

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07638

研究課題名(和文) セ斯巴ニア根粒菌が巨大構造体R-bodyにより宿主細胞核を崩壊させる分子機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of disrupting host cell nucleus by producing R-bodies

研究代表者

青野 俊裕 (Aono, Toshihiro)

東京大学・生物生産工学研究センター・講師

研究者番号：10372418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Azorhizobium caulinodansは熱帯マメ科植物セ斯巴ニアに窒素固定器官(根粒・茎粒)を形成させる根粒菌である。これらの器官の細胞内において、本菌は窒素固定により窒素分子からアンモニア生産し、宿主に与える。本菌は、共生菌でありながら、R-bodyと呼ばれる宿主細胞殺傷因子を生産する能力をもつ。そのため本菌は、R-body合成に関わるreb遺伝子群の発現を強固に抑制することで宿主との共生を成立させている。本研究では、reb遺伝子群の発現がどのように抑制され、また、どのようなときに抑制が解除されるのかを分子レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R-bodyという因子は元来、ゾウリムシの内生細菌が宿主ゾウリムシを殺傷するために持つものと長い間認識されてきた。しかし、我々は、このR-bodyによる真核生物に対する病原性は、ゾウリムシ内生菌だけではなく、マメ科植物と相利共生を示す根粒菌においても発揮されるということを明らかにしてきた。本研究を含めた我々の近年の成果は、その病原性の制御機構を全細菌で初めて示したものであり、細菌学上、重要な位置づけにあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Azorhizobium caulinodans is a rhizobium of a tropical legume Sesbania rostrata that forms nitrogen-fixing nodules on the roots and stems. This bacterium fixes nitrogen in the host cells in the stem/root nodules and provide ammonium to the host plants. Although A. caulinodans is a symbiotic bacterium, it has the ability to produce a host cell killing factor called R-body. Therefore, this bacterium establishes symbiosis with the host by strongly suppressing the expression of the reb genes that are involved in R-body synthesis. In the present study, we elucidated the molecular mechanism of the expression of reb genes.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根粒菌 共生 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

R-body とは、ゾウリムシの絶対内生細菌で最初に発見された構造体であり、*reb* 遺伝子群がコードする低分子タンパク質群の重合体である。R-body 生産菌を保持するゾウリムシは非保持ゾウリムシを殺すという現象が知られていたが、長い間着目されなかった。しかし、近年のゲノム解析により多くの細菌が *reb* 遺伝子群を保持することが判明し、その存在意義が問われ始めた。

Azorhizobium caulinodans は、熱帯マメ科植物セスバニアに窒素固定器官である茎粒・根粒を形成させる根粒菌である。我々は、本菌の全ゲノム配列決定、茎粒形成関連遺伝子群の網羅的解析を通して、根粒菌の進化における本菌の重要性を見いだしてきた。その過程に於いて、本菌が宿主細胞内に感染する共生菌でありながらも、*reb* 遺伝子群をオペロン (*reb* オペロン) として染色体上に保持していることを見出し、全細菌に先駆けて、*reb* オペロンの発現制御機構の解明を推進してきた。

A. caulinodans のオペロンの発現は、*reb* オペロンにコードされる転写因子 RebR により促進されるが、通常は、転写因子 PraR によって直接的に、Lon プロテアーゼによって間接的に、直接的および間接的に抑制されている。また、*reb* オペロンの発現は、2-OG が存在し、かつ、至適生育温度 (37-38 °C) よりも低い温度 (低温条件) で生育した場合に、高発現する。

A. caulinodans の *praR* 破壊株や *lon* 破壊株は、低温条件において *reb* オペロンが恒常的に高発現し、体内に R-body を生産する。これらの変異株により形成された茎粒内では、感染宿主細胞の半数が萎縮して核が崩壊し、それらの細胞内には R-body を生産する菌株が高密度に存在する。このように、*reb* オペロンの高発現は、宿主細胞の殺傷につながる。

2. 研究の目的

reb オペロンの発現制御機構を徐々に解明されつつあるが、未解明な部分が多く残されている。本研究ではその全容解明を目的とした。特に、2-OG の存在と低い生育温度が *reb* オペロンの高発現につながることの分子機構や、Lon プロテアーゼによる抑制機構、および新たな制御機構の発見について重点を置くことにした。また、R-body 生産による宿主細胞の殺傷機構の解明も目的とした。

3. 研究の方法

reb オペロンの発現制御系の全容解明にあたり、*reb* オペロンのプロモーター領域に対する PraR や RebR の結合度が 2-OG や温度により変化するのかを *in vitro* 試験で調査した。また、*reb* オペロンの発現が異常となる変異株の探索をトランスポゾン導入により行い、*reb* オペロンの発現に関与する新たな遺伝子を同定した。さらに、高温・低温条件下で、野生型株と変異株間において *reb* オペロンと相関のある発現パターンを示す遺伝子群・タンパク質群を同定し、それらの発現を制御するマスター因子を同定した。一方、R-body による宿主細胞の殺傷機構の解明の一環として、*reb* オペロン高発現株を基にしたトランスポゾン変異株群を作製し、正常共生を示す変異株群のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

まず、*reb* オペロンの発現に対する 2-OG の関与を解析した。His₆ タグを付加した PraR および RebR を精製し、*reb* オペロンのプロモーター領域 (*reb* プロモーター) へのこれらの結合が 2-OG の有無により影響を受けるのかを *in vitro* で解析した。その結果、2-OG 存在下では、PraR は *reb* プロモーターに結合しないが、RebR は結合することが判明した。このことから、2-OG が PraR と *reb* プロモーターの結合を阻害するため、2-OG 存在下で *reb* オペロンが高発現すると結論づけられた。また、PraR および RebR の *reb* オペロンへの結合は、温度には影響を受けないことが判明したため、他の要因により、低温条件下で *reb* オペロンの発現誘導が起こると考えられた。

