

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780058

研究課題名(和文)ダイズ根粒菌におけるグルタチオンによる細胞増殖増制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on relationships of fast growth and glutathione in Bradyrhizobium japonicum mutant

研究代表者

大津 直子 (NAOKO, OHTSU)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40513437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：TetR型転写抑制因子であるblr7984遺伝子を破壊したダイズ根粒菌では細胞増殖が速まる。対数増殖期の菌をマイクロアレイ解析に供したところ、近傍のbll7981-3、シトクロームオキシダーゼ、鞭毛形成や糖輸送体の遺伝子発現が上昇しており、細胞増殖との関連が示唆された。破壊株を接種した根粒中バクテロイドでは、bll7981-3のみが野生株由来のバクテロイドよりも上昇しており、これらがblr7984のターゲットであることが分かった。中でもグルタチオントランスフェラーゼであるbll7983は最も上昇しており、このことが増殖を速めた可能性を検証するため、bll7983過剰発現株の作成に着手した。

研究成果の概要(英文)：blr7984 is a putative TetR repressor in Bradyrhizobium japonicum and in the disruptant of this gene, cell growth speed was faster than wild-type. Microarray analysis with the cells grown at log-phase showed a large increase in gene expression of the adjacent genes bll7981-3, cbb-cytochrome oxidases needed for efficient respiration, proteins for flagella synthesis and transporters for sugars, suggesting the involvement of these genes in regulation of cell growth speed. In microarray analysis with bacteroids from soybean nodules infected withblr7984 disruptant, expression of the adjacent genes bll7981-3 only were increased compared with bacteroids infected with wild-type cells, indicating that these three genes are the targets ofblr7984. Especially bll7983 encoding glutathione transferase was induced the most. To confirm if the large induction of bll7983 caused the fast growth or not, generation of B. japonicum overexpressed with bll7983 was started.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：ダイズ根粒菌 グルタチオントランスフェラーゼ 細胞増殖 遺伝子破壊株 マイクロアレイ TetR型転写抑制因子

### 1. 研究開始当初の背景

ダイズ根粒菌はダイズの根に感染して形成された根粒中でバクテロイドに分化し、細胞増殖を抑制し、窒素固定能を獲得する。バクテロイドは、根粒中で植物細胞膜由来のペリバクテロイド膜に囲まれて存在しており、その中はペリバクテロイド溶液 (PBS) で満たされているため、PBS 中には根粒菌のバクテロイドへの分化を誘導する物質が含まれている可能性が考えられている。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA1100 株を PBS 中で培養した際に遺伝子発現が抑制されるゲノム領域があり、この領域はバクテロイドでも抑制を受けていた。そしてこの領域内には転写抑制因子である blr7984 遺伝子が存在した。このことから blr7984 遺伝子は、バクテロイド分化における遺伝子発現制御を行っている可能性が考えられ、この機能解明のためこの遺伝子破壊株を作成したところ、単生状態で細胞増殖が速まることが観察された。

### 2. 研究の目的

blr7984 遺伝子破壊株における細胞増殖促進機構およびバクテロイド分化との関わりを分子レベルで解明することを目的とし、増殖中の blr7984 遺伝子破壊株と野生株における遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。またダイズに共生した状態におけるマイクロアレイ解析も行い、破壊株の共生状態における遺伝子発現解析も行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 単生増殖期における遺伝子発現解析

*Bradyrhizobium japonicum* USDA1100 株の野生株と blr7984 遺伝子破壊株における増殖曲線を正確に描いた。そして増殖速度が明らかに異なる時間においてそれぞれの菌体采取了。菌体から RNA を抽出し、Affymetrics Soybean Gene 1.1 ST Array Strip (includes *B. japonicum*) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

#### (2) 共生状態における遺伝子発現解析

野生株と blr7984 遺伝子破壊株をダイズに感染させた後 3, 5, 9 週目の根粒を採取し、そこからバクテロイドを単離した。バクテロイドから RNA を抽出し、9 週目について (1) と同様にマイクロアレイ解析を行った。発現上昇した遺伝子については、3, 5, 9 週目についてリアルタイム PCR 法によって発現量を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 単生増殖期における遺伝子発現解析

図 1 に示すように、24-48 時間までは破壊株の方が明らかに増殖が速く、この時間における 1 時間あたりの分裂世代あたりの分裂時間は野生株の 3.6 倍だった。そこで菌体採取

