

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580115

研究課題名(和文) イネの形質転換に適した特質を持つアグロバクテリア菌株の解析

研究課題名(英文) Analysis of Agrobacterium strain which has unique characteristics suitable for rice transformation

研究代表者

鈴木 克周 (Suzuki, Katsunori)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50221320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイネを形質転換するのに適した特質をもつアグロバクテリア菌株を解析して、その仕組みを明らかにすることを目標としている。これまでイネはアグロバクテリアが植物に感染してT-DNA輸送するのに必須なvir遺伝子を発現するのに必要な誘導物質を作らないと考えられていた。本研究では、イネ懸濁培養から誘導活性のある物質を抽出精製し構造決定を試みた。その結果、誘導物質はクマリルアルコールであることがわかった。また、イネが微量分泌するクマリルアルコールを検出してvir遺伝子発現に至らせる未知の遺伝因子は、多くのvir遺伝子を有するTiプラスミド上ではなく、染色体DNA上にあることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The primary aim of this study is to reveal the mechanism of a unique Agrobacterium strain that has property suitable for rice transformation. So far, they thought that rice has no or little material that induces vir gene expression in agrobacteria. Here we successfully extract and purify the substance, and then determined the molecular structure. The fact was supported by an experiment using the chemically synthesized material. This study also showed that the phenotype of the strain is determined not by Ti plasmid but by chromosomal background of the strain.

研究分野：微生物学、分子遺伝学

キーワード：アグロバクテリア イネ 形質転換 感染遺伝子発現 遺伝子発現誘導物質

### 1. 研究開始当初の背景

アグロバクテリアは双子葉植物と裸子植物に感染して T-DNA を植物核ゲノムに挿入し発現させることで発病させることが知られている。この仕組みを利用して多くの植物の形質転換が行われている。一方、単子葉植物では接種しても基本的に発病しない。イネではアセトシリンゴンなどの *vir* 遺伝子発現誘導物質を添加すれば遺伝子導入可能なことが知られている。しかし、いまだに遺伝子導入が不可能なイネや効率が低いことも問題になっている。日本で分離されたアグロバクテリア病原株の P-Ag-5 株は *vir* 遺伝子発現誘導物質を人為的に添加しなくてもイネに遺伝子導入が可能であるという特異な性質をもっている。有用アグロバクテリア菌株は既に 30 年間以上も世界中で利用されているがこのような性質を示す菌株はこれまでに知られていない。本研究は、この菌株の性質を明らかにしようとするものである。

### 2. 研究の目的

本研究は、アセトシリンゴン等の既知 *vir* 遺伝子誘導物質を人為的に添加しなくてもイネ細胞と共存させると遺伝子発現されてイネへの遺伝子導入を行なうという、イネへの遺伝子導入に適した特性を持つ日本産アグロバクテリア菌株 P-Ag-5 が、どのような仕組みで遺伝子発現できるのか明らかにすることを目的としている。そのために、この菌株の *vir* 遺伝子発現様式を既知の菌株と対比して調査する。また、イネと共存することで遺伝子発現を促す未知の遺伝子系を解析する。更に、この菌株の *vir* 遺伝子発現様式を促す未知物質を、イネから抽出精製して、構造決定を目指す。

### 3. 研究の方法

イネによる *vir* 遺伝子発現誘導能の検出：*vir* 遺伝子発現を容易に検出するために常用されている GUS 酵素遺伝子 (*Pvir-GUS*) をレポーターとして利用した。また、化学発光遺伝子 *luxAB* を *vir* 遺伝子プロモーター直下に配置したレポーター (*Pvir-luxAB*) を新たに作成して利用した。

イネによる *vir* 遺伝子発現誘導能が低下した変異菌株の分離：上記の *Pvir-luxAB* レポーター保持株にトランスポゾン挿入して変異体を多数個用意した。各変異体をイネ培養細胞 0c を寒天培地中に包埋した固体培地を用意し、この上に変異体菌株を培養するという共存培養処理を行なってから *vir* 遺伝子発現を化学発光で検出した。この操作でほとんど全ての変異体は発光したが、発光しない株のみを選抜した。イネ培養細胞 0c との共存培養で発光しない変異体の中で、アセトシリンゴンで誘導されるものを選び出すことを試みた。このような変異体が得られれば、イネが分泌する物質を効率的に感知する遺

