

令和元年6月20日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07003

研究課題名(和文) 共生菌である根粒菌における3型分泌系の機能発現機構

研究課題名(英文) On the Mechanism of Functional Expression of Rhizobial Type III Secretion System

研究代表者

佐伯 和彦 (Saeki, Kazuhiko)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：40201511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌が宿主細胞へ病原因子を注入する装置と蛋白質毒素として発見された3型分泌系は、共生菌である根粒菌にも存在する。本研究では、分泌装置の基部を除いて植物病原菌の系とさえ低い保存性しか示さない根粒菌3型分泌系の機能発現の解明に取り組んだ。第1に、3型分泌系の転写活性化因子であるTtsIによる発現調節の標的の範囲を解析し、新たな標的を同定した。第2に、レポーター蛋白質との融合により分泌活性および転写誘導の迅速定量法の確立を試みた。第3には、分泌系遺伝子クラスター近傍に存在する遺伝子の分泌活性への必要性を調べた。並行して、人為誘導可能な根粒菌用発現ベクターならびに遺伝子破壊法の改良を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根粒菌の3型分泌系では、分泌装置の主要構成物(内膜リング構成物)においては動植物の病原菌の3型分泌系と類似性を示すものの、動物病原菌の系で知られている分泌シャペロンの相同物は見つかっておらず、分泌機能の発現や制御については知見が限られていた。本研究では、ミヤコグサ根粒菌を用いて3型分泌系の転写活性化因子であるTtsIの標的配列の検出と菌体外分泌活性を総合して、分泌活性に必須ではないもののTtsIにより発現する遺伝子の制御配列を同定した。これらに加えて、根粒菌以外のグラム陰性細菌でも利用可能な新しい発現プラスミド群を構築したことは、関連分野の進展に寄与するものと信ずる。

研究成果の概要(英文)：The Type III Secretion System (T3SS) was found as a toxin-injection system from pathogenic bacteria to mammalian cell. Genes for T3SS are identified not only in animal and plant pathogens but also in symbiotic bacteria such as rhizobia. Here, we have studied Mesorhizobial T3SS, which shows limited homology even to T3SSs in plant pathogens. We have investigated target genes of the T3SS transcriptional activator protein, TtsI, and found a few new binding sites. We also constructed reporter systems to access the secretion activity as well as transcriptional activation and utilized the systems to evaluate the necessity for secretion activity of the relatively small genes that situate around the main T3SS gene cluster. Simultaneously, we constructed new broad-host range vector-sets that are comprised of controllable promoter plasmid and temperature sensitive replication.

研究分野：遺伝生化学

キーワード：菌体外分泌系 転写活性化因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

3型分泌系はグラム陰性の病原細菌が病原因子を宿主の細胞質内に注入する系として1990年代初頭に同定され、病原性に関する新しいパラダイムとなった。当初、この系は病原菌に特有と考えられていたが、1997年に広域宿主根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 の共生プラスミドの配列決定により、共生細菌である根粒菌にも存在することが示された。その後、マメ科のモデル植物ミヤコグサの根粒菌やダイズの根粒菌等のゲノム解析から、多くの根粒菌が3型分泌系を持つことが示された。分子遺伝解析の結果から、根粒菌は3型分泌系を共生窒素固定能力の増大のために使う場合、さらに共生遺伝子を欠損した宿主に根粒を形成して共生を樹立するために使用する場合さえもあることが判明している(文献)。このように、根粒菌の3型分泌系は、真核宿主に傷害を与えることなく、根粒形成と窒素固定を増進する共生促進因子を注入するというに際立った特徴を持つ、反面、宿主から病原因子と見なされ排除される原因ともなる。本研究の開始前も現在も、共生因子の実体と作用機構、制御機構を明らかにすることは基礎科学としてだけでなく、植物生産に関わる応用科学としても重要な課題である。

