

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580077

研究課題名（和文） 根粒菌ペリプラズムに局在する環状グルカンの酸性置換基が共生成立に果たす役割

研究課題名（英文） Studies on the symbiotic function of anionic substituents of periplasmic cyclic glucans in rhizobia

研究代表者

三井 久幸 (MITSUI HISAYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：40261466

研究成果の概要：ミヤコグサ根粒菌から新規に分離した共生窒素固定能欠損変異株の解析により、機能未知遺伝子 *cep* は宿主植物の根への侵入に必須の役割を有することが判明した。更に、*cep* 遺伝子はペリプラズムグルカンに量的影響を与えることを示した。その構造は、NMR・MS 各分析から、cyclic beta-1,2-D-glucan 骨格を有し、置換基として phosphoglycerol と succinyl を含むことを決定した。この置換基の転移酵素遺伝子を同定し、共生成立に果たす役割を試験した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：共生、根粒菌、窒素固定

1. 研究開始当初の背景

プロテオバクテリアグループ (α 、 β 、 γ) の細菌は、そのペリプラズム中に特徴的なグルカンを保持する。細菌種によって、そのサイズ (グルコース残基数)・構造 (α 結合・ β 結合、直鎖状・環状、分枝の有無等) は様々であるが、他方、多くの場合酸性置換基 (phosphoglycerol、succinyl 等) を含むことや、外界の浸透圧低下に伴って増加すること等々の共通性も見られ、グラム陰性細菌の細胞を包む主要要素の一つとみなされる。*Agrobacterium tumefaciens* や

Sinorhizobium meliloti (アルファルファ根粒菌) で、このグルカンの生合成欠損が低浸透圧への適応阻害を引き起こすこと等から、グルカンの主要な役割とは、その置換基の陰電荷が外膜内外のドナン平衡に寄与することであるとの議論がなされてきた。しかし、*E. coli* を含む他の細菌では、グルカンの生合成欠損が必ずしも同様の低浸透圧感受性を示さないことや、酸性置換基を含まない中性グルカンのみを有する細菌種が少なからず存在することなどから、グルカンの酸性置換基の主要な役割は依然不明瞭であった。他

方、種々の植物・動物病原細菌 (*A. tumefaciens*、*Pseudomonas syringae*、*Salmonella typhimurium*、*Brucella abortus* 等々) や共生細菌 (根粒菌: *S. meliloti*、*Bradyrhizobium japonicum* 等々) において、グルカンの生合成欠損が病原性や共生能の低下・阻害を引き起こすことが報告されている。しかし、このように広く見られる宿主との相互作用に必須な機能が、グルカン分子のどのような性質に由来するのかは不明であった。

プロテオバクテリア α グループのうち根粒菌を含む *Rhizobiaceae* 科の細菌は、環状の β グルカン (β -1, 2, -1, 3, -1, 6 結合等) を保持する。研究の進んでいる *S. meliloti* では、その環状グルカンの存在が共生成立に必須であること、大部分が phosphoglycerol で修飾された酸性グルカンであることが知られていた。更に、グルカン骨格に phosphoglycerol を転移する酵素の遺伝子 *cgmB* の変異株が分離されているが、その株は正常な共生能を示す。この株では、グルカンが phosphoglycerol の代わりに succinyl 残基を含んでおり、その結果グルカンの陰電荷の総量は野生株と同様のレベルである。この研究より、グルカンの置換基の種類は機能上重要でないことが示唆されるが、同時に、置換基の陰電荷は共生に必須であるか否かという問題は解決されずに残された。その解決には、ペリプラズムグルカンは保持するものの酸性置換基は全て消失された変異株が必要であった。

2. 研究の目的

宿主植物との共生成立過程に対して、根粒菌のペリプラズムに局在する環状グルカンの構造特異性、特に酸性置換基の存在がいかなる影響を与えているのかを解明するために、グルカンの構造決定、その生合成に関与する遺伝子群の同定および変異株の表現型を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、*M. loti* の培養、組換え DNA 技術に基づくプラスミド DNA の作製とその *M. loti* への接合伝達、トランスポゾンを用いたランダム挿入変異誘発、宿主植物ミヤコグサへの接種試験および感染過程の観察、環状グルカンの細胞からの抽出、カラムクロマトグラフィーによる精製と定量、 $^1\text{H-NMR}$ ・ $^{13}\text{C-NMR}$ ・MALDI-TOF/MS によるグルカンの分析等の実験を行った。更に、各種 DNA 塩基配列データベースの検索を主とするデータ解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti*

