

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780231

研究課題名（和文）セสบニア—根粒菌共生系の改良により排水からのリン酸回収を促進させる技術開発

研究課題名（英文）Technological development for promoting phosphate recovery from wastewater by using symbiosis of *Sesbania rostrata* and *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

研究成果の概要（和文）：熱帯マメ科植物セสบニアは根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* と共生し、茎に茎粒という窒素固定器官を形成する。本研究では、本菌が持つ *reb* 遺伝子群の発現が *praR* という遺伝子により抑制されていること、および *reb* 遺伝子群が高発現している *praR* 変異株は共生菌から病原菌へと変化する事が判明した。また、本菌は茎粒内では ATP 非依存型のカリウム吸収系を利用しているが、ATP 依存型への変換も可能であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

*Azorhizobium caulinodans* is a microsymbiont of a tropical legume, *Sesbania rostrata*, and forms nitrogen fixing nodules on the stems. In this study, it was revealed that *praR* gene of *A. caulinodans* was involved in suppression of *reb* genes, and that an *A. caulinodans praR* mutant exhibiting high expression of *reb* genes changed from a symbiont to a pathogen. It was also found that an *A. caulinodans* mutant taking up potassium in ATP-dependent manner formed stem-nodules showing nitrogen fixation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・境界農学

キーワード：資源循環システム

## 1. 研究開始当初の背景

窒素・リン酸・カリウムは作物生産において最も重要な肥料であるが、特に窒素・リン酸に関しては諸問題が生じている。窒素肥料は主に化学固定により生産され、農地生態系

に大量に投与され、世界人口の増加に対する食料供給を支えている。この化学固定は地球上の生態系において最大の窒素固定源となっているが、多大なエネルギーが消費されており、化石燃料の枯渇問題はそのまま窒素肥

料不足問題に直結する。リン酸は土壌に固定されやすいため、施肥リン酸の作物による利用率は数~20%と非常に低く、作物栽培の際には大量のリン肥料が投与されている。リン酸肥料は主にリン鉱石から生産されているが、リン鉱石の枯渇という大きな問題に直面している。一方、農業・工業を含めた産業由来の窒素・リン酸による水圏の汚染も問題となっている。

セスバニアは熱帯水生マメ科植物であり、根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* と共生し、根粒のみならず茎に茎粒と呼ばれる窒素固定器官を形成し、高い窒素固定能を示す。セスバニアの生長は早く、数ヶ月で 2m 以上にも草丈が伸び、多大なバイオマスを生み出し、緑肥として用いられることもある。一般的に窒素固定には大量の ATP が消費されるために、マメ科植物は多量のリン酸を必要とする。特にセスバニアの場合、その生長を支えるための窒素固定能が高い故に、窒素固定茎粒を形成させ ATP 消費を増加させると、根におけるリン酸吸収能が大いに促進され、積極的にリン酸を獲得する。

## 2. 研究の目的

本研究は、セスバニア-*A. caulinodans* の共生系において、「窒素固定期間を長くし」、かつ、「ATP 利用率の最適化」を敢えて「非効率化」することにより、この共生系のリン酸要求量を増大させることを最終目的としている。そのために、茎粒の寿命に関与していることが示唆されていた *A. caulinodans* の *praR* 遺伝子に着目し、この遺伝子の機能解明を行うこととした。また、*A. caulinodans* は少なくとも 3 種類のカリウム吸収系 (ATP 非依存型の Kup と ATP 依存型の Kdp および Trk) を持つことが本菌の全ゲノム配列より推測されていたが、茎粒内ではどの吸収系が主に機能しているかは不明であった。そこで各吸収系の茎粒形成に対する寄与を解析することとした。

## 3. 研究の方法

### (1)

*praR* 遺伝子の機能を解明するために、*A. caulinodans* の *praR* 遺伝子破壊株を作製し、単生および共生状態における表現型を解析した。また、*praR* 遺伝子は転写因子をコードすると推測されるため、マイクロアレイ解析を行うことで、どのような遺伝子群が *praR* の制御下にあるのかを探索した。

### (2)

3 種類のカリウム吸収系のうち、1 つもしくは 2 つの系の遺伝子群を破壊した変異株群を作製し、これらの株による茎粒の表現型を解析した。また、これらの破壊株群における

各系の遺伝子群の発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)

*praR* 遺伝子破壊株の単生状態における表現型は野生型株と同じであった。しかし、共生状態つまり、この破壊株によって形成される茎粒は野生型茎粒とは全く異なり、宿主細胞内に感染後、宿主細胞を萎縮させ、萎縮細胞内で生存することが判明した (図 1)。このように「宿主細胞内感染後に病原菌として振る舞う変異株」はいずれの根粒菌においても報告が無く、極めて希である。

