

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580099

研究課題名(和文) ゲニステインで初期誘導されるダイズ根粒菌多剤排出ポンプの共生における役割

研究課題名(英文) Role of genistein-induced multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* on symbiosis with soybean

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズ根粒菌にゲニステインで特異的に誘導発現する遺伝子領域(BjG30)が見出された。発現は誘導後15分で最大に達し、既知の共生遺伝子(nod遺伝子群)とは異なる発現プロファイルを示した。BjG30は薬剤排出ポンプとポリヒドロキシ酪酸代謝、及びその調節遺伝子から構成され、根粒の形成や窒素固定能など、ダイズとの相利共生に重要であることが明らかになった。更に、網羅的な遺伝子発現解析により、薬剤排出ポンプによるゲニステインの排出系が、共生遺伝子群の誘導発現量を機能的に制御している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：One genomic region, which is induced by genistein, was found in *Bradyrhizobium japonicum* and named BjG30. The induction level reached maximum at 15 min after the addition of genistein and the induction profile was different from that of symbiosis genes (nod genes). The BjG30 composed of multidrug efflux pump, polyhydroxybutyrate metabolism, and transcriptional regulatory genes, and played an important role in symbiosis with soybean for the nodule formation and nitrogen fixation. In addition, the results of global gene expression analyses showed that the efflux of genistein would functionally regulate the expression levels of symbiosis genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ダイズ根粒菌 多剤排出ポンプ ゲニステイン 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)を形成し窒素固定を行う細菌で、宿主(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)で誘導発現した特定の遺伝子領域(共生領域内の *nod* 遺伝子群など)の産物が根粒形成を誘導し共生関係が始まる。しかし、共生領域外の遺伝子領域の共生に果たす役割は不明な点も多い。

(2) これまでに、ダイズ根粒菌の共生領域内では、*nod* や typeIII 分泌系 (T3SS) 遺伝子群を含む 4 つの巨大な遺伝子領域が誘導発現されること、及び T3SS 遺伝子群の誘導発現は低温条件で遅滞し、低温環境で根粒着生が遅れる原因の一つであること、種子抽出液による誘導発現には *nodD2* 遺伝子が関与していることを明らかにした^{1,2)}。

(3) 一方、共生領域外では、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、及び機能が不明な複数の遺伝子群の誘導発現が認められた¹⁾。その中で、ゲニステイン処理後 30 分の非常に早い段階で強く誘導発現する遺伝子領域 (7.73Mb-7.75 Mb:18.8kbp) が根粒菌ゲノムのマクロアレイを用いた網羅的な遺伝子(ゲノムクローン)発現解析により見出された(BjG30 と命名)(図1)。この領域は①ゲノム上の位置が共生領域(1.68-2.36Mb)とは全く異なること、②17個の遺伝子(b117017~b117033)が含まれ、多剤排出(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 TetR family 遺伝子であること、③ダイゼインでは顕著な発現が見られないこと、④誘導時間が、*nod* 遺伝子群(6時間程度)よりも著しく早いこと、などから、共生の初期過程は、ゲニステインが *nod* 遺伝子群の発現を誘導してスタートするという単純なパラダイムだけではなく、ゲニステインそのものの排出にも関連が推測される薬剤排出ポンプが密接に関わっている可能性が強く示唆され、本研究の着想に至った。

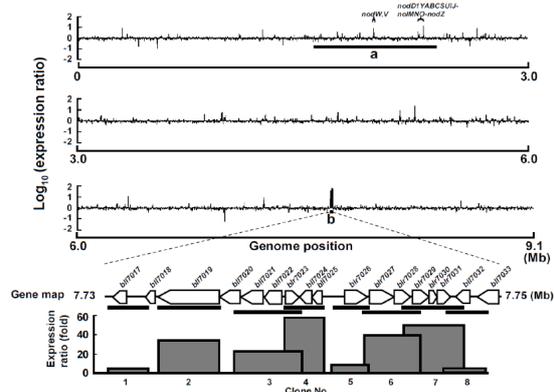


図1 BjG30 遺伝子領域の誘導発現
a: 共生領域 (1.68-2.36Mb)、b: BjG30 領域 (7.73-7.75Mb)