の新規共生必須遺伝子の同定

トランスポゾンを用いたランダム挿入変異誘発により、宿主ミヤコグサとの共生窒素固定能欠損となる新規変異株をミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* から分離した。その変異遺伝子座 (*cep* と命名) は、既知機能のタンパク質とはアミノ酸配列上の類似性を示さない推定ペリプラズムタンパク質をコードしている。この変異株は、ミヤコグサ根において、根粒様の隆起と根毛のカーリングの形成を誘起するが、感染糸の伸長は示さない。この現象は、環状グルカン生合成が欠損した他種根粒菌変異株の表現型と類似している。*cep* 変異株では、ペリプラズムグルカン量が部分的に減少し、また、低浸透圧条件下においては、親株とグルカン欠損変異株との中間的な運動能低下が観察された。*cep* 変異株の共生窒素固定能欠損が抑圧された疑似復帰変異株が分離され、その分析を行ったところ、一部の復帰変異株では共生能に加えてグルカン量が野生株と同程度に回復していることが判明した。以上の結果より、*cep* 遺伝子産物は、ペリプラズム中のグルカン量に影響を与えることを通じて、有効な共生成立に寄与していると考察した。

(2) ミヤコグサ根粒菌のペリプラズムグルカンの構造決定

ミヤコグサ根粒菌のペリプラズムグルカンを分離し、その酸性度に基づいて分画した。NMR 分析によって、このグルカンは cyclic beta-1, 2-glucan の骨格構造を有していることが確認された。更に、グルカンの中性画分には非グルコース性の置換基は存在しないが、酸性画分には phosphoglycerol 基と succinyl 基がそれぞれメジャー・マイナーな置換基として存在していることが判明した。MALDI-TOF 質量分析によると、酸性グルカンは、酸性度の違いに伴って分子当たり 1 個、2 個、ないし 3 個の置換基を有しているものの、グルコース残基数は中性グルカンと同様であり、その数 20~24 のものが大半を占めることが判明した。これらの結果によって、ミヤコグサ根粒菌におけるペリプラズムグルカンの分子構成が、電荷と分子量の観点から明らかとなったと言える。

(3) 環状グルカンの酸性置換基を欠損したミヤコグサ根粒菌の性状解析

以前に他種細菌で報告のあった phosphoglycerol 転移酵素遺伝子と同じ遺伝子座に逆向きに存在する ORF にコードされる推定タンパク質と相同性を示す、ミヤコグサ根粒菌の遺伝子 *cgmA* の変異株を取得し、その表現型を調べた。その結果、この遺伝子は、ミヤコグサ根粒菌において、環状グルカンへの phosphoglycerol 付加に必須であることが

判明した。そこで、succinyl 基転移酵素の相同タンパク質をコードする *opgC* と *cgmA* との二重変異株を作製することにより、環状グルカンから完全に酸性置換基を欠損させることに成功した。この変異株は、野生株と同様の共生窒素固定能および感染効率を示したことから、環状グルカンの酸性置換基は顕著な機能を有さないもの考えられる。が、根粒菌の宿主特異性に及ぼす影響の有無については解析が進んでいないので、この点の解明が今後の課題である。

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2件)

- ① Kawaharada, Y., H. Kiyota, S. Eda, K. Minamisawa, and H. Mitsui. 2008. Structural characterization of neutral and anionic glucans from *Mesorhizobium loti*. *Carbohydr. Res.* 343:2422-2427. (査読あり)
- ② Kawaharada, Y., S. Eda, K. Minamisawa, and H. Mitsui. 2007. A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicas*. *Microbiology* 153:3983-3993. (査読あり)

[学会発表] (計5件)

- ① 川原田泰之、清田洋正、江田志磨、三井久幸、南澤究：根粒菌の環状グルカンに存在する酸性置換基が共生窒素固定に果たす役割。日本農芸化学会 2009 年度大会。2009 年 3 月 29 日。福岡
- ② 川原田泰之、清田洋正、江田志磨、三井久幸、南澤究：ミヤコグサ根粒菌におけるペリプラズムグルカンの構造と共生過程での役割。日本農芸化学会 2008 年度大会。2008 年 3 月 27 日。名古屋
- ③ 川原田泰之、江田志磨、三井久幸、南澤究：ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* における環状グルカンの構造決定とその構造変化が及ぼす共生過程への影響。第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会。2007 年 12 月 12 日。横浜
- ④ 川原田泰之、江田志磨、三井久幸、南澤究：ミヤコグサ根粒菌におけるグルカン修飾基転移酵素遺伝子の同定と共生過程での役割。植物微生物研究会第 17 回研究交流会。2007 年 9 月 21 日。鹿児島
- ⑤ 川原田泰之、江田志磨、三井久幸、南澤究：根粒菌 *Mesorhizobium loti* の環状グルカンの細胞内含有量に影響を与える *cep* 遺伝子は、宿主ミヤコグサへの感染において必須の役割を有する。第 23 回日本微生物生態

学会。2007 年 9 月 15 日。松山

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 久幸 (MITSUI HISAYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：40261466

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし