

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780061

研究課題名（和文） セスバニア根粒菌における酸素克服機構の解明：内生窒素固定細菌としての利用に向けて

研究課題名（英文） Mechanism of low oxygen tolerance in *Azorhizobium caulinodans*

## 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・助教

研究者番号：10372418

## 研究成果の概要（和文）：

熱帯マメ科植物セスバニアは根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* と共生し、茎に茎粒という窒素固定器官を形成する。本研究では、*A. caulinodans* の推定内膜タンパク質をコードすると推測される遺伝子 *ocmA* が菌体外多糖生産に関与し、菌体外多糖のバリアで菌体内酸素濃度を制御している可能性を示した。また、Lonプロテアーゼも菌体外多糖の生産に関与しており、さらに、Lonプロテアーゼは宿主攻撃に関与する *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Azorhizobium caulinodans* is a microsymbiont of a tropical legume, *Sesbania rostrata*, and forms nitrogen fixing nodules on the stems. In this study, it was revealed that *ocmA* gene, which was predicted to encode an inner membrane protein, was related to production of exopolysaccharides in *A. caulinodans*. It was also revealed that Lon protease was involved in production of exopolysaccharides. Furthermore, Lon protease was found to be involved in suppression of *reb* genes, which is related to killer trait of this bacterium.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：窒素固定細菌、根粒菌

## 1. 研究開始当初の背景

*Azorhizobium caulinodans* は、マメ科植物セスバニアの根のみならず茎にも茎粒という窒素固定器官を形成する根粒菌である。本菌は植物への強い感染能を持ち、側根・不定根周辺の亀裂から植物組織内に侵入し、周辺植物細胞の一部を死滅させて形成された空間に定着してから、宿主細胞内に感染する。また、多くの根粒菌は共生状態のみで窒素固定を行うが、本菌は単生状態で、しかも、ある程度酸素が存在する条件

下でも高い窒素固定活性を示す。さらに、本菌は内生窒素固定細菌としての性質を持ち、イネやシロイヌナズナなどの非マメ科植物の組織内に定着し、窒素固定を行う。これは「強い感染能」と「単生での高窒素固定能」によりもたらされたと考えられる。これらの性質を詳細に解析し、最大限に制御・利用すれば、より広範囲の作物に本菌を内生窒素固定細菌として適用出来るのではないかと考えられる。我々は、*A. caulinodans* の

全ゲノム配列を決定し、ゲノムワイドな変異株探索による莖粒形成関連遺伝子群の網羅的探索と、マイクロアレイによる共生・単生での網羅的遺伝子発現比較などを行い、本菌の特性を解析する上での基盤を築き、根粒菌の進化における本菌の重要性を見いだしてきた。

## 2. 研究の目的

*A. caulinodans* の内生窒素固定細菌としての応用を考える上で、「レグヘモグロビンに守られていない非マメ科植物組織内で如何に酸素を克服しているのか？」という疑問が生じる。これは「ある程度酸素が存在しても単生窒素固定が可能なのは何故か？」という疑問でもあるが、申請者らは最近、新規の酸素克服機構が *A. caulinodans* に存在する可能性を、以下のように見いだした。

転写因子 FixK は、根粒菌の微好気呼吸・窒素固定に関連する遺伝子群の発現制御因子の一つである。一般的に、根粒菌の *fixK* 遺伝子の発現は、酸素センサーである二員制御系 FixL/FixJ により厳密に制御されており、低酸素条件下のみで誘導される。しかし、*A. caulinodans* の *fixK* は高酸素条件下でも発現しており、低酸素条件下ではさらに発現上昇する。我々は、*A. caulinodans* の推定内膜タンパク質をコードする遺伝子 (*ocmA* と命名) に着目し、*ocmA* 破壊株を作製してマイクロアレイ解析を行ったところ、高酸素条件下での *ocmA* 破壊株における“*fixK* および FixK 制御下にある遺伝子群”の発現が、野生型株に比べ極度に低下していることを見いだした(未発表)。FixL/FixJ 系の機能不全が原因であると疑ったが、*ocmA* 破壊株は気相酸素濃度1%以下の低酸素条件下で正常な窒素固定活性を示したので、FixL/FixJ 系は正常であると判断した。しかし、様々な気相酸素濃度での窒素固定活性を調査したところ、窒素固定が誘導される酸素濃度の閾値が、*ocmA* 破壊

株では野生型株に比べて低いことが判明した(未発表)。これらのことから、*ocmA* 破壊株は野生型株よりも細胞内酸素濃度が高いため、*fixK* の発現が低く、比較的低い気相酸素濃度にならないと窒素固定が誘導されないのではないかと予想された。つまり、「*A. caulinodans* の細胞内酸素濃度は、OcmA タンパク質が担う細胞内酸素濃度低下機構により、低く維持されている」という仮説が提起される。そこで本研究では、この仮説を証明し、さらに細胞内酸素濃度に関する新規知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、細菌細胞内の酸素濃度測定技術の開発を研究の第一段階としており、ニードル式マイクロ酸素濃度計を用いた直接的測定法と、低酸素プローブとして汎用されている pimonidazole-HCl を用いた分子生物学的測定法を検討した。

