

平成22年 5月18日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780045

研究課題名(和文) 細菌エンドファイトの感染必須遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of rhizobial genes essential for endophytic colonization of rice.

研究代表者

江田 志磨 (EDA SHIMA)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：50420005

研究成果の概要(和文)：根粒菌のエンドファイト感染および定着に関わる遺伝子として外膜タンパク質をコードする *tolC* 遺伝子を同定した。*tolC* 遺伝子の破壊により、種々の抗生物質や植物由来抗菌物質に対する感受性が上昇したことから、TolC タンパク質が薬剤排出ポンプの外膜チャンネルであることが明らかとなった。この結果は、宿主植物の防御応答により産生される抗菌物質の作用を回避することがエンドファイト感染の成立に重要であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that the *Sinorhizobium meliloti* TolC, an outer membrane component of multidrug efflux pump, was involved in endophytic colonization of rice seedlings. A *tolC* knockout mutant was more susceptible than wild type to various plant-derived antimicrobial compounds, suggesting that the extrusion of such toxic substances by the TolC-dependent efflux pumps is important for adaptation of *S. meliloti* to the host environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：エンドファイト、Signature-Tagged Mutagenesis、根粒菌

## 1. 研究開始当初の背景

エンドファイトは、植物体内に生息する真菌や細菌の中で宿主植物に病徴を起さずに感染しているものを指す。これまでに多様な菌種のエンドファイトが多くの植物から分離または検出されており、単子葉、双子葉

にかかわらず植物体内部に微生物が生息しているのは一般的であることが明らかとなってきた。エンドファイトは、病害耐性、窒素固定、植物ホルモン産生など、有用な形質を植物にもたらすことから、農業・環境分野への応用が期待されているが、技術開発の基

礎となる感染および機能発現の分子機構の解析はまだ端緒についたばかりである。特に感染から定着の過程に関わる因子は明らかになっておらず、エンドファイトがなぜ様々な防御システムを備える植物の体内に侵入し増殖できるのかという本質的な疑問に対する回答はまだ得られていない。

## 2. 研究の目的

これまでの細菌エンドファイトに関する研究は、どの植物に、どのような菌種が内生し、どのような機能を付与しているのかに焦点が置かれたマクロな解析が主流であった。今後、エンドファイトの機能を活用する為には、エンドファイトと植物の相互作用がどのように行われているのかを分子レベルで解析する必要がある。特に、種子伝達が主要な感染経路ではない細菌エンドファイトでは、感染のメカニズムを明らかにすることが重要である。しかし、細菌エンドファイトとして最も解析の進んでいる *Azoarcus* sp. BH72 株においても、感染に関わる因子として 4 型繊毛が同定されているのみである。本研究課題は大きく二つの段階からなる。研究期間前半では、根粒菌がイネの根に感染しその内部及び地上部に定着するうえで必須な遺伝子のスクリーニングを行う。具体的には、染色体上にランダムなトランスポゾンの挿入をもつ変異株プールから感染・定着能力が低下した変異株をスクリーニングにより選抜する。期間後半では、選抜した変異株においてトランスポゾンが挿入されている遺伝子の機能を分子生物学的・分子遺伝学的に明らかにする。主として感染過程のどの段階で機能しているのか及び宿主植物との相互作用にどう関わるのかを中心に行う。

## 3. 研究の方法

根粒菌はマメ科植物と共生し窒素固定を行う細菌として有名であるが、マメ科以外の植物からも多数分離される。イネを宿主とした場合、根粒菌は植物体表面だけでなく体内に定着し、宿主の成長を促進することが明らかとなっている。本研究では、この根粒菌のエンドファイトとしての側面・性質に着目し、エンドファイト感染機構の特徴を明らかにする。これまでエンドファイトとして多数の菌種が分離されているが、これら大部分のエンドファイトの遺伝子操作系は確立されておらず、分子遺伝学的な解析は難しい。一方、根粒菌では、豊富な遺伝解析手法が整備されており、特にミヤコグサ根粒菌およびアルファルファ根粒菌では Signature-Tagged Mutagenesis 法 (STM 法) による大規模な変異株のスクリーニングが可能であるので、本研究では感染効率の低下した変異株のスクリーニングに STM 法を採用した。

