



植物の生育促進への利用に資する、枯草菌の転写応答機構の研究

福山大学生命工学部生物工学科 准教授 広岡和丈

はじめに

枯草菌はその名が示すとおり枯れ草に多く生息し、植物根圏の土壌中にも普遍的に見いだされるグラム陽性細菌である。根圏枯草菌は、有機酸やシデロフォアと呼ばれるキレート化合物を分泌することで植物の鉄イオン取り込みを助け、またバイオフィルムを形成することで根での病原菌の増殖を防いでいる。このように枯草菌は、直接共生関係にはないものの植物の生育促進に作用する有用根圏微生物であるといえる。根圏土壌には、糖やフラボノイドなど、さまざまな有機化合物が植物から浸潤して豊富に存在する。グラム陰性細菌である根粒菌は、マメ科植物由来のフラボノイドに応答して根粒形成遺伝子群を誘導することが知られている。筆者は、枯草菌も根圏環境を認識するためのシグナル分子としてフラボノイドを利用するのではないかと考え、フラボノイドで誘導される遺伝子群の探索を行い、三つの転写制御系を見いだした。これらの転写因子とともに標的遺伝子群の機能解析を進めることで、フラボノイドを介した枯草菌と植物、あるいは他の根圏微生物との相互作用機構の解明を目指した。加えて、枯草菌での鉄や銅といった金属イオンの取り込み機構についての研究を行い、フラボノイド応答機構の知見とともに植物の生育促進あるいは土壌環境浄化への応用につなげることを目指した。

1. LmrA/QdoRによる二重制御系：バシラス属で初めてのフラボノイド応答性転写制御系の発見

LmrAはTetRファミリーに属する転写因子であり、その遺伝子はリンコマイシンなどへの耐性にかかわる多剤排出ポンプ

をコードする *lmrB* とオペロンをなし、このオペロンの発現を抑制するがその誘導物質はLmrBが排出する薬剤ではなく、明らかではなかった。*lmrA*破壊株を用いたDNAマイクロアレイ解析からLmrAの別の標的遺伝子群として *qdoI-ysxAH* オペロンが見いだされ、*qdoI*がケルセチン分解を触媒する酵素をコードすることから、LmrAの誘導物質がケルセチンなどのフラボノイドであると予想した。各種フラボノイドを添加した条件下でのDNA結合実験とレポーター実験の結果、LmrAによる抑制がケルセチンを含むいくつかのフラボノイドによって解除されることが明らかとなった。*qdoI-ysxAH*近傍上流に位置する *qdoR* はLmrAパラログをコードし、QdoRもLmrAと同じシス配列に結合して標的遺伝子群を抑制し、LmrAと同様にケルセチン存在下で脱抑制するが、そのフラボノイド応答特異性はLmrAとは部分的に異なっていた。*qdoR*自身もLmrA/QdoRによって制御され、合計五つの標的遺伝子群が明らかとなった。この制御系がバシラス属で初めて見いだされたフラボノイド応答性制御系となった(図1)。

*lmrA*と*qdoR*の両遺伝子を破壊した枯草菌株をケルセチンにさらすと野生株に比べて著しい感受性を示したが、その原因が過剰なQdoI活性によるケルセチン分解中間体の急激な蓄積であることが判明し、LmrA/QdoRの二重制御は細胞死につながるように*qdoI*発現を厳密に調節するためにあると考えられた。このことと*lmrB*発現が排出薬剤と構造的に無関係なフラボノイドで誘導されることを合わせると、枯草菌はこの機構を用いてフラボノイドから根圏環境を感知し、*qdoI*発現を