温度による *reb* オペロンの発現制御を解明するため、高温・低温における *reb* オペロンの発現パターンと類似もしくは相反した発現パターンを示す遺伝子の同定を試みた結果、クラス A -ラクタマーゼ遺伝子 *penA* が *reb* オペロンと相反して発現することが判明した。*penA* の発現は転写因子 PenR によって制御されており、*praR penR* 二重破壊株を作製し、温度別に *reb* オペロンの発現量を *praR* 破壊株と比較したところ、*praR* 破壊株では 37 °C から 38 °C に上がると急激に発現量が低下するが、*praR penR* 二重破壊株では *praR* 破壊株よりも高い発現量を示すことが判明した。このことから、PenR は高温時に *reb* オペロンの発現を抑制に関わる転写因子であることが示唆された。

reb オペロンの発現制御機構の全容解明に向け、野生型株、*praR* 破壊株、*lon* 破壊株由来のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを作製し、*reb* オペロンの発現量に異常が認められる変異株群を選抜することで、新たな *reb* オペロンの発現制御因子を探索した。この結果、新たに複数の遺伝子群が *reb* オペロンの発現量を制御する因子をコードすることが判明した。その

うち、転写因子をコードすると推定される 1 遺伝子 (*locus_tag*, AZC_3265) に着目して以降の解析を進めた。これまでに、*reb* オペロンの発現量は、*praR* 破壊株の方が *lon* 破壊株よりも高く、*praR lon* 破壊株では *praR* 破壊株および *lon* 破壊株よりも更に高いことが判明している。AZC_3265 破壊株における *reb* オペロンの発現量は *lon* 破壊株と同レベルであり、一見 AZC_3265 は *lon* に関与しているかのように考えられたが、*praR* AZC_3265 破壊株における *reb* オペロンの発現量は *praR* 破壊株と同程度であり、*praR lon* 破壊株ほどは高くなかった。このことから AZC_3265 は *lon* よりも *praR* に関与している可能性が示唆された。*lon* AZC_3265 破壊株における *reb* オペロンの発現量が *praR lon* 破壊株と同様に高かったことから、その可能性が強く示唆された。

R-body 生産による共生破綻の機構を解明するために、R-body を高生産して宿主を殺傷する *praR* 破壊株を基に、トランスポゾン変異株群を作製した。各々をセスバニアに接種して共生が破綻しなくなった変異株の探索を行ったが、本研究期間中には、目的の変異株の取得には至らなかった。

真核細胞殺傷因子 R-body の生産に関わる *reb* 遺伝子群の発現制御機構は、他の細菌においては全く進められて来なかった。本研究により、全細菌に先駆けて、その制御機構の一端が解明されてきた。この成果は、古くよりも存在が知られながら、近年になりようやく重要性が問われるようになった R-body という研究分野を牽引するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuoka Jun-ichi, Ishizuna Fumiko, Ogawa Tetsuhiro, Hidaka Makoto, Siarot Lowela, Aono Toshihiro	4. 巻 65
2. 論文標題 Localization of the reb operon expression is inconsistent with that of the R-body production in the stem nodules formed by <i>Azorhizobium caulinodans</i> mutants having a deletion of <i>praR</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 209-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2018.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Jun-ichi, Ishizuna Fumiko, Kurumisawa Keigo, Morohashi Kengo, Ogawa Tetsuhiro, Hidaka Makoto, Saito Katsuharu, Ezawa Tatsuhiro, Aono Toshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Stringent Expression Control of Pathogenic R-body Production in Legume Symbiont <i>Azorhizobium caulinodans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00715-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1128/mBio.00715-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Siarot Lowela, Toyazaki Hiroki, Hidaka Makoto, Kurumisawa Keigo, Hirakawa Tomoki, Morohashi Kengo, Aono Toshihiro	4. 巻 83
2. 論文標題 A novel regulatory pathway for K ⁺ uptake in the legume symbiont <i>Azorhizobium caulinodans</i> in which TrkJ represses the kdpFABC operon at high extracellular K ⁺ concentrations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01197-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1128/AEM.01197-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Jun-ichi, Ishizuna Fumiko, Kurumisawa Keigo, Morohashi Kengo, Ogawa Tetsuhiro, Hidaka Makoto, Saito Katsuharu, Ezawa Tatsuhiro, Aono Toshihiro	4. 巻 63
2. 論文標題 A putative TetR-type transcription factor AZC_3265 from the legume symbiont <i>Azorhizobium caulinodans</i> represses the production of R-bodies that are toxic to eukaryotic cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 452-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1080/00380768.2017.1371571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平川智基、松岡淳一、日高真誠、諸橋賢吾、青野俊裕
2. 発表標題 セバニア根粒菌における宿主殺傷能とアンピシリン耐性能は転写因子AmpRを介して温度により制御される
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川智基、松岡淳一、諸橋賢吾、青野俊裕
2. 発表標題 セバニア根粒菌の病原性R-bodyオペロンとアンピシリン耐性遺伝子の発現は転写因子AmpRを介して温度により制御される
3. 学会等名 日本土壌微生物学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡淳一、青野俊裕
2. 発表標題 セバニア根粒菌の宿主殺傷能に関わるrebオペロンの新たな発現制御因子群
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 勝晴 (Saito Katsuharu) (40444244)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	