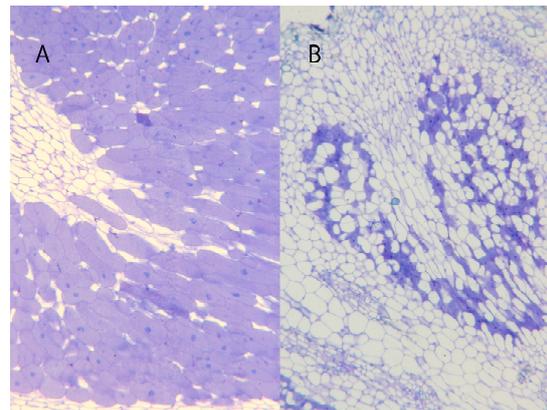


図 1. *praR* 破壊株による宿主細胞の萎縮. (A) 野生型により形成された茎粒の内部 (B) *praR* 破壊株により形成された茎粒の内部.

*praR* 遺伝子は *Alphaproteobacteria* 綱で保存されるが、機能は不明であった。そこで、単生状態の野生型株と *praR* 破壊株から全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、ゾウリムシ内生菌の宿主殺傷能に関与することで知られる R-body と呼ばれるタンパク質をコードする *reb* 遺伝子群が、*praR* 破壊株において高発現していることが判明した。このことから、*praR* 遺伝子は *reb* 遺伝子群の発現抑制に関与すると考えられた。

また、*reb* 遺伝子群が高発現している *praR* 破壊株がセスバニア宿主細胞を萎縮させるのに対して、*reb* 遺伝子群・*praR* 遺伝子の二重破壊株は宿主細胞を萎縮させないことが判明し (図 3)、*A. caulinodans* の *reb* 遺伝子群もゾウリムシ内生菌と同様に宿主殺傷能に関与していることが示唆された。

これまで *reb* 遺伝子群はゾウリムシ内生菌のみでしか着目されていない存在であったが、昨今のゲノム解析により *reb* 遺伝子群を保有する細菌の多くは動植物病原菌であることが分かってきており、その存在意義が議論されるようになってきた。本研究の成果は、*reb* 遺伝子群の機能の普遍性を提唱する初めての内容である。

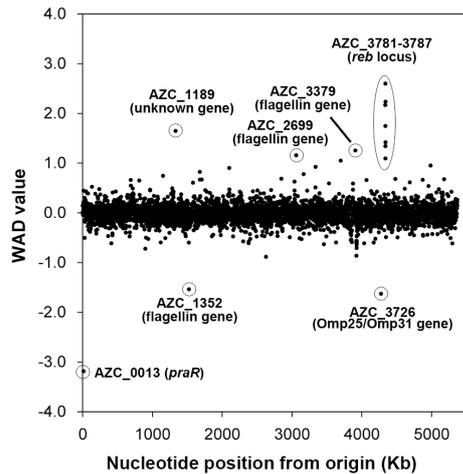


図 2. マイクロアレイ解析による野生型株と *praR* 破壊株における遺伝子群の発現比較。WAD 値が正の値である場合、*praR* 破壊株における発現が野生型株に比べて高いことを示す。

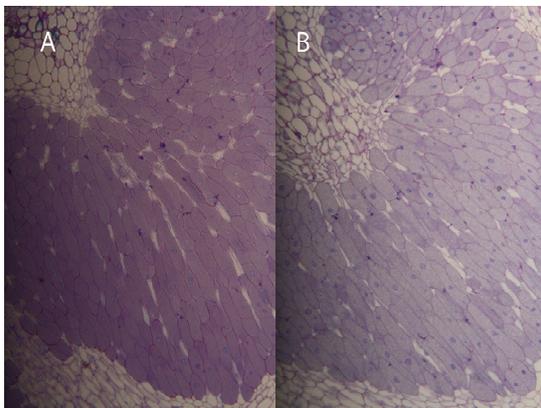


図 3. *reb* 遺伝子群の破壊が茎粒形成に及ぼす影響。(A) *reb* 遺伝子群破壊株により形成された茎粒の内部 (B) *reb* 遺伝子群・*praR* 二重破壊により形成された茎粒の内部。

(2)

各カリウム吸収系の茎粒形成への関与を調べるため、3つの系のうち1つまたは2つの系の遺伝子を欠失させた変異株を6株(Kdp系破壊株、Trk系破壊株、Kup系破壊株、Kdp・Trk系二重破壊株、Kdp・Kup系二重破壊株、Trk・Kup系二重破壊株)作製し、セスバニアの茎に接種した。その結果Kup系破壊株およびKdp・Kup系二重破壊株は、窒素固定能をもたない小型の茎粒を形成した。茎粒の切片を光学顕微鏡で観察したところ、これらの変異株は宿主細胞への侵入はしていたものの、その宿主細胞では液胞の肥大が見られ、バク

