

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660067

研究課題名(和文)根粒菌のイノシトール合成が担う新たな環境適応機構の発見

研究課題名(英文)Inositol synthesis in *Sinorhizobium meliloti* involved in salt tolerance

研究代表者

吉田 健一 (Yoshida, Ken-ichi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20230732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：*Sinorhizobium meliloti*においてmyo-イノシトールリン酸合成酵素をコードするino1は塩ストレスで誘導され、塩耐性に関わる可能性が示唆された。そこで種々の塩耐性関わる遺伝子群を複数組み合わせた多重変異株を多数作成して耐塩性変化を検討し、ino1が多少なりとも耐性獲得に関わるが、補助的な意義しか持たないことが確かめられた。そこで逆にこれを過剰発現させて耐性の増強が見られるか否か検討を試みたが、目的とする変異株を取得することができず、この過剰発現が何らかの毒性を持つ可能性が考えられた。いずれにせよ同菌においてino1が塩耐性獲得に関わることは新規の発見である。

研究成果の概要(英文)：*Sinorhizobium meliloti* possesses ino1 encoding myo- inositol phosphate synthase, which is induced upon salt stress, implying the possibility that inositol derivatives might function in this bacterium as an osmoprotectant. On the other hand, this bacterium has several other osmoprotectants, including glutamic acid, N- acetyl Guru Tamil glutamine amides, betaines, and trehalose, and the effects of ino1 might not be so obvious. A series of mutant strains with various combinations of inactivated genes indicated that ino1 could affect osmoresistance, but its contribution had only auxiliary significance. Therefore, an attempt was made to examine if overexpressed ino1 might enhance the resistance. However, we failed to overexpress ino1 after multiple trials, and over-expression of ino1 might have some toxicity. In any case, *S. meliloti* could produce myo-inositol phosphate, which is induced in response to salt stress and involved in salt tolerance acquisition.

研究分野：応用微生物学

キーワード：*Sinorhizobium meliloti* inositol salt stress osmotic stress

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、イノシトールは細胞膜を構成するリン脂質のひとつであると共にシグナル伝達系でも重要な役割を果たすホスファチジルイノシトールの成分として必須である。従って、必要量のイノシトールの供給が満足されるようにその生合成が維持されている。しかし、結核菌などの特殊な例を除いて、バクテリアではイノシトールは単に炭素源として分解利用されるに過ぎないと考えられてきた。

吉田は枯草菌のイノシトール分解系の全貌を解明したパイオニアである。その成果は、多数のバクテリアゲノムにおいて、枯草菌のイノシトール分解系との遺伝子の相同性に基づいて、イノシトール代謝機能を推定する根拠とされている。アルファルファ根粒菌 *S. meliloti* 1021 も、枯草菌とほぼ同等な分解経路の遺伝子セットを有する。一方、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* は、例外的にイノシトール 1 リン酸合成酵素を持ち、それをコードする *ino1* 遺伝子は必須遺伝子である(図 1)。

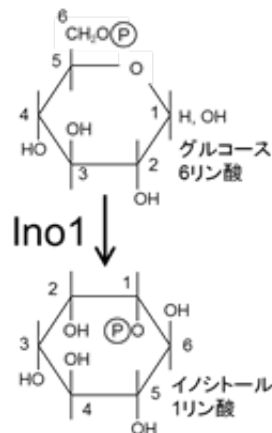


図 1

我々は、*S. meliloti* 1021 ゲノムに *ino1* の相同遺伝子(アミノ酸配列の同一性が 60% を超える)が存在することに気付き、また大腸菌や枯草菌にクローン化された同遺伝子産物が実際に当該酵素活性を発揮することを見出した。また、同遺伝子は塩ストレスで誘導されることも判明した。以上より、*S. meliloti* 1021 がイノシトール分解系のみならず、その生合成系を合わせ持つ事実を確信し、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

