

共生の初期段階でゲニステインに応答するダイズ根粒菌  
新規ゲノム領域の解析

平成26年3月  
(2014)

連合農学研究科  
博士課程 生物資源科学専攻

武島 圭介

# 目次

序論	2
----	---

## 第1章

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* TypeIII 分泌系の発現と  
根粒着生における低温の影響

緒論	5
----	---

材料および方法	8
---------	---

結果	16
----	----

考察	33
----	----

## 第二章

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の新規ゲノム領域 (BjG30)  
の発現解析

緒論	36
----	----

材料および方法	39
---------	----

結果	49
----	----

考察	60
----	----

総合考察	65
------	----

参考文献	69
------	----

摘要	84
----	----

謝辞	86
----	----

## 序論

地球に存在する窒素の大部分は地殻中（97.8%）と大気中（2%）に存在するが、土壌など、生物が利用できる環境中に存在する窒素は全体の 0.2%程度と言われている。窒素は微生物のタンパク質や核酸等の重要な構成要素の一つであり、空気中の窒素を利用するためには、窒素分子を反応性の高い窒素化合物に変換する窒素固定が必要である。

窒素固定は、窒素固定細菌による生物学的窒素固定（biological nitrogen fixation, BNF）とハーバー・ボッシュ法による化学的窒素固定に分けられる。化学的窒素固定により生産された窒素肥料は、世界の窒素肥料生産の 48%を占めるとされ(22)、農業関連で、年間約 8 千万トン程度の窒素が化学窒素肥料として用いられている。ハーバー・ボッシュ法は、高温高压条件を必要とし、大量のエネルギーを消費するため、環境への負荷が大きい(57)。一方、生物学的窒素固定は、窒素固定細菌のニトロゲナーゼが触媒する反応により窒素分子からアンモニアが合成され、 $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$  で表される。この反応は常温常圧で行なわれるため、化学的窒素固定のように環境に負荷をかけない。従って、窒素固定細菌の農業への利用は化学的窒素肥料を軽減し環境への負荷を軽減できるため重要である。

共生的窒素固定細菌は、植物から糖や有機酸、アミノ酸などの栄養を受け取り、植物へ窒素固定により得た窒素を供給する。根粒菌とフランキア属の細菌は、それぞれ、マメ科植物、アクチノリザル植物の根に根粒を形成し、共生的窒素固定を行うことが知られている(2)。根粒菌は  $\alpha$  プロテオバクテリア綱に属しており、16S rRNA 系統解析により、*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*,

*Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* の 5 つの属に分類される (56)。根粒菌の共生過程に関わる研究も進められ、次のように考えられている。即ち、宿主根の根毛に根粒菌が接近すると同時に、宿主植物からは固有の flavonoid が分泌され、それに応答して根粒菌では根粒形成遺伝子 (*nod/nol/noe*) が発現し、Nod ファクターと呼ばれるリポキチンオリゴサッカライドが生産、分泌される (66)。Nod ファクターが植物の Nod factor receptor (NFR) により受容されると、植物側では、根粒形成に関わる遺伝子群の発現が誘導される (31)。その結果、根粒菌を巻き込むように根毛がカーリングし、根毛内部に感染糸が形成されるとともに、根の皮層細胞の分裂が促進され、根粒原基が形成される。根粒菌は感染糸を通り、根粒原基細胞の内部へと侵入する (19)。侵入した根粒菌は、植物由来の膜構造 (シンビオソーム) に包まれ、バクテロイドと呼ばれる”窒素固定器官”へと分化する。この過程で、細胞分裂能の喪失、多核化、細胞形状の変化 (棍棒型、Y 字型等) を起こすとともに、窒素固定に関与する遺伝子 (*fix*, *nif* 等) が発現し、植物から供給される有機酸をエネルギー源として窒素固定が行われる (67, 68)。

根粒菌の全ゲノム解析も精力的に行われ、2000 年にミヤコグサを宿主とする *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (41)、2001 年にアルファルファを宿主とする *Sinorhizobium meliloti* USDA1021 (25)、2002 年にダイズを宿主とする *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (42)、2006 年にインゲンを宿主とする *Rhizobium etli* CFN42、及びソラマメを宿主とする *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain 3841 (27, 91)、2008 年にはセสบニアを宿主とする *Azorhizobium caulinodans* ORS571 のゲノムが解読された (48)。

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 のゲノム解析に利用されたゲノムクローンで作成されたマクロアレイを用い、genistein や種子の抽出液で誘導発現さ

れる根粒菌遺伝子が網羅的に解析され、共生領域内と共生領域外にそれぞれ特徴的な遺伝子発現領域が見い出された (86)。本論文では、共生領域内の type three secretion system (T3SS) と共生領域外でこれまでに全く報告されていない新規な遺伝子領域、*Bradyrhizobium japonicum* genistein-induced genes (BjG30) に着目し、論文全体を2つの章で構成した。第1章は、「ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* TypeIII 分泌系の発現と根粒着生における低温の影響」について論じ、第2章は「ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の新規ゲノム領域 (BjG30) の発現解析」について、薬剤排出ポンプ・PHB 代謝系の発現と共生における役割を論じる。

# 第1章

## ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* TypeIII 分泌系の発現と 根粒着生における低温の影響

### 緒論

Nod ファクターの基本骨格は、全ての根粒菌に共通して存在する *nodABC* 遺伝子により合成され、種により特異的な *nod* 遺伝子により側鎖が修飾される (73)。種に特異的な修飾を受けた Nod ファクターはそれぞれ特異的な宿主に受容されるため、Nod ファクターは宿主特異性に関係していると考えられている (8)。ダイズに含まれる主要な flavonoid には genistein と daidzein がある。ダイズ根粒菌 *B. japonicum* の 2 つの *nodD* 遺伝子 (*nodD1*, *nodD2*) の内、*nodD1* 遺伝子がこれらの flavonoid に応答発現し、*nodYABCSUJI* オペロンのプロモーター領域にある *nod* box に結合して、Nod ファクターが合成される (73)。*B. japonicum* には、NodD1 のほかに NodV と NodW が関与し、NodW は NodV によってリン酸化されて活性化することにより genistein を感知し、*nod* 遺伝子群を発現させると考えられている (53)。共生におけるダイズ根粒菌遺伝子の発現解析には、genistein や daidzein が誘導物質として用いられてきたが、soybean seed extract (SSE) (43) で根粒菌を処理すると genistein や daidzein で処理した場合に比べ、*nod* 遺伝子がより強く発現し、*nodW*, *nodD1* が変異しても *nod* 遺伝子の発現が見られた (75)。genistein と daidzein は SSE に含まれる主要な flavonoid であることが確認されているが (78)、その他

にも、ダイズ由来のタンパク質や炭水化物等の成分が溶出していると考えられることから、実際の土壌中における根粒菌と宿主植物とのシグナル応答による根粒菌遺伝子の発現には、flavonoid による相互作用に加え、その複合的な作用や他のダイズ由来の成分が共生における遺伝子発現に影響を与えている可能性がある。

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 の全ゲノムは 9.1Mb から構成され、ゲノム上の 1.68Mbp~2.36Mbp の位置に平均 GC 含量がゲノム全体に比べ 4.7%低い共生領域 (symbiosis island) と呼ばれる遺伝子領域が挿入されており、窒素固定関連遺伝子の *nif*, *fix* や Nod ファクター合成関連遺伝子の *nod*, *noe*, *noI* といった主要な共生窒素固定に関わる遺伝子が存在するが、*B. japonicum* の共生領域には III 型分泌装置 (T3SS) と呼ばれるタンパク質分泌機構をコードする遺伝子群も存在している (29)。T3SS はグラム陰性細菌に見られるタンパク分泌装置であり、根粒菌では *B. japonicum* USDA110(44) の他、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 (41), *Rhizobium* sp. NGR234(23), *Sinorhizobium fredii* USDA257(45)にも存在が確認されている。*B. japonicum* の T3SS は、genistein に応答して発現する以下のようなモデルが提唱されている (45、85)。即ち、NodD1 と NodV、NodW が genistein を感知し、T3SS 遺伝子群の *ttsI* の転写を活性化させる。TtsI はプロモーター領域にある *tts* ボックスに結合し、T3SS 遺伝子群の転写を促進させる (39 : Fig. 1)。根粒菌と宿主植物の共生系では、T3SS により分泌されるエフェクターは Nops (nodulation outer protein) と呼ばれ、宿主植物の防御反応を促進、或は抑制する方向に働くことが明らかになってきている。例えば、T3SS を欠失した *Mesorhizobium loti* は、ミヤコグサ属の *Lotus cornicalatus* における根粒着生が抑制されるが、異なるミヤコグサ属の *Lotus halophilus* における根粒着生は促進され、宿主により異なる

