

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07346

研究課題名(和文) ゲニステインで誘導発現するダイズ根粒菌TetR familyの共生への関与

研究課題名(英文) Involvement of genistein-inducible Bradyrhizobium japonicum TetR family early in the interaction with Glycine max (L.) Merr

研究代表者

大和田 琢二 (Ohwada, Takuji)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：90211804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒菌TetR family構造遺伝子のゲニステイン特異的な誘導発現はリプレッサー機能により引き起こされ、その主要産物である多剤排出ポンプは感染初期にゲニステインで誘導合成され、細胞毒性も併せ持つゲニステインの排出により細胞内ゲニステイン濃度を調整し、共生遺伝子(nod遺伝子群)の発現プロファイルをチューニングすることにより共生関係を最適化する可能性を示し、TetR familyが共生初期に関与する新しいパラダイムを提示した。

研究成果の概要(英文)：The genistein-specific induction of Bradyrhizobium japonicum TetR family structural genes was caused by a repressor function. The multidrug efflux pump of the TetR family could be induced early in the symbiosis and functionally regulate the expression profiles of symbiosis genes by adjusting the intracellular genistein concentration by its efflux having cytotoxicity. The results showed a new paradigm that TetR family plays an important role in symbiosis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：TetR family 多剤排出ポンプ ゲニステイン ダイズ根粒菌 相利共生

## 1. 研究開始当初の背景

(1)根粒菌は、主にマメ科植物の根に瘤(根粒)を形成し、生物窒素固定を行うグラム陰性の土壌細菌として知られ、宿主の種子や根から放出されるフラボノイド(ゲニステイン、ダイゼインなど)が根粒菌の特定の遺伝子領域(共生領域と呼ばれる)にある遺伝子群(*nod*遺伝子群や *typeIII* 分泌系遺伝子群など)を誘導発現させ、その産物(*nod factor* など)が根粒形成を誘導することにより、宿主との共生関係が始まると考えられている。しかし、国内外の研究を通して、共生領域外のゲノム領域が宿主と根粒菌の共生に果たす役割に関する報告は十分ではなく、不明な点も多い。

(2)これまでにダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (USDA110 は現在 *Bradyrhizobium diazoefficiens* に分類されている<sup>1)</sup>)のほぼ全ゲノム領域をカバーするクローンで構成されたマクロアレイを用いて、主にダイズ種子抽出液やゲニステインによって誘導発現される根粒菌遺伝子の網羅的な発現解析を行った。その結果、共生領域内のゲノムでは、*nod* 遺伝子群や *typeIII* 分泌系遺伝子群を含む 4 つの巨大なゲノム領域に含まれる遺伝子群が、特にダイズ種子抽出液により強く誘導発現され、*nod* 遺伝子群は処理 6 時間後、*typeIII* 分泌系遺伝子群は 12 時間後に、それぞれ強く発現することが明らかになった<sup>2)</sup>。更に、*typeIII* 分泌系遺伝子群の誘導発現は低温条件(15 程度)で著しく遅滞し、低温環境で根粒着生が遅れる原因の一つであることを示すとともに、ダイズ種子抽出液による十分な誘導発現には *nodD2* 遺伝子が関与していることを初めて明らかにした<sup>3)</sup>。

(3)一方、共生領域外のゲノム領域では、細胞外多糖合成、エチレン分解酵素などをコードする遺伝子群、並びに機能が不明な複数の遺伝子群の誘導発現が明らかになり、中でも、ゲニステイン処理後 30 分程度の非常に早い段階において、クローンレベルで 3.8~57.6 倍に強く誘導発現するユニークなゲノム領域(18.8kbp)が見出された。これまでの研究で、この領域は、ゲノム上の位置(7.73Mb-7.75Mb)が共生領域(1.68Mb-2.38Mb)とは全く異なる場所に位置していること、17 個の遺伝子(*bII7017-bII7033*)が含まれ、多剤排出ポンプ(RND 型薬剤排出ポンプ)とポリヒドロキシ酪酸代謝系に関わる構造遺伝子と *TetR family* 転写調節因子から構成されていること、及びゲニステインによって発現が強く誘導されるが、ダイゼインやダイズ種子抽出液では顕著に誘導されないことから、ゲニステインとダイゼインはともに共生領域にある遺伝子の誘導発現に関与する一方で、ゲニステインによる誘導発現をダイゼインが抑制