S. meliloti 1021 におけるイノシトール合成に関わる環境ストレス適応を明らかにする。バクテリアの浸透圧耐性には、一般にグリシンベタインやトレハロースなどのソリュ

ト(浸透圧などを調節する溶質)合成が関与している。従って、*ino1* 破壊単独のみならず、それに他のソリュート合成系の破壊を網羅的に組み合わせた種々の変異体を作成する。これら遺伝子の破壊によって生じる耐塩性、耐乾燥性などの環境ストレス適応能力や共生窒素固定への影響を探り、イノシトール合成の生理的機能を理解する糸口を得る。

3. 研究の方法

S. meliloti 1021 の *ino1* 破壊単独のみならず、耐塩性、耐乾燥性などに関連性が予見されるベタイン、トレハロースなどの合成系の関連遺伝子の破壊を組み合わせた多重変異体の作成する。これら遺伝子の破壊によって生じる耐塩性、耐乾燥性などストレス耐性および根粒形成や共生窒素固定などへの影響を種々の条件で検討する。また、同時にこれら種々の環境ストレスに呼応して、*ino1* およびベタインとトレハロース合成系の発現を調べ、さらにそれに同調する他の遺伝子の探索を進める。細胞内外のメタボライトの変化や欠失を探ることによって、イノシトール生合成系の生物学的な意義を解明する糸口の発見を目指す。

遺伝子破壊の対象としては、*ino1* およびベタイン合成系の遺伝子群、トレハロース合成系の遺伝子群など、加えて超好熱アーキアにみられる溶質であるジ-*myo*-イノシトール 1,1'-リン酸の合成に関わる遺伝子群(Chen, L. et al., *J. Bacteriol.* 180(15):3785-3792, 1998) など多数を想定している。これらの破壊に際しては、一般に用いられる相同組み換えによるマーカー置換法ではなく、染色体内の組み換えによる特定遺伝子領域の欠失によって実施する。この方法によると、原理的には複数の遺伝子破壊(欠失)をほぼ無制限に組み合わせ多重変異の導入が可能である。しかし、この方法はバクターの染色体への組み込みと、それに続く欠失組み換えの 2 段階を必要とする。前者は、接合伝達によって大腸菌からのマーカーを含むプラスミド DNA を導入し、それを染色体と組み換えるステップである。そして後者は、組み込まれたマーカーをポップアウトさせて目的の欠失組み換え体を濃縮・選抜するステップである(図 2)。

多数の遺伝子破壊株を、様々な温度、浸透圧、酸素濃度、栄養条件などに曝し、その耐性の変化を調べる。加えて、上記の遺伝子破壊株をアルファルファに感染させて試験を行う。植物の栽培は人工気象機内で行い、窒素固定能力を簡便に評価するために窒素源を含まない栽培条件で野生株感染と植物の成長を比較する。また、一定期間の感染栽培の後に根粒形成の頻度と規模も比較する。場合によっては、*lacZ* 遺伝子等マーカー遺伝子

を導入したコントロール株との競合感染実験も行い、感染力自体の変化も評価する。

以上の実施については、本菌のストレス応答研究の国際的専門家であるフランス農業研究所トゥールーズの Claude Bruand 博士を研究協力者として共同で研究を進める。博士は申請者フランス留学時代の同僚で 20 年来の知己として交流が深く、共同研究の準備が