3型分泌系の構造機能相関と発現制御の研究は、主に動物病原菌を用いて進められ、植物病原菌3型分泌系の研究は限られている。根粒菌のものに関する実証的研究はさらに限られている。いずれの3型分泌系も、細胞内膜・外膜を貫通する分泌装置基部と細胞外に伸びるニードルから成る分泌装置、分泌因子であるエフェクターと分泌を制御するシャペロンなどから構成される。分泌装置基部のサブユニットは、動植物の病原菌と共生菌を問わず保存が認められる。この事実とサブユニットをコードする遺伝子群が集まって存在することから、共生菌の3型分泌系の同定が可能であった(文献)。しかし、分泌装置サブユニット候補であっても保存度が低く機能が未確認なものが存在し、エフェクターや制御因子については相同性からでは同定が困難なため、エフェクターの分泌制御に関わるシャペロンは根粒菌では未知であった。

2. 研究の目的

本研究では、ミヤコグサ根粒菌3型分泌系について、転写から翻訳、分泌輸送に至る機能発現の調節機構の解明するために、特に転写活性化因子による調節対象ならびに分泌輸送に必要な蛋白質因子の同定を目指すとともに、それらを容易にするために根粒菌遺伝子の発現調節や破壊を行うためのツールの開発を目指した。

まず、3型分泌系の転写活性化因子である TtsI の結合配列 *tts*-box を実験的に同定して、新規な3型分泌系遺伝子の発見と *tts*-box コンセンサス配列の精度向上を行うことを目標とした。また、TtsI 制御や分泌活性のレポーターアッセイ系を構築して、未知の3型分泌シグナル配列ならびに分泌制御シャペロンの同定に資することも目標とした。並行して、人為誘導可能な根粒菌用発現ベクターならびに遺伝子破壊に用いるためのベクターセットの改良と開発を行い、本研究自体の進展促進とともに関連分野への貢献を目指した。

3. 研究の方法

(1) プロテオバクテリア用の新規ベクター群の構築：グラム陰性細菌ではあるがプロテオバクテリアに属する根粒菌では、プロテオバクテリアである大腸菌で利用可能な多くのプラスミドベクターが複製されず、人為誘導可能な発現ベクターや除去の容易な温度感受性ベクターなどが利用できないため、ランダムな配列を持つオリゴヌクレオチドの合成や Error-Prone PCR を用いて、それらの解決を図った。

(2) レポーター遺伝子との融合による転写誘導および分泌活性の測定：3型分泌系により細胞外に分泌されることが既知の NopX 等の発現のモニターを行うために、以下の方法を用いた。

転写レポーター遺伝子 (*PnopX-lacZ*) : *nopX* 遺伝子プロモーター *PnopX* の下流に大腸菌 λ -ガラクトシダーゼ遺伝子 *lacZ* を組み込んだ転写レポーターを作製した。

翻訳レポーター融合遺伝子 (*PnopX-nopX- ϕ hoA or -nanoLuc, Pmlr6358-mlr6358- ϕ hoA or -nanoLuc*) : NopX ならびに Mlr6358 のカルボキシル末端 (C 末端) に、大腸菌アルカリ性フォスファターゼ PhoA の成熟部位、または、トゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*) 由来のルシフェラーゼを蛋白質工学的に改良した NanoLuc を融合させるような遺伝子を構築した。なお、PhoA、NanoLuc 蛋白質の C 末端に hexa(His) 配列を付加した。

細胞上清回収とレポーター活性：付加した hexa(His) 配列を利用し、細胞外に分泌されたレポーター遺伝子の産物を培養上清から Ni ゲルにより容易に回収濃縮可能にした。アルカリ性フォスファターゼ活性は *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) の分解を 405nm の光学吸収増大で測定し、NanoLuc 活性は専用の NanoGlo Luciferase Assay 試薬添加による発光を Photon カウントすることで測定した。