時間を 36 時間目とし、マイクロアレイ解析に供した。

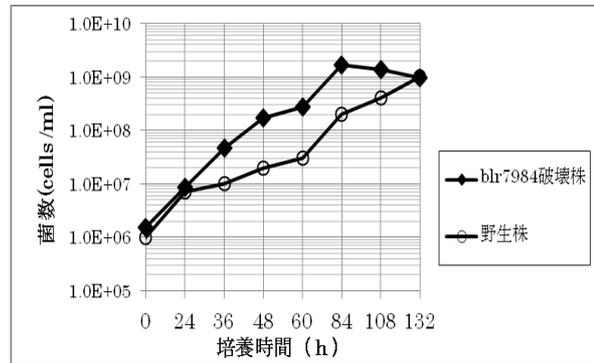


図 1. 単生根粒菌の増殖速度

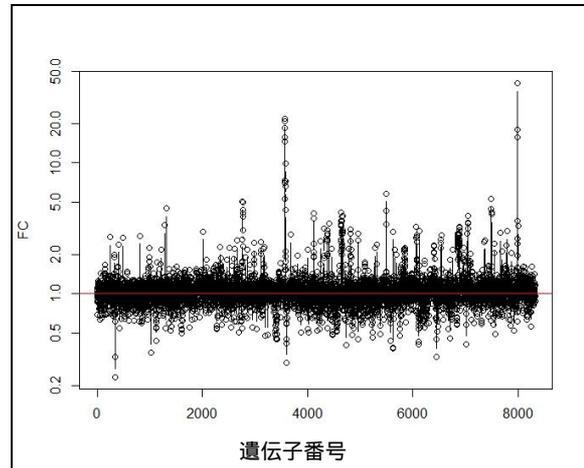


図 2. blr7984 破壊株 (単生状態) の cDNA マイクロアレイ解析の結果。FC ( ) が野生株に対する blr7984 破壊株の発現比を表す

図 2 に示すように野生株と比較して blr7984 遺伝子破壊株において最も発現が上昇していたのは、破壊した遺伝子の近傍にある blI7983、blI7982、blI7981 でありそれぞれ 40.7 倍、15.8 倍、18.0 倍上昇していた。破壊した blr7984 から離れた領域に存在する遺伝子群については、cbb3-type oxidase など嫌気呼吸に関与する酵素をコードする blr2762-2769 が 2.3-5 倍に、ABC transporter binding protein などの、糖の細胞外への輸送に関与するタンパク質をコードする遺伝子 blr3566-3571 が 4.4 - 9.9 倍に、また細胞内へ糖の取り込み経路の一つである PTS system に関与するタンパク質をコードする blr3572 - 3577 が 7.4 - 21.7 倍に上昇していた。その他にも、鞭毛形成に関与する flagellar motor switch protein をコードする blI6879 や、いくつかの機能未知の遺伝子も含めて、40 の遺伝子が 3 倍以上に発現上昇していた。

#### (2) 共生状態における遺伝子発現解析

図 3 に示すように、破壊株由来の根粒では 3 週目の植物体あたりの成熟根粒重および数の低下および、5 週目の成熟根粒数の増加が

観察された。ただし接種したダイズ植物体におけるバイオマスや窒素固定活性には影響はなかった。

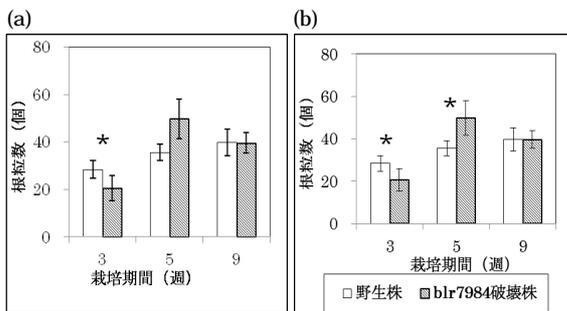


図3. 野生株及びblr7984破壊株を接種してきた根粒の成長解析。白いバーが野生株由来、グレーのバーが破壊株由来の根粒。(a) 植物体当たりの根粒重、(b) 植物体当たりの成熟根粒数。\*はt-test (P<0.05, n=5)で有意差があることを示す。

(1)の結果から単生状態におけるマイクロアレイ解析では、グルタチオントランスフェラーゼをコードする bII7983 遺伝子が最も発現上昇しており、グルタチオンに老化防止効果があることから、栽培後期である9週目の根粒から単離したバクテロイドについて、マイクロアレイ解析を行った。blr7984破壊株由来のバクテロイドでは、野生株由来と比較して3倍以上発現上昇していたのは破壊した遺伝子近傍の bII7981、7982、7983 のみであり、発現比はそれぞれ、12.8倍、4.9倍、121.4倍であった。bII7981、7982、7983 について3、5、9週目の発現をリアルタイムPCR法で解析したところ、どの週においても破壊株において強く発現しており、特に5週目での発現が高いことが分かった(図4)。