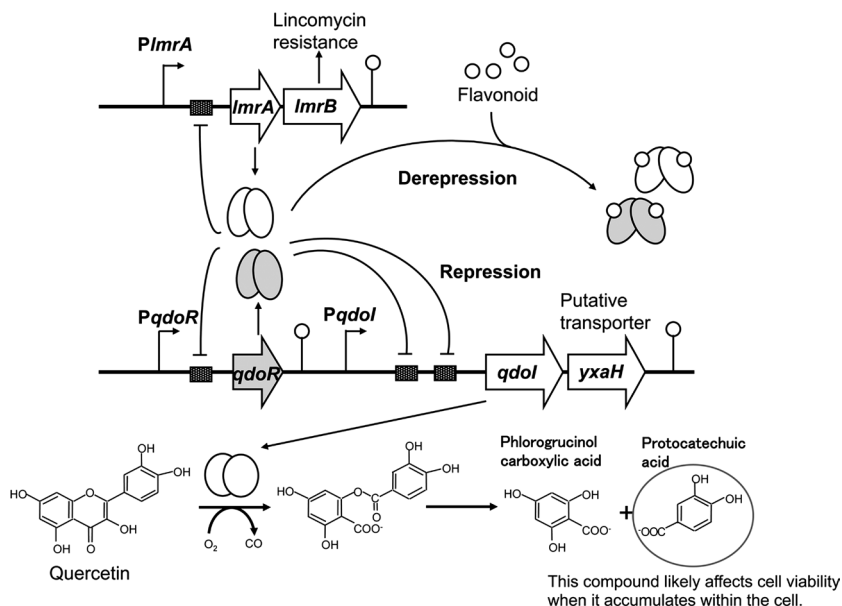


図1 LmrA/QdoR制御系の構成

*lmrB*はリンコマイシンなどに対する耐性を付与する多剤排出ポンプをコードする。*qdoI*遺伝子産物はケルセチンなどのフラボノールのC環開裂反応を触媒する。*lmrA/qdoR*二重破壊株ではQdoI活性が過剰となることで分解中間体が蓄積し、細胞毒性を及ぼす。

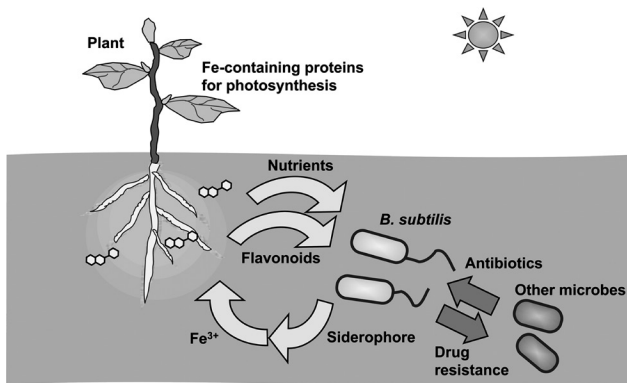


図2 根圏周辺でのフラボノイドを介した生物間相互作用
枯草菌は植物から分泌されたフラボノイドを感知し、シデロフォア合成系を含む遺伝子群を誘導する。錯形成した鉄イオンは、枯草菌のみならず植物にも取り込まれ、鉄含有光合成タンパク質などに利用される。光合成能が高まることで根圏に放出される栄養分も増す。枯草菌はフラボノイドから根圏にいることを感知し、他の根圏微生物が産生する抗生物質への耐性を高める。

必要なレベルだけ誘導して抗菌活性のあるフラボノイドを分解・解毒し、また同時に *lmrB* 発現を誘導して薬剤耐性を高めることで抗生物質を産生する他の根圏微生物群に対抗するという根圏適応モデルが考えられた(図2)。

QdoR に関して、その立体構造と同ファミリーに属する他の転写因子のリガンド複合体の立体構造をもとに、QdoR 内でフラボノイド認識・応答に重要なアミノ酸残基をいくつか予想し、各々をアラニン置換した変異型 QdoR を構築した。それらの特性解析によって、DNA 結合とフラボノイド応答に重要な三つの芳香族アミノ酸残基が同定された。

2. YetL 制御系と Fur 制御系：DNA マイクロアレイ解析で見いだされた新たなフラボノイド応答性制御系

DNA マイクロアレイ解析を用いてフラボノイドで誘導される新たな遺伝子群を探索した結果、推定モノオキシゲナーゼをコードする *yetM* 遺伝子とその候補として見いだされた。枯草菌ゲノム上で *yetM* 遺伝子の近傍上流に MarR ファミリー転写因子をコードする *yetL* 遺伝子が逆向きで存在しており、YetL の標的が *yetM* であると予想した。DNA 結合実験とレポーター実験の結果、YetL が *yetM* 遺伝子だけでなく自身をコードする *yetL* 遺伝子も各々のシス配列に結合することで抑制し、LmrA/QdoR とは異なるフラボノイド応答特異性で脱抑制することが示された。また YetL の応答特性と YetM の推定機能から、この制御系がフラボノイド分解にかかわることが予想された。

