

	すが わら まさ ゆき
氏名（本籍地）	菅原 雅之
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第86号
学位授与年月日	平成19年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	根粒菌 <i>Bradyrhizobium elkanii</i> のリゾビトキシン生合成遺伝子に関する研究
博士論文審査委員	（主査）教授 南 澤 究 教授 高 橋 秀 幸 教授 草 野 友 延

論文内容の要旨

序章

根粒菌とマメ科植物の共生関係に代表される植物—微生物相互作用は、作物の生長や維持および環境保護において重要であり、その感染および物質授受メカニズムの解明および強化は、持続的な食糧生産において欠かす事のできない課題である。

リゾビトキシンはダイズ根粒菌である *Bradyrhizobium elkanii* と、いくつかの植物病原菌が生産するアミノ酸様物質である。その生理活性として、メチオニン合成系の β -シスタチオナーゼ、および植物のエチレン合成系の 1-シクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素を阻害する。またリゾビトキシンは、マメ科植物のエチレン発生量を低下させ、根粒形成能を促進させる作用がある。このようにリゾビトキシンの根粒菌—マメ科植物の共生因子としての役割は明確であるが、他の微生物—植物の相互作用における役割は明らかとされていない。

一方で、近年当研究室において *B. elkanii* USDA94 株の 5 つの遺伝子から構成されるリゾビトキシン生合成遺伝子群 (*rtx* 遺伝子群) が同定され、このうち少なくとも *rtxAC* がその生合成において必須であることが明らかとなっている。しかしながら、*rtxAC* に続く下流遺伝子のリゾビトキシン生合成における関与、および詳細な機能について明らかとされていない。

そこで本研究では、リゾビトキシンの生合成遺伝子および生合成に関する知見を深めること、および他の植物—微生物相互作用における働きを解明することを目的として、1) *B. elkanii* の *rtx* 遺伝子群の再確認、2) *rtxC* の下流に隣接する機能未知遺伝子のリゾビトキシン生合成における必要性および機能の解明、3) リゾビトキシン生合成経路の解明、4) 異種細菌へのリゾビトキシン生産能の導入、5) リゾビトキシンの他の植物—微生物相互作用への働きと利用の可能性について検討を行った。

第一章 *Bradyrhizobium elkanii* の *rtx* 遺伝子群の構造比較と機能推定

Yasuta ら (2001) により同定された *B. elkanii* USDA94 株の *rtx* 遺伝子群は、*Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株の *rtx* 遺伝子群との比較により、その *rtxC* 下流領域の同定に誤りがあると考えられた。本章では異種細菌からの *rtx* 遺伝子の同定および比較による構造の再確認、また最新のデータベースを用いたアミノ酸配列情報に基づいたリゾビトキシン生合成に対する機能の推定を行った。その結果、新たにイネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* およびオジギソウ β -プロテオバクテリア根粒菌 *Burkholderia phymatum* に *rtx* 相同遺伝子群ホモログを見出し、これらとの比較により *B. elkanii* の *rtxA* から始まる *rtx* 遺伝子群は新た

に6つの遺伝子 (*rtxACDEFG*) から構成されることを明らかにした。また、アミノ酸配列情報より新たに、*rtxD* 遺伝子産物はセリノールに対するグルタミンアミド基の転移、および *rtxE* 遺伝子産物はリゾビトキシンの排出に関与することをそれぞれ推定した。

第二章 *rtx* 遺伝子群の破壊によるリゾビトキシン生産への影響

本章では *B. elkanii* のリゾビトキシン生産に関連する遺伝子領域の特定を目的とし、1) 逆転写 PCR による *rtx* 遺伝子群の発現解析、2) 各 *rtx* 遺伝子破壊株の作製、および 3) 各 *rtx* 遺伝子破壊株におけるリゾビトキシン生産量を野生株との比較を行った。その結果、*rtxACDEFG* の転写は単一のユニットにより制御され、*rtxA* の N 末端からおよそ 400 bp 上流にある -35/-10 プロモーターより開始されることが示唆された (図 1)。また、*rtxADEG* の各遺伝子破壊株のリゾビトキシン生産量は野生株と比較して有意に低下していた (図 1)。従って *B. elkanii* のリゾビトキシン生合成に対して少なくとも *rtxA* から *rtxG* までの遺伝子領域が関与することが明らかとなった。

