazaki S. (2017) Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with *Vigna radiata*. *Genes* 8(12), 374; doi:10.3390/genes8120374. (査読あり)
- ③ Miwa H and Okazaki S. (2017) How effectors promote beneficial interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 38:148-154. (査読あり)
- ④ Yasuda M, Miwa H, Masuda S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Okazaki S. (2016) Effector-triggered Immunity Determines Host Genotype-specific Incompatibility in Legume-Rhizobium Symbiosis. *Plant and Cell Physiol.* 57:1791-1800. (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Nguyen HP, Safirah TNR, Wint YTP, Yasuda M, Okazaki S. A novel T3 effector of *Bradyrhizobium elkanii* plays a dual function in symbiosis with legumes. JSME annual meeting & 10th ASME, 2018.
- ② Yasuda M, Okazaki S. Infection mechanism of *Bradyrhizobium elkanii* by type III secretion system. JSME annual meeting & 10th ASME, 2018.
- ③ 岡崎伸. マメ科植物との共生を司る根粒菌の III 型分泌系. 平成 29 年度植物感染生理談話会、2017. (招待講演)
- ④ Okazaki S. Symbiotic roles of rhizobial type III effectors. 20th International Congress on Nitrogen Fixation, 2017. (招待講演)
- ⑤ Nguyen PH, Okazaki S. Molecular mechanisms underlying *Vigna radiata*-rhizobia interactions 20th International Congress on Nitrogen Fixation, 2017.
- ⑥ Nguyen HP, Okazaki S. A novel type III effector of *Bradyrhizobium elkanii* abolishing infection and nodule development in *Vigna radiata*. 植物微生物研究会第 27 回研究交流会, 2017.
- ⑦ Okazaki S. Rhizobial type III secretion system and symbiosis with legumes. 17th IS-MPMI, 2016. (招待講演)
- ⑧ Okazaki S, Miwa H, Yasuda M, Masuda S. Symbiotic roles of the type III secretion system in *Bradyrhizobium elkanii*. 12th European Nitrogen Fixation Conference, 2016.
- ⑨ Masuda S, Miwa H, Yasuda M, Faruque OM, Okazaki S. Rhizobial type III effector protein regulates soybean nodulation. 12th European Nitrogen Fixation Conference, 2016.
- ⑩ 増田幸子, 三輪大樹, 安田美智子, Faruque OM, 岡崎伸. *Rj4* ダイズ非親和性を決定するダイズ根粒菌 3 型分泌装置エフェクター. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016.
- ⑪ 三輪大樹, 安田美智子, 増田幸子, 金子貴一, 佐藤修正, 岡崎伸. 根粒菌のエフェクターによるミヤコグサ根粒形成の制御. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016.
- ⑫ 安田美智子, 三輪大樹, 増田幸子, 竹林裕美子, 榊原均, 岡崎伸. 根粒菌エフェクター誘導型免疫による共生非親和性の決定機構. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会、2016.

[その他]

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~okazaki/index.html>

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名：エリック ジロー

ローマ字氏名：Eric Giraud

所属研究機関名：フランス農業開発研究国際協力センター

部局名：地中海熱帯地域共生研究室

職名：グループ長

[その他の研究協力者]

研究協力者氏名：ミヒャエル ゲトフェルト

ローマ字氏名：Michael Gottfert

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。