

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏 名 塚田 周平
指導教員名 小柳津 広志

論文題目

Azorhizobium caulinodans ORS571 の共生時における網羅的遺伝子発現解析と
Lon プロテアーゼ変異株の解析

<はじめに>

窒素は植物の生育に必須な栄養元素であり、農業上重要である。現代農業ではハーバーボッシュ法による化学合成アンモニアによって窒素肥料の安定的な供給が可能になったが、その一方で化石燃料の大量消費、窒素の流出による環境汚染など、新たな問題を引き起こしている。

根粒菌は、窒素固定細菌の中でも、共生的窒素固定を行う点で特徴的である。マメ科植物の分泌するフラボノイドを感知した根粒菌は **nodulation factor (Nod factor)** とよばれる糖脂質を分泌し、植物に形態的・生理的な変化を誘導する。その結果、根毛などに形成された感染糸から皮層で分裂される根粒原基の植物細胞に根粒菌が侵入して細胞内に共生し、効率的に窒素固定を行う。これらマメ科植物-根粒菌共生メカニズムの全容の解明は、農業上重要な知見となりうるが、その相互作用が複雑であるため、研究の余地が多く残されている。

当研究室において研究を進めている *Azorhizobium caulinodans* ORS571 は、熱帯性マメ科植物 *Sesbania rostrata* を宿主とし、根粒のみならず、茎に茎粒を形成する。*A. caulinodans* ORS571 の全ゲノム配列を解読した結果、これまでにゲノムの解読された根粒菌の中ではゲノムサイズおよび共生アイランドのサイズが最も小さく、根粒菌の進化上重要な根粒菌である。さらに当研究室では、Tn5 トランスポゾンを用いた 10,800 株の Tn5 トランスポゾン変異株を用いた大量スクリーニングを行っており、共生成立において主要な役割を果たすと考えられる 86 の遺伝子を見出している。本研究では、*A. caulinodans* ORS571-*Sesbania rostrata* 共生系を用いて網羅的遺伝子発現解析を行

ってその特徴を明らかにすると共に、大量スクリーニングから見出された、莖粒形成において重要な役割を果たすと考えられる転写後制御因子 Lon プロテアーゼの機能解析を行うことで、根粒・莖粒の成熟過程に関与する因子について新たな知見を得ることを目指した。

1. *Azorhizobium caulinodans* ORS571 の共生時における網羅的遺伝子発現解析

まず、マイクロアレイによって、*Azorhizobium caulinodans* ORS571 の共生時における遺伝子発現を解析することを試みた。生物現象を理解する上で、遺伝子発現から得られる知見は重要であり、根粒形成においても、*Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* において、共生時の網羅的発現解析が行われ、その生理的特徴が明らかにされてきた。一方で共生時における遺伝子発現は単生時に比べて大きく異なるため、植物との相互作用に必要な遺伝的因子をその中から選択し研究を進めるには候補遺伝子が莫大であり、困難である。*A. caulinodans* はゲノムサイズが小さいため共生に関与する因子が他の根粒菌と比較して少ない可能性があり、網羅的に遺伝子の発現を解析することは重要である。

富栄養および貧栄養培地中における単生時、フラボノイド添加時、および共生時の *A. caulinodans* ORS571 の全推定 ORF の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、*A. caulinodans* ORS571 の共生時における遺伝子発現の全容を明らかにした。同時に、窒素固定を担う *nif* および *fix* 遺伝子クラスター内に散在し、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子群の発現が共生時に上昇していることを見出した。これらの機能未知遺伝子は、シグナル分子 Nod factor を合成する Nod 遺伝子群を持たない莖粒菌である *Bradyrhizobium strains* BTai1 および ORS278 に高く保存されていた。さらに、共生アイランド内でトランスポザーゼ遺伝子群が、フラボノイド添加時および共生時の双方で発現が上昇していることが明らかになった。これは他の根粒菌では報告されておらず、*A. caulinodans* ORS571 に特徴的であると考えられる。加えて、得られた発現プロファイルを根粒菌の中で系統上近縁である *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の発現プロファイルと比較したところ、*B. japonicum* と共通した発現パターンを示す因子を多数見出した。

2. Lon プロテアーゼをコードする *lon* 遺伝子破壊株 ORS571Δ*lon* の表現型解析

当研究室における大規模スクリーニングからは、転写後制御因子 Lon プロテアーゼをコードする *lon* 遺伝子の破壊により、莖粒形成に異常が起こることが明らかになっている。Lon プロテアーゼは、不要タンパク質の分解のみならず特定のタンパク質に対して転写後制御因子として機能することが知られており、莖粒形成過程においても同様の機能を持つことが予想された。そこで、莖粒形成において Lon プロテアーゼの影響を評価するために、*A. caulinodans* ORS571 の Lon をコードすると考えられる *lon* 遺伝子 (AZC_1610) の欠損変異株を作成し、表現型の解析を行うと同時に、*lon* 遺伝子の発現動態を解析した。

lon 遺伝子欠損株 ORS571Δ*lon* を *S. rostrata* に接種したところ、大規模スクリーニングの結果と同様に未成熟な莖粒が形成された。この表現型は、完全な *lon* 遺伝子を相補することで復帰した。窒素固定活性を示すアセチレン還元能には、単生時には野生型株との有意な差は認められな