2. 研究の目的

(1) 研究の全体構想は、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、特異的に強く誘導されるダイズ根粒菌薬剤排出ポンプの共生における役割を明らかにすることである。本研究では、誘導発現される薬剤排出ポンプをコードしているクラスター遺伝子の発現プロファイルを詳細に検討すると共に、関連遺伝子の破壊株を構築して、ダイズ根への感染から根に形成された根粒の数や窒素固定の能力、並びに、共生関連遺伝子群の発現に及ぼす影響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、本研究は、薬剤排出ポンプが共生初期に関与する新しいパラダイムを示すことを目的としている。ゲニステインには根粒菌の増殖阻害作用があり、共生の初期段階で根粒菌が正常に宿主植物に応答するためには、ゲニステインの細胞外への排出がカギとなる可能性を明らかにする。更に、共生領域外に位置するクラスター遺伝子が共生に関わる知見を得る。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、根粒菌の共生初期における新規な知見が得られ、優れた根粒菌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) 遺伝子発現量の測定

①ゲニステインによる遺伝子の誘導発現と RNA の抽出: ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) をマンニトール/酵母エキス培地 (YMB 培地) で 30°C、3 日間振とう培養後、新しい YMB 培地で OD₆₀₀:0.1 に希釈した。これにゲニステインを添加し、30°C で振とう培養することにより遺伝子の発現を誘導した。ゲニステインの終濃度は 0.1~10 μM、誘導時間は 1~60 分で行った。また、5-ヒドロキシフラボノイド(ゲニステイン関連物質)にはアピゲニン、ピオカニン A、ルテオリン、ケンペロール、ナリングニン、ケルセチンを用い、5-デオキシフラボノイド(ダイゼイン関連物質)にはクメストロール、ホルモノネチン、グリシテインを用いた。菌液に等量の氷冷 5%フェノールを直接加えた後、遠心分離 (10,000rpm, 20分, 4°C) で菌体を回収し、ISOGEN-LS (ニッポンジーン) を加えて全 RNA を抽出した。

②遺伝子発現量の測定: プライマーは、Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) で作成した。遺伝子の発現量は、Qianti-Tect SYBR Green RT-PCR (Qiagen) と MiniOpticon™ (version 3.1, BioRad) で測定し、*sigA* (*B. japonicum* のハウスキーピング遺伝子) で標準化した。

(2) 遺伝子破壊株の構築

① *B. japonicum* USDA110 ゲノムのコスミドライブラリーより目的の遺伝子領域を含む DNA クローンを選抜・単離し、suicide vector (pK18mob) にライゲーションした。目的遺伝子領域の一部を制限酵素で除去後、抗生物質遺伝子カセット (Ω) を挿入し、破壊プラスミドを構築した。そして、ヘルパープラスミド (pRK2013) を用いた triparental mating により親株 (*B. japonicum* USDA110) に導入後、遺伝子相同組み換え (double crossover) により目的の遺伝子破壊株を得た。

構造遺伝子の破壊株は、薬剤排出ポンプの破壊株 (Δ RND 株) (bl117019-bl117021 遺伝子の欠失変異)、及びポリヒドロキシ酪酸代謝破壊株 (Δ PHB 株) (blr7026-blr7029 遺伝子の欠失変異) が構築された (図 2)。また、調節遺伝子の破壊株は、TetR 転写調節遺伝子の破壊株 (Δ TetR7023) (blr7023 遺伝子の挿入変異)、及び (Δ TetR7024) (bl117024 遺伝子の欠失変異) が構築された。

