

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04479

研究課題名(和文) イネの形質転換に適した特質を決定するアグロバクテリア遺伝子の解明

研究課題名(英文) Identification and analysis of Agrobacterium genes that determine characteristics suitable for rice transformation

研究代表者

鈴木 克周 (Suzuki, Katsunori)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：50221320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物形質転換に頻用されているアグロバクテリアのC58株はイネが合成するvir遺伝子発現誘導物質p-クマリルアルコール(PCAL)を酸化分解する能力が高い。本研究ではC58株の分解遺伝子を破壊して分解力を低下させ植物形質転換能力を高めることを目標にして分解系を解析した。PCAL脱水素酵素の候補遺伝子を6個破壊した変異体を作成したところ、酵素活性と分解力が低下し、イネカルスとの共存でvir遺伝子発現も向上した。PCAL脱水素酵素は基質特異性が極めて高く遺伝子も多重化していることが判り分解代謝の生理生態的意義を提示した。また、高度に安定で除去が難しいプラスミドを除去できる新技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：The Agrobacterium strain C58 has been used for rice transformation. The strain shows high ability to degrade p-coumarylalcohol (PCAL) that is secreted by rice cells and induces Agrobacterium vir genes. This study was conducted to enhance its transformation ability by revealing its genes for PCAL degradation. Removal of six putative dehydrogenase genes decreased PCAL dehydrogenase activity and degrading ability, and increased vir gene expression in response to co-cultivation with rice calli. The enzymes were found highly specific to PCAL. In addition to the multi gene family character, the data suggest physiological and ecological roles of the PCAL catabolism in the interaction between plant and Agrobacterium. In addition, this study invented a new and powerful technique to remove highly stable plasmid DNAs from strains.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：Agrobacterium rice transformation p-coumarylalcohol dehydrogenase catabolism mutant plasmid removal enzyme

1. 研究開始当初の背景

Agrobacterium を用いた植物細胞の形質転換法は、植物の科学研究と活用に不可欠な基盤技術であり、多数の成功例が報告される。しかし、形質転換体を得られないあるいは極めて稀にしか得られない植物種もある。既に成功が報告されている種においても品種系統が異なれば効率が大幅に低下するどころか、品種の維持過程でも低下する例はイネの国産主要品種コシヒカリでもよく知られている。世界の主要穀物であるムギやトウモロコシではイネよりも更に困難であり、また、単子葉植物では双子葉植物に比べて特にこのような例が多い。

申請者らは、従来から頻用されている有用菌株よりもイネに適した菌株が多様な *Agrobacterium* 病原性菌株の中にあるのではないかと考えてスクリーニングしたところ、優れた特質をもつ菌株 P-Ag-5 を見出した。P-Ag-5 の優れた特徴の1つは、国際的に利用されている有用菌株 C58 あるいは LBA4404 と異なり、イネ胚性カルスと共存させるだけで *vir* 遺伝子を発現し T-DNA 上の遺伝子を注入できる点にある。

P-Ag-5 に遺伝子発現を促す誘導物質をイネから抽出精製し構造決定したところ *p*-クマリルアルコールであることがわかった。この物質は P-Ag-5 株だけでなく C58 株にも遺伝子発現を促すが、イネが微量(数 μ M 程度)分泌するこの物質を C58 株は速やかに分解してしまう。一方、P-Ag-5 株では分解速度が緩やかなことも把握している。従って、この分解力の差が2つの菌株の差を決めている要因の1つと考えられる。そこで、*p*-クマリルアルコール分解を支配する遺伝子を人為的に操作することができれば、P-Ag-5 株の有用な性質を更に高め他の菌株も優良化できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、先ず *p*-クマリルアルコール分解を支配する遺伝子をクローニングする。P-Ag-5 が *p*-クマリルアルコールを分解する代謝中間体としてクマル酸を同定したのでフェノール系物質の側鎖を酸化する既知のデヒドロゲナーゼを指標にゲノム配列の中から検索できると考えられる。細胞がもつ分解遺伝子を解析して破壊することで分解速度が低下し、*p*-クマリルアルコールに対して高感度化することで既存菌株をイネ形質転換に更に適合させる汎用的な改善手法とすることを目標とする。

