

令和元年6月12日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04889

研究課題名(和文)根粒菌エフェクターによるマメ科植物新規共生経路の解明

研究課題名(英文) Characterization of a novel leguminous symbiosis pathway derived by rhizobial effector

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物の根粒形成には根粒菌が作るNod factor (NF)が必須であると長い間考えられていたが、申請者らは根粒菌Bradyrhizobium elkanii USDA61株が分泌タンパク質Bel2-5によりNF非依存的にダイズに根粒形成することを見出した。本研究では、Bel2-5の大腸菌発現系を構築し、抗Bel2-5抗体を作成してBel2-5の分泌と宿主細胞内での局在を明らかにした。また、Bel2-5を他根粒菌に導入した結果、NF受容体変異ダイズへの根粒形成能が可能となった。以上の結果から、Bel2-5がマメ科植物の共生シグナルをNF非依存的に活性化する本体であることが明らかとなった。

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(Bel2-5)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唆している。今後Bel2-5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紐解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 elkanii USDA61, however, establishes symbiosis with soybean by a putative secreted protein Bel2-5 in the NF-independent manner. In this study, we expressed Bel2-5 protein in Escherichia coli and generated anti-Bel2-5 antibody and confirmed the secretion and localization of Bel2-5 in host cells. Besides, when expressed in other rhizobia, Bel2-5 conferred the ability to modulate the NF receptor mutant soybean. These results indicated that Bel2-5 is responsible for activating the NF-independent nodulation signaling.

研究分野：植物微生物共生

キーワード：共生 根粒菌 マメ科植物 3型分泌系 エフェクター ダイズ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物・植物病原菌の中には、3型分泌系 (Type III secretion system) と呼ばれる細胞膜上の複合体により宿主細胞内へタンパク質 (エフェクター) を注入する機構がある (図1)。病原菌のエフェクターは、宿主の防御システムを制御することで病原菌の感染を促進するが、宿主細胞の中には注入されたエフェクターを認識することで、病原菌に対する防御応答を起こすものも存在する。

病原菌ではなく、マメ科植物と共生する根粒菌の中にも3型分泌系を持つものが見つかってきている。また、根粒菌の3型分泌系は、特定の宿主との共生成立に影響することが報告されている。病原菌の感染機構を考慮すると、根粒菌もエフェクターにより宿主機能を制御していると予想されるが、その分子機構は不明である。

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。第一段階は、根粒菌が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) という共生シグナル物質を合成・分泌する。第二段階は、NF が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 NF 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 (図2)。

申請者らは根粒菌の3型分泌系を研究する中で、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. FEMS Microbiol. Lett. 2009)。さらに、根粒菌の3型分泌系が、これまでマメ科植物-根粒菌共生の開始に必須と考えられていた根粒菌のNFとマメ科植物のNFRから成る相互認証過程を経由せずに、マメ科植物の根粒形成シグナルを直接活性化するという根粒菌の新規共生経路を明らかにした (図2, Okazaki et al. PNAS 2013)。2015年、申請者らはトランスポゾン変異法により、ダイズとの共生に関わる3型エフェクターをスクリーニングし、新たなエフェクター候補遺伝子 *Bel2-5* を発見した (Faruque et al. 2015, Appl. Environ. Microbiol.)。 *Bel2-5* を破壊した BE2-5 株を作成し、ダイズとの共生を調べた結果、BE2-5 株は NFR 変異ダイズ (En1282) への根粒形成能を失った。このことから、 *Bel2-5* 遺伝子産物は、NF と NFR から成る相互認証過程を経由せずに根粒形成シグナルを直接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。しかしながら、 *Bel2-5* の生化学的作用や宿主細胞内での機能については明らかになっておらず、根粒形成シグナル活性化機構についての詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、根粒菌3型エフェクター *Bel2-5* の生化学的解析、毛状根形質転換系による *Bel2-5* 発現植物の作成、および根粒菌エフェクター *Bel2-5* の異種根粒菌への導入とその共生能の評価を行い、根粒菌エフェクターによる新たなマメ科植物-根粒菌共生経路の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 根粒菌3型エフェクターの大腸菌発現系の構築と生化学的解析