表現型を示した (60)。

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 全ゲノムの塩基配列に基づいて DNA マクロアレイが作成された (37)。マクロアレイは、ダイズ根粒菌全ゲノムの遺伝子解析に用いられたクローンライブラリー (M13mp18 ベクターに組み込まれた平均 2.7kb のダイズ根粒菌ゲノムのクローン) を PCR 増幅し、ナイロンメンブレンにスポットする方法で作成され、3960 個のクローンの断片より成り、全ゲノムの 98.4% をカバーしている。作成されたマクロアレイを用いて、SSE 及び genistein で応答発現する遺伝子の網羅的な発現解析が行なわれた結果、SSE により共生領域内に 4 つの大きな遺伝子群 (Expression Cluster; EC I-IV) の発現が見い出された (86)。EC I-IV は 10 個以上の隣り合ったクローンから構成され、EC-I は *noIK, noeI, nodM, noeD*, EC-II は *nodV, nodW*, EC-III は T3SS、EC-IV は *nodDI, nodYABCSUJI* などの共生に関わる遺伝子が含まれており、SSE、或は genistein の処理後 30 分で EC-II が発現し、6 時間後には EC-I、EC-IV、12 時間後には EC-III (但し SSE による誘導は genistein より強い) の発現が見られた。これらの結果は、*nod* 遺伝子 (*nodW, nodV, nodDI*) の発現の後に T3SS が発現することを示しており、genistein による T3SS の発現モデルと一致していた (44)。しかし、T3SS の発現量は genistein よりも SSE で顕著に高く、T3SS の十分な発現にはゲニステイン以外の因子が関係している可能性が示唆された。

共生過程に影響を与える要因には、塩濃度、pH、栄養条件、乾燥、温度等が報告されている (92)。ダイズ根粒菌と宿主ダイズの共生に適した根圏温度 (RZT) は 25~30°C と報告されており (14, 38)、RZT が 17.5°C 以下になると、根毛のカーリングや感染糸への侵入が遅れ、根粒着生の遅滞に伴う窒素固定の遅れが生じる (93, 94)。また、ダイズの生育初期における低温は総節数や総



花数が減少し、結果的にマメ収量の減少になる。北海道十勝地方におけるダイズの播種・発芽時期である 5~6 月は 15°C前後と低いため、低温条件下における根粒菌の共生能の研究は重要な課題である。これまでに、genistein を宿主植物あるいは土壌に加えることで、低温による根粒着生の抑制がある程度改善されることが報告されている(5, 50, 95)。しかし、低温における遺伝子レベルでの根粒菌と宿主ダイズの相互作用についてはほとんど報告されていない。本章では、低温条件を北海道のダイズ播種時期の 15°Cに設定し、SSE と genistein に応答するダイズ根粒菌遺伝子の網羅的な発現プロファイルを 30°Cと比較することにより、根粒菌と宿主ダイズの共生系において、低温で影響を受ける根粒菌遺伝子とその発現系を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株及び培養方法

ダイズ根粒菌には *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 を用いた。*nodD2* 欠失変異株 (*B. japonicum* Δ370) (30)、及び *nolA* 欠失変異株 (*B. japonicum* BJB3) (26) は Gary Stacey 教授から分譲された。各菌株は yeast-mannitol broth(YMB)培地(39)で 30°Cで培養した。必要に応じて以下の抗生物質を加えた： chloramphenicol:30 μg/ml、streptomycin:50 μg/ml、kanamycin:50 μg/ml。

### 2. 根粒菌遺伝子の誘導発現

#### 2-1. ダイズ種子の抽出液 (SSE) の調製

SSE の調製は、Stacey らの方法を参考に行った (78)。即ち、ダイズ種子 (*G. max* L. Merr. cv. Enrei ) 1000 粒を 4 本の 500ml 容三角フラスコに分け、滅菌蒸留水で 2 回洗浄後、0.01N HCl 250ml で 15 分間殺菌し、滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。これに 1L の 50% ethanol (250ml×4) を加えて、30°C、120rpm、12 時間で振とうした。上澄みを 0.2 μm フィルター (ADVANTEC) でろ過・除菌後、ロータリーエバポレーター(40°C)で、300ml 程度にまで濃縮し、凍結乾燥した。これに 50% ethanol 100ml 加えて溶解後、0.2 μm フィルターで除菌し、-20°Cで凍結保存した。

## 2-2. 菌体の genistein/SSE 処理

根粒菌 (*B. japonicum* USDA110) を抗生物質 (親株:chloramphenicol 30 μg/ml , Δ 370: kanamycin 50 μg/ml、chloramphenicol 30 μg/ml, BJB3: streptomycin 50 μg/ml、spectinomycin 50 μg/ml) を加えた 20ml の YMB 培地で、3 日間、30°C、130rpm で振とう培養した。これに 200ml の YMB 培地を加え、対数増殖期 ( $0. D_{600}=0.4$ ) まで 30°C、130rpm で振とう培養した。培養した菌液は、抗生物質を含まない YMB 培地で  $OD_{600}=0.1$  になるように希釈し、SSE (20 μl/ml of culture) または genistein (終濃度 5 μM) を添加し、30°Cまたは 15°C、130rpm で 12 時間から 48 時間振とう培養した。

## 3. 宿主植物への接種試験

誘導処理した菌液を遠心分離 (4°C, 8000rpm, 5min) し、上清を除去後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20min) したphosphate-buffered saline (PBS) を 50ml加えて菌体を洗浄した。この操作を3回繰り返した後、PBSで $10^7$ cfu/mlに菌液を調製した。300ml容ガラスポット (柏洋硝子) の底に、水洗いした軽石を

1cm程度敷き詰め、給水用に半分に切ったストローを置いた。F0バーミキュライト(太平洋石炭販売輸送)を詰め、Norris&Date氏液(20)を1ポットにつき100ml添加し、アルミホイルで蓋をしてオートクレーブ滅菌した。ダイズ種子は、滅菌蒸留水で2回洗浄し、70%ethanol中に1分間置き、その後に滅菌蒸留水で3回洗浄した。そして、次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度5%)中に2分間置き、滅菌蒸留水で6回洗浄した。滅菌したポットに滅菌蒸留水を50ml注ぎ、バーミキュライト表面に作成した深さ2cm程度のくぼみに、表面殺菌した種子をポットあたり3粒ずつ、種子のへそを下にして置いた。そして、種子あたり調製した菌液を1mlずつ接種し、バーミキュライトを軽くかぶせてから、アルミホイルで軽く蓋をした。3日後に発芽を確認してから蓋を外し、適時滅菌蒸留水を与えた。栽培は、温室あるいは15°Cで栽培する場合は人工気象器(BiOTORON)内(明期:14時間15°C;暗期:10時間15°C)で行った。接種後25日目まで栽培後、地上部と地下部と切り分けた。地下部は蒸留水で洗浄し、バーミキュライトを落としてからFAA固定液(70%:ethanol:無水酢酸:ホルムアルデヒド=90:5:5 v/v)に浸し1日以上固定した。蒸留水で洗浄後、0.003%(w/v)トルイジンブルーで10分間室温で染色した。蒸留水で洗浄後、実体顕微鏡で根粒(根粒原基)数を計測した。根粒の成熟度は、直径が0.2mm以下:stage 1, 0.2~0.5mm:stage 2, 0.5mm以上:stage 3の3段階に分けた(Fig. 2)。

