

機関番号：14602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780056

研究課題名（和文）Rj 遺伝子保有ダイズとの共生成立を決定づける根粒菌分泌蛋白質の同定

研究課題名（英文）Identification of Rhizobial secreted proteins which are responsible for the nodulation on Rj soybean

研究代表者 岡崎 伸 (OKAZAKI SHIN)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教

研究者番号：40379285

研究成果の概要（和文）：*rj* 遺伝子保有ダイズおよび *nfr1* 変異ダイズにおいて、根粒菌は III 型分泌系依存的に根粒を形成した。このとき接種根では共生遺伝子 *ENOD40* および *NIN* の発現上昇がみられた。これらの結果は、III 型分泌系がマメ科植物-根粒菌共生に必須と考えられている Nod factor と NFR から成る相互認証を経由せずに共生シグナル伝達を活性化し、根粒形成を誘導することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：*rj* and *nfr1* mutant soybeans formed nodules by rhizobia harboring the type III secretion system (T3SS). Host nodulation genes were induced in the root inoculated with the T3SS-harboring rhizobia, suggesting that T3SS enforces legume host to initiate symbiotic programs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：植物微生物相互作用

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：根粒菌、共生窒素固定、ダイズ、III 型分泌機構、マメ科植物

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の相利共生は、シグナル物質を介した相互認証により成立する。ダイズ(*Glycine max*)では、ある血清型の根粒菌との共生成立を阻害する *Rj* 遺伝子が知られている。申請者らは、根粒菌のタンパク質分泌機構の一つである III 型分泌系 (Type III secretion system, T3SS) が *Rj* 遺伝子保有ダイズと根粒菌との共生に関与することを発見したが、その分子機構についてはほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では根粒菌 T3SS が *Rj* 遺伝子保有ダ

イズとの共生にどのように関与しているか、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 根粒菌分泌蛋白質候補遺伝子の破壊と共生能の評価

バイオインフォマティクス解析により、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株ゲノムより T3SS で分泌されるタンパク質候補遺伝子を選抜する。T3SS で分泌されるタンパク質の特徴として、N 末端アミノ酸配列における保存性 (Ser, Asp, Gln が多い、Cys が少ない、3、4 番目に Ile, Val, Ala, Pro が多

いなど) や、5'-上流に正の制御因子 TtsI 蛋白質結合配列を持つことが知られているので、これらの特徴を選抜基準とする。各々の候補遺伝子について破壊株を作製し、*Rj* 遺伝子保有ダイズとの共生能を野生株と比較検討する。

(2) *rj1* 遺伝子保有ダイズおよび *nfr1* 変異ダイズとの共生成立における T3SS の役割

USDA61 株は T3SS 依存的に *rj1* 遺伝子保有ダイズ Clark-*rj1* に根粒形成することができる。近年、*rj1* 遺伝子については根粒菌 nod-factor のマメ科植物側受容体 (NFR1, Nod factor receptor 1) の変異遺伝子であるという報告がなされている。これを検証するため、ダイズ品種エンレイ由来の *nfr1* 変異体である En1282 に *B. elkanii* USDA61 野生株と III 型分泌系破壊株 (Δ T3SS) を接種し、Clark-*rj1* と同様な現象が再現できるか検討する。

(3) 根粒菌 T3SS による宿主共生遺伝子の活性化

根粒菌 T3SS が宿主共生シグナルをどのように活性化するのかを推定するため、ダイズ根における遺伝子発現を比較する。USDA61 株または Δ T3SS を接種したダイズ根を回収して RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により宿主共生遺伝子の発現解析を行う。USDA61 株と Δ T3SS 接種の間で発現量が変動する遺伝子を突き止め、T3SS の共生シグナル活性化経路を推定する。

(4) T3SS が促進する根粒菌感染の特徴

T3SS が促進する根粒菌感染の特徴を解析するため、 β -グルクロニダーゼで標識した根粒菌を用いて、マメ科植物への感染を観察する。

4. 研究成果

(1) 根粒菌分泌蛋白質候補遺伝子の破壊と共生能の評価

バイオインフォマティクス解析の結果、根粒菌 *B. elkanii* USDA61 株ゲノムから III 型分泌タンパク質の基準に合致する遺伝子を 4 つ選抜した。これらの遺伝子の破壊株を作製し、*rj1* 遺伝子保有ダイズ Clark-*rj1* および *Rj4* 遺伝子保有ダイズ Hill に接種して共生形質を検討した。その結果、USDA61 株と遺伝子破壊株の接種において着生根粒数に有意な差はみられなかった。バイオインフォマティクス解析で検出されなかった III 型分泌タンパク質の可能性を考慮し、現在異種相補試験によるスクリーニングを行っている。