することで発現が制御されている可能性が示された。更に研究を進めた結果、この誘導発現は、ゲニステインのような 5-ヒドロキシフラボノイドで生じること(ダイゼインのような 5-デオキシフラボノイドでは強い誘導は見られない)、誘導後 15 分で最大に達し、ゲニステイン濃度に依存することから、*nod* 遺伝子群のゲニステインによる誘導発現プロファイルとは全く異なること、及び多剤排出ポンプを破壊すると、根粒重量や窒素固定能が有意に減少することが明らかになった<sup>4)</sup>。

(4)最近の研究で、構築された多剤排出ポンプの破壊株では、ゲニステインによる *nod* 遺伝子群の発現量が低下する可能性が示されたことから、ゲニステインが *nod* 遺伝子の発現を誘導して共生がスタートするという単純なパラダイムではなく、*TetR family* の多剤排出ポンプが、細胞毒性も併せ持つゲニステインの排出によりその細胞内濃度を一定の範囲に調節し、共生を機能的に行うために *nod* 遺伝子群の発現をチューニングしている可能性が強く示唆されたことから、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1)本研究は、宿主のダイズから放出されるフラボノイド化合物のゲニステインによって、特異的に強く誘導発現するダイズ根粒菌 *TetR family* の共生への関与を明らかにするため、構築された *TetR family* の転写調節因子と多剤排出ポンプをコードしている遺伝子の破壊株を用いて、ゲニステインによる *TetR family* 遺伝子の誘導発現における転写調節因子の役割を明らかにするとともに、*TetR family* の共生関連遺伝子(*nod* 遺伝子、*typeIII* 分泌系遺伝子群)の発現への関与、及びゲニステインに対する感受性と根粒形成過程への関与を明らかにすることを目的とした。

(2)ダイズ根粒菌の共生は、一般にゲニステインなどのフラボノイド化合物が *nod* 遺伝子群などの共生遺伝子群を誘導発現させることで開始されると考えられているが、本研究の特色は、*TetR family* が共生初期に関与する新しいパラダイムを提示することにある。特に、ゲニステインには細胞毒性のあることが知られており、共生の初期段階で根粒菌が正常且つ機能的に宿主植物に应答し共生関係を構築するためには、*TetR family* の多剤排出ポンプによりゲニステインが細胞外に排出され、細胞内のゲニステイン濃度が一定の範囲内に制御されることが機能的な共生のカギとなる可能性を明らかにすることができる。また、このゲノム領域は共生領域とは全く異なる場所に位置する 18.8kbp のクラスターを形成しており、共生領域外に位置する新規のゲノム領域が、共生の成立に関与する重要な知見を得ることができる。本研究

により、ダイズなどのマメ科作物と根粒菌の共生系において、共生初期の分子応答における新規且つ重要な知見が得られるとともに、優れた根粒菌の育種によるマメ生産能の強化に貢献できることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 根粒菌の培養と RNA 抽出

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) の親株、あるいは遺伝子破壊株 (多剤排出ポンプ破壊株: bll7019-bll7021 欠失変異; 転写調節遺伝子破壊株: blr7023、あるいは bll7024 欠失変異) をマニトール・酵母エキス培地 (YMB 培地) で 30、3~5 日間振とう培養後 ( $OD_{600}=0.3\sim 0.4$ )、新しい YMB で  $OD_{600}=0.1$  に調整した。これに、必要に応じてゲニステイン (終濃度  $5\mu\text{M}$ ) を添加し、30、30 分~12 時間振とう培養した。菌液に等量の氷冷した 5% フェノールを加え遠心分離 (10krpm、20 分、4) で菌体を回収後、ISOGEN-LS (ニッポンジーン) を加え、プロトコルに従って全 RNA を抽出した。

