

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450081

研究課題名(和文) セスバニア根粒菌の宿主殺傷機構の解明：R-bodyの発現と機能

研究課題名(英文) Host killing mechanism of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Azorhizobium caulinodansは熱帯マメ科植物セスバニアの根粒菌である。本菌は共生菌でありながらR-bodyと呼ばれる宿主殺傷因子の合成に関与するreb遺伝子群を持ち、宿主細胞内での共生時にはこれらの発現を抑制させている。本研究により、このreb遺伝子群の発現は、本菌の至適生育温度(約37°C)よりも低温、および、2-オキソグルタル酸濃度が高い(数mM以上)環境条件下において高く誘導されることが判明した。また、宿主細胞内でR-bodyが合成されると宿主の核が崩壊することも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Azorhizobium caulinodans is a microsymbiont of a tropical legume Sesbania rostrata. This bacterium possesses reb gene that are related to production of R-bodies, which are host-killing factors. The expression of reb genes is usually repressed in the bacterial cells inhabiting the plant host cells. In this study, we found that the expression of the reb genes was controlled by at least two environmental factors, 2-oxoglutarate and temperature. When A. caulinodans was supplied with high amount of 2-oxoglutarate (more than several mM) at lower temperatures than optimum growth temperatures (about 37°C), high expression of the reb genes was induced. Furthermore, we found that the nuclei of host plant cells were collapsed when A. caulinodans cells produced R-bodies in the host plant cells.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：根粒菌 共生 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

*Azorhizobium caulinodans* は、マメ科植物セスバニアと共生する根粒菌であり、窒素固定器官である根粒および茎粒をセスバニアに形成させる。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。つまり、その感染様式には“植物病原菌的側面”がうかがえる。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“単生窒素固定細菌”でもあり、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と考えられる。この大課題に挑戦するため、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茎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。

さらに我々は、本菌の持つ病原菌的側面としての新たな知見を見いだした。本菌のゲノム上には *reb* 遺伝子群と呼ばれる遺伝子群と機能未知遺伝子群から構成される遺伝子クラスター (*reb* locus) が存在する。*reb* 遺伝子群は元来、ゾウリムシの絶対内生菌 *Caedibacter* で発見され、*Caedibacter* の宿主殺傷能を担う R-body と呼ばれるコイル状構造物をコードすることで知られている。我々は、*A. caulinodans* においては PraR と

命名した転写因子および Lon プロテアーゼがそれぞれ *reb* オペロンの発現抑制に關与していること、そして、*reb* 遺伝子群の発現抑制が宿主細胞内への感染後の細胞内共生には必須であり、*reb* 遺伝子群が高発現すると宿主細胞を攻撃し、共生のパワーバランスが完全に崩壊してしまうことを明らかにした。

## 2. 研究の目的

### (1) *reb* 遺伝子群の発現制御機構の解明

PraR および Lon による *reb* 遺伝子群の発現抑制は、*reb* 遺伝子群の発現制御機構の一端に過ぎない。Lon は様々な転写調節因子の分解に働くが、PraR を直接標的にはしない。また、エンドウ根粒菌では PraR に CinS が結合すると転写抑制因子として機能しなくなる。これらのことから *reb* 遺伝子群の発現制御機構は想像以上に複雑であると考えられ、その全容解明を目指すこととした。

### (2) R-body と未知なる毒素による宿主殺傷機構の解明

*reb* 遺伝子群にコードされる R-body が如何に宿主殺傷へ關与しているのかはゾウリムシ内生菌でも判明していない。また、R-body そのものが、*A. caulinodans* では依然として観察されていない。そこで、本研究では宿主を殺傷する「毒素」の正体を突き止めることとした。

## 3. 研究の方法

(1) *reb* locus の遺伝子群がオペロンを形成しているのかを決定し、プロモーター領域内の転写因子結合配列を推測する。*reb* プロモーターへの PraR の結合活性を解析する。*reb* プロモーター-*lacZ* 融合株群を用い、*reb* オペロンの発現に影響を及ぼす環境因子を探索する。環境因子による発現制御機構の分子機構を明らかにする。

(2) 透過型電子顕微鏡により R-body の

微細構造を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) まず、*reb* 遺伝子群がオペロンを形成していることを確認し、*reb* オペロンと命名した。また、*reb* オペロンの転写開始点も決定し、*reb* オペロンの転写単位を確定させた。かつて、転写因子 PraR が *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与することが判明していたが、本研究では、PraR が実際に *reb* オペロンのプロモーター領域に結合することを見出し、PraR 結合配列も決定した。また、*reb* オペロンの最下流に位置する遺伝子にコードされる転写因子 RebR が *reb* オペロンのプロモーター領域に直接結合し、*reb* オペロン自体の発現を促進することも明らかにし、その結合配列も決定した。