### (1) STM 法による根粒菌変異株のスクリーニング

スクリーニングにはミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) の STM ライブラリーを用いた。このライブラリーは 3,000 を超える独立した変異株で構成されており、またトランスポゾンの挿入位置が決定済みである。滅菌パーミキュライトもしくは水耕で栽培したイネの幼植物体の根圏に、識別タグの種類によりソートした集団 (変異株プール) を接種した。2 週間生育させた植物体の根および地上部から直接 DNA を調製、または磨砕した植物体から分離したコロニーから DNA を調製した。この DNA とあらかじめ接種前のプールから調製した DNA とをテンプレートとしてリアルタイム PCR 反応を行い、個々のタグ配列を検出、定量した。

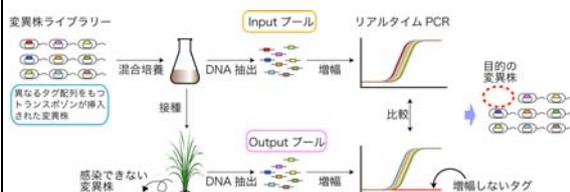


図1 STM法の概略

### (2) 感染、定着菌数の測定

接種から 7 日目の植物体を洗浄した後、エタノールと次亜塩素酸で表面殺菌した。これを乳鉢で磨砕し、生理食塩水で懸濁した。懸濁液を適宜希釈し寒天培地に塗布した。

### (3) 変異株の蛍光タンパク質標識と感染過程の観察

野生株及び変異株に緑色または赤色蛍光タンパク質を構成的に発現するプラスミドを導入し標識した。イネ幼苗の根圏に標識菌を接種し、数日ごとに根を蛍光顕微鏡で観察した。

### (4) 抗菌性物質感受性の測定

各種化合物に対する最小生育阻止濃度 (MIC) を平板希釈法により測定した。

### (5) 菌体外多糖の定量

マンニトールを炭素源、グルタミン酸を窒素源とする最小培地で各菌株を培養し、その上清を限外濾過で濃縮した。濃縮液をゲル濾過カラム (Sephadex-G75) で分画し、各画分に含まれる糖をアンスロン硫酸法で定量した。

### (6) 運動性の測定

各菌株の培養液を軟寒天培地 (0.25%) にスポットして 30°C で 3 日間インキュベートした後、コロニーの直径を測定した。また、蛍光タンパク質で標識した各菌株を混合し、蛍光顕微鏡で動きを比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 変異株のスクリーニング

STM 法によるスクリーニングにより、感染

または定着効率が低下していると考えられた候補株が多数得られた。これら候補株の変異遺伝子にコードされているタンパク質の機能に基づき分類を行ったところ、多剤排出タンパク質遺伝子に変異を持つ株が複数得られた。そこで遺伝的解析がより簡便に行えるアルファルファ根粒菌を用いて多剤排出タンパク質と感染、定着との関連を調べた。

## (2) *tolC*破壊株の作成と解析

グラム陰性細菌の多剤排出タンパク質は外膜、内膜、ペリプラズムタンパク質の3つの複合体で機能する。この3成分輸送体はToICタンパク質を共通の外膜チャンネルとするため、*tolC*遺伝子を破壊すると全ての3成分輸送体の機能をノックアウトすることができる。そこで *tolC* 破壊株を作成し感染、定着効率が調べた。*tolC*破壊株では、エンドファイトックに定着した菌数が野生株に比べて約 1000 分の1と大幅に低下していた (図2)。次に、蛍光タンパク質で標識した

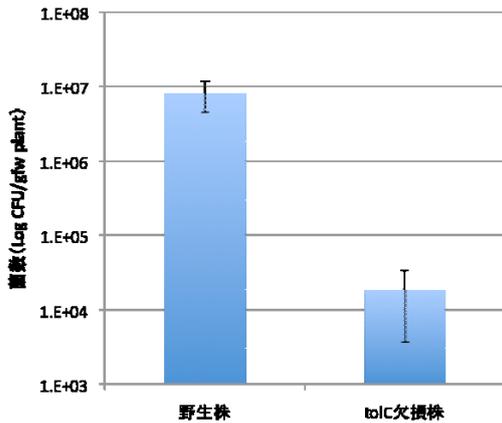


図2 接種後7日目のイネに定着した菌数

菌株を用いて根部への定着の様子を観察した。野生株では、側根の基部において侵入した菌体が多量に見られたのに対して、*tolC*破壊株ではほとんど認められなかった (図3)。また、根の表面に付着した菌体も少なかった。

