

平成21年 6月11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710188

研究課題名（和文） 根粒形成に關与する根粒菌成分とその植物免疫反応の研究

研究課題名（英文） Studies on rhizobacterial components and their plant immune responses

研究代表者

橋本 雅仁（HASHIMOTO MASAHITO）

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30333537

研究成果の概要：

本研究では、*Mesorhizobium loti* 由来菌体成分の分離と NO 産生誘導活性の解析をおこなった。その結果、主にリポ多糖に NO 誘導能が存在することを見いだした。また、リポ多糖中の全く異なる2つの構造が NO 誘導に關与することもわかり、植物免疫誘導機構が複数の経路を持つことが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：マメ科植物、ミヤコグサ、根粒菌、*Mesorhizobium loti*、リポ多糖
リポオリゴ糖、菌体外多糖、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

増加の一途をたどる世界人口を支えるために、農業生産性の飛躍的な向上が望まれている。現在、この目的のためには、化学肥料や化学農薬の過剰な使用および食経験のない耐病遺伝子等の導入による食糧増産方法が用いられている。しかし、これらの方法は、残留農薬問題や遺伝子産物の安全性など人のみならず生態系や環境への悪影響が懸念されており、社会的に大きな問題となっている。そこで、生体への安全性や環境持続性などの社会的課題をクリアした収量増加技術

の開発が不可欠になっている。

根粒菌の共生が、マメ科作物の生育と収量を大きく上昇させることが古くから知られている。根粒菌はマメ科作物の根に感染すると、根粒と呼ばれる器官の形成を誘導し、そこで大気中の窒素ガスをアンモニアに変換するいわゆる生物的窒素固定を行い、植物に供給することができる。例えば、ダイズやラッカセイの子実中タンパク質は共生窒素固定に80%近く依存していることが分かっており、化学肥料の過剰使用に依存しない農業生産が理論上可能になっている。しかし、マメ科植物への根粒菌の感染成立、それに続く

根粒形成過程での植物細胞と根粒菌の相互作用の詳細については十分に明らかになっておらず、いまだ根粒の人為的制御による食糧増産には至っていない。

根粒菌とマメ科植物には厳密な相互認識機構が存在し、特定の共生パートナーのみを選別することが知られている。近年、この分子メカニズムの一端が解明され、根粒菌の nod ファクターや植物フラボノイドを介した相互作用が明らかになってきた。しかし、これらの因子の一致だけでは窒素固定に至らない例が知られており、さらに複雑なメカニズムの存在が示唆されている。最近、申請者の共同研究者らは、マメ科植物の根に共生パートナーの根粒菌が感染する際、その極初期に感染部位で植物の病原応答のシグナル分子である一酸化窒素 (NO) が産生されること、また NO 産生は時間の経過とともに消失し、その後、感染が成立することを見いだした。共生しない根粒菌の場合は NO 産生が見られないことから、共生の成立には一過性の病原応答様反応が重要であることが示唆された。さらに、この反応には根粒菌の細胞表層成分が関与していることも明らかにしている。

動物では、病原菌の細胞表層に存在する多糖成分や鞭毛タンパクが病原微生物由来分子パターン (PAMPs) として認識され、自然免疫反応と呼ばれる初期の生体防御応答を誘導することが明らかになっている。近年、同様な機構が植物とその病原菌の間にも存在すると考えられるようになり、「植物の免疫機構」として注目されるようになってきた。すなわち、根粒菌の細胞表層成分によるマメ科植物の根に対する NO 産生誘導は、この機構によって制御されている可能性があると考えられる。しかし、この NO 産生反応に関与する菌体成分の構造および関与する植物側のレセプターについては、いまだ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、ミヤコグサとその共生根粒菌をモデル系として、菌体側成分の分離、化学構造の同定、および植物側のレセプターの解明を目指す。すなわち、根粒菌から細菌表層成分を抽出し、NO 産生誘導活性をもとにした宿主 (ミヤコグサ細胞) との相互作用解析を指標として分離精製する。単離した成分の化学構造を解析することで、共生成立に必要な根粒菌側の因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 菌体

モデル細菌として、*Mesorhizobium loti*

MAFF303099 野生株 (WT) を用い、人工培養し菌体を得た。また、変異株として NO 産生能を持たない *exo* 株も検討した。

(2) 菌体成分の分離精製

細菌表層成分は、これまでの検討から、成分が多糖である可能性があることから、まずリポ多糖 (LPS、リポオリゴ糖 (LOS)、細胞外多糖 (EPS) などの多糖を抽出した。LPS は温水フェノール法を用いて菌体から抽出した。EPS は細菌培養後の培地からエタノール沈殿により回収した。

分離精製は、成分の性質に応じて疎水性相互作用、イオン交換、ゲル濾過等の各種クロマトグラフィーを用いた。リピドA、多糖、オリゴ糖の各部分は、LPS、LOS それぞれの画分を弱酸加水分解し分離することで調整した。

(3) 分析手法

質量分析 (MS) は ESI-TOF を用いて行った。核磁気共鳴 (NMR) は JEOL ECA-600 を用いて測定した。根で産生された NO は、DAF-FM 試薬を用いて可視化した後、蛍光顕微鏡で観測した。

4. 研究成果

(1) *M. loti* 由来多糖成分の分離

まず、菌体成分の分離を実施した。菌体として WT 株と EPS 変異株 *exo* を用いた。菌体成分の分離は、温水フェノール抽出法を用いて、図 4 に従っておこなった。その結果、図 5 に示した SDS-PAGE のように、それぞれ水層に LOS、フェノール層に LPS を主に含む成分が得られた。LPS および LOS は、弱酸により部分分解後、精製し、OS、PS、リピドA 画分を得た。また、EPS は EtOH 沈殿後、ゲル濾過により精製した。