根粒菌エフェクター *Bel2-5* 遺伝子は、1,328 アミノ酸からなる産物をコードし、産物の1000~1200 残基目に真核生物の SUMO-specific protease 様システインプロテアーゼ類似配列を持つことから、宿主細胞内の標的タンパク質に SUMO (Small ubiquitin-related modifier, ユビキチン様の修飾因子) を付加/除去する可能性が考えられる。そこで、*in vitro* で *Bel2-5* タンパク質の生化学的作用を明らかにするため、大腸菌発現系を構築する。精製を容易にするため、MBP や GST などの分子タグを付加したタンパク質として発現させる。タンパク質の発現量が少ない、発現しても不溶化する場合などは、誘導系の異なる発現ベクターやシャペロンとの共発現、根粒菌内での発現を試みる。

なお、上記のように大腸菌で発現させた *Bel2-5* タンパク質を用いて、抗体を作成する。抗体は根粒菌エフェクターと宿主標的タンパクとの間の相互作用解析、エフェクター発現ミヤコグサ根粒菌によるミヤコグサ共生変異体への根粒形成、および根粒菌エフェクターを発現するマメ科植物形質転換毛状根の作出と根粒形成能の評価において、 *Bel2-5* タンパク質の検出のために利用する。

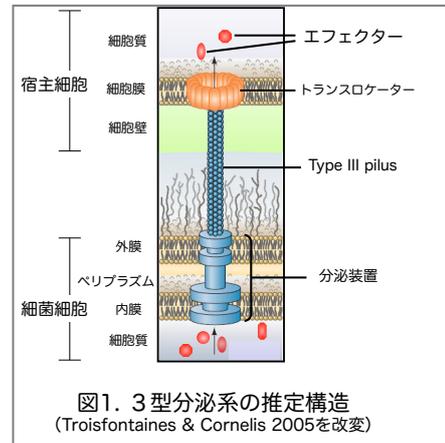


図1. 3型分泌系の推定構造 (Troisfontaines & Cornelis 2005を改変)

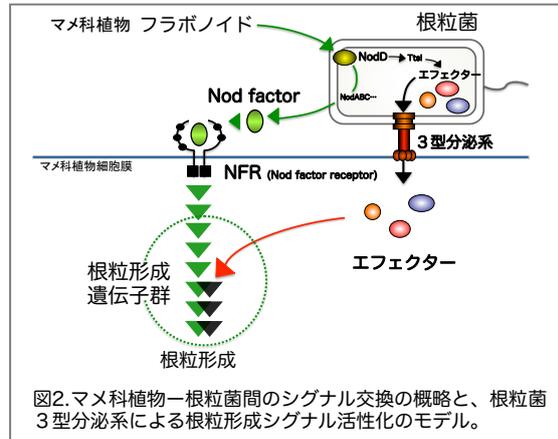


図2. マメ科植物-根粒菌間のシグナル交換の概略と、根粒菌3型分泌系による根粒形成シグナル活性化のモデル。

(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。毛状根形質転換用ベクターpJCV51に *bel2-5* 遺伝子を導入し、*Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 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 *bel2-5* 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 の局在を観察した。

(4) 根粒菌エフェクターBel2-5 の異種根粒菌への導入とその共生能の評価  
根粒菌エフェクター *bel2-5* 遺伝子をとランスポゾンプラスミド pBjGroEL4::DsRed2 (Hayashi et al., 2014) の *SacI-KpnI* サイトにクローニングし、pBjGroEL4::*bel2-5* を作成した。塩基配列を確認したのち、pBjGroEL4::*bel2-5* をミヤコグサ根粒菌など各種根粒菌に三者接合により導入した。Bel2-5 遺伝子の挿入を PCR により確認した後、ミヤコグサやダイズ等に接種して根粒形成能力を調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 根粒菌エフェクターBel2-5 の生化学的解析

大腸菌での Bel2-5 発現系を検討した。最初に使用した pET ベクターでは発現量が低かったため、可溶性タンパク質の発現に適している2つの発現ベクター (GST 融合発現ベクター pGS-21a およびマルトース結合タンパク質融合発現ベクター pMAL-c5x) を用いて大腸菌における発現量と可溶性を検討した。IPTG で発現誘導し、SDS-PAGE で確認した結果、いずれのベクターでも Bel2-5 の分子量に近いタンパク質の存在が確認され、特に GST 融合発現ベクターでの発現量が高かった。現在、この GST 融合 Bel2-5 のアフィニティカラム精製を行なっている。今後、精製した Bel2-5 を用いて *in vitro* で SUMO 付加・除去およびプロテアーゼ活性について検討する。