細胞上清回収分画と免疫学的手法による分泌活性の評価：3型分泌系を誘導した培養液を遠心により、細胞と細胞上清に分画した。上清は 0.45 μ m フィルターを通して残存する細菌細胞を除去後に限外濾過で濃縮(培養上清濃縮物) 沈殿した細胞は再懸濁後に音波処理で破壊、これを遠心して菌体破碎後上清と菌体破碎後沈殿物に分画した。

3型分泌系により細胞外に分泌されることが既知の NopC に対する特異抗体を用いて、Western ブロット解析により NopC の局在性を評価した。

(3) 3型分泌系転写活性化因子 TtsI の標的配列の解析：3型分泌系の転写活性化因子 TtsI の遺伝子を、上記(1)で作製した、IPTG 誘導可能な可能なプラスミドベクターにクローン化し、植物由来の成分と無関係に3型分泌系の誘導を可能にした。この際、TtsI のC末端に hexa(His)配列を付加した。

CHIP 処理：hexa(His)配列を付加した TtsI を発現させた根粒菌細胞を含む培養液にホルムアルデヒドを添加し DNA と TtsI を架橋、音波処理により菌体を破碎した後、Ni ゲル懸濁液を混和して TtsI-hexa(His)を吸着させた。Ni ゲルを遠心により回収、高濃度イミダゾール添加により TtsI-hexa(His)を解離させたのち、再度の遠心によりゲルを除去した。得られた試料を加熱して架橋を外した後、DNA をスピニングにより回収した。

CHIP-PCR & -Seq：既知の *tts-box* を含む DNA 断片が含まれていることを PCR により確認した後、残余の DNA 試料を配列決定サービスに委託して、配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 3型分泌系転写活性化因子 TtsI の標的配列の同定：まず、*PnopX-lacZ* 系を転写レポーターとし、TtsI を IPTG により転写誘導させる実験を行った。その結果、C末端に hexa(His)配列を付加した TtsI-hexa(His)も非付加物と遜色の無い、*nopX* の転写活性化能を持つことが判明した。(但し、TtsI を過剰に誘導した場合は致死的效果もあることが判った。)そこで、コントロールとして TtsI-hexa(His)遺伝子を含まないベクターのみを保持する細胞を使用して、CHIP 処理を行い、DNA を回収した。

回収された DNA 試料を鋳型として、*nopC* 上流の *tts-box* を含む領域が増幅可能 (CHIP-PCR) であることを確認できたので、CHIP-Seq 解析に進んだ。その結果、ほぼ既知の *tts-box* が検出され、未同定の新規 *tts-box* は殆ど検出されなかった。検出できたもののうち、実際に下流遺伝子が TtsI または、宿主植物由来成分添加による NodD 活性化により転写誘導されることが確認できたのは、*mlr6338* (根粒菌群の3型分泌系で保存が認められ、*rhcC1* あるいは *nolW* とも呼称される：以後、*rhcC1* と記載する) の上流に位置するものだけであった (図1)。

```

CCGTCAGCTTGTCGTAAGCCAACCCGCCTA - 295 bp mlr6316
AGGTCAGAGTCACGTCAGGTGAAGGGGATA - 49 bp mlr6331
CAGTCAGCTTGTCGTCAGCTCGGCCACCTA - 71 bp mlr8763 (nopB)
CCGTCAGCTAATCGTCAGCCAAGCGATCTA - 218 bp mlr6361
TCGTCAGGTTCTCGAAAGCTCCTGCTCGTA - 57 bp mlr8768 (nopC)
TCGTCAGTTTACCGAAAGCTAAACCGCTCA - 100 bp ml16337 (nopX)
GCCTCAGCTCACCGTCAGCTCGTTCGAGTA - 417 bp mlr6358

ycGTCAGyAtttnyCGAwAAGACYApnSSnAcnYA MAFF303099 consensus

CaGgCAAtGaTTTCAtGgGCTAAGCCAATCA - 663 bp mlr6338 (rhcC1/nolW)
CgagCAGCTTTTCGTCAaCCATGGACCGTgc - 942 bp mlr6338 (rhcC1/nolW)

tcGTCAGctt.tcGaaAGct..gcc.c.ta Rhizobium sp. NGR234 consensus
tcGTCAGctT.tcGaaAGct...cc.cctA B. japonicum USDA110 consensus