(2) *rj1* 遺伝子保有ダイズおよび *nfr1* 変異ダイズとの共生成立における T3SS の役割

ダイズ品種エンレイ由来の *nfr1* 変異体であ

る En1282 に USDA61 株および III 型分泌系破壊株 (Δ T3SS) を接種した結果、USDA61 株は En1282 に窒素固定根粒を形成したが、 Δ T3SS は全く根粒を形成しなかった (図 1)。

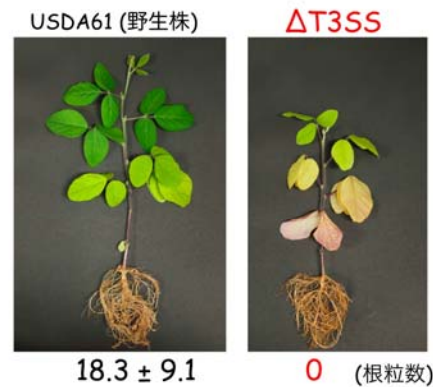


図1. *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 野生株と III 型分泌系破壊株 (Δ T3SS) を接種したダイズ En1282。30日間栽培

この結果から、ダイズ品種エンレイにおいても根粒菌は T3SS 依存的に *nfr1* 変異体ダイズへ根粒形成することが明らかとなった。すなわち、Clark-*rj1* およびエンレイという 2 つのダイズ品種において、根粒菌が T3SS によって *nfr1* 変異体ダイズへ根粒形成するという現象を確認できた。

(3) 根粒菌 T3SS による宿主共生遺伝子の活性化

発現解析の結果、USDA61 株を接種した *nfr1* 変異体ダイズ En1282 の根において、通常は Nod factor -NFR の相互認証により誘導される共生遺伝子 *ENOD40* および *NIN* の発現上昇がみられた (図 2)。一方、 Δ T3SS 接種

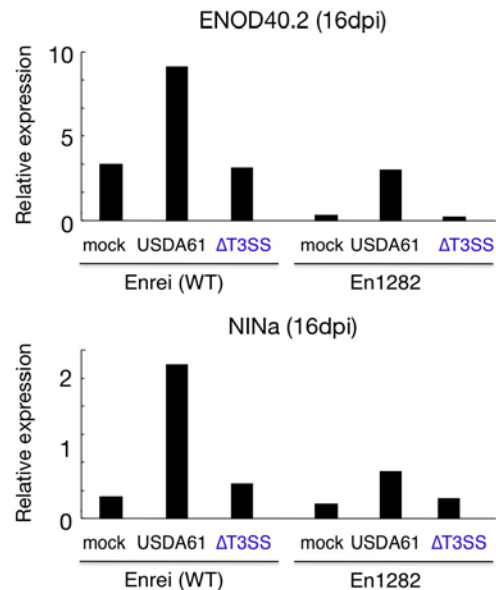


図2. 宿主側共生遺伝子 ENOD40.2 および NIN の発現。USDA61 株および Δ T3SS を接種し 16 日後のダイズ根における発現をユビキチン遺伝子に対する相対量で表示。

根では無接種と同程度の発現量であった。
 以上の結果から、根粒菌 T3SS は、マメ科植物-根粒菌共生に必須と考えられていた Nod factor と NFR から成る相互認証過程を経由せずに、共生シグナル伝達を活性化し、根粒形成を誘導することが示唆された (図3)。