伝子に変異があると期待される。

イネの分泌する *vir* 遺伝子発現誘導物質の精製と構造決定：イネ懸濁培養上清液にある誘導物質の抽出は、上清液に酢酸エチルを加えて酢酸エチル層を回収し濃縮して行った。次に、抽出物を逆相カラムクロマトにかけてメタノール勾配で溶出し、誘導活性を示す画分を得た。この画分を更に順層のカラムクロマトで精製純化した。この物質を質量分析および NMR 分析した。この機器分析は広島大学自然科学研究支援開発センターの支援と機器によって行なわれた。

p-coumarylalcohol の化学合成：*p-coumaric acid* のエチルエステルを還元して合成した。この合成は本学の化学専攻の高木隆吉博士のご指導を頂いて行なわれた。

### 4. 研究成果

**P-Ag-5 株の *vir* 遺伝子発現の特性：**  
P-Ag-5 株がイネと共存培養するのみで *vir* 遺伝子発現するという現象は、P-Ag-5 株が *vir* 遺伝子を恒常的に発現するので誘導物質を必要としないとすれば単純である。しかし、P-Ag-5 株の *vir* 遺伝子は既知菌株と同様に細菌用栄養培地や誘導物質を添加していない誘導用培地等では全く発現せず、アセトシリンゴン（既知の *vir* 遺伝子発現誘導物質）を添加すると発現した。すなわち、イネに対する特異な性質は恒常的な *vir* 遺伝子発現によって生じるという考えは否定された。P-Ag-5 株から Ti プラスミドを除去したうえで既知菌株の Ti プラスミドを移入した菌株 P-Ag-5 (pTiC58) は、P-Ag-5 株と同様の性質を示した。一方、C58(pTiPAg5) は C58 株と同じ性質を示したことから、P-Ag-5 株の特異な性質を決定する遺伝子は Ti プラスミド上には無く、染色体上にあると考えられた。

P-Ag-5 株ゲノムにトランスポゾン挿入した変異体の中から、イネに対する応答能が低下したものを分離したところ、いずれもアセトシリンゴンによる誘導能にも低下がみられたので目標の変異体を得ることができなかった。

**イネの分泌する *vir* 遺伝子発現誘導物質の精製と構造決定：**イネ懸濁培養上清液にある誘導物質を精製純化することに成功した。この物質を質量分析および NMR 分析したところ、*p-coumarylalcohol* (PCAL) であることがわかった。また、化学合成した同物質もイネから抽出したものと同様の活性を示した。イネ懸濁培養上清液に含まれる PCAL 濃度を測定したところ、数マイクロモルという低い濃度でのみ存在していた。P-Ag-5 株と C58 株の PCAL 分解能力を予備的に分析したところ、C58 株の方がはるかに大きいことも明らかになった。また、PCAL は C58 株にも *vir* 遺伝子発現を促した。2 菌株の PCAL 分解力は、C58 株の方が明らかに高いことから、2 菌株のイネに対する応答の差は分解力の差にあると推定される。

以上のように本研究の成果から、イネが合成してP-Ag-5菌株の*vir*遺伝子発現を誘導している物質はPCALであることが明らかになった。更に、P-Ag-5がイネに対する応答性が優れている仕組みはPCAL分解力が低いことにあると示唆されたので、今後は分解力を決定する遺伝子に焦点をあてて研究をすすめる。

PCALはリグニン合成の中間体として知られている物質である。そのため、PCALはどの植物でも合成していると推定できる。本研究で明らかになったPCALが*vir*遺伝子発現誘導活性を持つという事実と合わせて考えると、リグニンをもつ多くの下等植物はアグロバクテリアによる感染を受けないが、そのような下等植物によってもアグロバクテリアは*vir*遺伝子発現誘導を受けうるという可能性もある。

#### 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)

[雑誌論文](計 5件)

