

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658057

研究課題名(和文) 超近縁菌比較ゲノムによるブラディリゾビウム属細菌の植物共生システムの解明

研究課題名(英文) Global systems of symbiotic nitrogen-fixing bradyrhizobia by comparative genomics of phylogenetic super-neighbors

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) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒菌に近縁な細菌の中で、植物共生表現型が異なる「超近縁菌」のゲノム比較により、新規な共生機構を解明した。土壌低栄養細菌S23321株は共生アイランドが転移する前の祖先型ゲノムであった。一方、土壌低栄養細菌Agromonas oligotrophicaは共生アイランドを持たないが、クサネムに根粒と茎粒を形成する共生窒素固定細菌であった。ダイズ根粒菌USDA122株はタンパク質分泌系によりRj2ダイズに共生不和合性を起こすことが分かり、マメ科植物と根粒菌の進化上のせめぎ合いが明らかとなった。以上のように、微生物-植物相互作用の解明ために「超近縁菌比較ゲノム」の戦略が大変有効であった。

研究成果の概要(英文)：Global systems of symbiotic nitrogen-fixing bradyrhizobia were conducted by comparative genomics of phylogenetic super-neighbors of the bacteria. Soil-dwelling Bradyrhizobium sp. strain S23321 lacked symbiosis island with high genomic co-linearity with *B. japonicum* USDA110, suggesting an ancestral-type genome of symbiotic bradyrhizobia. On the other hand, the genome analysis suggested soil-dwelling Agromonas oligotrophica (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aechynomene indica*. Indeed, all tested strains of *A. oligotrophica* are able to nodulate *A. indica* with symbiotic nitrogen fixation. In addition, the *rhcJ* and *ttsI* mutants of *B. japonicum* for the type III protein secretion system (T3SS) gained the ability to nodulate Rj2 soybean, suggesting the effectors secreted via T3SS trigger in compatibility between these two partners.

研究分野：農学

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：共生 ゲノム比較 根粒菌 *Bradyrhizobium* 窒素固定 土壌低栄養細菌 タンパク質分泌系

## 1. 研究開始当初の背景

ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属ダイズ根粒菌の近縁菌には、根粒共生のみでなく、茎粒共生、エンドファイト共生をする窒素固定細菌が知られており、持続的食糧生産にとって重要である。しかし、これら細菌のゲノムサイズは大きく、研究開始時はダイズ根粒菌 USDA110 株と光合成茎粒菌 ORS278 と BTAi1 株の3株のみが公表されていた。申請者らは、ダイズ根粒菌 USDA110 株アレイ比較により、ITS 領域(rRNA 遺伝子間の可変領域)で初めて相違が認められる「超近縁菌」でゲノム比較が可能であった。そこで、申請者は上記3株と極めて近縁な細菌株「超近縁菌」を土壤低栄養細菌エココレクションから選抜し、他の研究機関と共同して「超近縁菌」S23321 株等のゲノム1次情報を得て、解析をスタートしていた。また、共生不和合性 *Rj2* 因子保有ダイズ品種に不和合性を起こす USDA122 株ゲノム解析も進めている。そこで、エンドファイト共生・茎粒形成・根粒形成不和合性というレベルの異なる共生現象を担う遺伝子の解析をゲノム比較ベースで進める研究計画を策定した。

## 2. 研究の目的

ダイズ根粒菌に近縁な細菌として、根粒形成 (*nod*) 遺伝子のない光合成茎粒菌、窒素固定エンドファイト、宿主遺伝子 *Rj* と不和合性を起こすダイズ根粒菌が知られ、全ゲノムデータが蓄積しつつある。しかし、*Bradyrhizobium* 属植物共生細菌は、ゲノムサイズ(7.5-9.2 Mb)が大きく、従来法ではゲノムから共生に関わる遺伝子や領域を特定するのは難しい。そこで、16S rRNA 遺伝子や ITS 配列より極めて近縁と判断される非共生または植物共生表現型が異なる「超近縁菌」を探索し、両者のゲノム比較を行い、そこから得られた知見に基づいて、植物共生遺伝子・共生領域・共生因子を明らかにし、それらの持続的食糧生産への利用の基盤とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Bradyrhizobium* 属細菌を HM 液体培地で培養し、常法で DNA を抽出精製した。ショットガンライブラリーおよびペアエンドライブラリーを作成し、454 パイロシーケンサーおよびサンガー法(3730xl DNA アナライザー)