#### (2) 遺伝子発現量の測定

TetR family (bll7017-bll7033) の構造遺伝子全体の発現プロファイルは、マイクロアレイを用いたクローンレベルの発現により調べた。すなわち、抽出された全 RNA を除タンパク、および DNase 処理後、mRNA を回収した (MicrobeExpress、Ambion)。ランダムプライマー (Gibco) と逆転写酵素 (SuperScript II、Invitrogen) で cDNA をアイソトープ ( $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) で標識後、AutoSeqG (GE Healthcare) で精製し、ダイズ根粒菌ゲノムの M13 ファージクローンで構成されたアレイシートとハイブリダイゼーションした (55)。洗浄後、IP シートに露光させ、イメージアナライザー (Fuji BAS5000) と画像解析システム (ArrayVision、GE Healthcare) で TetR family (bll7017-bll7033) を含むクローンの発現量を親株と比較した。

TetR family 構造遺伝子、及び *nod* 遺伝子 (*nodC*、*nodD1* など) や *typeIII* 分泌系遺伝子 (*ttsI*、*rhcN* など) の発現量は、定量的 RT-PCR により遺伝子の発現量を測定した。すなわち、Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) でプライマーを作成し、Qanti-Tect SYBR Green RT-PCR (Qiagen) と MiniOpticon™ (version 3.1、BioRad) で遺伝子の発現量を測定した。測定値はハウスキーピング遺伝子 (*sigA*) で標準化した。

#### (3) ゲニステイン感受性試験

ダイズ根粒菌の親株、および多剤排出ポンプと転写調節遺伝子の破壊株を YMB 培地 (破壊株はカナマイシンを含む) で対数期まで 30 で振とう培養後、生理食塩水で約  $10^7$  cfu/ml の希釈菌液を調製した。96 ウェルプ

レート (各ウェルに、YMB 培地 (ゲニステインの希釈系列を含む  $180\mu\text{l}$ )、希釈菌液 ( $10\mu\text{l}$ ) を分注後、30 で 6~46 時間培養した。WST solution と electron mediator reagent 混合液 (発色試薬: Microbial Viability Kit-WST、DOJIN)  $10\mu\text{l}$  をウェルに添加・培養後、マイクロプレートリーダー ( $OD_{450}$ ) で生存率を測定した。また同時に、ゲニステインの希釈系列を含んだ YMB 培地で通常の振とう培養 (30、130rpm) を行い、培養菌液の増殖をモニターし ( $OD_{600}$ )、破壊株のゲニステイン感受性を親株と比較した。

#### (4) 接種試験

接種菌液の調製と種子殺菌: ダイズ根粒菌の親株、および多剤排出ポンプと転写調節遺伝子の破壊株を YMB 培地で対数後期まで振とう培養し、リン酸緩衝液で  $10^7$  cfu/ml に調整した。競合能を評価する場合は、suicide vector (pmTn5SS*gusA20*) 上のレポーター遺伝子 (*gusA20*) をメーティング法により供与菌 (大腸菌 S17-1 *pir*) から親株に導入し、構築された *gusA20* 標識菌株 (親株) と破壊株の等量 ( $10^7$  cfu/ml) を混合して接種菌液とした。ダイズ種子 (*Glycine max* L.cv. Enrei) は、次亜塩素酸とエタノールで殺菌後、滅菌蒸留水で十分に洗浄した。

接種と栽培: 栽培液 (Norris & Date 氏液) を入れたシードバッグに種子を置き、種子あたり 1ml の接種菌液を接種した。40~50 日間、人工気象器 (Biotron、NK) で栽培した。

根粒原基の形成、根粒内の感染率、および競合能の測定: 根粒原基 (接種後 1~2 週間) の着生数は、根粒をトルイジンブルー色素で染色し、実体顕微鏡で計測した。根粒内の感染率は、根粒をトルイジンブルーで染色しマイクロスライサーで切片を作成後、感染域を顕微鏡で観察・計測した。競合能は、根粒を基質緩衝液 (0.02% X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt)、0.04% SDS、20% メタノール、0.1M リン酸緩衝液) で 1~2 日間処理し、染色された根粒の割合から評価した。