ったが、共生時には ORS571 Δlon を接種した茎粒は窒素固定活性を持たなかった。また、*lon-lacZ* の transcriptional fusion 株を接種し、 β -Galactosidase 活性を観察したところ、感染糸内、および感染細胞内の両方において *lon* 遺伝子が発現していることが確認された。光学顕微鏡によって *lon* 欠損株接種後 12 日目の茎粒を観察したところ、野生型株と異なり、感染糸は観察されるものの感染細胞はほとんど観察されず、感染領域と考えられる領域も不均一な形態の細胞で占められていた。また、infection pocket に菌が蓄積し、肥大している様子が観察された。さらに透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、ORS571 Δlon が感染した植物細胞はほとんどが液胞で占められており、正常なバクテロイドとは異なる形態の菌体が観察された。また、感染糸には菌が蓄積していた。これらは光学顕微鏡での観察を裏付けた。細胞外多糖量の調節には、ORS571 Δlon で異常がみられた。*A. caulinodans* ORS571 においては、細胞外多糖の異常により茎粒形成に異常が起こることが知られているが、ORS571 Δlon においてもその表現型を示す原因のひとつである可能性がある。さらに、*lon* 遺伝子のプロモーター領域を、茎粒中で強く発現が上昇する *nifH* 遺伝子のプロモーター領域と置換した株を接種したところ、一部の茎粒では表現型の回復が見られたが、表現型が回復しない茎粒も観察された。これらの解析から、ORS571 Δlon が感染した茎粒では植物細胞への侵入、もしくは侵入直後のバクテロイド化とバクテロイドの維持に異常が起きていることが示唆された。

3. Lon プロテアーゼが発現を制御する遺伝子の探索

上述の結果から、Lon プロテアーゼが制御する因子に、茎粒成熟の初期において重要な役割を担う遺伝子が含まれる可能性が示された。そこで、ORS571 Δlon における網羅的発現解析を行うことで、Lon プロテアーゼによる制御の特徴を明らかにすることを試みた。ORS571 Δlon の形成する茎粒では、バクテロイドがほとんど存在せず、単離することができないため、富栄養および貧栄養培地中の単生時における発現解析を行った。

得られた発現プロファイルを基に階層的クラスタリング解析を行った結果、単生時に Lon プロテアーゼの欠損によって発現が影響され、かつ野生型株の網羅的解析から茎粒形成においてその発現調節が重要と考えられる遺伝子を①茎粒形成時に発現が上昇する Group 1、および②茎粒形成時に発現が抑制される Group2 の 2 つに分類された。Group 1 にはビオチン生合成遺伝子をはじめとして、茎粒中で必須であるものの ORS571 Δlon では発現が低下するものが含まれた。また、Group2 には、ORS571 Δlon のみで発現が上昇しており、植物病原菌が保持していることが知られている *rebB* 遺伝子などが含まれた。これらから、Lon プロテアーゼの機能には、共生関係を促進する遺伝子の発現を誘導する機能および共生関係を阻害する遺伝子の発現を阻害する機能の 2 つの機能を持つことが示唆された。一方、細胞外多糖の合成に関わると考えられる *exp* 遺伝子群の発現が貧栄養培地中で上昇しており、これは細胞外多糖量調節の異常と関連していると考えられる。これに加え、Group 1 には、*fixNOQP*、*nifA* など、窒素固定に関与し、FixK によって制御されていることが知られる遺伝子が含まれたため、Lon プロテアーゼが FixK による制御に関与していることが予想された。*A. caulinodans* ORS571 においてこれらの遺伝子 *fixNOPQ* および *nifA* の他に発現が FixK に依存する因子はこれまでに知られていないが、これらの遺伝子と同様にクラスタリング

された遺伝子群も FixK によって制御されている可能性が示唆された。そこでクラスタリングによって得られた遺伝子群の上流配列を解析したところ、双方のグループにおいて FixK box と考えられるコンセンサス配列 TTGA-N6-TCAA を保持する 16 遺伝子が見出された。ここから、*A. caulinodans* ORS571 において FixK がより広範囲にわたる遺伝子の制御を行う可能性が示唆された。

まとめ

本研究では、マイクロアレイによって *A. caulinodans* ORS571 の全 ORF の網羅的発現遺伝子解析を行った。さらに *A. caulinodans* ORS571 の *lon* 遺伝子欠損株を作成し、その表現型を詳細に解析するとともに、*lon* 遺伝子欠損株の発現プロファイルを解析することで、Lon プロテアーゼが制御する因子の探索を試みた。

その結果、*A. caulinodans* の共生時における遺伝子発現の全容を明らかにしたと同時に、Lon プロテアーゼが、莖粒成熟の初期に重要な機能を果たしており、発現解析の結果から共生関係を促進する遺伝子の発現を誘導する機能、および共生関係を阻害する遺伝子の発現を阻害する機能の 2 つの機能を持つ可能性を見出した。特に、従来の逆遺伝学的研究からは共生を阻害する因子の解析を進めることは困難であり、本研究はマメ科植物-根粒菌間の相互作用を理解する上で重要な知見となりうる。さらに、発現解析からは Lon プロテアーゼが FixK による遺伝子発現制御に関与し、FixK の下流にある遺伝子群が過去に知られていた以上に広範囲にわたることが示唆された。これらの結果は、根粒菌の進化、またマメ科植物-根粒菌共生メカニズムの解明に向けた重要な知見であると考えられる。