にて配列決定を行った。得られた配列データを Phred/Phrap/Consed システムでアセンブルを行い、コンテイング間のギャップの PCR 産物をサンガー法で配列決定し、全ゲノム塩基配列を決定した。タンパク質をコードする遺伝子は MetaGeneAnnotator により予測を行った。遺伝子の系統樹は、CLUSTAL W と MEGA を用いて作成した。MUMmer または GenomeMatcher により、ゲノムレベルの塩基配列比較を行った。

ダイズ、クサネム、サイラトロのマメ科植物の種子を表面殺菌後、*Bradyrhizobium* 属細菌を接種し、根粒や茎粒形成および植物体の生育を比較した。窒素固定活性はアセチレン還元法または無接種区を対照として全窒素集積で求めた。蛍光タンパク質 DeRed や GasA で標識菌を作成し、接種し、形成された根粒や茎粒を(共焦点)蛍光顕微鏡で観察した。

ダイズ根粒菌の3型タンパク質分泌装置(T3SS)の *rhcJ* 遺伝子および T3SS 遺伝子群の誘導タンパク質をコードしている *ttsI* 遺伝子の破壊株を作成した。ダイズ根粒菌の根粒形成遺伝子を誘導するフラボノイドであるゲニステインを添加および無添加の根粒菌培養液から分泌タンパク質を精製し、飛行時間型の質量分析装置(MALDI/TOF/MS)で分析し、分泌タンパク質の同定と有無を調べた。

## 4. 研究成果

(1) ダイズ根粒菌 USDA110 株の「超近縁株」S23321 株のゲノム決定と比較

「超近縁株」戦略のひな形として、土壤低栄養細菌 S23321 株のゲノムと USDA110 株ゲノムの詳細な比較解析を行った(図1)。ゲノム全体として相同性が高いが、共生アイランドの欠失と大きな逆位が観察された。USDA110 株の共生アイランド周辺配列と S23321 ゲノムの比較により、S23321 株は tRNA-Val の配列も含めて共生アイランドのボーダー配列(USDA110)を保持していた。また、主に共生アイランドに存在し、共生アイランド外に飛び散る性質を持っている多数の挿入配列も S23321 ゲノムには一つも検出されなかった。したがって、S23321 株は共生アイランドが転移する前の祖先型ゲノムを持っていることが示唆された。さらに、S23321 株は系統的には USDA110 株に近縁であるが、窒素固定(*nif*)遺伝子群は共生アイラ

ンド上の *nif* 遺伝子群とは異なり、むしろ光合成茎粒菌 ORS278 株の *nif* 遺伝子群と相同性が高かった (図2)。S23321 株はほぼ完全な光合成遺伝子を保有していた。これらの結果より、ダイズ根粒菌に共生アイランドが挿入されると、本来保有していた *nif* 遺伝子群が排除されるのではないかと推定された。

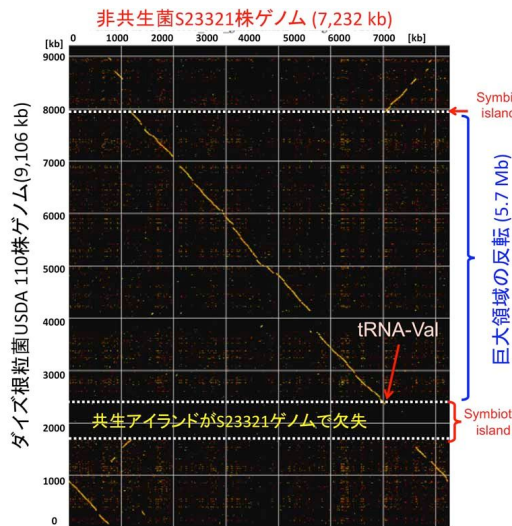


図1 ダイズ根粒菌USDA 110株とS23321株とのゲノムの比較

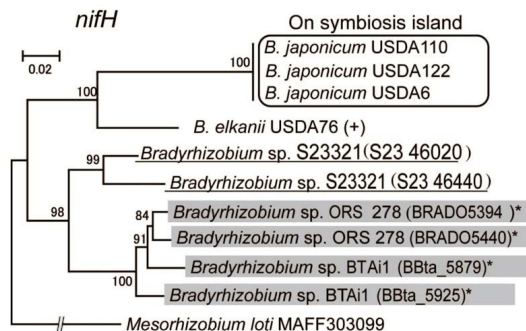


図2 S23321、ダイズ根粒菌 (USDA110, USDA122, USDA6)、光合成Bradyrhizobium属細菌 (グレー) の *nifH* 系統樹