② 構造遺伝子の破壊株を得るために、薬剤排出ポンプの破壊プラスミドは、クローンライブラリー (brc02044) から *NheI* 断片 (bl117019-bl117021 を含む 11.1kb) を単離し、pK18mob (*XbaI* サイト) にライゲーションした (pK18mob-[*NheI* frag])。そして、pHP45 Ω (*SmaI* サイト) から単離した Ω カセットを pK18mob-[*NheI* frag] (*BsiWI* サイト) にライゲーションした (pK18mob-[*NheI* frag]:: Ω)。また、ポリヒドロキシ酪酸代謝の破壊プラスミドは、クローンライブラリー (brc00911) から *HindIII* 断片 (blr7026-blr7029 を含む 12.2kb) を単離し、pK18mob (*HindIII* サイト) にライゲーションした (pK18mob-[*HindIII* frag])。そして、pHP45 Ω (*SmaI* サイト) から単離した Ω カセットを pK18mob-[*HindIII* frag] (*EcoRV* サイト) にライゲーションした (pK18mob-[*HindIII* frag]:: Ω) (図 2)。また、調節遺伝子の破壊株を得るために、TetR (blr7023) の破壊プラスミドは、pK18mob-[*HindIII* frag] (*AsiSI* サイト) に Ω カセットをライゲーションし (pK18mob-[*HindIII* frag]:: Ω)、TetR (bl117024) の破壊プラスミドは、pK18mob-[*HindIII* frag] (*AciI* サイト) に Ω カセットをライゲーションした (pK18mob-[*HindIII* frag]:: Ω)。

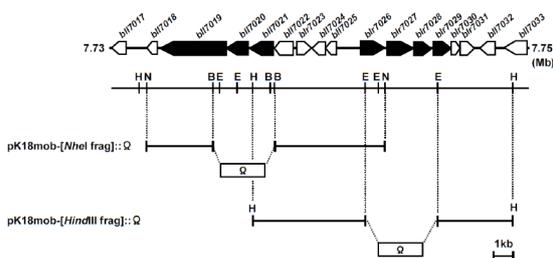


図 2 B.jG30 構造遺伝子の破壊

(3) 遺伝子破壊株の根粒着生と窒素固定活性

① 接種菌液の調製と種子殺菌: *B. japonicum* USDA110 (親株と破壊株) を YMB 培地で対数後期まで振とう培養し、リン酸緩衝液で菌体を洗浄後、菌密度を 10^7 cfu/ml に調整した。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。

② 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 日間、人工気象器 (Biotron, NK) で栽培した。

③ 根粒着生と窒素固定活性の測定: 着生した根粒数は経時的に計測した。特に着生初期 (接種後 1~2 週間) 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。窒素固定活性は、常法によりガスクロマトグラフィーによるアセチレン還元活性から求めた。

(4) 共生関連遺伝子群の発現解析

B. japonicum USDA110 (親株と破壊株) を YMB 培地で 30°C、3 日間振とう培養後、新しい YMB 培地で菌液 (OD_{600} :0.1) を調製した。これにゲニステイン (終濃度 5 μ M) を添加し、30°C、6~12 時間培養して遺伝子を誘導発現させた。RNA 抽出後、除タンパクと DNase 処理を行い、mRNA を回収した (MicrobeExpress, Ambion)。ランダムプライマー (Gibco) と逆転写酵素 (SuperScriptII, Invitrogen) で cDNA を [α - 32 P]dCTP 標識後、AutoSeqG (GE Healthcare) で精製し、*B. japonicum* USDA110 ゲノムの M13 フェ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を行った (55°C)。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) で共生関連遺伝子群 (*nod* 遺伝子, T3SS 遺伝子) を含むクローンの発現量 (ゲニステイン処理/無処理) を親株と比較した。

4. 研究成果

(1) ゲニステインによる B.jG30 遺伝子発現量の測定

ダイズ根粒菌 (*B. japonicum*) の B.jG30 に含まれる 17 個の遺伝子について、ゲニステイン (終濃度 5 μ M) 処理後 30 分における誘導発現量を定量的 RT-PCR 法で調べた。その結果、5 個の遺伝子 (bl117017, blr7026, blr7031, bl117032, bl117033) を除く全ての遺伝子がゲニステイン添加後 30 分で 24.6~213.9 倍に誘導発現した。特に、薬剤排出ポンプに関わる遺伝子を含む遺伝子領域 (bl117018-bl117021)、ポリヒドロキシ酪酸代謝系に関わる遺伝子を含む遺伝子領域 (blr7027-blr7030) の発現量が高かった。この発現プロファイルは、マクロアレイで得られたクローンの発現プロファイルとよく一致していた (図 1)。一方、ダイゼインで同様に処理した結果、ゲニステインで見られた