DNA マイクロアレイ解析の結果からは、鉄イオン応答性転写抑制因子として知られる Fur が、本来のエフェクターである鉄イオンだけでなく、フラボノイドに対しても応答することも示唆された。Fur は Fur ファミリーに属し、通常は鉄イオン取り込みにかかわる 40 余りの遺伝子群を各シス配列に結合することで抑制し、鉄イオン欠乏に応答して脱抑制する。DNA 結合実験とレポーター実験の結果、鉄イオン濃度に依存せずにフィセチンなどで Fur による抑制が部分的に解除されることが示された。Fur の標的にはシデロフォア合成遺伝子群も含まれ、植物はフラボノイドを介して枯草菌のシデロフォア産生を促し、自身の鉄イオンの取り込みに利用するというフラボノイドの新たな生理的役割が見いだされた。鉄イオン取り込

みの向上で鉄含有光合成タンパク質などの生産が増し、生育促進につながる。同時に植物から土壤に放出される栄養分も増すので、植物と枯草菌はこの制御系によって互いに利益を高めているといえる(図2)。

3. YcnK 制御系：枯草菌がもつユニークな銅イオン取り込み制御系

鉄イオンとともに銅イオンも生命活動に必須の金属イオンである。一方で、過剰の銅イオンは細胞毒性を及ぼすので、そのホメオスタシスは重要な生理機能の一つある。枯草菌では、CsoR 転写因子が銅イオン排出系をコードする *copZA* オペロンを負に制御しており、銅イオン過剰条件でこれを脱抑制する。一方、筆者らがその制御機構を明らかにした YcnK 転写因子は *ycnKII* オペロンを抑制し、銅イオン飢餓で脱抑制して銅イオンを取り込むための YcnJ が生産される。また、CsoR もこのオペロンの制御に CopZA と YcnK を介して間接的に関与することも明らかにした。これまで細菌の銅イオン排出機構に関する研究は多いが、取り込みに関する研究はほとんどなく、また *ycnKII* オペロンはバシラス属の狭いサブグループでのみ保存されている。YcnK は DeoR ファミリーに属するが、これまで報告のある同ファミリーの転写因子とは異なる特徴的な構造をとり、合わせて YcnK 制御系のユニークさを際立たせている。YcnK および CsoR 制御系を改変して取り込み能を高めることで、土壤を汚染する銅などの重金属を枯草菌細胞内に隔離し、植物の生育に適した土壤環境に改善するといった応用が期待される。

おわりに

これまで根粒菌などのグラム陰性細菌では一つの菌種がフラボノイド応答性転写制御系を複数もつことが報告されていたが、グラム陽性細菌においてはここで紹介した枯草菌での事例が初めてとなる。現段階で三つのフラボノイド応答性制御系が見いだされているが、これら以外にも存在するか否か、枯草菌で更なる探索と解析を進めると同時に、見つかった系を手がかりに他のグラム陽性細菌にも対象を広げたい。また、実際に植物と共培養した際のこれらの制御系の応答と、植物の生育に与える影響についても解析を進めていきたい。これまで類を見ない枯草菌の銅イオン取り込み制御系を応用して銅などの重金属を隔離して植物の生育に適した土壤環境に改善することが期待され、重金属を含む土壤で植物と共存させる方法で今後調べたいと思っている。

謝辞 本研究は、福山大学生命工学部生物工学科ゲノム科学研究室にて行われました。終始ご指導賜りました同研究室の藤田泰太郎先生に心より感謝申し上げます。また、一緒に研究に取り組んでくれた学生諸君、スタッフの方々、ならびに研究を進めるにあたりご助言いただいた吉田健一先生(現・神戸大学)に深く感謝申し上げます。学生のときよりご指導いただいている東北大学大学院工学研究科の西野徳三先生と中山 亨先生、博士研究員として所属して以来ご指導いただいている大阪大学大学院工学研究科の小林昭雄先生と福岡英一郎先生に深く感謝申し上げます。両研究室のスタッフの方々、当時の学生の方々にもたいへんお世話になりました。最後に、本賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長の山田 守先生ならびにご支援賜りました諸先生に厚く御礼申し上げます。