```

図1 . TtsI の標的配列 *tts-box* として新たに検出された配列
塩基数は当該遺伝子 (locus tag) 開始コドンからの距離を示す

この結果は、多数の *tts-box* がゲノム全体に分散して存在するのではないかと開始した本研究の期待に反するものであった。但し、*rhcC1* 上流に TtsI が結合することを確証できて点で従来からの謎を解くことができた。

すなわち、RhcC1 は *Yersinia* 3型分泌装置基部の外膜リング構成因子である Ysc と低いが相同性を示し(分子全体では10%程度だが、アミノ末端側160残基では約30%の identity、約50%の similarity)、分泌活性に必須であると想定されていた。また、*ttsI* 欠失株や *nodD* 欠失株では、転写誘導が認められなかったにも関わらず、*rhcC1* の上流には既知の *tts-box* と相同性を示す配列が見当たらず、転写誘導機構が謎であった。今回、従来 of *tts-box* コンセンサス配列を拡張する配列が見つかったことで、初めてその解決が成された。

(2) 翻訳レポーター融合遺伝子を用いた迅速定量法の開発の試み：作製したレポーター融合遺伝子を IncP1 ベクターにクローン化し、ミヤコグサ根粒菌野生株ならびに各種の遺伝子破壊株に導入した派生株を作製した。ミヤコグサ種子抽出物を共生関連遺伝子の誘導剤として用いる場合はそのまま、純粋フラボノイドとして naringenin を用いる場合はクローバー根粒菌由来の *nodD* 遺伝子を保持させた IncQ プラスミド pMP2112 (IncP1 プラスミドと共存可能) を導入してから用いた。

いずれも、細胞上清から Ni ゲルにより回収、濃縮したものについて活性を測定した結果、*PnopX-nopX-*phoA** および *Pmlr6358-mlr6358-*phoA** を用いた場合、培養上清からは低い活性回収しか認められなかった。*PhoA* が二量体になって始めて活性を示すことと根粒菌自身のフォスファターゼ活性が妨げていると考えられた。一方、単量体として機能し背景活性の無い *PnopX-nopX-nanoLuc*, *Pmlr6358-mlr6358-nanoLuc* レポーターを用いた場合、ルシフェラーゼ活性

は回収できたものの細胞内と細胞膜中により多量の活性とポリペプチドが残存した。翻訳された NanoLuc 部分の folding が細胞質内で迅速に行われて安定な立体構造を形成して unfold され難く、アミノ末端側の NopX や Mlr6358 部分が 3 型分泌装置へ挿入されない、あるいは挿入されても構造を持たないポリペプチド鎖として分泌装置内部を通過することに問題が生じている、などの可能性があり、レポーター遺伝子構築には更なる改良の余地があると判断された。

(3) 分泌系遺伝子 *rhcC2* の分泌活性への必要性：転写活性化因子 TtsI の遺伝子の下流には、*ttsI* とともに共転写される *mlr6335-mlr8762* が存在する。これらは動物植物の病原菌の 3 型分泌系遺伝子とは同源性を示さないが、根粒菌の 3 型分泌系遺伝子群では保存され (*rhcC2* と *y4xK* の命名有り) 分泌機能に関連することが期待された。そこで、*ttsI* とともにこれらを欠失させた菌株に、欠失部分全体の *ttsI-mlr6335-mlr8762* または、*ttsI-mlr6335* あるいは *ttsI* だけを導入した菌株を用いて、従来法 (NopC の菌体外分泌を細胞上清濃縮物と細胞分画物を用いて Western 解析) で、分泌活性を調べたところ、*ttsI* のみの導入でも、*ttsI-mlr6335-mlr8762* 全体の導入に比べて、60%以上の分泌活性が認められた。これらの遺伝子産物は、3 型分泌に必須ではないものの、効率化またはシャペロンなどの補助機能を持つと考えられた。