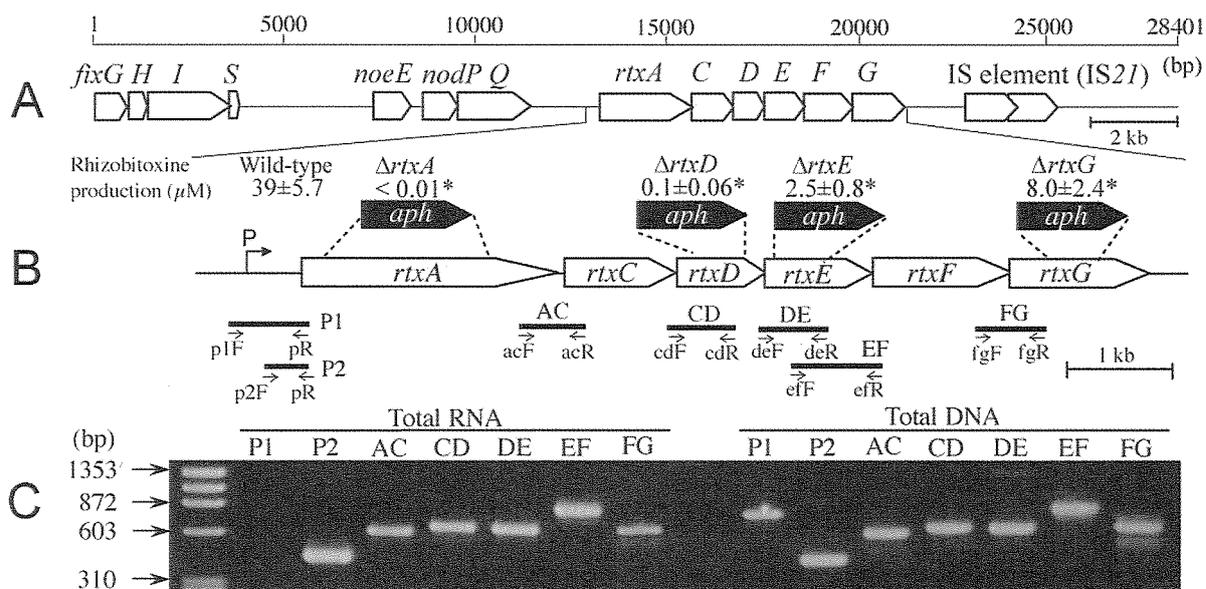


図 1. *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 株の *rtx* 遺伝子群とその発現および破壊株のリゾビトキシン生産

A: *rtx* 遺伝子群とその周辺遺伝子, B: カナマイシン耐性遺伝子 (*aph*) 挿入破壊株とそのリゾビトキシン生産量, C: *B. elkanii* USDA94 株より抽出した RNA および DNA を鋳型とした逆転写 PCR 解析。

第三章 グルタミンのリゾビトキシン生合成への影響

rtxD および *rtxG* の遺伝子産物はグルタミンに関与する酵素タンパク質と相同性が高いが、リゾビトキシン生合成系におけるグルタミンの関与は明らかではない。本章では、グルタミンのリゾビトキシン生合成への関与の有無を検証することを目的として、*B. elkanii* USDA94 へのグルタミン投与実験、および安定同位体

標識グルタミンによるトレーサー解析をそれぞれ実施した。その結果、グルタミンは少なくともリゾビトキシン前駆体のセリノールおよびジヒドロリゾビトキシン合成量を増加させることを明らかにした。また、グルタミンのアミド基がリゾビトキシン関連物質に取り込まれないこと、セリノール合成系にあるアミノ基転移反応にグルタミンのアミノ基が利用されること、およびグルタミンとセリノールとの縮合によりジヒドロリゾビトキシンが合成される可能性が示唆された。

第四章 *rtxD* 遺伝子のリゾビトキシン生合成における機能の解明

遺伝子破壊実験の結果から、*B. elkanii* USDA94 株の *rtxD* はリゾビトキシン生合成に関与する遺伝子であり、グルタミンアミノ基のセリノールおよびジヒドロリゾビトキシンへの取り込みに *rtxD* 遺伝子産物が関与している可能性が考えられた。本章では *rtxD* 遺伝子の機能を解明することを目的として、*rtxD* 破壊株および相補株のリゾビトキシン生合成における表現型を検討した。その結果、*rtxD* 欠損株は *rtxD* 保有株と比較して、細胞内におけるリゾビトキシンおよびジヒドロリゾビトキシンが同程度以上蓄積する一方で、細胞外への分泌量は著しく低下した。従って、*rtxD* はリゾビトキシンおよびジヒドロリゾビトキシンの細胞外への排出に関与することが明らかとなった。また、グルタミンのアミノ基転移において *rtxD* は必須ではないことが明らかとなった。