また、Bel2-5 タンパク質に対する抗体を作成し、ウェスタンブロットにより Bel2-5 タンパク質が検出されることを確認した。Bel2-5 タンパク質は GST タグ融合タンパク質としても発現できたことから、今後、Bel2-5 タンパク質を精製して生化学的解析を行うことで、宿主マメ科植物内での機能解析を行う。

(2) 根粒菌エフェクターを発現するマメ科植物形質転換毛状根の作出と根粒形成能の評価  
宿主細胞内における根粒菌エフェクターの局在が、根粒形成を誘導するスイッチとなるかを検討するために、Bel2-5 を発現するダイズの形質転換毛状根を作出し、その根粒形成を調査した。ミヤコグサユビキチンプロモータの下流に *bel2-5* 遺伝子を挿入したバイナリーベクターを作成し、*Agrobacterium rhizogenes* を用いた毛状根形質転換系によりミヤコグサ Gifu B-129 および MG-20 で Bel2-5 タンパク質を発現させたが、根粒組織形成や根の形態に顕著な変化は観察できなかった。また、同様の実験をダイズ品種エンレイを用いて行った結果、Bel2-5 導入形質転換体では、根の伸長が著しく阻害される現象が観られた。詳細は不明であるが、Bel2-5 がダイズ根の細胞機能に悪影響を及ぼしている可能性が考えられた。今回利用したバイナリーベクターのユビキチンプロモーターの転写活性が強すぎる可能性が考えられたため、今後は DEX 誘導プロモーターなど発現をコントロールできるベクターで検討する必要がある。

##### (3) 根粒菌エフェクターの植物細胞内における局在解析

Bel2-5 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。Bel2-5 は中心部に核局在シグナルと推定されるアミノ酸配列 (RPAKRPTL) 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。

##### (4) エフェクターBel2-5 の異種根粒菌への導入とその共生能の評価

ミヤコグサ根粒菌 MAFF303099 株にエフェクターBel2-5 遺伝子を導入し、宿主域の拡大や根粒形成促進が観られるか検討した。トランスポゾンで Bel2-5 を導入した MAFF303099 株をミヤコグサの Nod factor 受容体変異株へ接種し、根粒形成を調査したが、根粒組織形成や根の形態に顕著な変化は観察できなかった。この原因としては、Bel2-5 はダイズ根粒菌 USDA61 株のエフェクターであり、ミヤコグサ根粒菌では分泌されない、分解や修飾を受けるなどの要因が考えられた。

次に、同様の方法で Bel2-5 を根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株と *Bradyrhizobium* sp. STM6978 株に導入した。USDA110 株では Bel2-5 導入株と野生株で共生能に変化はみられなかったが、STM6978 株では野生株がダイズ En1282 に根粒を形成できないのに対し、Bel2-5 導入株では根粒形成がみられた。これらの結果から、Bel2-5 がダイズの根粒形成シグナルを活性化できること、その能力の発現は根粒菌株および宿主植物に依存することが明らかとなった。Bel2-5 の効果が菌株依存的、宿主植物依存的な理由は現時点で不明であるが、根粒菌株ごとに 3 型分泌エフェクターのレパートリーが異なることを考えると、エフェクター分泌や宿主細胞内でのエフェクターの機能が宿主と根粒菌の共進化により分化してきたことが背景にあると推察される。

以上のように、本研究では、根粒菌エフェクター Bel2-5 の大腸菌発現系を構築し、抗 Bel2-5 抗体を作成して Bel2-5 の分泌と宿主細胞内での局在を明らかにした。また、Bel2-5 を他根粒菌に導入した結果、NF 受容体変異ダイズへの根粒形成能が可能となった。これらの結果から、Bel2-5 が根粒菌 *B. elkanii* USDA61 により分泌されダイズにおいて 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が明らかとなった。

## 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

(1)研究分担者

研究分担者氏名：林 誠

ローマ字氏名：Hayashi Makoto

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：環境資源科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）：30291933

※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。