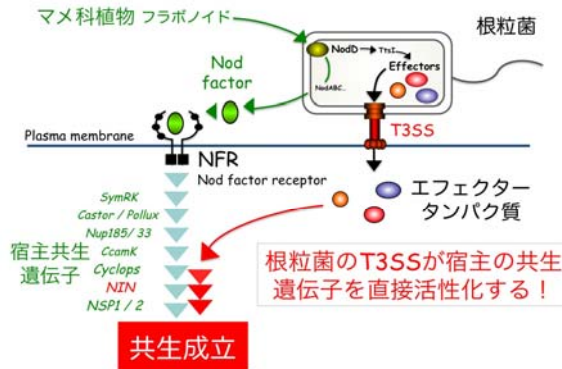


図3. 根粒菌のIII型分泌系の作用機構モデル。III型分泌系で打ち込まれる分泌蛋白質 (エフェクター) が宿主の共生遺伝子を直接活性化する。

(4) T3SS が促進する根粒菌感染の特徴

β -グルクロニダーゼで標識した根粒菌 USDA61 株と Δ T3SS を野生型エンレイと *nfr1* 変異体 En1282 に接種した結果、野生型エンレイでは USDA61 株と Δ T3SS どちらも根毛からの感染が観察され、特徴的な根毛のカーリングや感染糸とよばれる構造が観察された。一方、*nfr1* 変異体 En1282 では根毛からの感染は観察されなかった (図4)。En1282 では根の裂け目から根粒菌が侵入する crack entry や細胞間感染とよばれる感染が起きている可能性があり、T3SS はこのような感染を促進している可能性が示唆された。

		根毛	感染糸	根粒
野生型 エンレイ	USDA61	カーリング	感染糸	根粒
	Δ T3SS	カーリング	感染糸	根粒
<i>nfr1</i> 変異体 En1282	USDA61			根粒
	Δ T3SS			根粒形成なし

図4. 野生型エンレイおよび *nfr1* 変異体 En1282 への USDA61 および Δ T3SS の感染過程。根粒菌は β -グルクロニダーゼで標識しており、染色により青く染まっている。

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 2 件) (いずれも査読あり)

① Okazaki S, Okabe S, Higashi M, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, Hashiguchi M, Akashi R, Göttfert M, K. Saeki. (2010) Identification and functional analysis of Type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23:223-342.

② Okazaki S, Zehner S, Hempel J, Lang K, Göttfert M. (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiology Letters*. 95:88-95.

[学会発表] (計 11 件)

① 岡崎伸 : 根粒菌の III 型分泌機構はマメ科植物の共生シグナルを活性化する. 第 5 回日本ゲノム微生物学会若手の会 (2011 年 9 月 29 日、静岡)

② 岡崎伸, 佐伯和彦 : 根粒菌 III 型分泌系によるマメ科植物共生シグナルの活性化機構. 植物微生物研究会第 2 1 回研究交流会 (2011 年 9 月 22 日、岡山)

③ 岡崎伸 : マメ科植物と共生する根粒菌の III 型分泌機構. 第 5 回細菌学若手コロッセウム (2011 年 8 月 9 日、高知)

④ 岡崎伸, 東未来, 岡部沙織, 佐伯和彦 : マメ科植物と共生する根粒菌の III 型分泌機構. 第 4 回ゲノム微生物学会 若手の会 (2010 年 10 月 1 日、神戸)

⑤ Okazaki S, Saeki K : Rhizobial Type III Secretion System Modulates the Nodulation Signaling in Soybean. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (2010 年 9 月 21 日、宮崎)

⑥ 岡崎伸, 東未来, 岡部沙織, 佐伯和彦 : マメ科植物との共生を決定づけるミヤコグサ根粒菌 3 型分泌系. 日本植物生理学会第 51 回年会 (2010 年 3 月 19 日、熊本)

⑦ Okazaki S, S Okabe, M Higashi, Göttfert M, K Saeki : Symbiotic Roles of Rhizobial Type III Secretion Systems. The 7th Okazaki Biology Conference. (2010 年 1 月 14 日、掛川)

⑧ 岡崎伸, 東未来, 岡部沙織, 佐伯和彦 : マメ科植物との共生における根粒菌 3 型分泌系の役割. 第 3 回細菌学若手コロッセウム (2009 年 10 月 27 日、宮崎)

⑨ 岡崎伸, 佐伯和彦 : *Rj* 遺伝子保有ダイズとの共生を司る根粒菌 Type III 分泌系. 植物微生物研究会第 19 回研究交流会 (2009 年 9 月 9 日、松本)

⑩ 岡崎伸, 東未来, 岡部沙織, 佐伯和彦 : 宿主特異性を決定づけるミヤコグサ根粒菌

Type III エフェクターの同定. 第 56 回日本生化学会近畿支部例会 (2009 年 7 月 25 日、高槻)

⑪ Okazaki S, M Higashi, S Okabe, Göttfert M, K Saeki : Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. 14th International congress on molecular plant-microbe interactions. (2009 年 7 月 21 日、Quebec, Canada)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 伸 (OKAZAKI SHIN)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・助教
研究者番号 : 40379285