### 4. 研究成果

(1) ゲニステインで特異的に強く誘導発現するダイズ根粒菌 TetR family 領域 (bll7017~bll7033 の 17 個の遺伝子) の発現への TetR 転写調節遺伝子 (blr7023 および bll7024) の関与を調べるため、blr7023、および bll7024 破壊株の TetR family 遺伝子全体の発現プロファイル (親株に対する比) を調べた。発現量は、マイクロアレイを用いて、17 個の遺伝子を含む 8 個のクローンレベルの発現量により調べた。その結果、blr7023 破壊株では、ゲニステイン無処理にも関わらず全てのクローンが有意に発現し、その発現量と発現パターンはゲニステイン (終濃度  $5\mu\text{M}$ ) で処理された親株の場合と類似していた。しか

し、bII7024 破壊株では、クローンレベルでの有意な発現は認められなかった。

さらに、TetR family の主要な構造遺伝子 (bII7019: 多剤排出ポンプをコードする遺伝子; blr7029: ポリヒドロキシ酪酸代謝系をコードする遺伝子) を用いて、遺伝子レベルにおける発現量を親株と比較した。blr7023、および bII7024 破壊株の発現量(親株に対する比)を培養後 30 分と 12 時間に定量的 RT-PCR で測定した結果、blr7023 破壊株では、bII7019 の発現量は 1064 倍 (30 分) および 1018 倍 (12 時間)、blr7029 の発現量は 689 倍 (30 分)、および 383 倍 (12 時間) を示した。一方、親株をゲニステイン処理した場合の発現量は、bII7019 は 805 倍 (30 分) および 3.3 倍 (12 時間)、blr7029 は 451 倍 (30 分) および 4.4 倍 (12 時間) であったことから、blr7023 破壊株の主要な TetR family 構造遺伝子の発現量 (親株に対する比) は、ゲニステイン処理後 30 分における親株の発現量と同程度であり、処理後 12 時間でも発現量が顕著に高く維持されていることが示された。一方、blr7024 破壊株では、bII7019 は 3.2 倍 (30 分) および 29.6 倍 (12 時間)、blr7029 は 1.6 倍 (30 分) および 9.1 倍 (12 時間) を示し、親株で見られたゲニステイン処理後の急激な発現量の増加は認められなかった。以上の結果から、主に blr7023 産物が、TetR family 構造遺伝子の発現制御にリプレッサーとして機能していると考えられた。

(2)ゲニステインで特異的に強く誘導発現するダイズ根粒菌 TetR family 遺伝子の共生関連遺伝子の発現への関与を調べるため、構築された多剤排出ポンプ破壊株と転写調節遺伝子破壊株 (blr7023 欠失変異株) を用いた。研究成果 (1) より、多剤排出ポンプを含む TetR family 構造遺伝子がゲニステインの有無に関わらず強制的に発現されている) の培養菌液にゲニステインを添加し、3~20 時間後の共生関連遺伝子 (*nodD1*, *nodD2*, *nodC*, *nodW*, *ttsI*) の誘導発現量を定量的 RT-PCR により親株と比較した。その結果、多剤排出ポンプ破壊株では、*nodC* の発現量がゲニステイン処理後 6~12 時間で親株よりも顕著に高く、6 時間後の発現量は、親株 60.2 倍に対して破壊株 158.4 倍、12 時間後の発現量は、親株 11.3 倍に対して破壊株 109.0 倍を示した。また、6~12 時間後における *nodW* の発現量は *nodD1/D2* よりも高い傾向を示したことから、*nodC* の高い発現は、*nodW* により強く依存している可能性が示唆された。

一方、転写調節遺伝子破壊株では、*nodC* の発現量は、ゲニステイン処理後 6 時間は 56.7 倍、12 時間は 75 倍と時間とともに増加傾向を示した。親株の場合は処理後 6 時間をピークに 12 時間では顕著に減少したことから、転写調節遺伝子の破壊 (blr7023 の破壊) により、ゲニステインによる *nodC* 誘導発現の