(2) LPS および LOS 画分の NO 誘導活性

次いで、各成分の NO 誘導活性を検討した。*exo* 株は、菌体レベルでは NO 産生誘導能を示さないことから、*exo* 株と WT との比較を行うことで NO 産生に必要な成分の探索を試みた。まず、WT および *exo* 由来の LOS、LPS を用いて、*L. japonicus* 根に対する NO 誘導活性を検討した。その結果、*exo* 株においても、LPS/LOS 画分は NO 産生誘導能を持つことがわかった。このことは、NO 誘導活性には EPS よりも LPS/LOS がより関与していることを示唆している。

そこで、LOS/LPS 中の必要な構造を検討するために、部分分解生成物を用いて NO 産生誘導能を検討した。まず、*exo* 株由来成分で検討したところ、分解物である PS/OS とともに活性を持つことがわかった。しかし、濃度依

存的活性を検討したところ、LOS よりも LPS が OS よりも PS が高い活性を有することがわかった。次いで WT でも同様の検討を行った。この場合も同様に LPS および PS に高い活性がみられた。また、WT ではリピド A も検討し、濃度的には LPS に匹敵する活性を持つこともわかった。一方で、EPS 画分は NO 産生誘導活性を示すものの、その強度は弱いこともわかった。以上の結果は、*M. loti* 菌体の NO 産生誘導活性が主に PS およびリピド A に由来していることを示唆している。

(3) *exo* 株および WT 株由来 LPS/LOS の構造比較

exo 株由来 LPS/LOS と WT 株由来 LPS/LOS の構造を比較するため、それぞれのリピド A、OS、PS 画分の構造を MS および NMR で検討した。その結果、すべての画分で大きな差異は観察されず、同様の構造を持つことがわかった。

(4) PS 部分の構造解析

また、PS 部分の構造解析を実施した。構成糖をアルジトールアセテート法で検討した結果、ラムノースと 6-デオキシタロースを含むことが明らかになった。次いで、メチル化分析によって結合解析を行った結果、1-2 結合が主要な結合であることがわかった。

(5) 考察

本研究では、*M. loti* が共生パートナーである *L. japonicus* 根に NO 産生を誘導する際の原因物質について検討し、これが LPS/LOS の PS 部分およびリピド A 部分であることを明らかにした。LPS/LOS は *M. loti* の菌体表層に存在し、PS を外側にリピド A を内側に向けて配置されている。そこで、根との接触は PS で最も早く起こると考えられ、PS は認識物質として妥当であると考えられる。しかし、リピド A は菌の内部に存在することから、全菌レベルでの接触には関与が少ない可能性が高い。さらに PS とリピド A は、多糖と糖脂質という全く異なる物性をもつことから、*L. japonicus* 根での NO 産生には、複数の経路が関与している可能性が示唆される。以前の研究で明らかになっている、非共生パートナー細菌や病原細菌での NO 産生誘導挙動の違いは、このような経路の組み合わせが原因である可能性も考えられ、*M. loti* 以外の細菌成分を用いた更なる検討が必要である。

今回、*exo* 株において全菌レベルでは NO 産生誘導活性がなく、LPS/LOS 画分では活性を持つことも明らかになった。WT と *exo* 株での構造には大きな差異は認められないことから、両株とも LPS/LOS レベルで活性を持つことは疑問の余地はない。*exo* 株は EPS 関連遺伝子が破壊されていることから、

LPS/LOS のさらに外層に存在する EPS が NO 産生誘導能に負の影響を与えている可能性が考えられる。

(6) 今後の展望

今回の研究から、*M. loti* の多糖部分が、*L. japonicus* の NO 産生に関与していることがわかった。今後は、さらに詳細な構造解析を進めるとともに、有機合成化学的手法を用いることで化学構造の妥当性を証明する必要がある。その上で合成化合物を用いた更なる検討を実施し、NO 産生に必要な構造要因の特定を行いたい。また、リピド A 部分にも活性が存在することが明らかになり、NO 産生に複数の経路が関与している可能性も示唆された。そこで、NO 産生に関与する *L. japonicus* 側のシグナル経路の同定が今後必要となる。これらの結果は、*M. loti* と *L. japonicus* の共生メカニズムの解明につながるものと考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Masahito Hashimoto, Keita Tsunemi, Yasuo Suda, Maki Nagata, Ken-Ichi Kucho, Mikiko Abe, Toshiki Uchiumi, Studies of NO-inducing glycoconjugates from *Mesorhizobium loti*, BMB2008, 2008 年 12 月 10 日、神戸・ポートアイランド

(2) Masahito Hashimoto, Keita Tsunemi, Yasuo Suda, Maki Nagata, Ken-Ichi Kucho, Mikiko Abe, Toshiki Uchiumi, Characterization of NO-inducing polysaccharides from *Mesorhizobium loti*, 8th European Nitrogen Fixation Conference, 2008 年 9 月 1 日、Universitet Gent, Belgium

(3) Hashimoto Masahito, Daishi Honda, Kenji Kajiyama, Yasuo Suda, Maki Nagata, Ken-ichi Kucho, Mikiko Abe, Toshiki Uchiumi, Characterization of NO-inducing lipopolysaccharides from *Mesorhizobium loti*, BMB2007, 2007 年 12 月 12 日、パシフィック横浜

(4) 橋本雅仁, 本人大士, 梶山健次, 隅田泰生, 永田真紀, 九町健一, 阿部美紀子, 内海俊樹, 一酸化窒素誘導性 *Mesorhizobium loti* 由来リポ多糖の研究, 第 17 回植物微生物研究会, 2007 年 9 月 21 日、鹿児島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO MASAHITO)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30333537

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者