

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870604

研究課題名(和文)芳香族アミノ酸「ドーパ」を介した植物-微生物の根圏共栄メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of plant-microbe interaction mediated by aromatic amino acid L-DOPA

研究代表者

小柳 喬 (KOYANAGI, Takashi)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：20535041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：芳香族アミノ酸「ドーパ」は植物根圏において異種間生長抑制作用をもたらすアレロケミカルであり、本研究ではドーパの濃度調節を介して植物(宿主)とコミュニケーションする細菌として *Pseudomonas putida* に着目した。本菌種はドーパをドーパミンに変換する「芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)」を有し、本酵素活性によりドーパがもたらすアレロパシーを軽減できる。研究の結果、ドーパ存在下において本菌がAADCの転写活性を選択的に誘導していることをDNAマイクロアレイにより確認し、本転写誘導に関与する機能未知ORFを得ることに成功した。本結果は、AADCを介した共生モデルの詳細に迫るものである。

研究成果の概要(英文)：Aromatic amino acid L-DOPA acts as an allelochemical in rhizosphere to cause the growth inhibition of other organisms. In this study, we investigated the role of a rhizospheric bacterium *Pseudomonas putida* for plant-microbe interaction via control of the concentration of L-DOPA. *P. putida* harbors aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) which specifically catalyzes the reaction converting L-DOPA into dopamine, through this reaction the allelopathy of L-DOPA is reduced. DNA microarray analysis revealed that only the expression of the AADC structural gene was drastically induced in the presence of L-DOPA, indicating the specific role of this bacterium through responding to L-DOPA. In addition, we obtained the candidate ORFs with unknown functions possibly encoding the specific factors regulating the AADC induction. Based on these results, we could expand the grasp of AADC-mediated symbiosis between *P. putida* and plant.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Pseudomonas* 属 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 ドーパ脱炭酸酵素 ビタミンB6酵素 アレロケミカル
アレロパシー 根圏細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な生長・増殖制御作用をもつ「アレロケミカル」

農作物をはじめ植物は、様々な病原微生物の攻撃に常にさらされているため、それに対抗する手段として、多くの生体防御機構を備えている。その中の一つに、「アレロパシー」がある。「アレロパシー」は、他の植物や微生物の生長もしくは増殖を抑制・促進する化学物質「アレロケミカル(他感物質)」を放出し自己の周辺環境を整える現象であり、特に、根の周囲の土壌部分(根圏)において微生物を誘引あるいは排斥するために多くのアレロケミカルが根から放出されている。それらには安息香酸やクマリンといった芳香族化合物が多数含まれている。

(2) 根圏における重要なアレロケミカル～芳香族アミノ酸「ドーパ」

例として、マメ科の植物ムクナ (*Mucuna pruriens*) においては、細胞内において高濃度の L-ドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン、以下「ドーパ」) が合成・分泌されて雑草や微生物の生育を抑える効果を持つことが知られている。ムクナ体内のドーパ濃度は 1%前後、特に種子では 6~9%に達し(引用文献)、昆虫による種子の摂食等も防いでいる。ドーパはチロシンの水酸化により植物体内で合成され、通常はその後「芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)」によってドーパミンへと変換されるが、ムクナにおいては AADC による変換を経ずに蓄積あるいは細胞外へ排出されると考えられる。また、ムクナだけでなく同じマメ科のナタマメ (*Canavalia gladiata*) 等にも、種子を中心に高濃度のドーパが存在することが知られている。

2. 研究の目的

(1) 根圏細菌 *Pseudomonas putida* の AADC は高いドーパ脱炭酸能を持つ

AADC は高等生物においては、動物における神経伝達物質・ホルモン(ドーパミン、セロトニン、アドレナリン、ノルアドレナリン)の合成、植物においてはアルカロイド等の二次代謝産物の合成など、極めて重要な生理的意義が知られている。著者はこれまでに、根圏微生物の一種である *Pseudomonas putida* から該酵素遺伝子を取得し、大腸菌組換え酵素を得て詳細な機能を報告した(引用文献)。本酵素はこれまでに知られる AADC と異なり、ドーパに対してのみ極めて高い特異性を持つ類を見ない酵素であることを明らかにした(k_{cat}/K_m において、他の基質となる芳香族アミノ酸群の 100 倍以上)。これは、これまでに「ドーパ脱炭酸酵素」と呼ばれてきた哺乳類の AADC よりも 20 倍以上ド

ーパへの特異性が高いことを示しており、さらに研究の過程において、本酵素遺伝子の発現がドーパ存在下のみにおいて 20 倍以上活性化されることも明らかとした。これまで細菌においてドーパにより転写が劇的に促進されたという報告が皆無であることから、*P. putida* に新規なドーパ代謝プロセスが存在していることが強く示唆された。