## 4. RNAの単離

### 4-1 RNAの抽出

結晶フェノール 35g を三角フラスコに入れ、65°Cの恒温槽で融解させ、700mlの99.5% ethanolと混合し、5%(w/v)フェノール/ethanolとした。菌体を誘導処理後、mRNAの分解を最小限に抑えるため、速やかに-20°Cの5%

(w/v) フェノール/ethanol を菌液 200ml に対し等量を加え混合後、250ml 容ステンレス遠沈管で遠心分離 (9,000rpm 15 分) した。上清を捨てピペッティングにより 1.5ml 容チューブに集菌し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

菌ペレットに超純水  $200\ \mu\text{l}$  を加え、氷上に置いたオートクレーブ済みの乳鉢中に入れた後、液体窒素を直接加えて菌体を凍結状態で乳棒で十分に磨り潰した。そして、ISOGEN-LS (Nippon Gene) を 1ml 加え 20 分以上、混合液が融解し、液体になるまで乳棒で十分に混合・破碎した。混合液をピペットでガラスホモジナイザーに移し、ペッスルで 100 回程度上下に往復する操作でホモジナイズした。これを 1.5ml 容チューブに移し、常温に 5 分間静置後、クロロホルム  $200\ \mu\text{l}$  を加え、15 秒間ボルテックスで混合し、常温に 5 分間静置した。15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離後、上層 (RNA 層) をピペットで新しい 2ml 容チューブに移し、これに等量のイソプロパノールを加えて $-20^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。遠心分離 (15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) で RNA を沈殿後、上清を捨て残った RNA のペレットに 80%ethanol を 1ml 加えて遠心分離する操作を 2 回繰り返し、RNA を洗浄した。上清を捨て、RNA のペレットを 5 分間クリーンベンチ中で風乾後、超純水  $50\ \mu\text{l}$  に溶解した。

#### 4-2 total RNA の精製

RNA 溶液  $50\ \mu\text{l}$  に対して DNaseI (5 units/ $\mu\text{l}$ 、TaKaRa) を  $2.3\ \mu\text{l}$ 、DNaseI に付属の 10 $\times$ buffer を  $5.8\ \mu\text{l}$  加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分反応させ DNA を除去した。そして、超純水を  $200\ \mu\text{l}$ 、ISOGEN-LS を  $750\ \mu\text{l}$  加えて混合後、常温に 5 分間静置した。クロロホルム  $200\ \mu\text{l}$  を加え、15 秒間ボルテックスで混合し、常温に 5 分間静置後、遠心分離 (15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) により上層 (RNA 層) だけをピペットで新しい 2ml 容チューブに移した。これに等量のイソプロパノール

を加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ に一晩静置後、遠心分離 ( $15000\text{rpm}$ ,  $15$  分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) で RNA を沈殿させた。RNA の抽出時 (4-1) と同様の操作で RNA を洗浄し、 $50\mu\text{l}$  の total RNA 溶液を得た。

#### 4-3 mRNA の単離

MICROBExpress™ Kit (Ambion)を用いて、付属のプロトコールに従って mRNA を精製した。即ち、total RNA 溶液 (最大  $15\mu\text{l}$  に RNA  $2\sim 10\mu\text{g}$  を含む) と Binding buffer を  $200\mu\text{l}$  混合し、Capture Oligo Mix を  $4\mu\text{l}$  加えて混合し、 $70^{\circ}\text{C}$  で  $10$  分間、 $37^{\circ}\text{C}$  で  $15$  分間インキュベートした。その間に、Oligo MagBeads  $50\mu\text{l}$  を  $1.5\text{ml}$  容チューブに取り、マグネットスタンドにチューブを取り付け  $3$  分ほど静置し、Oligo MagBeads をペレット状に吸着させた。上清を取り除き超純水を  $50\mu\text{l}$  加えて懸濁し、再びマグネットスタンドで Oligo Magbeads を吸着させた。上清を取り除き、Binding buffer を  $50\mu\text{l}$  加えて懸濁し、同様の操作で Oligo Magbeads を吸着させた。この操作をもう一度繰り返し、最終的に Oligo Magbeads に Binding buffer を  $50\mu\text{l}$  懸濁し、 $37^{\circ}\text{C}$  で保温した。インキュベートを終えた total RNA と Capture Oligo Mix の混合液に Binding buffer に懸濁した Oligo Magbeads を  $50\mu\text{l}$  加え、よく混和して  $37^{\circ}\text{C}$  で  $15$  分インキュベートした。そして、マグネットスタンドで Oligo Magbeads を吸着させ、上清を新たな  $1.5\text{ml}$  容チューブに移した。残った Oligo Magbeads は、 $37^{\circ}\text{C}$  で保温した Wash Solution に懸濁し、マグネットスタンドで Oligo Magbeads を吸着させ、上清を前の操作と同じ  $1.5\text{ml}$  容チューブに移した。 $1.5\text{ml}$  容チューブに集めた上清の体積に対して  $1/10$  量の  $3\text{M}$  酢酸ナトリウム溶液と  $1/50$  量のグリコーゲン ( $5\text{mg}/\text{ml}$ ) を加え、これに  $3$  倍量の  $100\%$  ethanol を加えて混合し、 $-20^{\circ}\text{C}$ に一晩置いた後、遠心分離 ( $15000\text{rpm}$ ,  $15$  分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。

RNA の抽出時 (4-1) と同様の操作で RNA を洗浄し、 $50\mu\text{l}$  の mRNA 溶液を得た。

#### 4-4 アガロースゲル電気泳動

RNA を 1%アガロースで電気泳動した。即ち、アガロース粉末を TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0) に溶解し、エチジウムブロミド (EtBr :  $0.5\mu\text{g/ml}$ ) を添加した TAE アガロースゲルを作成した。試料の 1/10 量の  $10\times$  loading buffer (TaKaRa) を添加し、 $70^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベート後、氷上に 5 分間静置した。TAE アガロースゲルを GelMate 2000 電気泳動装置にセットし、試料を 100V、30 分で泳動した (泳動用 buffer : TAE buffer)。泳動後、トランスイルミネーター (254nm) で RNA を確認した。

### 5. マクロアレイ解析

#### 5-1. [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]dCTP による cDNA の標識

精製した mRNA を鋳型として [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]dCTP で標識した cDNA を逆転写した。mRNA の濃度を  $160\sim 180\mu\text{g/ml}$  になるよう超純水で希釈し、 $12.25\mu\text{l}$  を  $1.5\text{ml}$  容チューブに加え、 $94^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートし、氷上に 5 分間置いた。Random primer ( $500\text{ng/ml}$ : Invitrogen) を  $0.75\mu\text{l}$  ずつ加え、 $70^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベート後、以下の試薬を加えた：

---

dd(AGT) TP mix*	$1.5\mu\text{l}$
$5\times$ First strand buffer**	$6.0\mu\text{l}$
0.1M DDT**	$1.5\mu\text{l}$
RNaseOUT ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ : Invitrogen)	$1.5\mu\text{l}$

[ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP\*\*\* 5  $\mu$  l

---

\* 100mM ddNTP set (Promega) より, 100mM ddATP, 100mM ddGTP, 100mM ddTTP をそれぞれ 20  $\mu$  l ずつと超純水 40  $\mu$  l を混合した.