1. S. Yamamoto, K. Suzuki (2012) Development of a reinforced Ti-*eviction* plasmid useful for construction of Ti plasmid-free *Agrobacterium* strains. *Journal of Microbiological Methods* 89: 53-56. (査読審査有り)
2. K. Kiyokawa, S. Yamamoto, Y. Sato, N. Momota, K. Tanaka, K. Moriguchi, K. Suzuki (2012) Yeast transformation mediated by *Agrobacterium* strains harboring an Ri plasmid: comparative study between *GALLS* of an Ri plasmid and *virE* of a Ti plasmid. *Genes to Cells* 17: 597-610. (査読審査有り)
3. 山本真司, 清川一矢, 大嶺悠太 (2013) アグロバクテリアの植物との相互作用. *日本乳酸菌学会誌* 24:38. (査読審査無し・招待執筆)
4. 大嶺悠太, 清川一矢, 山本真司 (2013) アグロバクテリアの微生物との相互作用. *日本乳酸菌学会誌* 24:39. (査読審査無し・招待執筆)
5. K. Suzuki, K. Moriguchi, S. Yamamoto (2015) Horizontal DNA transfer from bacteria to eukaryotes and a lesson from experimental transfers. *Research in Microbiology* 166:753-756. (査読審査有り・招待執筆)

[学会発表](計 10件)

1. 庄田佐知子, 藤井研人, 坂井綾子, 高木隆吉, 安倍学, 山本真司, 鈴木克周

(2015) イネ細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質 p-coumaryl alcohol の *Agrobacterium* による分解 (中国四国植物学会 第72回大会 2015年5月16日 於 愛媛大学)

2. 柴田桃子, 山本真司, 鈴木克周 (2015) 高病原性を示すアグロバクテリウム菌株 CN15 の研究(中国四国植物学会 第72回大会 2015年5月16日 於 愛媛大学)
3. 鈴木克周, 方岡結衣, 柴田桃子, 山本真司, 澤田宏之, 内山郁夫 (2015) 高病原性 *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Rhizobium radiobacter*) 菌株 CN15 のゲノム全塩基配列決定, ならびに環状と線状の染色体 DNA の予備的な解析 (中国四国植物学会 第72回大会 2015年5月17日 於 愛媛大学)
4. 庄田佐知子, 松井拓也, 清川一矢, 山本真司, 鈴木克周, 高木隆吉, 安倍学, 平賀良知 (2014) イネ細胞から分泌される p-coumaryl alcohol による *Agrobacterium* の *vir* 遺伝子発現誘導. (日本分子生物学会 第37回年会, 於 パシフィコ横浜 2014年11月27日).
5. 方岡結衣, 藤本裕人, 山本真司, 澤田宏之, 鈴木克周 (2014) 日本で単離された *Rhizobium radiobacter* 病原性菌株におけるゲノムグループの解析. (中国四国植物学会 第71回大会, 於 岡山理科大学 2014年5月10日).
6. 庄田佐知子, 松井拓也, 高木隆吉, 山本真司, 鈴木克周 (2014) イネ培養細胞による p-coumaryl alcohol の分泌および *vir* 遺伝子誘導能の解析. (中国四国植物学会 第71回大会, 於 岡山理科大学 2014年5月10日).
7. 清川一矢, 松井拓也, 高木隆吉, 山本真司, 鈴木克周, 安倍学, 平賀良知 (2013) イネ培養細胞が分泌する *vir* 遺伝子発現誘導活性物質の単離, (第70回中国四国植物学会第大会, 2013年5月11-12日, 於 徳島大学)
8. 山本真司, 清川一矢, 鈴木克周 (2013) アグロバクテリアのTiプラスミドを簡便に交換する技術の確立, 日本農芸化学会 2013年度大会 (2013年3月24-28日、於 東北大学)
9. 山本真司, 清川一矢, 田中克幸, 鈴木克周 (2012) より多くの生物に遺伝子を注入するアグロバクテリア株の探索. 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ (2012年12月11-14日 於 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)
10. 清川一矢, 田中克幸, 平賀良知, 山本真司, 守口和基, 鈴木克周 (2012) イネに含まれるアグロバクテリア *vir* 遺伝子誘導物

質の解析，第69回中国四国植物学会第大会  
(2012年5月12-13日，於島根大学)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 克周 (SUZUKI Katsunori)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：5 0 2 2 1 3 2 0

### (2)研究分担者

山本 真司 (YAMAMOTO Shinji)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：5 0 6 0 7 3 4 8