ような顕著な発現は見られなかった。また、ゲニステインによる誘導発現はダイゼインの添加で減少した。これらの結果から、BjG30 遺伝子の発現はゲニステイン特異的であり、ダイゼインで競合的に阻害されると考えられた。

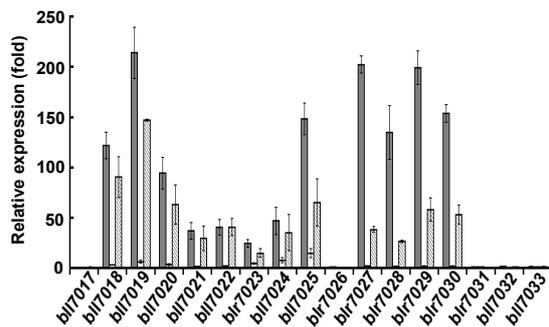


図3 BjG30 遺伝子の誘導発現プロファイル
■, genistein; □, daidzein; ▨, genistein + daidzein

(2)5-ヒドロキシ/デオキシフラボノイドによる BjG30 遺伝子の発現

ゲニステインで誘導発現した BjG30 遺伝子の中で、発現が顕著だった遺伝子 (bll7019, bll7025, bll7027, bll7029) を代表を選び、5-ヒドロキシフラボノイド「イソフラボン (ゲニステイン, ビオカニン A)、フラボノール (ケンペロール, ケルセチン)、フラボン (アピゲニン, ルテオリン)、フラバノン (ナリングニン) (図 4A) と 5-デオキシフラボノイド (ダイゼイン, クメストロール, ホルモノネチン, グリシテイン) (図 4B) による誘導発現量を調べた。その結果、発現量には差異があったが、ナリングニンを除く全ての 5-ヒドロキシフラボノイドで代表遺伝子の発現が認められ、ケルセチンによる誘導発現量はゲニステインと同程度に高かった。一方、5-デオキシフラボノイドでは顕著な発現が認められた遺伝子は見られなかった。これらの結果から、BjG30 は 5-ヒドロキシ基を有するイソフラボン, フラボノール, フラボンで強く誘導されることが示された (図 4)。

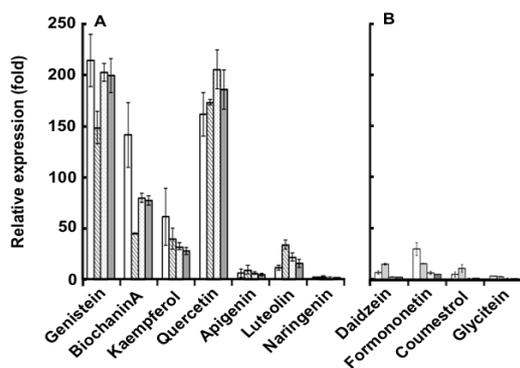


図4 BjG30 代表遺伝子の誘導発現プロファイル
□, bll7019; ▨, bll7025; ▩, bll7027; ■, bll7029

(3) BjG30 遺伝子の誘導発現におけるゲニステインの処理時間と濃度の影響

代表遺伝子 (bll7019, bll7025, bll7027, bll7029) について、BjG30 遺伝子の誘導発現におけるゲニステイン処理時間 (図 5A)、及びゲニステイン濃度 (図 5B) の影響を調べた。その結果、誘導発現は、ゲニステイン処理後 5 分で生じ、その発現量は処理後 15 分で最大に達した。発現量はゲニステイン濃度に依存的で、7.5 μM で最大になった。一方、共生関連遺伝子群 (*nodW*, *nodD1*) の発現はゲニステイン処理後 15 分で生じ、その発現量は時間とともに増加する傾向があったが、ゲニステインの濃度を変えても大きな変化は見られなかった。これらの結果から、BjG30 の発現プロファイルは *nod* 遺伝子とは全く異なることが示された。