\*\* M-MLV RT Buffer kit (Invitrogen) より

\*\*\* (Deoxycytidine 5'-triphosphate, tetra (triethylammonium) salt, [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-9.25MBq (PerkinElmer Life & Analytical Sciences)

以上を加え 25°C で 10 分、42°C 2 分間インキュベート後、Superscript II (Invitrogen) を 1.5  $\mu$  l 加え、42°C で 2 時間以上インキュベートした。インキュベートを終えた混合液を新たな 1.5ml 容チューブにセットした Auto Seq G-50 (Amersham Biosciences) 樹脂上に乗せ、遠心分離 (4600rpm, 1 分間) する操作により、1.5ml チューブに精製した cDNA 溶液を回収した。cDNA 溶液は 94°C で 5 分間インキュベートし、氷上に 5 分以上置いた。以上により得られた [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP で標識された cDNA をプローブとしてマクロアレイシートとハイブリダイズさせた。

## 5-2. アレイシートと cDNA のハイブリダイゼーション

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 全ゲノムの塩基配列に基づいて作成された DNA マクロアレイシート (37) をナイロンメッシュで挟み、2 枚を 1 本のハイブリボトル (高さ 150mm × 直径 35mm) に入れ、Hybridization Mixture を 50ml 加え、55°C で 2 時間以上プレハイブリダイゼーションした。そして Mixture を 25ml 捨て、<sup>33</sup>P-dCTP で標識した cDNA 溶液をプローブとして 55°C で一晩ハイブリダイズさせた。アレイシートを 0.1% SDS を含んだ 2×SSC で 5 分間、室温で 3 回洗浄後、0.1% SDS を含んだ 0.3×SSC で 8 分間、室温で 2 回洗

浄、そして 0.1%SDS を含んだ  $0.3 \times \text{SSC}$  で 8 分間、 $55^{\circ}\text{C}$  で 2 回洗浄した。洗浄後、アレイシートはタオルペーパーで水分よく切ってから、サランラップで包み、イメージングプレート (FUJIFILM) へ一晩露光した。

### 5-3. シグナルの検出と解析

ハイブリダイゼーションシグナルをバイオイメージングアナライザー (BAS5000;FUJIFILM) で検出し、Array Vision ソフトウェア (GE Healthcare) を用いてシグナル強度を解析した。アレイメンブレン上のスポットの総シグナル強度でノーマライゼーションを行った。各クローンの SSE/ゲニステイン処理の無処理に対する発現量はノーマライゼーションしたシグナル強度に基づいた比率で表した。3960 クローンの発現量は、以前に行われたマクロアレイ解析 (76kari) より 2.2 倍以上の発現の上昇と 0.4 倍以下の発現の低下を有効数とした。

### 6. 定量的 RT-PCR

遺伝子の相対発現量を、単離した TotalRNA を鋳型にした定量的 RT-PCR で測定した。反応液に QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) を、核酸増幅には MiniOpticon™ Version 3.1 (Bio-Rad) を用いた。定量的 RT-PCR に用いた Forward 及び Reverse Primer のオリゴヌクレオチド配列を Table 1 に示した。RT-PCR 反応では、反応当たり RT-PCR Mater Mix  $7.5\mu\text{L}$ , Forward Primer  $0.3\mu\text{L}$  Reverse Primer  $0.3\mu\text{L}$  Quanti Tect RT Mix  $0.15\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O  $3.75\mu\text{L}$  を混合し、RNA 溶液 ( $100\text{ng}/3\mu\text{l}$ ) を  $3\mu\text{l}$  加えた。RT-PCR 反応は  $95^{\circ}\text{C} \cdot 15$  分, ( $94^{\circ}\text{C} \cdot 15$  秒,  $55^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒,  $72^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒)  $\times 35$  サイクルで行った。相対発現量の解析には CFX Manager (Bio-Rad) を使用し、Bio-Rad 社 Real-time PCR Application



Guide に従い、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で、相対発現量を求めた。*B. japonicum* のハウスキーパー遺伝子 *sigA*(b117349) は、本実験の誘導条件では発現に有意な差が生じないことを確認し、発現量の基準とした。

## 結果

### 1. ダイズ根粒菌の根粒着生における温度と SSE/genistein の影響

#### 1-1. 15°Cにおける SSE 処理の影響

低温がダイズ根粒菌の根粒着生の時期及び着生数に与える影響を調べるため、SSE で 15°C 20 時間誘導処理した *B. japonicum* USDA110 を *Glycine max*(L.) cv. Enrei に接種し、常温の場合 (86) と比較した。その結果、常温では、SSE 接種後 3 日目で stage 1 まで発達した根粒を確認することができたが、15°C では同じ stage 2 の根粒は接種後 13 日目で確認され、根粒着生に 10 日ほどの遅滞が見られた (Fig. 3)。植物体当たりの根粒数は、常温では、接種後 13 日目で、SSE 処理により無処理の 1.45 倍の増加が見られた。また、stage 3 まで発達した根粒は SSE 処理が無処理の 3 倍に増加した。一方、15°C では、接種後 25 日目で SSE 処理が無処理の 1.6 倍の増加が見られ、stage 3 まで発達した根粒は SSE 処理の方が無処理の 2 倍に増加した。以上の結果から、低温条件における根粒着生時期は常温より遅れるが、常温で見られたような SSE 処理による根粒着生数と根粒着生時期の早期化は、低温条件でも確認された。

### 2. ダイズ根粒菌遺伝子の発現における温度の影響

#### 2-1. 30°C と 15°C における根粒菌全遺伝子の発現プロファイル比較

*B. japonicum* USDA110 の全ゲノム情報に基づき作成されたマクロアレイを用いて、SSE と genistein に応答する遺伝子の網羅的な発現解析を行い、15°C (20～48 時間) で得られた根粒菌遺伝子の発現プロファイルを、Wei らにより得られた 30°C (12 時間) のプロファイルと比較した (86)。発現量が 2.2 倍以上、或は 0.4 倍以下のクローンの総数を共生領域内外で集計した。その結果、30°C 12 時間で発現したクローンの総数は、共生領域外では、SSE 処理で 78 個、genistein 処理で 75 個と両者には大きな差は見られなかったが、共生領域内では、SSE 処理で 62 個、genistein 処理では 14 個になり、SSE 処理が genistein 処理よりも 4 倍以上多かった。また、SSE 処理で発現したクローンの 44% が共生領域内にあり、genistein 処理の場合 (16%) よりも多かった (Fig. 4)。一方、15°C、誘導 20 時間では、共生領域内で発現したクローン数 (割合) は、SSE 処理で 20 個 (27%)、genistein 処理で 22 個 (21%) と、大きな差は見られなかったが、誘導 48 時間では、SSE 処理で 56 個 (17%)、genistein 処理で 12 個 (5%) だった。これらの結果は、15°C では、SSE/genistein いずれの処理でも、処理時間とともに発現するクローン数が、特に共生領域外で大幅に増加することを示した。一方、抑制されたクローン数は、SSE、genistein 処理のいずれの場合でも、処理時間とともに増加する傾向があったが、ほとんどが共生領域以外のクローンであった。

## 2-2. 30°C と 15°C における共生領域 (ECI～IV) の発現プロファイル比較

ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 を種子の抽出液 (SSE) 或は genistein で処理し、30°C、12 時間後の共生領域の発現プロファイルから、EC-I (*no1K/noeL/nodM/noeD* など)、EC-II (*nodWW* など)、EC-III (type three secretion system: T3SS など)、EC-IV (*nodDIYABCSUIJ* など) の 4 つの大きな発

現領域が見い出された (86)。これを 15°C、12 時間後の発現プロファイルと比較すると、15°Cでは、EC-I, EC-II, EC-IV の領域には発現が見られたが、EC-III の領域には発現が全く見られなかった。更に 20 時間まで処理しても発現プロファイルは 12 時間後と同様に EC-III の発現は見られなかったが、48 時間後では EC-III の発現が認められ、その発現量は SSE の方が genistein よりも顕著に高かった (Fig. 5)。以上の結果から、EC-III の発現は低温 (15°C) で遅滞し、その発現量は genistein よりも SSE の方が際立って高いことが示された。

### 2-3. 30°Cと15°Cにおける *nod* 遺伝子群 (*nodW*, *nodD1*, *nodD2*) と *ttsI* 遺伝子の発現量比較

共生領域の EC-IV にある *noIA*, *nodD1*, *nodD2* を含むクローンの SSE/genistein による発現量を 30°Cと 15°Cで比較した。その結果、genistein 処理の場合は、いずれの温度条件でも、これらのクローンの発現量は処理時間とともに減少した。しかし、SSE 処理の場合は、*nodD1* を除いて、*noIA* と *nodD2*を含むクローンの発現量は、いずれの温度条件でも上昇した (Fig. 6)。