## (2) 土壌低栄養細菌 *Agromonas oligotrophica* と光合成 *Bradyrhizobium* 属細菌のクサネムへの根粒・茎粒形成

光合成茎粒菌—エンドファイト—非共生土壌細菌の「超近縁株」比較では、まず *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) S58 株ゲノムを決定し、近縁のクサネム *Aeschynomene indica* の茎粒・根粒菌である ORS278 および BTai1 株ゲノムとの比較を行ったところ、驚いたことに S58 株ゲノムには根粒発達遺伝子 (*nodV*) や窒素固定遺伝子 (*nif*, *fix*) をほぼ全て保有していた。そこで、クサネムに接種実験とその他の観察

を行ったところ、*Agromonas oligotrophica* に属する全ての株がクサネム根粒菌であることが分かった。Gus および DsRed 標識株による接種実験で S58 株がクサネム (*Aeschynomene indica*) に茎粒と根粒を形成し、当該土壌細菌が根粒内でバクテロイドに分化することを証明した (図3)。S58 株ゲノムには Cluster 1 に属するダイズ根粒菌のように *B. japonicum* 根粒形成遺伝子 (*nod* gene) や共生アイランドが存在しなかったため、本結果は、未知の Nod-factor 非依存性の共生システムやその共生進化について大きな一石を投じた。



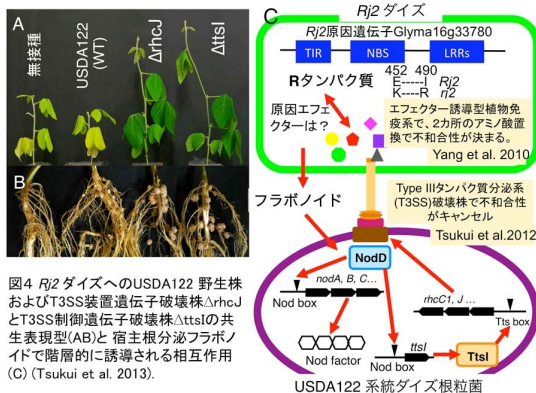
図3 *A. oligotrophica* のクサネムへの接種実験

## (3) 「超近縁菌株」USDA122 株のゲノム決定による共生不和合性と共生窒素固定促進エフェクターの解析

*Rj2* 因子保有ダイズに不和合性を示す USDA122 の Type III タンパク分泌系の遺伝子 *rhcJ* と *ttsI* の遺伝子破壊株を作成し、接種実験を行ったところ、共生不和合性現象が完全にキャンセルされた (図4)。すなわち、*rhcJ* と *ttsI* 変異体の接種では *Rj2* ダイズに根粒が正常に形成されるようになった。この結果は、ダイズ根粒菌の Type III 分泌系が宿主植物に打込むエフェクターが不和合性現象を起こしていることを強く示唆した。

*Rj2* ダイズに共生不和合性を起こす USDA122 株と不和合性を起こさない USDA110 株の超近縁菌のゲノム比較データと、フラボノイド存在下における T3SS 依存性の分泌タンパク質の解析を行った。その結果、共生不和合性を起こす USDA122 株に特有な分泌タンパク質をコードしている遺伝子 122\_1969 を同定した。面白いことに、122\_1969 遺伝子はフラボノイドで誘導される *tts* box を保有しており、約 10 kb の稼働性領域として USDA110 株ゲノムの対応領域にターゲット重複を起

こして挿入されていた。USDA122 株の 122\_1969 遺伝子破壊株を作成し、*Rj2* ダイズに接種したが、共生不和合性はキャンセルされなかった。この結果は、少なくとも 122\_1969 遺伝子のみが共生不和合性を起こしていないと考えられた。しかし、*rj2* ダイズに接種したところ、根粒形成は野生株と同様であったが、共生窒素固定能が有意に半分となった。この結果は、USDA122 株の 122\_1969 遺伝子が共生窒素固定能を上昇させるエフェクターであることを示唆していた。122\_1969 遺伝子は、ミヤコグサ根粒菌にも T3SS (日本型)、T4SS (欧米型) のエフェクター遺伝子ホモログで共生に重要と考えられる。また、既報の根粒数や感染の制御ではなく、共生窒素固定能を上昇させるエフェクター遺伝子として初めての発見となった。



#### (4) 今後の研究の推進方向

3年間の *Bradyrhizobium* 属細菌の超近縁菌比較ゲノムによる植物共生システムの研究から数々の面白い成果が得られた。

USDA122 株に特有な分泌タンパク質をコードしている遺伝子 122\_1969 の研究は、共生窒素固定能を上昇させるエフェクター遺伝子である可能性が高い。また、USDA122 株の 122\_1969 遺伝子破壊株および USDA110 株の染色体への 122\_1969 遺伝子相補株の作成に成功しており、今後タンパク質分泌実験やダイズ接種への実験を引き続き行い、論文をまとめたい。また、本研究の経験から、*Rj2* ダイズに共生不和合性を起こすエフェクターも、複数のエフェクターが関わる場合でも同定可能なシステムを、近年汎用されてきている MiSeq による安価なゲノムシーケンズにより作りつつある。