ピークは親株よりも遅滞すると考えられた。また、他の遺伝子全ての発現量のピークも親株の 6 時間後に対し 12 時間後まで遅滞した。

以上の結果は、多剤排出ポンプの破壊によるゲニステインの細胞内取り込みの早期化、また、転写調節遺伝子の破壊による排出ポンプの恒常的な作動によるゲニステインの細胞内取り込みの遅滞が生じたため、*nodC* で代表される共生遺伝子の発現量とその誘導時間が影響を受けたと考えられ、TetR family 遺伝子は、その多剤排出ポンプの機能を通して、共生の初期過程で細胞内ゲニステイン濃度を共生遺伝子の発現に最適な濃度に調整している可能性が示された。

(3)TetR family のゲニステイン感受性と根粒形成への関与を調べた。多剤排出ポンプ破壊株と転写調節遺伝子破壊株 (blr7023 欠失変異株) の培養菌液にゲニステイン、あるいはダイゼインを 5~100  $\mu$ M 添加し、18 時間培養後の生存率を Microbial Viability Assay Kit の発色値により測定した。その結果、ゲニステイン感受性は、多剤排出ポンプ破壊株では高く、逆に転写調節遺伝子破壊株では低い傾向が示された。一方、ダイゼイン感受性には有意な差は見られなかったことから、多剤排出ポンプは、主にゲニステインの排出に関与していると考えられた。

次に、接種後 11~20 日目の根粒原基の形成を調べた結果、多剤排出ポンプ破壊株では形成が早期化し、逆に転写調節遺伝子破壊株では遅延する傾向が見られた。さらに、根粒のサイズと感染細胞の割合を調べた結果、多剤排出ポンプ破壊株では根粒のサイズ、および感染細胞の割合が減少し、転写調節遺伝子破壊株では逆に増加する傾向が見られた。また、GUS 標識株を用いて根粒形成における親株との競合能を調べた結果、特に転写調節遺伝子破壊株の競合能が著しく低下していた。転写調節遺伝子破壊株の増殖能が親株よりも低下する傾向が見られたことが競合能の低下を引き起こした原因の一つであると考えられた。

以上の結果から、TetR family の多剤排出ポンプによるゲニステイン排出能がダイズ根粒菌の根粒形成過程に大きく関与していることが示された。今後のさらなる研究により、マメ科作物と根粒菌の共生における新しい展開が望まれるとともに、優れた根粒菌の育種によるマメ生産能強化への貢献が期待される。

#### <引用文献

Delamuta, JRM., Ribeiro, RA., Ormeno-Orrillo, E., Melo, IS., Martinez-Romero, E., and Hungria, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63:3342-3351. doi: 10.1099/ijs.0.049130-0.2013.

Wei, M., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiumi, T., Abe M., and Ohwada, T. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. DNA Research, 15 (4), 2008, 201-214.

Wei, M., Takeshima, K., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiumi, T., Abe M., Ishii, S., and Ohwada, T. Temperature-dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23 (5), 2010, 628-637.

Takeshima, K., Hidaka, T., Wei, M., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiumi, T., Abe M., Tokuji, Y., and Ohwada, T. Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. Microbes and Environments, 28 (4), 2013, 414-421. doi:10.1264/jsme2.ME13057

#### 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)

大和田 琢二. ゲニステインで誘導発現するダイズ根粒菌 TetR family の共生への関与 (Involvement of genistein-inducible *Bradyrhizobium japonicum* TetR family early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr.). アグリバイオ (Agricultural Biotechnology) (査読無), 1 (10), 2017, 44-46.

[学会発表](計3件)

大和田 琢二(代表者) \ ダイズ根粒菌 TetR family 遺伝子は感染初期の共生遺伝子発現プロファイルに影響する、植物微生物研究会、2017年.

大和田 琢二(代表者) \ Preferential gene expression of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. 1<sup>st</sup> UGAS, Iwate

University International Symposium、2016年.

大和田 琢二(代表者) \ ダイズ根粒菌 TetR family の共生における役割、植物微生物研究会、2015年.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大和田 琢二 (OHWADA, Takuji)  
国立大学法人 帯広畜産大学・  
生命・食料科学研究部門・教授  
研究者番号：90211804