そこで、*nodW*, *nodD1*, *nodD2*, *ttsI*, *noIA* の発現量を定量的 RT-PCR 法で調べた結果、*nodD1* の発現量は、SSE/genistein の処理で、15°C、30°Cのいずれの温度条件でも、処理時間とともに発現量が減少した。しかし、*noIA* と *nodD2* の発現量は、マクロアレイの結果と一致した。即ち、SSE 処理の場合は、*noIA* と *nodD2* の発現量は、いずれの温度条件でも上昇した (Fig. 7)。以上の結果から、SSE による T3SS の十分な発現には、*noIA*、或は *nodD2* の発現が重要である可能性が示唆された。

### 3. 共生領域の発現と根粒形成における *noIA*, *nodD2* 変異の影響

#### 3-1. 共生領域の発現プロファイルにおける *noIA*, *nodD2* 変異の影響

*B. japonicum* Δ370(*nodD2* 欠失変異株)、*B. japonicum* Bjb3(*noIA* 欠失変異株)を用いて SSE による網羅的な発現解析を行い、*noID2*, *noIA* 変異が共生領域の遺伝子発現に与える影響を調べた。その結果、*noIA* 変異株では、30°C12 時間、15°C48 時間のいずれにおいても、親株と類似の T3SS 発現プロファイルが見られたが、*nodD2* 変異株では、30°C12 時間、15°C48 時間のいずれの条件でも、T3SS の発現は見られなかった (Fig. 8)。

#### 3-2. *nod* 遺伝子群 (*nodW*, *nodD1*, *nodD2*) と *ttsI* 遺伝子の発現における *noIA*, *nodD2* 変異の影響

*nodW*, *nodD1*, *nodD2*, *ttsI*, *noIA* の発現量を定量的 RT-PCR 法で調べた。30°C12h と 15°C48h で菌体を SSE で処理し、定量的 RT-PCR (SYBR-Green) によって発現量を調べた結果、*noIA* 変異株では、30°C12 時間と 15°C48 時間のいずれの場合でも、*ttsI* が 2 倍以上に発現したが、*nodD2* 変異株では、*nodW*, *nodD1* の発現は見られたが、*ttsI* の発現は見られなかった (Fig. 9)。

#### 3-3. 根粒の経時的な形成と成熟度における *noIA*, *nodD2* 変異の影響

*B. japonicum* USDA110(wild)、*B. japonicum* Δ370(*nodD2* 欠失変異株)、及び *B. japonicum* bjb3(*noIA* 欠失変異株)を宿主ダイズに接種し、根粒数を経時的に計測した。その結果、wild と *noIA* 変異株では、接種後 6 日目から根粒が着生したが、*nodD2* 変異株では、根粒の着生が確認されたのは、接種後 17 日目であり、根粒着生の遅滞が見られた。また、接種後 21 日目の植物体当たりの根粒

数は、wild、*noIA* 変異株では、あらかじめ SSE で処理された菌体で形成された根粒数は、無処理の場合の 1.1 倍になった。stage 3 まで発達した根粒は、wild では SSE 処理菌体の場合は無処理の 1.75 倍、*noIA* 変異株では 1.5 倍にそれぞれ増加した。しかし、*nodD2* 変異株では、植物体当たりの根粒数は wild, *noIA* 変異株の半分以下であり、菌体をあらかじめ SSE 処理しても、植物体当たりの根粒数、及び stage 3 の根粒数は増加しなかった (Fig.10)。

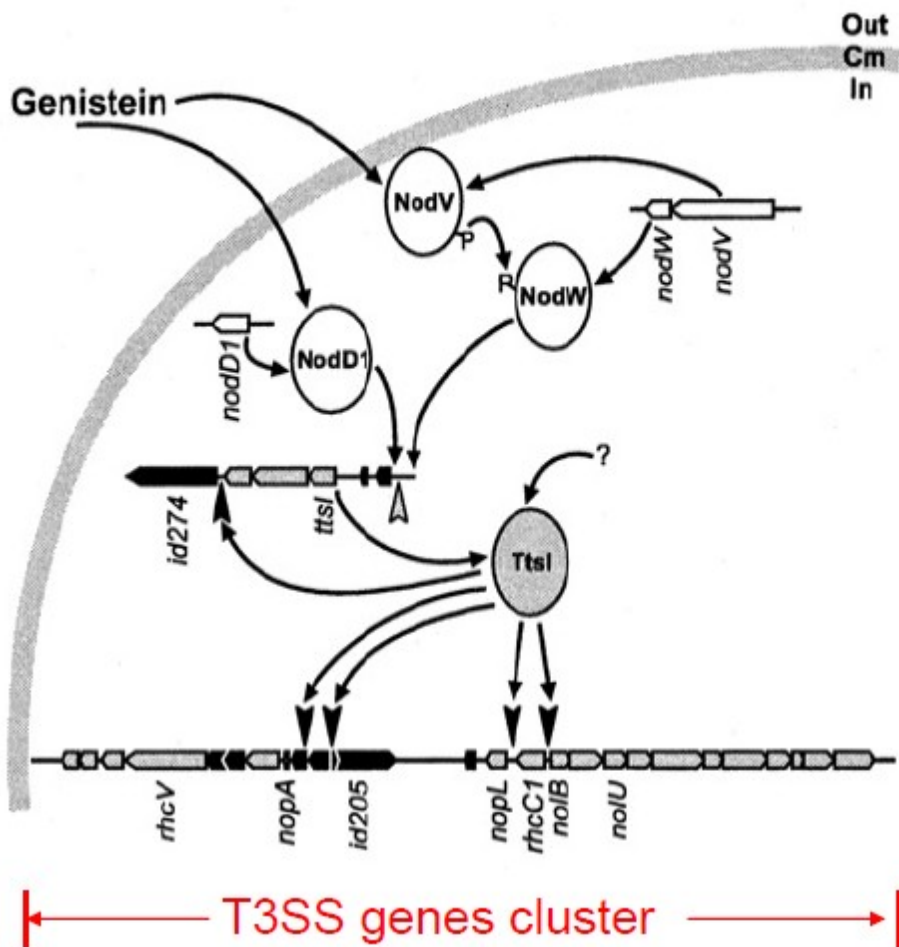


Fig. 1. T3SS 遺伝子群の発現調節モデル (44)

T3SS 遺伝子群で、*Bradyrhizobium* に固有の Open reading frame (ORF) は黒で、他の根粒菌と相同性のある ORF はグレーで示した。*nod* 遺伝子は白で示した。