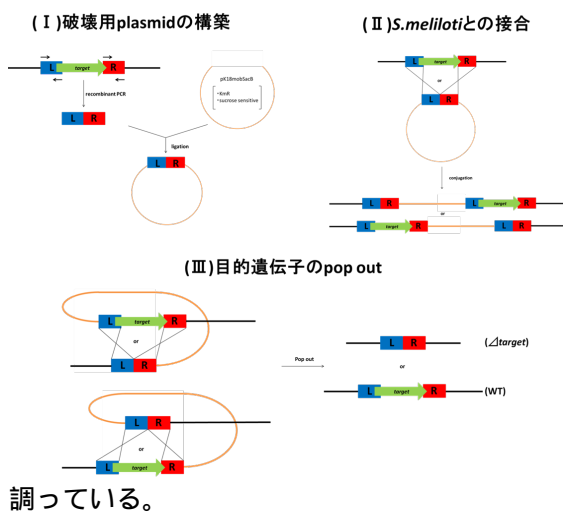


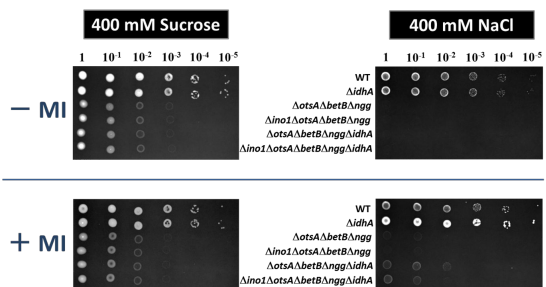
図 2

4. 研究成果

超好熱アーキアや一部の超好熱菌においてイノシトール類であるジ - myo-イノシトール 1,1'-リン酸がソリュートとして機能している例が報告されている。実際、アルファルファ根粒菌 *S. meliloti* 1021 において myo-イノシトールリン酸合成酵素をコードする *ino1* は塩ストレスで誘導されることが既に判明しており、生育温度の低い根粒菌においてもイノシトールが生産変換されて何らかのソリュートとして機能する可能性が示唆された。但し、同菌ではグルタミン酸、N-アセチルグルタミルグルタミンアミド、ベタイン、トレハロースなどの他のソリュートが存在するため、その効果がマスクされてしまう可能性がある。

そこで、*S. meliloti* において *ino1* および N-アセチルグルタミルグルタミンアミド (*ngg*)、グリシンベタイン (*betB*)、そしてトレハロース (*otsA*) の生産に関わる遺伝子群の破壊を複数組み合わせさせた多重変異株のラインアップを調べた。それら変異株は通常の生育条件では全く変化を示さなかったが、耐塩性や耐乾燥性等の形質変化を検討し、やはり *ino1* が多少の耐性獲得に関わることを示唆する結果を得た (図 3)。

しかし、*ino1* のこれら耐性に関する貢献度は決して大きなものとは言えず、極めて補助的は意義しか持たないことも確かめられた。加えて、いずれの遺伝子破壊についてもアル



→MI 添加により浸透圧耐性の向上

→MI 存在下において *ino1* 遺伝子が浸透圧耐性に寄与

ファルファとの共生根粒形成ならびに窒素
図 3

固定、競合感染実験による感染力評価に関して何等明確な影響を与えることはなかった。すなわち、これらの遺伝子機能はいずれも共生の樹立のみならず共生窒素固定の両面において重要な役割を担ってはいない可能性が濃厚となった。

そこで、我々は逆発想による当初は想定していなかった研究アプローチにふみきった。つまり、*ino1* の欠失に代えて逆にこれを過剰発現させて耐塩性の増強がみられるか否か検討を試みる方針で、この過剰発現に必要な遺伝子操作を何度も繰り返し試みたのである。しかし、なぜか未だ目的とする変異株を取得するに至っていない。この結果は全く予期していなかったことであるが、*ino1* の過剰発現が何らかの細胞毒性を持つ可能性を示唆するものと考えられた。

ino1 の過剰発現は細胞内のグルコース 6-リン酸を通常には起こりえない速度で消費することになると予想される。言うまでもなく、グルコース 6-リン酸は解糖系やペントースリン酸経路の初発化合物として中心代謝系の中で極めて重要な位置にあり、これが激減することが細胞システムに悪影響を与えるのかもしれない。これを回避するためには、PTS 系やグルコーストランスポーター及びヘキソキナーゼの増強等によって細胞内のグルコース 6-リン酸を強制的に補給する戦略が想定できるが、*S. meliloti* に於いてはこれらに関する知見が不足しており、現状では手を出すことができないジレンマがある。

