

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252065

研究課題名(和文) ダイズ根粒菌の共生進化ダイナミズムと温室効果ガス削減の分子機構

研究課題名(英文) Mechanisms of symbiotic evolution and N<sub>2</sub>O mitigation of soybean bradyrhizobia

研究代表者

南澤 究 (Minamisawa, Kiwamu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70167667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：根粒菌と宿主の共進化とN<sub>2</sub>O還元酵素遺伝子発現制御機構の解明を目的とした。Rj2ダイズに共生不和合性を起こすUSDA122株のタイプ3型エフェクター遺伝子を同定した。共生和合性を示すUSDA110株にも当該遺伝子があり、4アミノ酸残基の置換が存在した。これは、当該nop遺伝子産物と宿主Rタンパク質による根粒菌の共進化の科学的根拠を与える。nasSTは硝酸異化系の制御にも関わっており、硝酸センサーNasSとそのレギュレータNasTのアンチターミネーション制御によるnosR発現までの一連の制御カスケード系が明らかとなった。この知見はN<sub>2</sub>O還元酵素活性の高い根粒菌作出の基盤となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Rj2 restricts nodulation by specific rhizobial strains including *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122. We identified a T3SS effector gene that induces the incompatibility to Rj2-soybeans. These results suggested that hosts monitor the rhizobial T3SS effector during infection and reject nodulation via host R protein. *B. diazoefficiens* is able to scavenge the greenhouse gas N<sub>2</sub>O through the N<sub>2</sub>O reductase. Comparative analysis of Nos(++) mutant genomes showed that nasS mutation of resulted in Nos(++) phenotype. nasS mutation induced nosZ via NasT. NO<sub>3</sub>(-) addition dissociated the NasS-NasT complex in vitro, suggesting the release of the activator NasT. Disruption of nasT led to a marked decrease in nosZ transcription. Thus NasST regulates the NO<sub>3</sub>(-) -mediated response of nosZ gene. EMSA analysis suggested that nos expression is subjected to antitermination on both H1 and H2 hairpins upstream of nosR.

研究分野：植物微生物学、土壤微生物学

キーワード：生物間相互作用 共生 脱窒 タンパク質分泌系 エフェクター 根粒菌 ダイズ

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ダイズ根粒菌の遺伝的多様性および共生窒素固定と脱窒に焦点を当てた研究を野外の圃場実験も駆使して長らく行ってきた。その中で、下記2課題については、その分子機構解明も含めた徹底的な基礎研究を行う価値があると判断した。

### (1) *Rj2*-ダイズ共生不和合性の分子機構

ダイズ根粒菌 USDA122 株とその近縁株は、*Rj2* 因子を保有しているダイズに対して、共生が阻止される。近年 Yang ら(2010)により宿主側の *Rj2* 因子は、TIR-NBS-LRR ドメインを持ったエフェクター誘導型の R タンパク質による強力な植物免疫系であることが明らかになった(図 1C)。研究代表者のグループの Tsukui ら(2012)は *Rj2* ダイズに不和合性を起こす USDA122 株の Type III タンパク質分泌系(T3SS)の構造体遺伝子 *rhcJ* および T3SS 遺伝子群のグローバルレギュレーター遺伝子 *ttsI* を破壊すると、両パートナーの共生不和合性がキャンセルされることが明らかとなった(図 1ABC)。以上の事実は、その共生不和合性を誘導しているのは USDA122 株の T3SS を介した分泌タンパク質(エフェクター)であることを意味している。また、宿主側 *Rj2* は当該 R タンパク質の二つのアミノ酸置換により決定されていること(図 1C)、不和合性の USDA122 株の共生窒素固定能が劣っていることから、申請者は「共生窒素固定能の低い根粒菌を排除するために防御応答システムを活用した共進化である」という仮説を提唱している(Tsukui *et al.* 2012)。今まで、病原菌と植物のせめぎ合いとして知られていた植物 R タンパク質と病原微生物エフェクターの防御システムが、共生菌と植物の間でも共生に有利に機能している可能性が高い。

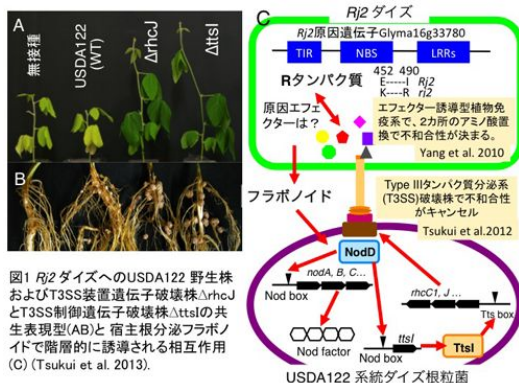
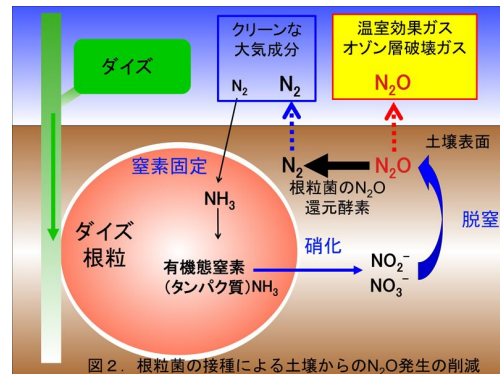