3. 研究の方法

p-クマリルアルコール分解の代謝中間体として *p*-クマリルアルデヒドと *p*-クマル酸を検出したので *p*-クマリルアルコール分解の初発酵素はアルコール脱水素酵素と推定し、菌株 C58 のゲノム全塩基配列情報に基づいて、アルコール脱水素酵素遺伝子の候補を抽

出した。主な候補遺伝子を標的破壊するために、該当遺伝子 ORF 両端部分の塩基配列を増幅して1つのベクターにクローン化して遺伝子破壊用プラスミドを作成した。このプラスミドを菌株ゲノムへ相同組換えで導入し、次いで第2段階の相同組換えによってゲノム上の遺伝子 ORF 欠失変異体を作成した。候補遺伝子の中にはプラスミド上に座位するものもあるので、プラスミドを欠失させることによる変異体作成も行なった。

変異体作成と平行して、該当遺伝子 ORF を発現ベクターへクローニングした。クローン化した遺伝子を大腸菌で強制発現させた上で、脱水素酵素活性を分析した。

細菌菌体による *p*-クマリルアルコール分解活性は、合成 *p*-クマリルアルコールを添加した合成培地で一夜培養し、培養上清の酢酸エチル抽出物を HPLC で分析して残存量から分解量を算出した。*p*-クマリルアルコール脱水素酵素活性は、補酵素 NAD 酸化型から還元型への変換を吸光度上昇でモニターした。

4. 研究成果

多重変異体での分解酵素活性と分解能力の低下

C58 菌株がもつ12個のアルコール脱水素酵素遺伝子候補のうちで予測値の高い6個を各々破壊した変異体を作成した。いずれの1遺伝子破壊体も有意な *p*-クマリルアルコール分解活性ならびに脱水素酵素活性の低下を示さなかった。そこで、多重変異体を作成した。染色体上の2遺伝子(atu0626, atu3278)の欠失と4遺伝子(atu5074, atu5138, atu5202, atu5240)を含むプラスミド pAtC58 の完全欠失によって作成した6重変異体(atu0626, atu3278, atu5074, atu5138, atu5202, atu5240)では、脱水素酵素活性と分解能力が大幅に低下していた。この低下したレベルは野生型株に較べて1/5であり、優良株に近いレベルであった。多重変異体での残存活性が未だゼロでないのは、未だ破壊していない6個のアルコール脱水素酵素遺伝子あるいは脱水素酵素ではない遺伝子も部分的に分解に関与し、その発現がグルコースによって抑制されることを示唆している。

この多重変異体は親株に比してイネの形質転換効率が上昇するという予備的な結果を得た。今後、この効果を更に検証して有用菌株として提供出来るようにしたい。

アルコール脱水素酵素の高度な *p*-クマリルアルコール特異性

C58 菌株の細胞抽出液および酵素遺伝子 atu5202 を強制発現させた大腸菌細胞抽出液を粗酵素として用い、アルコール脱水素酵素の特性を分析した。PCAL を基質とすると高い活性を示したのに対して、エタノールやプロパノールなど直鎖状アルコールは基質活性を示さなかった。*p*-クマリルアルコールに類

似しているがフェノールに直結したOHの無いシンナミルアルコールも基質としての活性がなかった。従って、C58 菌株のアルコール脱水素酵素は *p*-クマリルアルコールへの基質特異性が極めて高いといえる。

atu5202 以外に3つの *atu* 遺伝子を強制発現させた場合には有意な酵素活性を示さなかった。これらの遺伝子の変異体は細菌の分解活性に影響するので、ヘテロ会合型酵素のサブユニットであるなどの可能性が想定される。