一方、そもそも *S. meliloti* にはイノシトールを単一の炭素源として分解利用するシステムがあり、通常はイノシトールが細胞内に過剰に蓄積するとは考えにくい。*ino1* の過剰発現によって、そのような不自然な状況を引き起こされた可能性が想定できる。加えて、*ino1* 反応の産物は myo-イノシトールではなく、その前段階である myo-イノシトールリン酸である。一般にリン酸化された糖が細胞内に蓄積すると毒性を発揮することが知られ

ており、ino1 の過剰発現はそういった毒性につながる可能性がある。従って、この毒性を回避するために、イノシトール-モノフォスファターゼを合わせて発現強化して myo-イノシトールリン酸を素早く myo-イノシトールへと変換しなければならないのかもしれない。しかし、そうなると ino1 によってもたらされる myo-イノシトールリン酸から、未知なる他のイノシトール類縁化合物を生産する可能性を断つことになってしまい本来の目的に反することになってしまう可能性が生じるため、この戦略も必ずしも得策とは言えない。

いずれにせよ、*S. meliloti* には明らかに myo-イノシトールリン酸の合成系が存在し、かつ何らかの生理機能を担うこと、そしてそれが塩ストレスに応じて誘導されること、さらに部分的とは言え耐塩性の獲得に関与していることを示すことができた。

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 3 件)

Tsuji, S., Tanaka, K., Takenaka, S., and Yoshida, K. (2015) Enhanced secretion of natto phytase by *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* Vol. 79, No. 11, 2015, pp. 1906-1914.
DOI:10.1080/09168451.2015.1046366

Tanaka, K., Takenaka, S., and Yoshida, K. scyllo-Inositol, a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease. *Austin J Clin Neurol* Vol. 2, No. 4, 2015, pp. 1040.
URL:
<http://austinpublishinggroup.com/clinical-neurology/fulltext/ajcn-v2-id1040.php>

Tanaka, K., Iwasaki, K., Morimoto, T., Matsuse, T., Hasunuma, T., Takenaka, S., Chumsakul, O., Ishikawa, S., Ogasawara, N., and Yoshida, K. Hyperphosphorylation of DegU cancels CcpA-dependent catabolite repression of rocG in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol.* Vol. 15, 2015, pp. 43.
DOI: 10.1186/s12866-015-0373-0

〔学会発表〕(計 5 件)

夏目文音、田中耕生、竹中慎治、吉田健二 枯草菌のリンゴ酸酵素遺伝子 ytsJ および 6 ホスホグルコン酸脱水素酵素遺伝子 gndA の調節因子の探索 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.27-30、札幌コンベンションセンター(北海道)

岡田 大、白江雄介、田中耕生、竹中慎治、吉田健一 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の IolE ホモログの特性解明 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.27-30、札幌コンベンションセンター(北海道)

西畑省吾、田中耕生、竹中慎治、吉田健二 *Bradyrhizobium japonicum* の PHB 蓄積に関わるファジン遺伝子の解析 第 67 回日本生物工学会大会 2016.10.26-28、城山観光ホテル(鹿児島県)

本窪田章博、田中耕生、竹中慎治、Laurent Sauviac、Claude Bruand、吉田健一 アルファルファ根粒菌に見出されたイノシトール合成系に関する研究 日本農芸化学会関西支部例会(第 487 回講演会) 2014.12.6、神戸大学(兵庫県)【学生優秀発表賞受賞】

K. Yoshida, A. Motokubota, L. Sauviac & C. Bruand. To be, or not to be: that is the question. - myo-inositol in *Sinorhizobium meliloti*. The 11th European Nitrogen Fixation Conference, 2014.9.7-10、テネリフェ(スペイン)

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 健一(YOSHIDA, Ken-ichi)、神戸大学大学院農学研究科、教授

研究者番号: 20230732