(4) プロテオバクテリア用の新規ベクター群：本研究を実施するにあたり、以下の広域宿主ベクター群を作製した。広域宿主プラスミドで温度感受性を持つものはほとんど知られておらず、根粒菌以外の プロテオバクテリアの分子遺伝学研究中に適用可能である点で、関連分野の研究推進に貢献するものと信ずる。

人為誘導可能な発現ベクター群：プロテオバクテリア全般で複製可能な、IncP1 複製起点を持つプラスミドを利用して、プロモーターを持たない GFP および薬剤耐性遺伝子の upstream に、部分的にランダムな配列を持つ短鎖 DNA を配置し、ミヤコグサ根粒菌で異なるレベルの転写活性を有する人工プロモーターを得た。これらのプロモーターのうち 3 種の両端に大腸菌の *lac* オペレーター配列 (*lacO*) を配置し、中程度の転写活性を持つプロモーターで大腸菌の *lacI* を発現させる発現ベクターを構築し、IPTG による誘導を可能にした。温度感受性ベクター：これも プロテオバクテリア全般で複製可能な pBBR1 プラスミドの複製に関わる遺伝子に Error-Prone PCR によりランダム変異を導入、第 1 段階では大腸菌で、第 2 段階では根粒菌を用いてスクリーニングを行い、温度感受性化したプラスミドを得た。

< 引用文献 >

Okazaki S, Kaneko T, Sato S and Saeki K (2013) "Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(42):17131-17136

Saeki K and Ronson CW (2014) "Chapter 5: Genome sequence and gene functions in *Mesorhizobium loti* and relatives" In *The Lotus japonicus Genome* (Eds. Tabata S and Stougaard J) pp.41-57, Springer-Verlag, Berlin, Germany

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Shimoda Y, Hirakawa H, Sato S, Saeki K, Hayashi M (2016) "Whole-Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing Symbiotic Rhizobium *Mesorhizobium loti* Strain TONO" *Genome Announcements* **4**:e01016-16; doi:10.1128/genomeA.01016-16

[学会発表] (計 5 件)

日下部翔平、金子貴一、安田美智子、三輪大樹、岡崎伸、佐伯和彦、佐藤修正 . *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 株の 3 型分泌エフェクターはミヤコグサに複数の防御反応を誘導する . 2018 年 9 月 20 日 (植物微生物研究会・第 28 回研究交流会)

疋田真穂、佐伯和彦 . 宮古島の土壌とミヤコグサから単離された根粒菌多様性調査 . 2018 年 9 月 20 日 (植物微生物研究会・第 28 回研究交流会)

中川知己、佐伯和彦、豊岡公德、佐藤繭子、平川英樹、大澤美英、若崎真由美、福原舞、川東拓司、吉田彩恵、菅沼教生、三井久幸、佐藤修正、川口正代司 . ミヤコグサが土壌微生物叢を操る仕組み . 2018 年 3 月 28 日 (第 59 回日本植物生理学会年会)

大澤美英、窪田和奈、佐伯和彦 . 根粒菌ゲノムのマーカーレス改変のための新規ツールセットの開発とその利用 . 2016 年 3 月 5 日 (第 10 回日本ゲノム微生物学会年会)

下田宜司、西ヶ谷有輝、山谷紘子、丸山洋介、佐伯和彦、佐藤修正、山崎俊正、河内宏、梅原洋佐、林誠 . 宿主変異体の窒素固定活性を規定する根粒菌因子の解析 . 2015 年 9 月 15 日 (植物微生物研究会・第 25 回研究交流会)