第五章 異種細菌への *rtx* 遺伝子群の導入によるリゾビトキシン生産

リゾビトキシン生産能付与細菌は、植物-微生物相互作用を促進することが期待される。本章では、リゾビトキシン生産能力の異種細菌への付与と、リゾビトキシン生合成に関与する新たな因子の探索を目的として、ゲノム解読がなされている細菌への *rtxACDEFG* 導入と、そのゲノム情報に基づいた代謝の改変を行った。その結果、*rtxACDEFG* を発現した *Agrobacterium tumefaciens* および *Sinorhizobium meliloti* は、*O*-アセチルホモセリン存在下でリゾビトキシンを大量に生産した。また、両菌株のゲノム上に *O*-アセチルホモセリン合成遺伝子 *metXW* が存在しないので (図 2)、*Mesorhizobium loti* の *metXW* を *rtxACDEFG* と同時導入したところ、*A. tumefaciens* および *S. meliloti* のリゾビトキシンの生産能が高まった (図 3)。従って、代謝改変によりリゾビトキシン生産に適合する細菌が構築でき、またホモセリンから *O*-アセチルホモセリンを合成する過程および遺伝子 (*metXW*) がリゾビトキシン生合成において重要であることが新たに明らかとなった。また、リゾビトキシン生産能の異種細菌への付与を実現させるためには、生合成に関与する遺伝子 (*rtxACDEFG*) の細菌内における発現と、*rtx* 遺伝子産物が機能、すなわち細菌の代謝背景がリゾビトキシン生合成に適合しうるということが重要であることも明らかとなった。

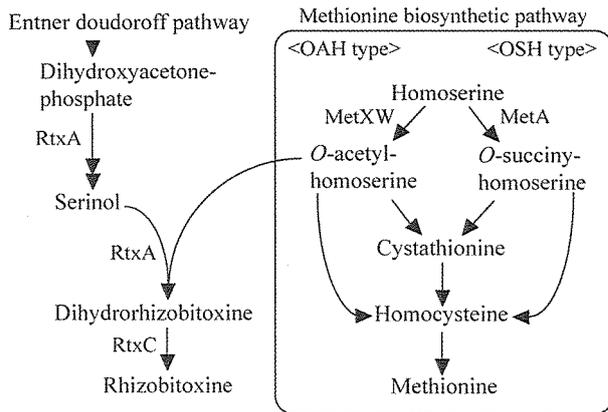


図2. リゾビトキシン生合成経路とメチオニン代謝系の相関

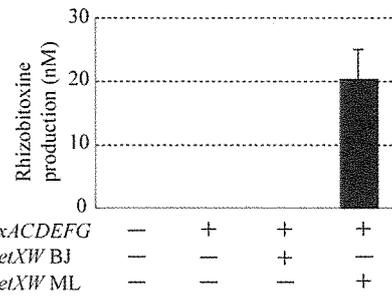


図3. *rtxACDEFG*および*metXW*遺伝子導入 *Agrobacterium tumefaciens*のリゾビトキシン生産

第六章 *Agrobacterium* を介した植物遺伝子導入へのリゾビトキシンの影響

エチレンは *A. tumefaciens* を介した遺伝子導入を抑制するので、エチレン生合成阻害剤であるリゾビトキシンにより遺伝子導入が促進されることが期待された。本章では、遺伝子導入に対するリゾビトキシンとリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* の影響を検討した。その結果、リゾビトキシンはメロン子葉切片からのエチレン発生量を低下させ、植物遺伝子導入効率を向上させた。また、作製したリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* を接種したメロン子葉切片はリゾビトキシン非生産株接種区と比較して、エチレン発生が低く抑えられ (図 4A)、遺伝子の導入効率が上昇した (図 4B)。本結果より、根粒菌がもつ共生因子リゾビトキシンが他の植物-微生物相互作用においても効果的に働くことが明らかとなり、また作製したリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* は、植物育種において有用な細菌となりうることを期待される。