グレーの矢印は、*nod* box の位置を、黒の矢印は *tts* box の位置を示している。

Cm=cytoplasmic membrane

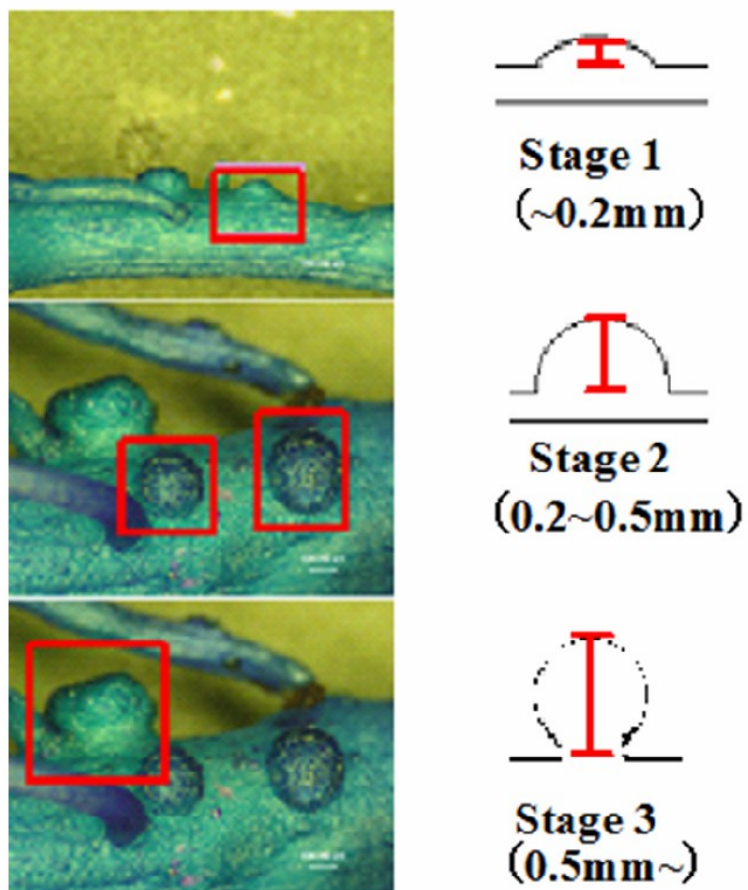


Fig. 2. 根粒の成熟段階

植物体地下部を FAA 固定液で 1 日以上固定し、蒸留水で洗浄後、0.003%

(w/v) トルイジンブルー染色液で 10 分間染色した。根粒、根粒原基の成熟度は、径が 0.2mm 以下を stage1、0.2~0.5mm を stage2、0.5mm 以上を stage3 の 3 段階に分けて測定した。

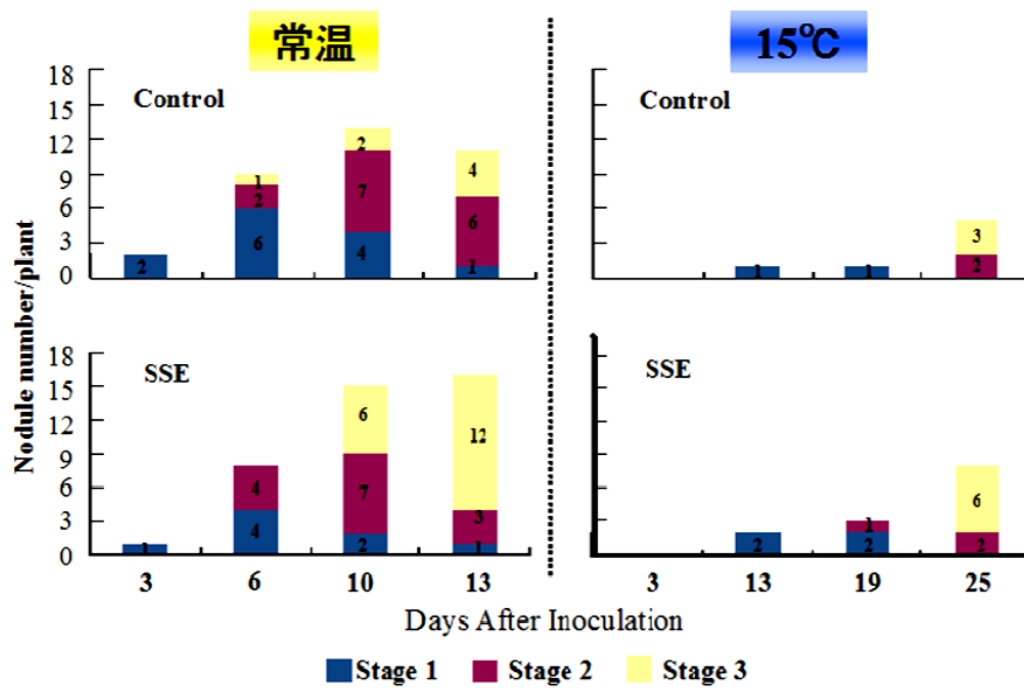


Fig.3. 常温条件と低温(15°C)の根粒着生における SSE 処理の影響

ダイズ種子(エンレイ)に菌体(10<sup>7</sup>cfu/seed)を接種し 15°Cで栽培し、同時に SSE(20 μl/ml) 15°C、48 時間処理した菌体で接種試験を行った。接種3日目以降に植物体を 10 個体を回収し、植物体当たりの根粒の着生数と成熟度を調べた。成熟度は根粒の直径 0.2mm 以下を stage 1、0.2~0.5mm を stage 2、0.5mm 以上を stage 3 とした。



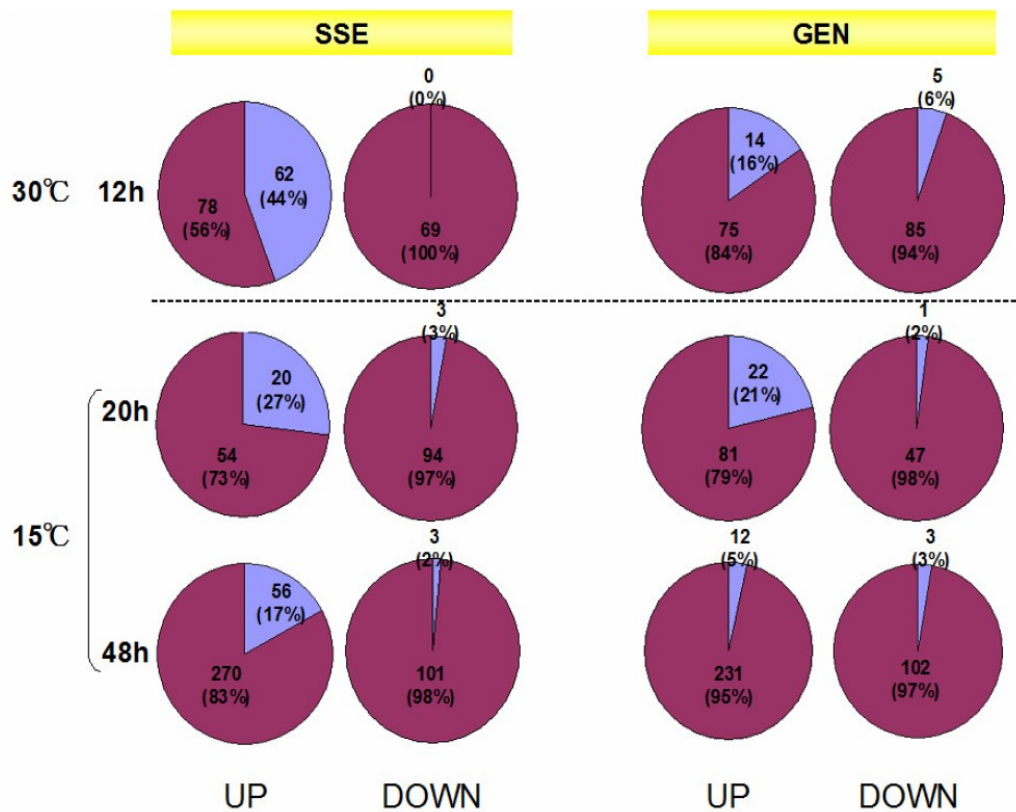


Fig. 4. 低温(15°C)と30°CにおけるSSEと genistein 処理による発現(抑制)クローン数とその割合

15°C(20h、48h)でSSE或は genistein で発現(抑制)されたクローン数とその割合(%)を30°C(12h)と比較した。共生領域のクローンを■、共生領域外のクローンを■で表し、円グラフの数値に発現、或いは抑制したクローン数を示した。UPは2.2倍以上に発現したクローン、DOWNは0.4倍以下に発現が抑制されたクローンを表す。