当初非共生の土壌細菌と考えていた

*Agromonas oligotrophica* S58 株やその近縁土壌細菌が何故 Nod factor に依存しない茎粒や根粒をクサネムに形成するのかの解明の貴重な研究資源となりつつあり、我々のグループでも共生高次化の視点で、研究を継続したい。サツマイモエンドファイトについては、超近縁土壌細菌を見いだせず、ゲノム比較に至らなかったが、今後 *Bradyrhizobium* 属細菌コレクションのドラフトゲノム配列と引き続き比較を続けて行きたい。

今回の研究成果をベースにして、今後 16S rRNA 遺伝子および ITS が完全に一致している菌株同士の「超超近縁菌株」のゲノム比較により、食料生産の基盤になる共生システムや系統の進化の研究に取り組みたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Tsukui, T., S. Eda, T. Kaneko, S. Sato, S. Okazaki, K. Kakizaki-Chiba, M. Itakura, H. Mitsui, A. Yamashita, K. Terasawa, and K. Minamisawa. 2013. The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with *Rj2* soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1048-1051. (査読あり) doi: 10.1128/AEM.03297-12

Okubo, T., S. Fukushima, M. Itakura, K. Oshima, A. Longtonglang, N. Teamroong, H. Mitsui, M. Hattori, R. Hattori, T. Hattori, and K. Minamisawa. 2013. Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 2542-2551. (査読あり) doi: 10.1128/AEM.00009-13

Okubo, T., S. Fukushima, and K. Minamisawa. 2012. Evolution of *Bradyrhizobium-Aeschynomene* mutualism: Living testimony of the ancient world or highly evolved state? *Plant Cell Physiol.* 53: 2000-2007. (査読あり) doi: 10.1093/pcp/pcs150

Okubo T, T. Tsukui, H. Maita, S. Okamoto, K. Oshima, T. Fujisawa, A. Saito, H. Futamata, R. Hattori, Y. Shimomura, S. Haruta, S. Morimoto, Y. Wang, Y. Sakai, M. Hattori, S. Aizawa, K. V. P. Nagashima, S. Masuda, T. Hattori, A. Yamashita, Z. Bao,



M. Hayatsu, H. Kajiya-Kanegae, I. Yoshinaga, K. Sakamoto, K. Toyota, M. Nakao, M. Kohara, M. Anda, R. Niwa, P. Jung-Hwan, R. Sameshima-Saito, S. Tokuda, S. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Yokoyama, T. Akutsu, Y. Nakamura, Y. Nakahira-Yanaka, Y. Takada Hoshino, H. Hirakawa, H. Mitsui, K. Terasawa, M. Itakura, S. Sato, W. Ikeda-Ohtsubo, N. Sakakura, E. Kaminuma and K. Minamisawa. 2012. Complete genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. S23321: Insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. *Microbes Environ.* 27: 306-315. (査読あり)  
doi:10.1264/jsme2.ME11321

〔学会発表〕(計 18 件)

Yuta Suzuki, Cristina Sánchez, Kaori Kakizaki-Chiba, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, Takahiro Tsukui, Kiwamu Minamisawa: Analysis of symbiotic phenotypes of an effector gene unique to *Bradyrhizobium japonicum* USDA122. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. (October 14-18, 2013. Miyazaki, Japan)

Takashi Okubo, Shohei Fukusima, Manabu Itakura, Kenshiro Ohshima, Aphakorn Longtonlang, Neung Teaumroong, Hisayuki Mitsui, Masahira Hattori, Reiko Hattori, Tsutomu Hattori, and Kiwamu Minamisawa. Soil oligotrophic bacterium, *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica* as suggested by genome analysis. The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (Poster presentation, October 28 - November 1, 2012. Phuket, Thailand)

津久井隆裕、江田志磨、金子貴一、佐藤修正、岡崎伸、柿崎(千葉)芳里、板倉学、三井久幸、南澤 究 ダイズ根粒菌 Type III 分泌系による *Rj2* ダイズ共生不和合性の誘導 植物微生物研究会第 22 回研究交流会 (2012 年 9 月 25 日~27 日、神戸)

大久保卓、大島健志朗、三井久幸、服部勉、服部正平、南澤 究：土壌低栄養細菌 *Agromonas oligotrophica* S58<sup>T</sup> のゲノム解析 . 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会 (2012 年 3 月 10 日-12 日、東京)

## 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科・教授