(2) *P. putida* AADC の性状から予想される植物-微生物間相互作用

本研究では、*P. putida* が植物の根部分の周囲の土壌、すなわち根圏に存在する微生物であること、植物の根からアレロケミカルとしてドーパが分泌されること、以上の二つの事実から AADC の働きが植物との相互作用にあると考えた。AADC 反応生成物であるドーパミンは、ドーパに比べ生育阻害効果は低い。すなわち、AADC を保持する *P. putida* のような細菌はドーパによるアレロパシーを打破し、根圏に繁殖し続けるために有利となる。本研究課題では、*P. putida* AADC の存在意義を根圏における「生存競争」にあると考え、その機構の一端の解明を目指し研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) ドーパ存在下における *P. putida* の遺伝子発現変化の網羅的解析

P. putida KT2440 株を 1 mM ドーパ存在下および非存在下において培養し、トータル RNA を抽出、逆転写による cDNA 化ののちにカスタム DNA チップを作成して DNA マイクロアレイ(タカラバイオ・ドラゴンジェノミクスセンター)に供した。アレイ用サンプル調製に際しては、Cy3 ラベルによる 1 色法を用いた。

(2) AADC 欠損株取得コンストラクトの作製

AADC の機能を詳らかにするために、*P. putida* において AADC 欠損株の構築を遂行した。スクロース存在下において生育障害を受けるカウンターセレクトションマーカーとして *sacB* 遺伝子を擁するプラスミドに *P. putida* KT2440 株由来 AADC 構造遺伝子の一部欠失断片(ORF 中央部位を欠損した約 1 kb の断片)を挿入し、本プラスミドの *P. putida* KT2440 株ゲノムへのインテグレーションを行った。遺伝子導入にはエレクトロポレーションを用いた。

(3) AADC のドーパ誘導を担う転写活性化因子の探索

ドーパ存在下における AADC の転写活性化機構を明確にするため、*P. putida* KT2440 株についてプラスミドを用いたゲノムライブラリーを構築し、*P. putida* AADC 遺伝子のプロモーター下流に大腸菌由来 *lacZ* 遺

伝子を連結したレポーター遺伝子を有する大腸菌株にライブラリの導入を行った。形質転換体を X-gal 含有 LB 寒天培地に生育させ、コロニーの青変より転写活性化因子をコードするゲノム由来断片の選抜取得を試みた。

4. 研究成果

(1) *P. putida* KT2440 株はドーパ存在下において AADC の転写を選択的に向上させる

DNA マイクロアレイ解析により、1 mM ドーパ存在下における *P. putida* KT2440 株の遺伝子転写量は AADC 構造遺伝子 (locus tag: PP_2552) において 50 倍程度に上昇し、全遺伝子中最も高い発現上昇レベルであることが明らかになった。本結果は、ドーパによるアレロパシーを軽減し根圏環境の調整を担うという *P. putida* における AADC の生理的意義に関する本研究の予測と合致するものであった。また、NAD(P)H 脱水素酵素および azoreductase の発現についても 10 倍超の発現上昇がみられ、双方とも NAD(P)H の酸化還元に関わる酵素であることから、何らかの電子受容体を介した酸化還元反応が細胞内において亢進していることも示唆された。また、AADC 構造遺伝子は隣接する ORF との位置関係から上流遺伝子とのオペロンを形成していると予測していたが、DNA マイクロアレイでは AADC 構造遺伝子のみ転写量が大幅に向上しており、単独の転写単位として機能していることが示された。さらに、Total RNA を cDNA 化し PCR によって転写単位を確認したところ、ゲノム DNA から増幅した上流遺伝子に跨る DNA 断片が cDNA からは増幅しなかったことから、このことが裏付けられた (図 1)。上記結果より、ドーパ存在下において *P. putida* は AADC の発現を選択的に向上させ、何らかの環境応答を行っている可能性がより深まった。

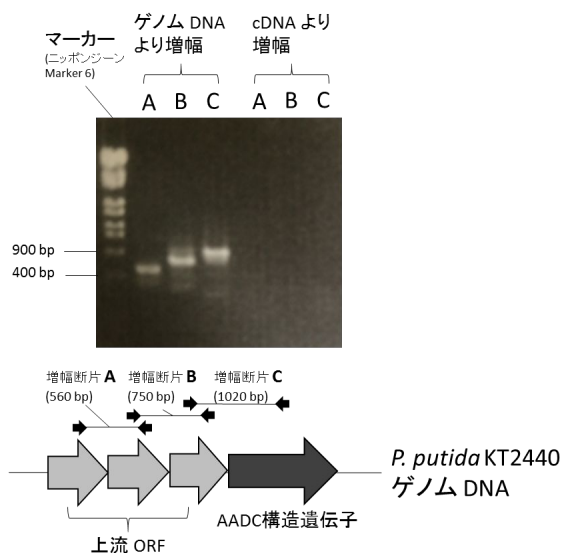


図 1 *P. putida* AADC 構造遺伝子の転写単位の解析

そこで、AADC の生理的意義をより詳しくするために、遺伝子欠損力セットを *P. putida* KT2440 株に導入して欠損株の作製を試みた。カナマイシン耐性によるコロニー選抜により形質転換体を既に得ており、本課題期間終了時点で導入されたプラスミドを *sacB* の自殺機能により除去しているところである。

