

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 15 年度博士課程 進学  
氏 名 丸 幸弘  
指導教員名 小柳津 広志

### 論文題目

根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 - 熱帯性マメ科植物 *Sesbania rostrata* 共生系における根粒成熟過程に関する研究

マメ科植物が栄養不足の土壌でも生育でき、輪作などによって土壌を肥沃にすることができることは、昔から経験的に知られており、農業にも大いに利用されてきた。また、遺伝子組換えによって根粒形成能をマメ科植物以外の作物に付与することで効率的に窒素源を作物に供給することも、環境負荷を与えずに持続可能な生産を行う上で大きく貢献すると期待されている。

*Azorhizobium caulinodans* ORS571 は熱帯性マメ科植物に共生することで、根粒のみならず茎粒を形成することが知られている。この茎粒は成長が早く接種後約 10 日で成熟し、また茎粒は地上の不定根の部分にでき、あらかじめ部位を特定できるので観察するのが容易である。現在、根粒形成に関する研究は、根粒菌が宿主となる植物体へ感染するまでの根粒形成初期過程の研究が主流であり、根粒原基が形成されて根粒菌が侵入した後、根粒が成熟し窒素固定を開始するまでの間（成熟過程）にどのようなシグナル交換が起こり、遺伝子が発現しているかはほとんど解明されていない。

そこで本研究では *A. caulinodans* - *S. rostrata* 共生系の利点を利用し、Tn5 挿入変異株を接種試験により簡便にスクリーニングする系を確立し、未だ研究の進んでいない根粒成熟過程に関与する根粒菌の遺伝子の機能解明を試みた。

## 1、*A. caulinodans* ORS571 の Tn5 挿入による莖粒未成熟変異株の取得

*A. caulinodans* への Tn5 トランスポゾンの挿入は、プロモーターレスの *gusA* 遺伝子、恒常発現の *nptII* 遺伝子、*gfp* 遺伝子のカセットをもちつ Tn5 を含むプラスミドベクター pFAJ1819 を保持した *E. coli* S17-1 による接合伝達法を用いた。その結果、1000 の Km 耐性菌株のコロニーを取得した。得られた 1000 株の *A. caulinodans* の Tn5 挿入変異株を接種試験により選別し、莖粒が成熟しない変異型株を 7 株(ORS571-C1, ORS571-C12, ORS571-C30, ORS571-C33, ORS571-C38, ORS571-C49)単離した。本研究では感染糸を伸ばし細胞内部に進入するが、その後成熟がとまり、莖粒が成熟するにいたることができなくなっている ORS571-C12, ORS571-C24 の 2 株に焦点を絞り研究を進めた。

## 2、変異型株 ORS571-C12 と ORS571-C24 の Tn5 挿入部位の同定と遺伝子解析

サザンハイブリダイゼーションによって Tn5 トランスポゾンの挿入の確認を行った結果、Tn5 はゲノム上の 1 箇所に挿入されていることを確認することができた。次に挿入部位の同定をするため、それぞれの変異株のゲノムを *XhoI* で消化し、Tn5 上にある Km 遺伝子断片と根粒菌のゲノム未知領域遺伝子断片を保有する領域を、ショットガンクローニングにより単離した。その結果、ORS571-C12, ORS571-C24 のそれぞれ 645bp、1541bp の未知領域を含む遺伝子断片クローンが得られた。シーケンスの結果、ORS571-C12 は、*Bradyrhizobium japonicum* の *blr2921*(Hypothetical protein)と 76%、ORS571-C24 は、*B. japonicum* の *blr4322* (TetR family transcriptional regulatory protein) と 47%の相同性を示し、この推定 ORF ( open reading frame ) 上に Tn5 が挿入されていることがわかった。次に挿入部位の遺伝子の全長と周辺部位の解析をするために、野生株のゲノムコスミドライブラリーを作成し、遺伝子の全長を含むシャロミドベクターのスクリーニングを行なった。それぞれのシャロミドベクターを primer walking シーケンスを行なうことで Tn5 挿入周辺部位 6813bp (*XhoI*~*EcoRI*), 6921bp (*BamHI*~*HindIII*) を得た。FASTA 検索を行った結果、ORS571-C12 は挿入部位も含めて 6 つの推定 ORF が、ORS571-C24 は挿入部位も含めて 4 つの推定 ORF を見出した。ORS571-C12 は、*B. japonicum* の推定 ORF である *blI2920*, *blr2921*, *blr2922*, *blr2923*, *blr2924*, *blr2925*, *blr2926* とそれぞれアミノ酸レベルで 72%, 81%, 82%, 74%, 79%, 87%, 85%の高い相同性を示した。ORS571-C24 は、*B. japonicum* の推定 ORF である *blr4322*, *blI4321*, *blI4320*, *blI4319* とそれぞれアミノ酸レベルで 47%, 56%, 55%, 71%の高い相同性を示した。この情報から、ORS571-C12 の挿入部位の周辺部位の一連の構造は ABC transporter を構成する一連のタンパク質であることが推測され、ORS571-C24 は resistance/nodulation/cell division (RND) family に属する Multi-drug efflux system を形成することが推測された。