テロイドの数が少ないように見えた。実際に茎粒から菌体を再分離し、コロニー形成率(CFU)を測定したところ、これらの変異株のCFUは野生型株に比べて低く、茎粒中での生存率が低下していることが示唆された。一方、Kup系以外の系をそれぞれ、もしくは二重に破壊した株は正常な茎粒を形成した。これらのことからTrk系やKdp系は茎粒中においてはカリウム吸収に関与せず、Kup系が茎粒中におけるバクテロイドの生存に重要であることが示唆された。

上記の茎粒形成試験において、Trk・Kup系二重破壊株は、Kup系が機能しないにもかかわらず、わずかながら窒素固定能を持つ小型の茎粒を形成した。この原因はKdp系の発現にあるのではないかと推測した。そこでKdp系輸送体をコードする*kdp*遺伝子群の転写活性を各株において調べた。その結果、Trk・Kup系二重破壊株は、非共生状態では、高カリウム濃度条件下においても*kdp*遺伝子群が発現していることが分かった。また、この株は、茎粒中のバクテロイド状態においても*kdp*遺伝子群を発現させていた。一方、野生型株、Trk系破壊株、Kup系破壊株は、高カリウム条件下および茎粒中においては*kdp*遺伝子群が発現していなかった。これらのことからTrk・Kup系二重破壊株では、Kdp系の機能を相補することにより窒素固定活性を持つ茎粒を形成することができると考えられる。非共生状態においてTrk・Kup系二重破壊株の細胞内カリウム含量を測定すると、他の株よりもカリウム含量が低いことが分かり、一見、細胞内濃度の低下を感知して*kdp*遺伝子群を発現させたと考えられる。しかし、Kup系破壊株は非共生状態での細胞内カリウム含量が高いにもかかわらず、茎粒内ではバクテロイドが維持されない。バクテロイド内カリウム含量は測定できないが、バクテロイドの維持ができないことから、おそらくKup系破壊株のバクテロイドのカリウム含量は極度に低下していると考えられる。そのような状態であっても、Kup系破壊株のバクテロイドでは*kdp*遺伝子群は発現していなかった。細菌の*kdp*遺伝子群の発現は二成分制御系KdpDEによって正に制御されていることが知られている。上記の非共生状態の*kdp*遺伝子群の発現は、このKdpDEの関与によって説明がつくが、茎粒中での発現はKdpDEの関与のみでは矛盾が生じる。このことから、*kdp*遺伝子群の発現には何らかの負の制御系が存在しているのではないかと考えられる。推測ではあるが、Trk系がカリウム輸送系としてのみならず、センサーとして機能し、細胞内外のカリウム濃度や細胞へのカリウムの流入量などを感知して、Kdp系を負に制御している可能性が考えられる。

## 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3件)

- ①Akiba N, Aono T, Toyazaki H, Sato S, Oyaizu H (2010) *phrR*-like gene *praR* of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is essential for symbiosis with *Sesbania rostrata* and is involved in expression of *reb* genes. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 3475-3485. 査読有
- ②Tsukada S, Aono T, Akiba N, Lee KB, Liu CT, Toyazaki H, Oyaizu H (2009) Comparative genome-wide transcriptional profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 grown under free-living and symbiotic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5037-5046. 査読有
- ③Suzuki T, Aono T, Liu CT, Suzuki S, Iki T, Yokota K, Oyaizu H (2008) An outer membrane autotransporter, AoaA, of *Azorhizobium caulinodans* is required for sustaining high N<sub>2</sub>-fixing activity of stem nodules. *FEMS Microbiology Letters* **285**: 16-24. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ①Noriko Akiba, Toshihiro Aono, Hiroki Toyazaki, Satō Sato, and Hiroshi Oyaizu, The *praR* gene of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 is essential for symbiosis with *Sesbania rostrata*, and is involved in expression of *reb* genes. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 2010年9月20日、宮崎
- ②秋葉紀子、青野俊裕、小柳津広志、*Azorhizobium caulinodans* ORS571における *phrR* 遺伝子の機能解明(2)、日本土壤肥料学会、平成21年9月15日、京都
- ③秋葉紀子、青野俊裕、小柳津広志、*Azorhizobium caulinodans* ORS571における *phrR* 遺伝子の機能解析、日本土壤肥料学会、平成20年9月9日、名古屋
- ④戸矢崎裕希、青野俊裕、小柳津広志、*Azorhizobium caulinodans* ORS571におけるカリウム吸収関連遺伝子群の機能解析、日本土壤肥料学会、平成20年9月9日、名古屋
- ⑤塚田周平、青野俊裕、小柳津広志、*Azorhizobium caulinodans* ORS571におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析、日本土壤肥料学会、平成20年9月9日、名古屋

## 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