図1 *Rj2* ダイズへのUSDA122 野生株およびT3SS装置遺伝子破壊株 $\Delta rhcJ$ とT3SS制御遺伝子破壊株 $\Delta ttsI$ の共生表現型(AB)と宿主根分泌フラボノイドで階層的に誘導される相互作用(C) (Tsukui *et al.* 2013).

### (2) $N_2O$ 還元酵素遺伝子発現制御機構

代表者は、ダイズ根圏から発生する温室効果ガス  $N_2O$  は、土壌生物による根粒有機態窒素の無機化・硝化・脱窒により発生することを解明し、 $N_2O$  還元酵素を強化した根粒菌で根圏の  $N_2O$  発生を圃場レベルで削減した。

(Itakura *et al.* 2013)(図 2)。染色体複製エラーの校正機能を低下させた USDA110 株を  $N_2O$  呼吸条件下で集積培養して得られた  $Nos^{++}$  変異株 ( $N_2O$  還元酵素活性と *nosZ* 遺伝子発現が高い)のゲノム解析を行ったところ、*blI4572* 遺伝子が原因遺伝子であることが示唆され、部位指定変異により証明した。*blI4572* 遺伝子は同化型硝酸/亜硝酸還元酵素遺伝子の二成分制御系 *nasST* の *nasS* 遺伝子と相同性が高かった。ダイズ根粒菌も含めた細菌の *nasST* がどのように異化的な  $N_2O$  還元酵素遺伝子の発現制御の分子機構は不明である。



引用文献: Sánchez *et al.* 2013. Appl. Environ. Microbiol. 79: 4178. Itakura *et al.* 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74: 7258. Tsukui *et al.* 2012. Appl. Environ. Microbiol. 79: 1048; Yang *et al.* 2010. PNAS 107:18735.

## 2. 研究の目的

研究代表者は、フィールド実験によるダイズ根粒菌の共生特性や農業利用の研究から、基礎と応用が結びつく二つの課題: (1)病原システムと類似したダイズ根粒菌の共生不和合性、(2)  $N_2O$  還元酵素遺伝子発現制御の新規二成分制御系(NasST)を見いだした。本研究では、これらの課題の基礎研究を深化させることにより、(1)植物共生細菌がどのように病原システムを取り入れて共進化してきたのか、(2)温室効果ガス除去に重要な根粒菌  $N_2O$  還元酵素遺伝子の転写促進を促す二成分制御系 NasST の制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下の項目の研究を行った。

### (1) ダイズ根粒菌の共生不和合性の分子機構

*Rj2* ダイズ Hardee に共生不和合性を示すダイズ根粒菌 USDA122 株の完全長ゲノム配列を次世代シーケンサーで決定した。次に、原因エフェクターを同定するため、*Rj2* ダイズ Hardee に根粒を形成する USDA122 の突然変異株を複数単離した。それらの突然変異株の

MiSeq リードを USDA122 株ゲノムと比較し、変異箇所を探索した。さらに、種々の変異株を共生不和合性 USDA122 株と共生和合性 USDA110 株上で、三親接合法で作製し、*Rj2* ダイズ Hardee と *rj2* ダイズ Lee に接種を行い根粒形成および窒素固定能を調べた。

Hardee (*Rj2*)と Lee (*rj2*)ダイズの R タンパク質遺伝子の cDNA 断片、及び USDA122 と USDA110 のエフェクター遺伝子を PCR により増幅し、酵母ツーハイブリッド(Y2H)法の bait, prey となる形質転換用プラスミドにそれぞれ導入した。その後 prey と bait の組み合わせを変えた形質転換酵母を作製し、栄養要求性培地上の生育による相互作用を観察した。

## (2) N<sub>2</sub>O 還元酵素遺伝子発現制御機構

ダイズ根粒菌の脱窒遺伝子 *napA*, *nirK*, *norB*, *nosZ* の転写レベルを調べるために *lacZ* 遺伝子の転写融合体を作製した。N<sub>2</sub>O の取込みで N<sub>2</sub>O 還元酵素活性を、メチルピオローゲン法で硝酸還元酵素活性を定量した。