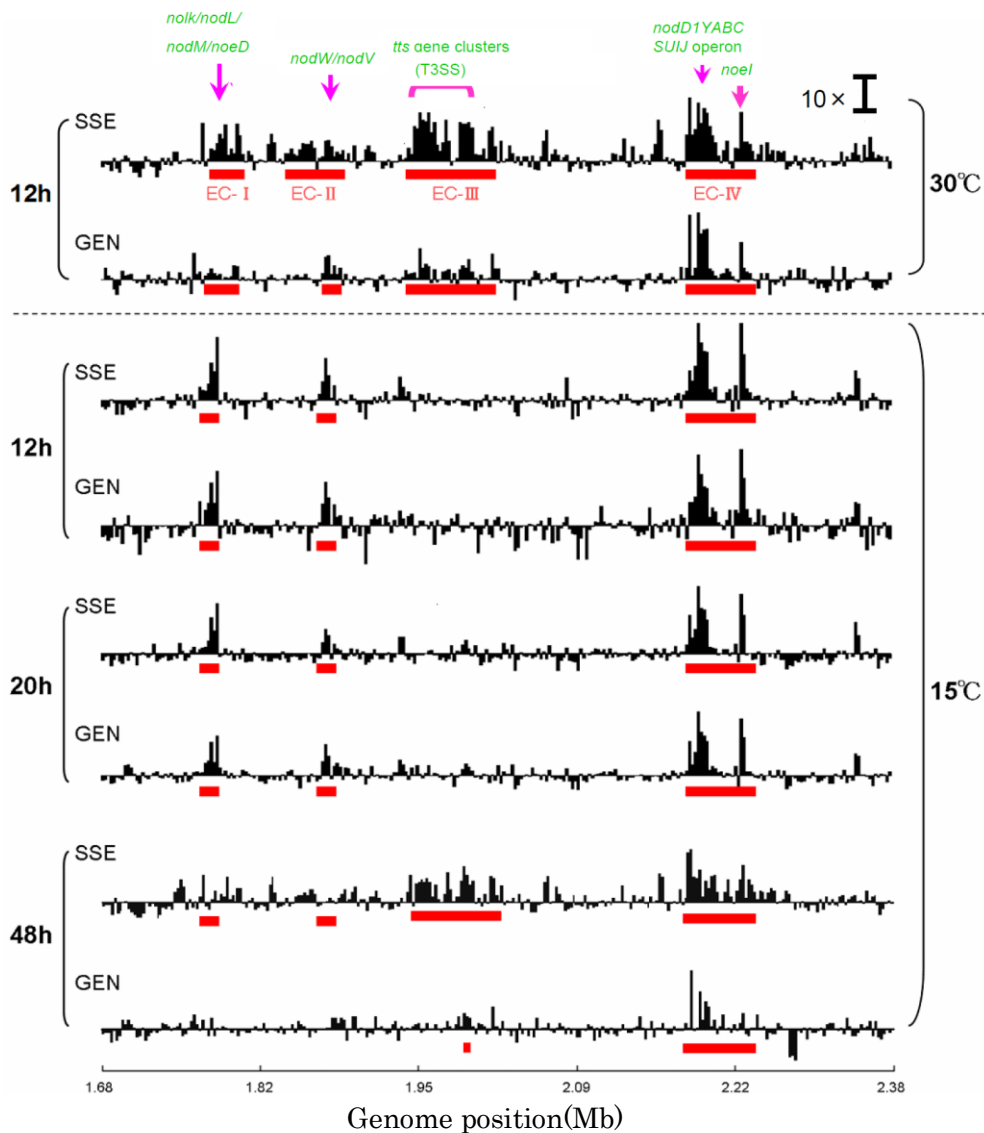


Fig. 5. 15°Cと30°Cにおける共生領域遺伝子群の発現比較

15°Cで SSE/genistein (GEN) (12~48 時間) 処理菌体から mRNA を単離・精製後、<sup>33</sup>PdCTP でラベルされた cDNA を調製し、これをプローブとしてアレイメンブレンにハイブリダイズさせ、得られた結果を画像解析装置 (BAS5000) で読み取り共生領域の 275 クローンについて Array Vision で発現量を解析した。発現量は、対数 ( $\log_{10}$ ) で表され、10 倍の発現量比を 10X のバーで示した。また EC-I~IV の発現領域を赤色のバーで示した。

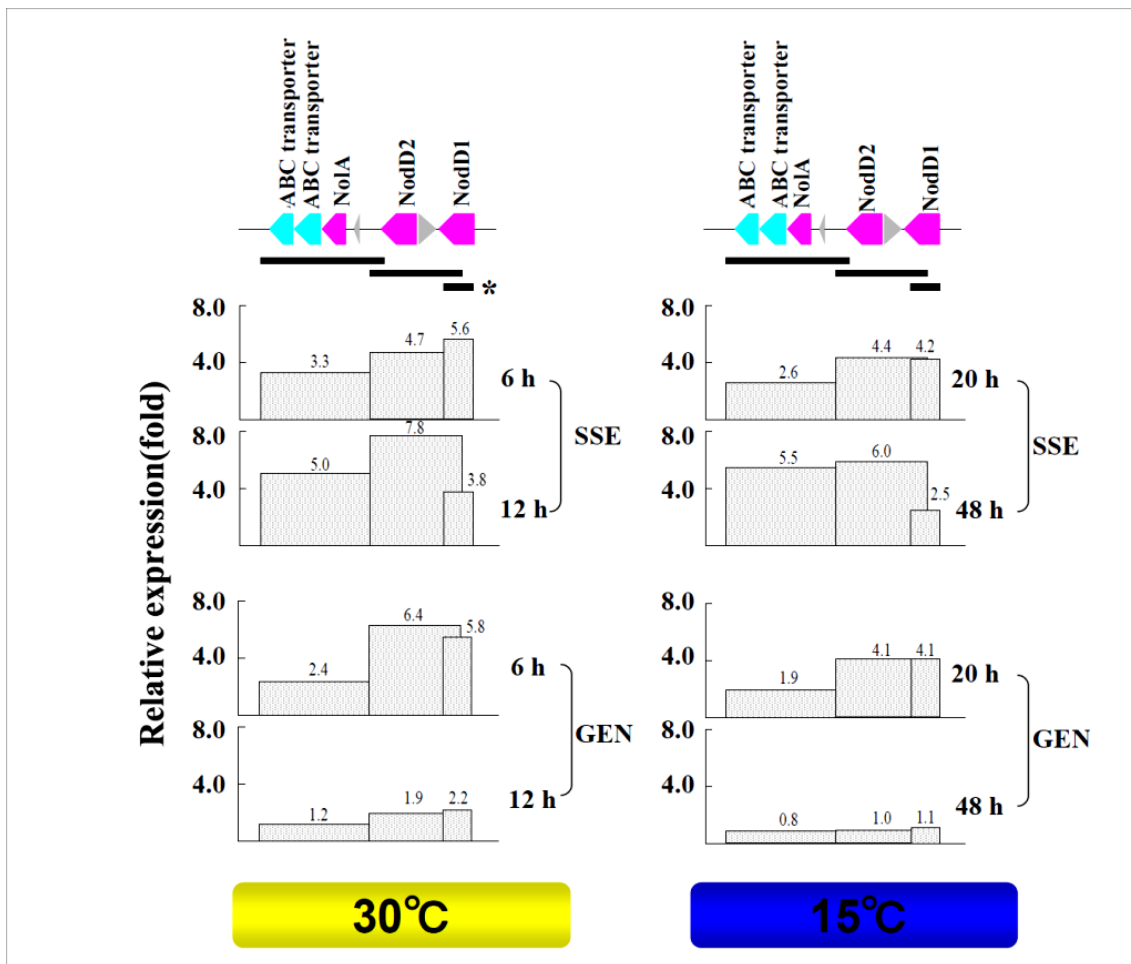


Fig. 6. *noIA*, *nodD1*, *nodD2* を含むクローンの発現量における誘導時間及び温度の影響

共生領域の EC-IV 上に存在する *nodD1*, *nodD2*, *noIA* を含むクローンの発現を比較した。SSE または genistein (GEN) で 30°C 誘導 6、12 時間及び 15°C 誘導 20、48 時間における 各クローンの発現量を棒グラフで表した。遺伝子マップの下にアレイ解析に用いたクローンの位置を横バーで示した。