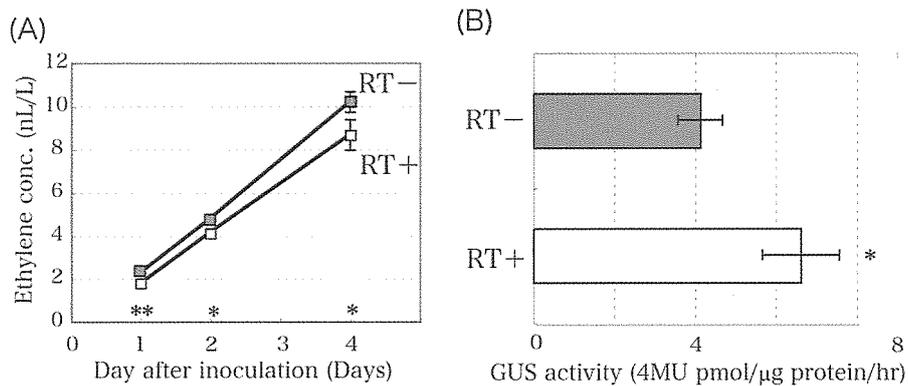


図4. リゾビトキシン生産 *Agrobacterium* によるエチレン発生および遺伝子導入効率に対する影響
(A) エチレン蓄積量の経時的変化, (B) 遺伝子導入効率, RT+: リゾビトキシン生産株接種区, RT-: リゾビトキシン非生産株接種区。

論文審査結果の要旨

根粒菌、植物病原菌、根圏細菌は宿主植物のエチレンレベルを下げることにより感染を促進する複数の機構を持っている。リゾビトキシンは、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* が生産するエチレン生合成阻害剤であり、マメ科植物のエチレン発生を低下させ、根粒形成能を促進する。そこで本研究では、リゾビトキシンの生合成遺伝子系とその植物—微生物相互作用における働きの解明を目的とした。

まず、*B. elkanii* USDA94 株の *rtxACDEFG* 遺伝子の全ての領域が一つの転写単位として、リゾビトキシン生合成に関与していることを遺伝子破壊等により明らかにした。次に *Agrobacterium tumefaciens* C58 株への *B. elkanii* *rtxACDEFG* 導入したところ、異種細菌においても導入遺伝子は転写および翻訳されていたにもかかわらず、リゾビトキシンは生産されなかった。C58 株のゲノム情報およびリゾビトキシン生合成系の知見より、前駆物質の一つである *O*-アセチルホモセリン(OAH)が供給されないことが原因として考えられた。そこで、OAH 投与および *Mesorhizobium loti* 由来の OAH 合成遺伝子 *metXW* の導入を行ったところ、C58 株はリゾビトキシンを生産した。リゾビトキシン生産 C58 株は、非生産株と比較して植物のエチレン発生を低下させ、メロンの形質転換効率を有意に上昇させた。

イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae*、オジギソウ根粒菌 *Burkholderia phymatum* のゲノムからもリゾビトキシン生合成遺伝子群が見いだされたが、それらは *O*-スクシニルホモセリン(OSH)を前駆物質とする可能性が高く、しかも OSH 合成酵素遺伝子 *metA* を生合成遺伝子群に取込んでいた。したがって、広義にはメチオニン代謝の *metXW*, *metA* もリゾビトキシン生合成遺伝子と見なすことができる。本論文では、以上の成果をもとに、根粒菌が有するエチレン発生を低下させる機構を利用して微生物側から植物形質転換技術を改良したという点でも画期的である。

以上の論文内容は、菅原雅之氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。そこで、審査員一同、菅原雅之氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認めた。