ダイズ根粒菌の野生型、変異型の NasS-GFP、NasT-CFP を作成し、大腸菌で発現し、硝酸/亜硝酸添加の有無の条件下で、分子間相互作用とタンパク質複合体の形成のされかたの違いについて FRET 法等で検討した。

上記の NasT タンパク質を用いて、*nosR*, *nosZ*, *nap E* 遺伝子上流の RNAヘアピン構造を取る可能性がある領域の RNA 断片を調製し、NasT タンパク質との相互作用を EMSA 解析により検討した。

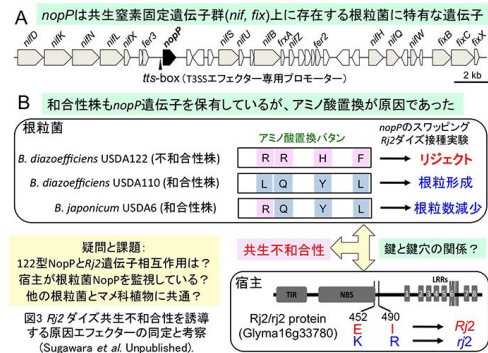
## 4. 研究成果

### (1) ダイズ根粒菌の共生不和合性の分子機構

突然変異体の解析より *nopP* 遺伝子産物が共生不和合性の原因エフェクターであることを明らかとした。*nopP* 遺伝子は共生窒素固定遺伝子群上に存在し(図 3A)、驚いたことに和合性株(USDA110)にも存在した。不和合性 USDA122 と和合性 USDA110 株の *nopP* 遺伝子をスワッピングした USDA122 (110 型 *nopP*) / USDA110 (122 型 *nopP*)を *Rj2* ダイズ Hardee へ接種したところ、122 型 *nopP* 遺伝子で共生不和合性が決まっていた(図 3B)。これは、NopP タンパク質の 4 つのアミノ酸置換により共生表現型が決まっていることを意味していた(図 3B)。さらに、それらの中間型である USDA6 株の 6 型 *nopP* 遺伝子導入では根粒数が半減した(図 3B)。しかし、酵母ツーハイブリッド法(Y2H)により *Rj2* 型 R タンパク質と 122 型 NopP の相互作用は観察されなかった。したがって、NopP と R タンパク質が直接的な相互認識を経て共生不和合性が誘導されるのではないが、その他の因

子も関わった間接的な相互認識機構の存在が示唆された。

共生和合型の USDA110 株だけでなくダイズ根粒菌ゲノム上に広く存在していることから、和合性株が宿主に打ち込む NopP タンパク質に本来の役割がある可能性が考えられ、根粒菌とマメ科植物の共進化という視点から興味を持たれる。また、突然変異株のゲノム解析からダイズ根粒菌ゲノム内で、種々の挿入配列が活性化されて変異が起こっていることが分かり、根粒ゲノム進化の一端も明らかになった。



### (2) N<sub>2</sub>O 還元酵素遺伝子発現制御機構

ダイズ根粒菌 USDA110 株を N<sub>2</sub>O 呼吸条件下で集積培養して得られた Nos<sup>++</sup>変異株(N<sub>2</sub>O 還元酵素活性と *nosZ* 遺伝子発現が高い)のゲノム解析を行ったところ、新規の二成分制御系遺伝子 *nasST* の *nasS* 遺伝子に変異が認められた。

ダイズ根粒菌の NasST システムは硝酸センサーであることを FRET 法で証明したが、ダイズ根圏の硝酸濃度はその閾値より低く、NasST は通常複合体を形成していた(図 4)。一方、*nasS* 変異体は NasST 複合体を形成できず、遊離 NasT タンパク質が生成し、*nosR* 上流のリーディング RNA 配列のアンチターミネータであるヘアピン H1 と H2 に結合した。

EMSA 解析の結果、NasT の結合により *nosR* 遺伝子上流のターミネータ(T)の構造が消失し *nos* オペロンの正の転写促進因子であると考えられた(図 4)。さらに、ヘアピン H1H2T 領域を欠損した根粒菌は *nos* オペロンの発現が恒常的に上昇し、非常に高い N<sub>2</sub>O 還元活性が検出され、温室効果ガス削減の有望な戦略であると考えられた。残された課題は NosR タンパク質による *nos* オペロンの制御である。

また、根粒菌 NasST の FRET 系を動物細胞へ導入したところ、リアルタイムでの細胞内硝酸・亜硝酸濃度のモニターが可能であった。

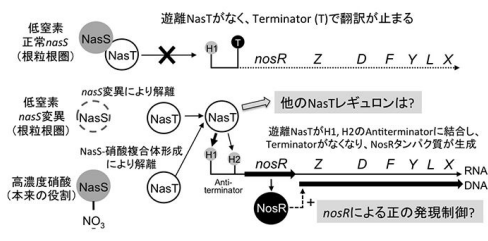


図4. NasSTによるnosオペロンの制御機構。遊離NasTがAntitermination機構によりNosRタンパク質合成を促進する (Sanchez et al. 2017)。