次に、*reb* オペロンの発現制御機構の全容解明に向けて、これらの転写因子がどのような環境状態の時に転写因子として機能するのかを解析した。*reb* オペロン-*lacZ* 転写融合株を作成し、ベータガラクトシダーゼ活性を指標に *reb* オペロンの発現を制御する環境要因を探索したところ、至適生育温度（約 37 °C）よりも低温、かつ、2 オキシグルタル酸（2OG）が高い環境条件下（数 mM 以上）において *reb* オペロンの高発現が誘導されることが判明した。*praR*/*rebR* 破壊株群を用いて発現解析を行ったところ、「PraR による *reb* オペロンの転写抑制は RebR による転写促進よりも優勢的である」こと、「RebR による *reb* オペロンの転写促進は低温で誘導され、温度による転写調節には PraR は関与しない」こと、「PraR による *reb* オペロンの転写抑制は 2OG 存在下で解除され、かつその解除には RebR が必要である」ことが判明した。温度がどのように発現制御に関わっているのかは依然不明ではあるが、2OG は *reb* プロモーターに対する PraR の結合を阻害するということは判明した。

(2) *reb* オペロンには 4 つの *reb* 遺伝子群と 3 つの機能未知遺伝子群および *rebR* 遺伝子が含まれている。これらの各遺伝子群の破壊株群を作製し、透過型電子顕微鏡（TEM）観察を行ったところ、一部の *reb* 遺伝子群が R-body 合成に必須であることが確認されると共に、3 つの機能未知遺伝子群のうち 1 つは R-body 合成に必須であることが判明した。また、詳細な TEM 観察により、宿主の核が R-body のような形状に引きちぎられて崩壊している様子が観察されたため、R-body 自体が宿主の核を攻撃する毒素ではないかという仮説を立ち上げるに至った。

近年のゲノム解析技術の進展により、多くの細菌群が *reb* 遺伝子群を保持することが明らかになった。興味深いことに *reb* 遺伝子群を持つ細菌群のほとんどは動植物の病原細菌である。これらの細菌群において R-body がそのような役割を担っているのかは不明である。本研究では、これらの細菌群に先駆けて *reb* 遺伝子群の発現制御機構を明らかにした。また、ゾウリムシ内生菌以外で初めて R-body に宿主殺傷能があることを明らかにし、R-body の毒性は普遍的である可能性を示唆した。

#### 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)

Sato S, Siarot L, Matsuoka J, Aono T, Oyaizu H (2016) An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 mutant with deletion of a gene encoding a TIGR02302 family protein overproduces exopolysaccharides and is defective in infection into plant host cells. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62 (4): 392-398. (査読有り)

Wakao S, Siarot L, Aono T, Oyaizu H (2015) Effects of alteration in LPS structure in *Azorhizobium caulinodans* on the nodule development. *Journal of General and Applied Microbiology*, 61 (6): 248-254. (査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

松岡淳一、青野俊裕「セสบニア根粒菌の宿主殺傷能に関わる *reb* オペロンの新たな発現制御因子」日本土壌肥料学会 2016 年度大会、2016 年 9 月 20-22 日、佐賀大学(佐賀県佐賀市)

青野俊裕、石綱史子、松岡淳一「セสบニア根粒菌における *reb* オペロン発現および R-body 合成の温度による調節」日本土壌肥料学会 2016 年度大会、2016 年 9 月 20-22 日、佐賀大学(佐賀県)

松岡淳一、青野俊裕「セสบニア根粒菌の宿主殺傷能に関わる *reb* オペロンの発現は温度と炭素源により制御されている」日本土壌肥料学会 2015 年度大会、2015 年 9 月 9-11 日、京都大学(京都府京都市)

青野俊裕、石綱史子、松岡淳一「セสบニア根粒菌における *reb* オペロンを構成する各遺伝子の R-body 生産に対する寄与」日本土壌肥料学会 2015 年度大会、2015 年 9 月 9-11 日、京都大学(京都府京都市)

松岡淳一、青野俊裕「セสบニア根粒菌における *reb* オペロンの発現に影響を及ぼす環境要因の検討」日本土壌肥料学会 2014 年度大会、2014 年 9 月 9-11 日、東京農工大学(東京都府中市)

青野俊裕、遠藤史康、石綱史子、松岡淳一「セสบニア根粒菌における *reb* オペロンの

発現制御機構--- *reb* オペロンの発現を制御するリプレッサーとアクティベーター---」日本土壌肥料学会 2014 年度大会、2014 年 9 月 9-11 日、東京農工大学(東京都府中市)

## 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