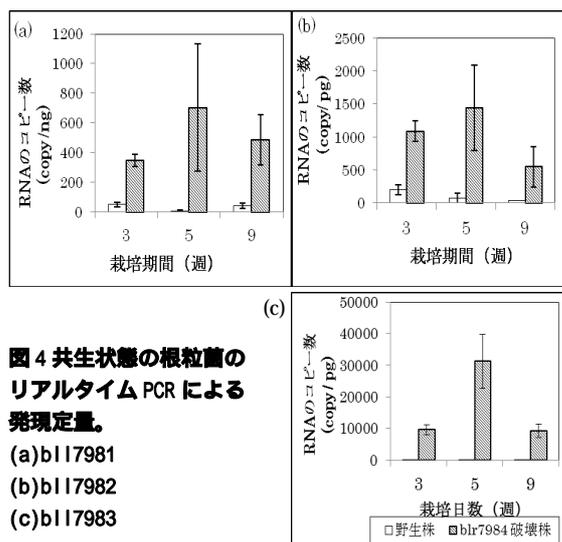


図4 共生状態の根粒菌のリアルタイムPCRによる発現定量。

- (a) bII7981
- (b) bII7982
- (c) bII7983

#### (4) bII7983 過剰発現株の作成

マイクロアレイの結果において、破壊した遺伝子に隣接する bII7983 の発現が大きく上昇していたことから、この遺伝子が細胞増殖促進をはじめとした破壊株の表現型を引き

起こした原因である可能性が考えられた。これを検証するために、bII7983 遺伝子の過剰発現株の作成に着手した。既存の、BjGroESL4 プロモーターの下流に DsRED の遺伝子をつないだプラスミドから DsRED を切り取り、そこに bII7983 の翻訳領域を組み込んでいる。今後このプラスミドを、ダイズ根粒菌野生株に形質転換し、blr7984 同様の表現型が観察できるかどうか、解析してゆく。

#### (5) 考察

共生状態の遺伝子発現解析から、転写抑制因子 blr7984 のターゲットは近接の bII7981-3 の3遺伝子であることが分かった。中でもグルタチオントランスフェラーゼ(GST)をコードする bII7983 は最も強く制御を受けていた。GST は酸化物や生物異物をグルタチオンに結合させる反応を司る酵素であり、これらはグルタチオン抱合体となることによって解毒されたり、さらに液胞内に隔離されることが報告されている。GST は、また、グルタチンペルオキシダーゼ活性も持ち、酸化物を還元して解毒することができ、老化の防止にも関与する。本研究では、blr7984破壊株では栽培5週目の根粒数が野生株より有意に多かったが、窒素固定活性は3週目が最も高く、5週目、9週目は低下した。このことより、栽培5週目においては、既に根粒の老化し脱落し始めていたが、破壊株では bII7983 の発現が大きく上昇していたために根粒の脱落が抑えられた可能性がある。

単生状態においては、bII7981-3 以外にも多くの遺伝子の発現が上昇していた。それらは呼吸によるエネルギー生産や糖輸送、鞭毛形成などを司る遺伝子であった。これらは、単生状態において blr7984 の制御を受けている可能性、あるいは直接制御を受けずに blr7984 のターゲットである bII7981、7982、7983 の発現が上昇することにより細胞増殖速度が速まった結果、その増殖速度を維持するために2次的に誘導された可能性の両方が考えられる。この事については今後、作成中の bII7983 の過剰発現株においても細胞増殖が促進され、これらの遺伝子発現が上昇するかどうかを調べることにより、明らかにして行く。

#### 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 4 件)

- 1) Naoko Ohtsu, Haruna Honma, Toshinori Kozaki, Kazuo Ishii, Maki Nagata, Akihiro Suzuki, Tadashi Yokoyama: Transcriptomic analysis of mechanisms causing high growth speed and sustained high nitrogen fixation activity in the blr7984 gene knockout mutant

of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110.  
18th International Congress on Nitrogen  
Fixation, 2013 年 10 月 16 日、宮崎

- 2) 本間春菜・大津直子・横山正・永田真紀・鈴木章弘、ダイズ根粒菌 USDA110 株の blr7984 遺伝子破壊株におけるグルタチオン濃度上昇と、細胞増殖促進及び窒素固定活性長期維持との関係、植物微生物研究交流会、2013 年 9 月 8 日、愛知
- 3) 本間春菜・大津直子・古崎利紀・石井一夫・横山正、ダイズ根粒菌 *B.japonicum* USDA110 株由来の blr7984 遺伝子破壊株の形質調査および遺伝子発現解析、日本土壤微生物学会、2013 年 6 月 20 日、東京
- 4) 大津直子・本間春菜・平岡恭奈・佐野義憲・中込マリコ・市田紗智子・横山正、ダイズ根粒菌 USDA110 株の blr7984 遺伝子破壊株におけるグルタチオン濃度上昇と細胞増殖促進及び窒素固定活性長期維持との関係、植物微生物研究交流会、神戸、2012 年 9 月 25 日

〔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

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/32/0003141/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大津 直子 (OHTSU, Naoko)

東京農工大学大学院 農学研究院・講師

研究者番号：40513437

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

横山 正 (YOKOYAMA, Tadashi)

東京農工大学大学院 農学研究院・教授

研究者番号：70313286