二つの課題とも、生化学や分子生物学の解析が進み、新たな疑問と課題が見えており(図3、図4)、根粒菌とマメ科植物の共生制御や地球温暖化への貢献が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)(全て査読あり)

- (1) Sánchez C, Mitsui H, Minamisawa K. Regulation of nitrous oxide reductase genes by NasT-mediated transcription antitermination in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. 2017. Environ. Microbiol. Rep. (doi: 10.1111/1758-2229.12543)
- (2) Sugawara M, Tsukui T, Kaneko T, Ohtsubo Y, Sato S, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Minamisawa K. 2017. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122, a nitrogen-fixing soybean symbiont. Genome Announc. 5: e01743-16. (doi: 10.1128/genomeA.01743-16)
- (3) Hidaka M, Gotoh A, Shimizu T, Minamisawa K, Imamura H, Uchida T. 2015. Visualization of  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  dynamics in living cells by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging employing a rhizobial two-component regulatory system. J. Biol. Chem. 291: 2260-2269. (doi: 10.1074/jbc.M115.687632)
- (4) Sánchez C, Itakura M, Okubo T, Matsumoto T, Yoshikawa H, Gotoh A, Hidaka M, Uchida T, Minamisawa K. 2014. The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase and periplasmic nitrate reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. Environ. Microbiol. 16: 3263-3274. (doi: 10.1111/1462-2920.12546)

〔学会発表〕(計 33 件)

- (1) 菅原雅之, 岩野裕也, 今道仁, 高橋智子, 佐藤修正, 梅原洋佐, 三井久幸, 南澤究: ダイズと *Bradyrhizobium diazoefficiens* との共生不和合性を誘導する根粒菌 3 型分泌エフェクター. 日本農芸化学会 2017 年度大会. (2017 年 3 月 17 日-20 日, 京都市)
- (2) Kiwamu Minamisawa: Frontiers of plant-associated bacteria. 4th Asian Conference Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. (October 16-19, 2016, Penang, Malaysia)
- (3) 菅原雅之, 岩野裕也, 今道仁, 高橋智子, 日下部翔平, 佐藤修正, 梅原洋佐, 三井久幸, 南澤究: ダイズと *Bradyrhizobium*

diazoefficiens との共生不和合性を誘導する根粒菌エフェクター. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会. (2016 年 9 月 8 日, 仙台市)

- (4) 今道仁, 菅原雅之, 岩野裕也, 佐藤修正, 三井久幸, 南澤究: 共生不和合性を誘導する根粒菌エフェクターのダイズによる認識と応答. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会. (2016 年 9 月 8 日, 仙台市)
- (5) 高橋智子, 鈴木悠太, 菅原雅之, 三井久幸, 南澤究: ダイズ根粒菌 3 型分泌エフェクター遺伝子の多様性. 植物微生物研究会第 26 回研究交流会. (2016 年 9 月 8 日, 仙台市)
- (6) 菅原雅之, 鈴木悠太, 板倉学, 千葉(柿崎)芳里, 佐藤修正, 加賀秋人, 石本政男, 南澤究: 日本のダイズ根粒菌とダイズの *Rj2* 共生不和合性. 日本土壤微生物学会 2015 年度大会. (2015 年 5 月 22-23 日, つくば市)
- (7) Sánchez C, Itakura M, Okubo T, Matsumoto T, Yoshikawa H, Gotoh A, Hidaka M, Uchida T, Minamisawa K. Regulation of nitrous oxide reductase genes by the NasST system in *Bradyrhizobium diazoefficiens*. 20th European Nitrogen Cycle Meeting. (September 28-30, 2016, Aberdeen, UK)

〔図書〕(計 4 件)

- (1)南澤究 植物における共生の総論(第 13 章 pp.138-146) 共生微生物-生物と密接に関わるミクロな生命体、化学同人(東京)2016 年
- (2)南澤究 微生物ゲノム情報を圃場で生かすー作物根圏からの温室効果ガス発生を制御するためにー(第 6 章, pp.85-102) シリーズ 21 世紀の農学、日本農学会編、養賢堂(東京)2015 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
南澤究 (MINAMISAWA, Kiwamu)  
東北大学・大学院生命科学研究所・教授  
研究者番号: 7 0 1 6 7 6 6 7
- (2)研究分担者  
佐藤修正 (SATO, Shusei)  
東北大学・大学院生命科学研究所・准教授  
研究者番号: 7 0 3 7 0 9 2 1
- (3) 研究分担者  
内田隆史 (UCHIDA, Takafumi)  
東北大学・大学院農学研究所・教授  
研究者番号: 8 0 3 1 2 2 3 9