***p*-クマリルアルコール分解の意義の考察**

上記のようにC58 菌株の *p*-クマリルアルコール分解酵素は高い基質特異性を示し、しかも多数の分解酵素遺伝子を持つことが明らかになった。従って、*p*-クマリルアルコール分解能力は生理的にも進化的にも重要な形質であると推察される。高等植物は全般に *p*-クマリルアルコールを H 型リグニン生合成の前駆物質としていることが知られている。感染菌あるいは内生菌として侵入した細菌が宿主植物体内で *p*-クマリルアルコールを分解してエネルギー源とするなどの生理的意義があるものと推察する。

研究過程で開発した技術

プラスミド pAtC58 上には、アルコール脱水素酵素候補遺伝子が複数あることから、当初はプラスミド全体を脱落処理することで多重変異体作成を企図した。しかし、従来開発した方法、および安定化遺伝子の1つを破壊することと組合せた方法では pAtC58 全体を脱落した変異体を得ることができなかった。従来法ではプラスミドの複製遺伝子を用いる不和合性を利用する原理で除去していたが、本研究では不和合性原理と不和合性プラスミドを高コピー型とすることで除去能力を高め pAtC58 を着実かつ完全に除去することが可能となった。この原理によるプラスミド除去法を上記の実施例として示し、汎用的な方法として提案した。

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 2 件)

① S. Yamamoto, A. Sakai, V. Agustina, K. Moriguchi, K. Suzuki (2018) Effective removal of a range of Ti/Ri plasmids using a pBBR1-type vector having a *repABC* operon and a *lux* reporter system. Appl. Microbiol. Biotech. 102:1823-1836. (doi: 10.1007/s00253-017-8721-7) 査読あり

② K. Suzuki, K. Moriguchi, S. Yamamoto (2015) Horizontal DNA transfer from bacteria to eukaryotes and a lesson from experimental transfers. Res. Microbiol. 166:753-756 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① K. Suzuki. Broad application range of *Agrobacterium*-mediated transformation as well as virulence gene induction by the H-type lignin precursor evoke an idea to implicate lower classes of plants as ancestral hosts. Plant Signaling & Behavior 2017, held at KUNIBIKI Messa, Matsue, JAPAN June 30, 2017 (June 27-30).

② 清川一矢・大嶺悠太・柚木和也・山本真司・守口和基・鈴木克周.

イネ由来 *vir* 遺伝子誘導物質パラクマリルアルコールを分解するアグロバクテリアのアルコール脱水素酵素分子種の特定. 2017 分子生物学会 (2017 年 12 月 8 日 於 神戸ポートアイランド国際展示場)

③ 山本真司, ビタアグスティーナ, 坂井綾子, 守口和基, 鈴木克周 複製遺伝子 *repABC* を二つ具備する Ti プラスミドの各 *repABC* 領域の機能 (2017 年 3 月 17 日-20 日, 日本農芸化学会 2017 年度京都大会, 京都女子大学)

④ 庄田佐知子, 藤井研人, 坂井綾子, 高木隆吉, 平賀良知, 安倍学, 山本真司, 鈴木克周 (2015) イネ細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質 *p*-coumaryl alcohol の *Agrobacterium* による分解 (中国四国植物学会 第 72 回大会 2015 年 5 月 16 日, 会場 愛媛大学)

⑤ 庄田佐知子, 福満啓博, 藤井研人, 坂井綾子, 高木隆吉, 安倍学, 山本真司, 鈴木克周 (2016) イネ細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質 *p*-coumaryl alcohol の *Agrobacterium* による分解 (2016 年 3 月 29 日, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 1 件)

名称 : プラスミド除去用組み換えプラスミドおよびその利用

発明者：山本真司, 鈴木克周
権利者：国立大学法人広島大学
種類：特許
番号：5818312
取得年月日：平成 27 年 10 月 9 日
国内外の別： 国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 克周 (SUZUKI, Katsunori)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50221320

(2) 研究分担者

山本 真司 (YAMAMOTO, Shinji)
広島大学・大学院理学研究科・特任助教
研究者番号：50607348

平賀 良知 (HIRAGA, Yoshikazu)
広島工業大学・生命学部・教授
研究者番号：10238347

(4) 研究協力者

高木 隆吉 (TAKAGI, Ryukichi)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：90304394