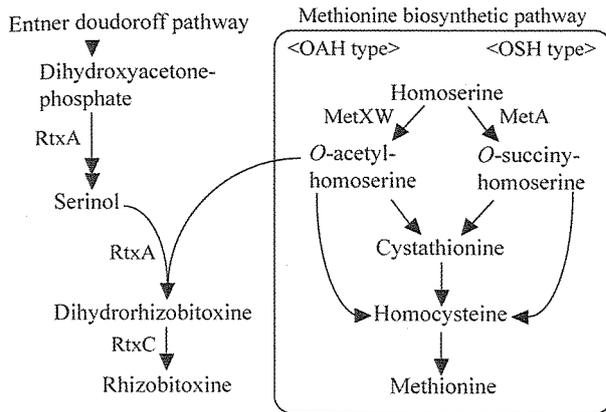


図2. リゾビトキシン生合成経路とメチオニン代謝系の相関

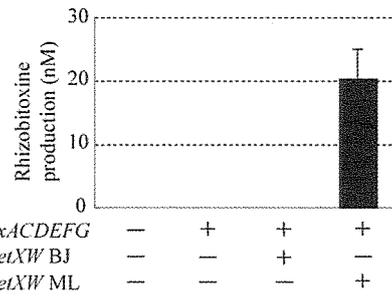


図3. *rtxACDEFG*および*mexXW*遺伝子導入 *Agrobacterium tumefaciens*のリゾビトキシン生産

第六章 *Agrobacterium* を介した植物遺伝子導入へのリゾビトキシンの影響

エチレンは *A. tumefaciens* を介した遺伝子導入を抑制するので、エチレン生合成阻害剤であるリゾビトキシンにより遺伝子導入が促進されることが期待された。本章では、遺伝子導入に対するリゾビトキシンとリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* の影響を検討した。その結果、リゾビトキシンはメロン子葉切片からのエチレン発生量を低下させ、植物遺伝子導入効率を向上させた。また、作製したリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* を接種したメロン子葉切片はリゾビトキシン非生産株接種区と比較して、エチレン発生が低く抑えられ (図 4A)、遺伝子の導入効率が上昇した (図 4B)。本結果より、根粒菌がもつ共生因子リゾビトキシンが他の植物-微生物相互作用においても効果的に働くことが明らかとなり、また作製したリゾビトキシン生産 *A. tumefaciens* は、植物育種において有用な細菌となりうることを期待される。

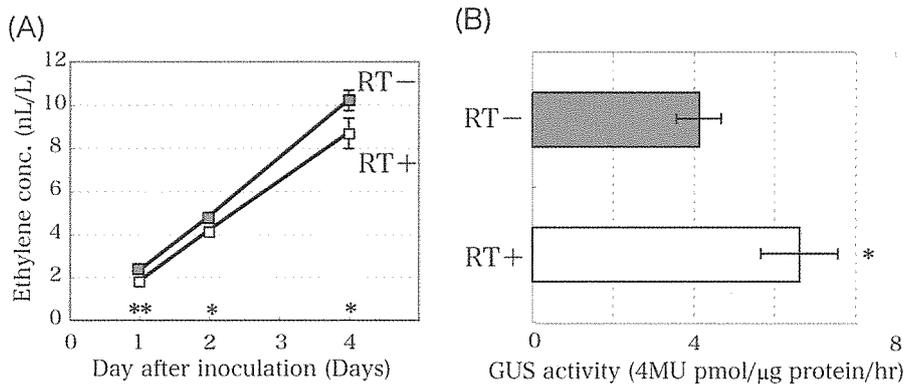


図4. リゾビトキシン生産 *Agrobacterium* によるエチレン発生および遺伝子導入効率に対する影響
(A) エチレン蓄積量の経時的変化, (B) 遺伝子導入効率, RT+: リゾビトキシン生産株接種区, RT-: リゾビトキシン非生産株接種区。

論文審査結果の要旨

根粒菌、植物病原菌、根圏細菌は宿主植物のエチレンレベルを下げることにより感染を促進する複数の機構を持っている。リゾビトキシンは、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* が生産するエチレン生合成阻害剤であり、マメ科植物のエチレン発生を低下させ、根粒形成能を促進する。そこで本研究では、リゾビトキシンの生合成遺伝子系とその植物—微生物相互作用における働きの解明を目的とした。

まず、*B. elkanii* USDA94 株の *rtxACDEFG* 遺伝子の全ての領域が一つの転写単位として、リゾビトキシン生合成に関与していることを遺伝子破壊等により明らかにした。次に *Agrobacterium tumefaciens* C58 株への *B. elkanii rtxACDEFG* 導入したところ、異種細菌においても導入遺伝子は転写および翻訳されていたにもかかわらず、リゾビトキシンは生産されなかった。C58 株のゲノム情報およびリゾビトキシン生合成系の知見より、前駆物質の一つである *O*-アセチルホモセリン(OAH)が供給されないことが原因として考えられた。そこで、OAH 投与および *Mesorhizobium loti* 由来の OAH 合成遺伝子 *metXW* の導入を行ったところ、C58 株はリゾビトキシンを生産した。リゾビトキシン生産 C58 株は、非生産株と比較して植物のエチレン発生を低下させ、メロンの形質転換効率を有意に上昇させた。

イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae*、オジギソウ根粒菌 *Burkholderia phymatum* のゲノムからもリゾビトキシン生合成遺伝子群が見いだされたが、それらは *O*-スクシニルホモセリン(OSH)を前駆物質とする可能性が高く、しかも OSH 合成酵素遺伝子 *metA* を生合成遺伝子群に取込んでいた。したがって、広義にはメチオニン代謝の *metXW*, *metA* もリゾビトキシン生合成遺伝子と見なすことができる。本論文では、以上の成果をもとに、根粒菌が有するエチレン発生を低下させる機構を利用して微生物側から植物形質転換技術を改良したという点でも画期的である。

以上の論文内容は、菅原雅之氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。そこで、審査員一同、菅原雅之氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認めた。