この変異株のコンプリメンテーションテストを上記の遺伝子破壊部分を含むシャロミドベクターを用いて行なった結果、莖粒成熟能は回復した。さらに、Tn5 に組み込まれるプロモーターレスの *gusA* 遺伝子が根粒中で発現していることを確認し、Tn5 が破壊した推定 ORF は根粒中で発現する ORF 上に挿入されたことを確かめた。

### 3、変異型株 ORS571-C12 と ORS571-C24 の表現型の解析

根粒着生数を比較したところ、ORS571-C12 は野生株と同数の着生数を示したが、ORS571-C24 は野生株に比べ 2 倍の無効根粒が形成された。アセチレン還元活性を用いて窒素固定活性を確認した結果、それぞれの変異株を接種した茎粒では窒素固定能がないことが明らかとなった。共焦点レーザー顕微鏡による観察からは、ORS571-C12 と ORS571-C24 は内部への侵入および細胞への進入は見られるものの、感染細胞の数は非常に少ないことがわかった。さらに、電子顕微鏡により茎粒内部を詳細に観察したところ、野生株を接種した茎粒では感染細胞と非感染細胞が明確に別れ、感染細胞において数個の根粒菌がバクテロイド膜の中に存在し、活動を行っている様子が観察された。一方、ORS571-C12 では、バクテロイド膜の内部に 1 個しか存在せず、それぞればらばらに存在している様子が観察され、ORS571-C24 では、バクテロイドの形成が起こってはいるものの、感染細胞の細胞膜が細胞壁と分離し、細胞が縮小している感染細胞が見受けられ、感染細胞数も減少していた。さらに、過去にこのような表現形が LPS や EPS の構造の変化により起こるといった報告があるため、それぞれの変異型株の LPS を抽出し SDS-PAGE を行い銀染色により LPS の比較を行なった。その結果、LPS に異常は見られなかった。

以上の結果、少なくとも Tn5 の挿入部分の遺伝子の変異により根粒の成熟が変化し、詳細な表現型の解析により、今までに報告されている変異株とは違い、新規の根粒形成関与遺伝子であることが分かった。

### 4、TetR family に Tn5 が挿入された変異型株 ORS571-C24 の遺伝子解析

TetR family の転写因子が根粒形成にどのように関与するかを検討するため、ORS571-C24 に着目し、さらに研究を行った。ORS571-C24 のそれぞれの遺伝子を、*sreRABC* (*sre* stands for *symbiosis related RND efflux transporter*) とし、これらの遺伝子を RT-PCR と遺伝子破壊 (ホモロガスリコンビネーション) を用いて解析した。

一般的に、TetR family の制御因子は、上流もしくは下流にある遺伝子やオペロンのオペレーター領域に結合し、発現を抑制している場合が多い。シークエンス解析の結果から、*sreA* の上流に回文構造をとるコンセンサス配列 AAC-N6-GTT の存在が明らかになった。したがって、SreR がこのコンセンサス配列に結合し、上流にある *sreA* 以下の遺伝子の発現を制御している可能性がある。そこで、野生型株と ORS571-C24 の Free-living (非共生状態) の RNA の抽出を行い、RT-PCR 法によって野生型株と ORS571-C24 の *sreA* の発現を比較した。その結果、野生型株では Free-living での発現が確認されたが、ORS571-C24 では発現が低下していた。このことから、*sreR* は何らかの形で *sreA* の発現を制御しており、*sreR* の変異によって *sreA* の発現が低下した可能性が示唆された。さらに、野生型株の Free-living と茎粒中のバクテロイドにおいて発現を比較することで、*sreA* の発現と茎粒形成との関連性を検討した。その結果、茎粒中のバクテロイドでは *sreA* の発現が Free-living 時よりも上昇していることが分かった。

次に *sreA* 遺伝子の Gm カセットによる破壊を行ない、莖粒への接種試験を行なった。その結果、成熟莖粒を形成しないことが観察できた。これらの結果から、*sreA* は根粒中で発現して機能を果たしており、ORS571-C24 では *sreR* の機能が不完全になることによって *sreA* の根粒中のバクテロイド内での発現が低下し、その発現低下によって莖粒形成に異常が生じている可能性が示唆された。

本研究では根粒菌側の成熟に関与する新規の遺伝子を単離、解析する方法を確立し、1000 株の変異型株から 2 つの新規遺伝子の単離に成功した。また、TetR family と相同性のある転写制御遺伝子である *sreR* の遺伝子の制御関係を明らかにした。本研究の規模をさらに拡大することで、数多くの変異型株の取得と新規遺伝子の単離が可能であり、また、さらなる詳細な遺伝子の解析を進めることで、根粒形成の成熟過程のメカニズムの解明に貢献することが期待される。