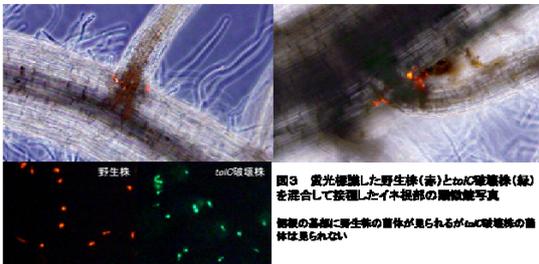


図3 蛍光標識した野生株(青)とtolC破壊株(赤)を混合して接種したイネ根の顕微鏡写真  
 根の基部に野生株の菌体が見られるがtolC破壊株の菌体は見られない

*tolC* 破壊株では多剤排出タンパク質が機能しないことにより植物由来の抗菌物質に感受性が上昇し、その結果として根面および植物体内での増殖が抑制されている可能性が考えられた。そこで、*tolC*破壊株の各種抗菌物質に対する感受性を調べた。*tolC*破壊株は、植物由来の抗菌物質 (サクラネチン、ナ

リングニン、ベルベリン等) だけでなく各種の抗菌物質や界面活性剤にも感受性であることが分かった (図4)。

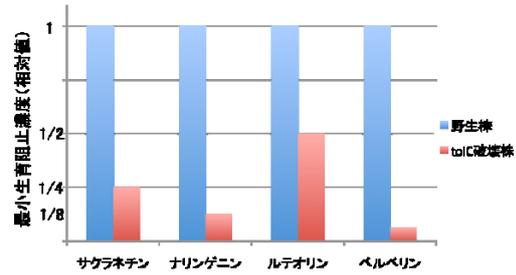


図4 抗菌物質感受性

根粒菌が菌体外に分泌する多糖類は、根粒形成に必須な因子であり、宿主植物の防御反応を抑制する働きを持つことが明らかとなっている。*tolC*破壊株は多糖産生培地において乾いたコロニーを形成したことから、多糖産生能の低下が示唆された。そこで、培養上清に含まれる多糖類の分子量分画及び定量を行ったところ、*tolC*破壊株では高分子画分に含まれる糖が著しく少なかった。一方で低分子画分に含まれる糖は増加していた (図5)。

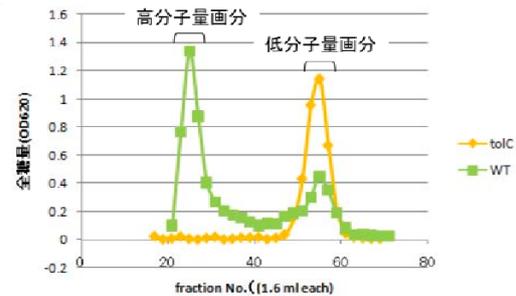


図5 菌体外多糖の分子量分画

植物病原細菌では運動性と感染能に関連がある例が知られている。そこで、軟寒天培地上での運動性を調べた。*tolC*破壊株の菌体が広がった範囲は野生株に比べて小さく、運動能の低下が認められた。また、培養液を顕微鏡下で観察した場合でも、*tolC*破壊株の動きが遅いことが確認された。

以上の結果より、ToICが根粒菌のエンドファイトックな感染に重要であることが明らかとなった。ToICは多剤排出タンパク質の外膜チャンネルとして知られており、本研究においても植物由来の抗菌物質に対する耐性に関わることが示された。したがって、宿主植物環境に存在する抗菌物質の作用を回避することがエンドファイト感染の成立に重要であることが示唆される。また、アルファルファ根粒菌の *tolC* 破壊株は、抗菌物質感受性であるだけでなく、菌体外多糖産生能や運動性の低下も示した。菌体外多糖がエンドファイトックな感染にどのように影響しているかについてはさらに詳しく解析する

必要があるが、根粒形成時と類似の働きをしているとすれば興味深い。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

① 江田志磨、植物共生細菌 *Sinorhizobium meliloti* の感染過程における TolC の機能、日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋国際会議場

② 森有季子、江田志磨、三井久幸、南澤究、菌体外多糖合成におけるアルファルファ根粒菌外膜蛋白質 TolC の機能解析、植物微生物研究会、2008年9月18日、奈良女子大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

江田 志磨 (EDA SHIMA)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：50420005

##### (2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：