(2) AADC のドーパ誘導機構の解明

AADC 構造遺伝子上流域にはプロモーター様配列が存在しないにも関わらず本遺伝子のみがドーパ存在下において転写亢進することから、独自の未知転写調節因子が発現調節を担っている可能性が示唆された。そこで、AADC 構造遺伝子の転写調節領域が存在すると思われる上流数百ベースペアの領域を大腸菌由来 *lacZ* 遺伝子と連結したレポーター遺伝子を作製し、プラスミド上に導入して大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。本プラスミドと同一細胞内で共存可能な別個のプラスミドを用いて *P. putida* KT2440 株由来ゲノム DNA ライブラリー (挿入断片長 3~7 kbp) を構築し、同株に導入を行った。形質転換後のコロニーを X-gal 含有 LB 寒天培地に生育させ、 β -ガラクトシダーゼ活性発現に伴うコロニーの青変を観察し、複数のポジティブ株を得た (図 2)。本株群に導入されていたプラスミド上にコードされる ORF はいずれも機能未知の遺伝子であったことから、現在新規転写因子候補として解析を進めている。

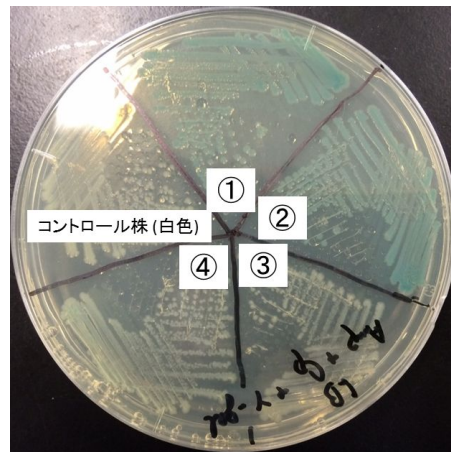


図 2 スクリーニングにより取得された青変のみられた形質転換体 (および)

<引用文献>

Golisz A, Sugano M, Hiradate S, Fujii Y. 2011. Microarray analysis of *Arabidopsis* plants in response to allelochemical L-DOPA. *Planta*, 2011. 233:231-240

Koyanagi T, Nakagawa A, Sakurama H, Yamamoto K, Sakurai N, Takagi Y, Minami H,

Katayama T, Kumagai H. 2012. Eukaryotic-type aromatic amino acid decarboxylase from the root colonizer *Pseudomonas putida* is highly specific for 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine, an allelochemical in the rhizosphere. *Microbiology*, 2012. 158:2965-74.

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 3 件)

中川明, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 河野徳昭, 吉松嘉代, 山本憲二, 熊谷英彦, 佐藤文彦, 南博道. 2015. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 査読有, 第 7 巻, 10390. DOI: 10.1038/ncomms10390

中川明, 松崎千秋, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 山本憲二, 佐藤文彦, 熊谷英彦, 南博道. 2014. (R,S)-Tetrahydropapaveroline production by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 査読有, 第 4 巻, 6695. DOI:10.1038/srep06695

金柱成, 中川明, 山崎裕也, 松村栄太郎, 小柳喬, 南博道, 片山高嶺, 佐藤文彦, 熊谷英彦. 2013. Improvement of reticuline productivity from dopamine by using engineered *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 第 77 巻, 2166-2168. DOI:10.1271/bbb.130552

[学会発表](計 6 件)

中川明, 松村栄太郎, 片山高嶺, 小柳喬, 山本憲二, 熊谷英彦, 佐藤文彦, 南博道, 大腸菌を用いたモルヒネの発酵生産、日本農芸化学会大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)。

中川明, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 山本憲二, 佐藤文彦, 南博道, 大腸菌を用いた単純な炭素源からのモルヒネ発酵生産系の構築、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、2015年12月2日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)。

中川明, 杉本実菜世, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 山本憲二, 佐藤文彦, 南博道, 大腸菌を利用した医薬中間体候補化合物であるメチル化ノルラウダノソリンコレクションの作製、日本農芸化学会大会、2015年3月28日、岡山大学(岡山県・岡山市)。

中川明, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 山本憲二, 熊谷英彦, 佐藤文彦, 南博道, モルヒネの生成中間体であるサルタリジンの微生物生産、日本農芸化学会大会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)。

小柳喬, 中川明, 桜間晴子, 山本恵子, 桜井直文, 高木幸信, 南博道, 片山高嶺, 熊谷英彦, バクテリアのドーパ脱炭酸酵素～根圏細菌 *Pseudomonas putida* における役割を探る、植物感染生理談話会、2013年8月19日、粟津温泉法師(石川県・小松市)。

中川明, 松村栄太郎, 小柳喬, 片山高嶺, 佐藤文彦, 南博道, テパインの発酵生産に向けたサルタリジンの微生物発酵、第6回北陸合同バイオシンポジウム、2013年11月17日、国民宿舎能登小牧台(石川県・七尾市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 喬 (KOYANAGI, Takashi)
石川県立大学・食品科学科・准教授
研究者番号: 20535041