

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712006

研究課題名(和文)根粒菌のエフェクタータンパクによるマメ科植物の共生窒素固定制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the symbiotic nitrogen fixation mechanism of legumes controlled by rhizobial effector protein

研究代表者

下田 宜司 (Shimoda, Yoshikazu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域・主任研究員

研究者番号：80415455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科植物は根粒菌と共生することより根に根粒を形成し、その内部に共生した根粒菌が固定した空中窒素を利用し生育することができる。本研究では、根粒の窒素固定活性の制御機構の一端を明らかにするため、窒素固定ができないマメ科植物変異体の表現型を規定する因子として根粒菌の5型タンパク質分泌装置に着目し、その機能解析を行った。本研究では、根粒菌の5型タンパク質分泌装置の構造特性や分泌活性および分泌領域を明らかにするとともに、5型タンパク質分泌装置の欠損株および過剰発現株を用いて根粒の窒素固定への影響を明らかにした。さらに窒素固定ができないマメ科植物変異体の原因遺伝子との機能的な関連についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Legume plants establish endosymbiotic association with rhizobia and form nitrogen-fixing root nodules to acquire nitrogen nutrition. In order to reveal the molecular mechanisms that control symbiotic nitrogen fixation activity of nodule, We here focused on the legume symbiotic mutant that defective in symbiotic nitrogen fixation and rhizobial protein secretion system as a determinant of symbiotic phenotype of the legume mutant. In this work, we carried out functional analyses on the rhizobial protein secretion system and revealed its protein structure, protein secretion activity and effector protein region that is secreted to extracellular component. By using gene disruption mutants and over-expression of the secretion system, we also revealed the effects of the secretion system to symbiotic nitrogen fixation and functional relationships between the causal gene of host mutant and the protein secretion system.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：マメ科植物 根粒菌 窒素固定 エフェクタータンパク

1. 研究開始当初の背景

マメ科植物と根粒菌の共生は、宿主と根粒菌の相互認識に始まり、根粒菌の感染・根の細胞分裂の活性化を経て、最終的に根粒菌が共生し窒素固定を行う根粒が形成される。近年、マメ科のモデル植物とそれに共生する根粒菌の変異体の解析から、共生の初期過程に関わる複数の遺伝子が同定され、根粒菌の認識や感染過程が分子レベルで明らかになってきた。しかしながらマメ科植物と根粒菌共生の最も重要な形質である窒素固定に関わる宿主および根粒菌遺伝子については未同定なものも多く、根粒の中で根粒菌の窒素固定活性がどのようにして発現し、また宿主によりどのようにコントロールされているのかについては明らかになっていない。本研究開始当初、代表者は根粒菌が感染しても窒素固定を示さないマメ科ミヤコグサの変異体を用いた解析から、根粒菌の5型分泌装置が破壊された株がミヤコグサ変異体の窒素固定表現型を抑圧することを見出していた。そこで本課題では、根粒菌の5型分泌装置の機能解析を通して窒素固定の活性を制御する新たな分子メカニズムの解明を目指し研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究ではマメ科植物-根粒菌間で見られる共生窒素固定の活性を規定する根粒菌因子として5型分泌装置に着目し、そこから分泌されるエフェクターの機能解析を行う。具体的には、エフェクター領域の特定を行い、宿主植物における共生への影響やミヤコグサの窒素固定不全変異体の原因遺伝子との機能的な相互関係を明らかにし、窒素固定活性を制御する新規な分子間相互作用として提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ミヤコグサ根粒菌 TONO 株のゲノム解読

ミヤコグサの変異体(Ljsym104)に対して窒素固定活性のない無効根粒を形成するミヤコグサ根粒菌 TONO 株の全ゲノム配列の解読を Roche454 シーケンサーを用いて行った。

(2) ミヤコグサ根粒菌 (TONO 株) の5型分泌装置変異株の同定

ミヤコグサ根粒菌 TONO 株において、トランスポゾンを用いたミュータントライブラリーを構築し、ミヤコグサの窒素固定不全変異体(Ljsym104)の表現型を抑圧する遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。また得られた変異株について増殖特性等の表現型の解析を行った。

(3) ミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置の構造と分泌領域の特定

ミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)について機能ドメインの特徴づけを行うとともに、ホモロジーモデリングに

よる立体構造予測を行った。また根粒菌の培養上清より分泌タンパクを回収し、TONO-ATのタンパク質分泌活性の有無について検討した。さらに TONO-AT より分泌されるエフェクタータンパクの機能領域を特定するため、特定の領域を欠損した数種類の TONO-AT を作成し、ミヤコグサおよび根粒菌に導入して共生表現型を解析した。

(4) 窒素固定活性の低下に関連する宿主遺伝子の探索

ミヤコグサの野生型および窒素固定不全変異体に対し、2種類のミヤコグサ根粒菌(MAFF株、TONO株)を接種し、根粒における遺伝子発現をRNA-seqにより網羅的に解析した。