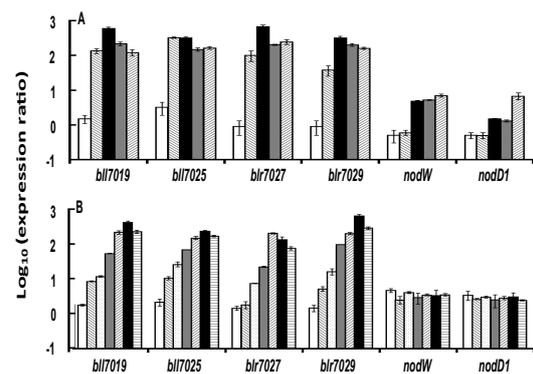


図5 BjG30 と *nod* 遺伝子のゲニステイン誘導発現プロファイル

A: □, 1 min; ▨, 5 min; ■, 15 min; ▩, 30 min; ▪, 60 min. B: □, 0.1 μM; ▨, 0.5 μM; ▩, 1.0 μM; ▪, 2.5 μM; ▫, 5 μM; ■, 7.5 μM; ▬, 10 μM.

(4) BjG30 遺伝子破壊株の構築と共生関係に与える影響

BjG30 の薬剤排出ポンプ遺伝子 (bll7019-7021) の破壊株 (Δ RND)、ポリヒドロキシ酪酸代謝遺伝子 (bll7028-7029) の破壊株 (Δ PHB)、及び TetR 転写調節遺伝子 (bll7023, bll7024) の破壊株 (Δ TetR7023, Δ TetR7024) を構築し、共生に関わる機能、即ち根粒の着生数 (接種 25~40 日: number/plant) と重量 (接種 40 日目: mg/nodule)、植物体重量 (接種 40 日目: g/plant)、及び窒素固定能 (接種 40 日目: アセチレン還元活性) を親株と比較した。その結果、 Δ RND 株の根粒数は親株よりも増加したが、根粒重量と窒素固定能は有意に低下した。また、 Δ TetR7023 株では、根粒数は親株の 50%程度に減少したが、根粒重量と窒素固定能は増加した。しかし、いずれの破壊株も、植物体あたりの重量は減少した。一方、 Δ PHB 株と Δ TetR7024 株には、親株と比べて大きな差異はみられなかった。以上の結果から、BjG30 の薬剤排出ポンプと TetR 転写調節

遺伝子 (blr7023) は、機能的な共生関係の構築に重要であることが明らかになった。

(5) BjG30 遺伝子の共生関連遺伝子群の発現に及ぼす影響

マクロアレイを用いて、 Δ RND 株、及び Δ TetR7023 株のゲニステイン処理後 12 時間における共生関連遺伝子群の発現量を親株と比較した。その結果、*nodYABC* が含まれるクローン (brb16006:2183559~2186529bp) の発現量は、親株 (43.6 倍) に対し、 Δ RND 株 (19.5 倍)、 Δ TetR7023 (36.6 倍) となり、薬剤排出ポンプの破壊により *nodYABC* の発現が有意に抑制されることが示された。以上の結果から、RND 型薬剤排出ポンプによるゲニステインの排出系は、ゲニステインによる共生関連遺伝子群の発現系に密接に関わっていることが明らかになった。

〈引用文献〉

①Wei, M., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiyumi, 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.

②Wei, M., Takeshima, K., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiyumi, 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.

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)

①Takeshima, K., Hidaka, T., Wei, M., Yokoyama T., Minamisawa, K., Mitsui H., Itakura M., Kaneko T., Tabata S., Saeki K., Omori H., Tajima S., Uchiyumi, 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

〔学会発表〕 (計 3 件)

①大和田 琢二 (代表者)、Genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* is involved in the early interaction with *Glycine max* (L.) Merr.、18th International Congress on Nitrogen Fixation、平成 25 年 10 月 15 日、フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県・宮崎市)

②大和田 琢二 (代表者)、共生の初期段階におけるダイズ根粒菌 TetR family 遺伝子の役割、植物微生物研究会、平成 25 年 9 月 7 日、基礎生物学研究所・岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

③大和田 琢二 (代表者)、ダイズ根粒菌のゲニステイン誘導遺伝子の破壊と共生における役割、植物微生物研究会、平成 24 年 9 月 26 日、神戸大学百年記念館 (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和田 琢二 (OHWADA, Takuji)

帯広畜産大学・食品科学研究部門・教授

研究者番号：90211804