また、*ocmA*破壊株を作製し、詳しい表現型解析を行い、低酸素克服にOcmAがどのように関与しているのかを検討した。

さらに、低酸素克服機構に関与するOcmA以外の他の因子を見つけ出し、その因子に関与する遺伝子の破壊株を作成し表現型解析等を行った。

## 4. 研究成果

本研究において、ニードル式マイクロ酸素濃度計を用いた直接的測定法と、低酸素プローブとして汎用されている pimonidazole-HCl を用いた分子生物学的測定法の、細菌内酸素濃度測定への応用は可能とならなかった。

研究を進める最中に、*A. caulinodans* の *ocmA* 遺伝子破壊株は野生型株に比べて多量の菌体外多糖を生産することが判明し、OcmA は菌体外多糖生産に関与し、菌体外多糖のバリアで菌体内酸素濃度を制御している可能性が浮上して

きた。また、Lon プロテアーゼをコードする *lon* 遺伝子破壊株の菌体外多糖生産能が野生型株に比べて劣ることが判明し、*lon* 遺伝子が細胞内酸素濃度低下機構を担う可能性がある遺伝子として候補に挙げられた。

詳細な解析を行うと、*lon* 遺伝子は菌体凝集にも関与している可能性が判明し、菌体凝集により細胞内酸素濃度の低下が制御されている可能性も見いだされた。

さらに、*lon* 遺伝子破壊株の表現型解析を進めると、細胞内酸素濃度とは関係ないが、*lon* 遺伝

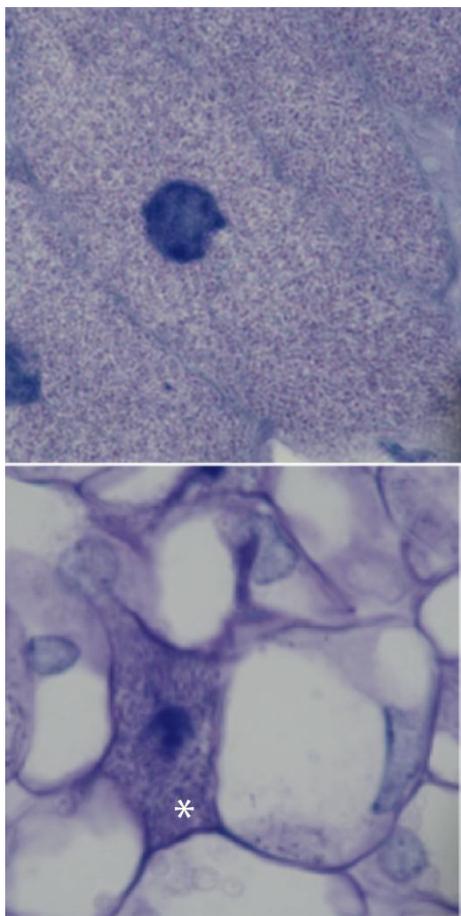


図1. *A. caulinodans* の野生型株 (上) と *lon* 破壊株 (下) により形成された茎粒内部の宿主植物細胞。 *lon* 破壊株では萎縮した宿主細胞 (\*) に菌体が定着している。

子は宿主植物細胞に対する本菌の攻撃性に関与する *reb* 遺伝子群の発現制御にも関わっていることも、本研究により見いだされた。*reb* 遺伝子群とは、もともとゾウリムシ内生菌の宿主殺傷能に関与する R-body タンパク質をコードしていることで知られていた。我々はかつて、*praR* と名付けた転写因子が *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与していることを報告している。*lon* 遺伝子も *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与しており、*reb* 遺伝子群が高発現している *lon* 破壊株が植物細胞内に感染すると、宿主植物細胞の一部が萎縮し、その萎縮した細胞内に *lon* 遺伝子変異株が定着することが判明した(図1)。

#### 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)

①Nakajima A, Aono T, Tsukada S, Siarot LL, Ogawa T, Oyaizu H (2012) Lon protease of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is required for the suppression of *reb* gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (19): 6251-6261. 査読有り

②Zhang Y, Aono T, Poole P, Finan TM (2012) NAD(P)<sup>+</sup>-malic enzyme mutants of *Sinorhizobium* sp. strain NGR234, but not *Azorhizobium caulinodans* ORS571, maintain symbiotic N<sub>2</sub> fixation capabilities. *Applied and Environmental Microbiology* **78** (8): 2803-2812. 査読有り

[学会発表] (計3件)

①中島梓、青野俊裕、塚田周平、Lowela Siarot、小川哲弘、小柳津広志「*Azorhizobium caulinodans* の Lon プロテアーゼは *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与している」日本土壤肥料学会、鳥取 (2012年9月4日)

②Siarot, L. Toyazaki, H. and Aono, T. The role of potassium transport systems of *Azorhizobium caulinodans*. 2nd Asian Conference in Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2012年10月28日 (ポスター)、30日 (口頭)、プーケット・タイ

③Nakajima A., Aono T., Tsukuda S, Siarot L.L, Ogawa T, Oyaizu H, Lon protease of *Azorhizobium caulinodans* is required for

the suppression of *reb* gene expression. XV  
International Congress on Plant-Microbe  
Interactions. 2012年7月30日、京都

6. 研究組織

(1) 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・助  
教

研究者番号：10372418