(5) ミヤコグサの窒素固定不全変異体の原因遺伝子(Ljsym104)と根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)との機能的な関係

Ljsym104とTONO-ATとの機能的な関係を明らかにするため、TONO-ATを過剰発現した根粒菌の共生表現型を調査した。またそれぞれの組み換えタンパクを作成し、特性を評価した。

4. 研究成果

以下の番号は上記3の研究の方法の番号と対応する。

(1) ミヤコグサ根粒菌 TONO 株の全ゲノム解読を行い、7.8Mbの主染色体と3つのプラスミド(294Kb, 220Kb, 80kb)の配列を明らかにした(DDBJ/EMBL/Genbank アクセッション番号 AP017605~AP017608)。既知の共生遺伝子(nod, nif, fixなど)は先にゲノム解読が完了している別のミヤコグサ根粒菌(MAFF303099株)とほぼ同一であった。

(2) 約12000株のスクリーニングより、5型分泌装置(TONO-AT)の遺伝子破壊アレルを9株得た。これらは全てLjsym104変異体の窒素固定不全表現型を抑圧し、窒素固定活性のある正常根粒を着生した。また得られた破壊株のうち2株について、増殖、運動性、細胞外多糖の分泌、野生型ミヤコグサへの共生能について評価したところ、いずれも野生型と同等であることが分かった。さらに遺伝子破壊株にTONO-AT遺伝子を導入することによって表現型が相補されることを確認した。このことからミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置は根粒共生において機能し、宿主変異体Ljsym104の窒素固定活性を規定する因子であることが明らかとなった。

(3) ミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)についてウェブツールによる機能ドメインの予測を行った結果、N末端に約50アミノ酸からなるシグナルペプチドが予測

され、C末端の約400アミノ酸は膜貫通領域が予測された。またシグナルペプチドから膜貫通領域まではグリシンに富んだ約45アミノ酸からなるモチーフが40回ほど存在するリピート領域であった(図1)

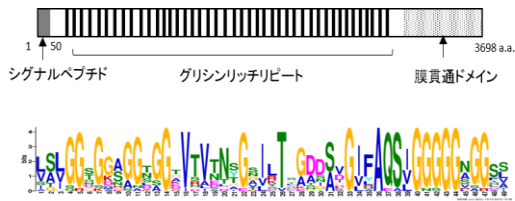


図1 ミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)の機能ドメイン(上図)とグリシンリッチモチーフ(下図)

相同性検索の結果、TONO-ATと同様のリピート領域を持つタンパク質は他の根粒菌を含むグラム陰性細菌やシアノバクテリアにも広く見いだされたが、機能が実験的に明らかにされたものは現時点では無かった。

TONO-ATのC末端に予測された膜貫通領域について緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)のEstAタンパク(PDBID:3KVN)をもとにホモロジーモデリングを行ったところ、5型分泌装置に特徴的な膜貫通型のバレル構造が予測された(図2)。さらに予測された立体構造をもとに、細胞外に分泌されていると考えられる領域のN末端をタグ標識し、細胞外への分泌を確認した。その結果、培養上清よりタグ付きタンパクを検出することができた。またTONO-ATの分泌領域はシグナルペプチド以降から3265aaまでであることが分かった。

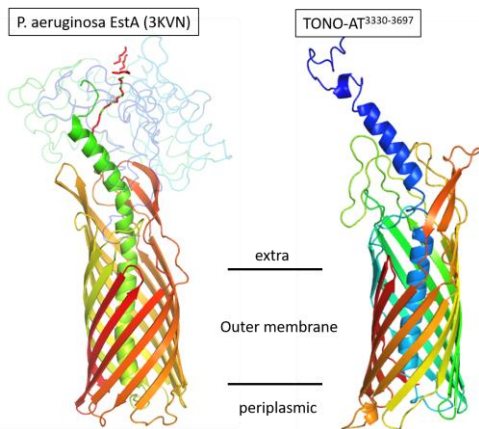


図2 緑膿菌のEstAの立体構造(左)をもとに予測したミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)のC末端領域の立体構造(右)

TONO-ATより分泌されるエフェクタータンパクの機能領域を特定するため、特定の領域を欠損した数種類のTONO-ATを作成し、ミヤコグサおよび根粒菌に導入して共生表現型を解析した。ミヤコグサの根においてTONO-AT

を発現させた場合には共生表現型に有意な変化は認められなかったが、根粒菌に導入した場合にはTONO-ATの全長を導入した場合のみ窒素固定表現型が変化することが明らかとなった。

以上のことからミヤコグサ根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)は細胞外にタンパク質を分泌する活性を有し、分泌領域全長で機能することが明らかとなった(図3)。

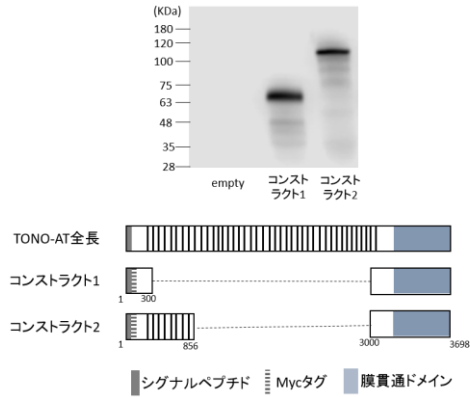


図3 TONO-ATのタンパク質分泌活性Mycタグによる分泌タンパクの検出(上図)と解析に使用したコンストラクトの模式図(下図)

(4)RNA-seq解析により窒素固定表現型と関連のある宿主遺伝子を探索した結果、ERFやbHLH型の転写因子、DnaJシャペロン、cysteine proteaseなどの遺伝子が窒素固定が低下する宿主・根粒菌の組み合わせで顕著に上昇することが分かった。さらに根粒菌の5型分泌装置(TONO-AT)とRNA-seqで発現変動を示した遺伝子との関連を調べた結果、TONO-ATを過剰発現した根粒菌株は野生株に比べてcysteine protease遺伝子を強く誘導することが分かった(図4)。cysteine proteaseは老化した根粒で誘導されることが知られており、以上の結果よりTONO-ATとcysteine proteaseとの機能的な関連を見出すことができた。しかしながらTONO-ATによるcysteine protease遺伝子の発現誘導が直接的なものであるかについてはさらなる検討が必要である。

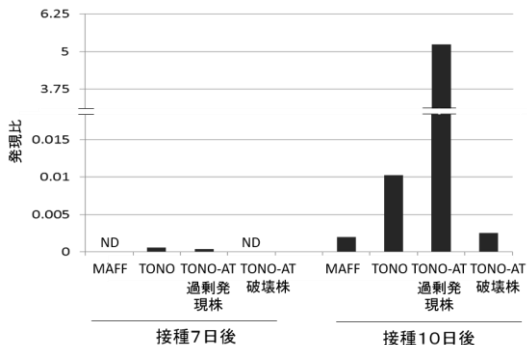


図4 根粒におけるCysteine proteaseの発現

(5) TONO-AT を過剰発現する根粒菌をミヤコグサ野生型および Ljsym104 変異体に接種し、根粒表現型を解析したところ、Ljsym104 変異体では窒素固定活性のない根粒のみが着生する一方で、野生型ミヤコグサでは正常な根粒と窒素固定活性が低い根粒が混在していた。また組み換えタンパクを用いた解析の結果、TONO-AT は LjSYM104 によって分解を受けることが分かった。

以上のことから TONO-AT は根粒の窒素固定活性の低下を誘導する活性をもち、その効果は LjSYM104 による分解により打ち消されるという機能的な関連が示唆された。

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 1 件)

- ① 下田 宜司、平川 英樹、佐藤 修正、佐伯 和彦、林 誠

Whole-Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing Symbiotic Rhizobium *Mesorhizobium loti* Strain TONO.

Genome Announcement, 2016, 4(5): e01016-16. 査読有

DOI:10.1128/genomeA.01016-16

[学会発表] (計 7 件)

- ① 下田宜司 他

ミヤコグサ変異体の窒素固定活性を規定する根粒菌因子の機能解析

第 58 回日本植物生理学会 2017. 3. 16 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

- ② 箱山雅生 他 (全 3 人中 2 番目)

遺伝子共発現ネットワーク解析を用いたミヤコグサ根粒菌共生変異体の選抜

第 26 回植物微生物研究会 2016. 9. 8 東北大学 (宮城県・仙台市)

- ③ 下田宜司 他

宿主変異体の窒素固定活性を規定する根粒菌因子の解析

第 25 回植物微生物研究会 2015. 9. 15 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

- ④ 下田宜司 他

宿主変異体の窒素固定活性を規定する根粒菌因子の解析

第 24 回植物微生物研究会 2014. 9. 20 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)

- ⑤ 丸山洋介 他 (全 5 人中 5 番目)

根粒菌の宿主特異性を決定する根粒菌因子の網羅的同定

第 24 回植物微生物研究会 2014. 9. 20 佐賀大学 (佐賀県・佐賀市)

- ⑥ 下田宜司 他

Exploring Mesorhizobium loti genes that determine strain-specific Fix- phenotype of Lotus japonicus mutant.

第 18 回国際窒素固定会議 2013. 10. 16 宮崎シーガイア (宮崎県・宮崎市)

- ⑦ 下田宜司 他

宿主変異体の窒素固定表現型を規定する根粒菌因子の同定

第 23 回植物微生物研究会 2013. 9. 7 基礎生物学研究所 (愛知県・岡崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下田 宜司 (SHIMODA, Yoshikazu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・生物機能利用研究部門・植物・

微生物機能利用研究領域・主任研究員

研究者番号：80415455