\*はアレイにスポットされた *nodD1* 遺伝子を示す。

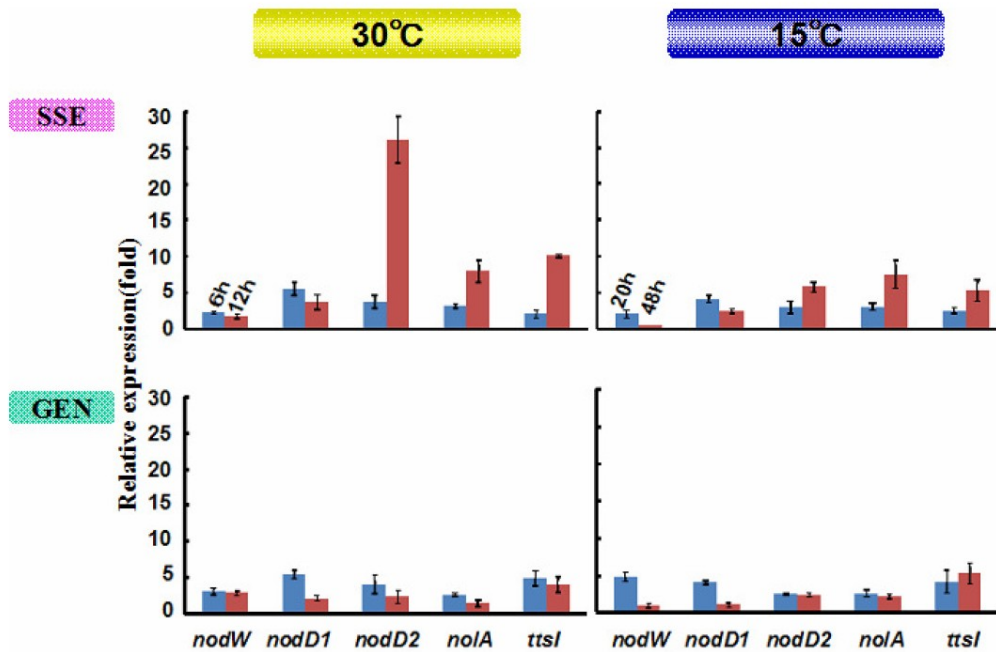


Fig. 7. *nod* 遺伝子群 (*nodW*, *nodD1*, *nodD2*) , *nolA* と *ttsI* 遺伝子の発現量の比較

菌液濁度 ( $OD_{600}$ ) 0.1 で菌体を SSE あるいは genistein (GEN) で 30°C 6、12 時間、15°C 20、48 時間誘導処理し、定量的 RT-PCR (SYBR-Green) によって発現量を調べた。相対発現量は、ダイズ根粒菌のハウスキーピング遺伝子 (*sigA*) の発現量を基準とし、3 連の実験の平均値 ± 標準偏差を示した。

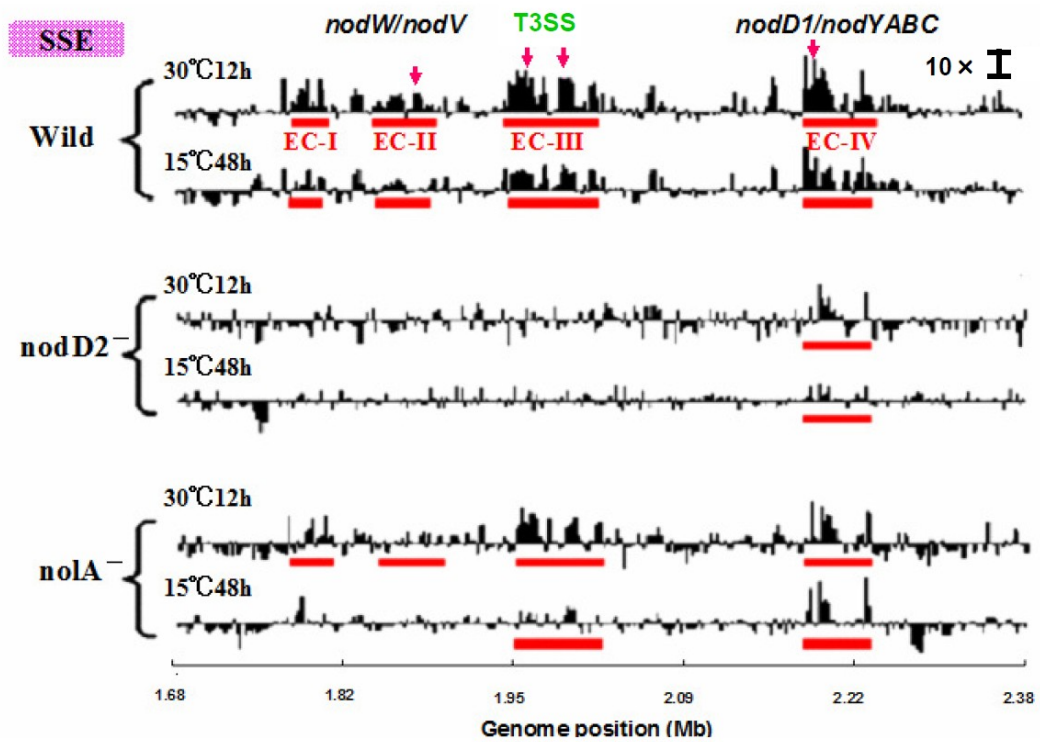


Fig. 8. 15°Cと30°Cにおける共生領域の発現における *nolA*, *nodD2* 変異の影響  
 菌体を 30°C、12 時間、または 15°C、48 時間 SSE 処理し、mRNA を単離・精製後、<sup>33</sup>PdCTP でラベルされた cDNA を調製し、マクロアレイ解析を行った。発現量は対数 ( $\log_{10}$ ) で表され、10 倍の発現量比を 10X のバーで示した。また EC-I-IV の発現領域を赤のバーで示した。

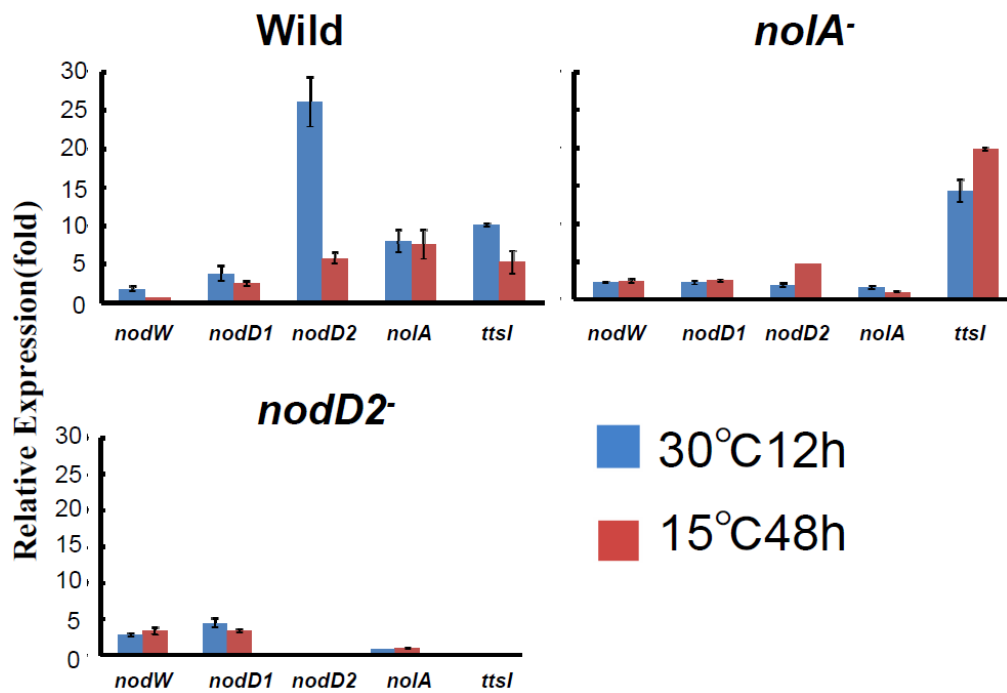


Fig. 9. *noIA*, *nodD2* 変異における *nod* 遺伝子群 (*nodW*, *nodD1*, *nodD2*) と *ttsI* の発現量比較

30°C12h と 15°C48h で wild(親株)、*noIA* 変異株、*nodD2* 変異株を SSE で(20  $\mu$  l/ml)処理し、定量的 RT-PCR (SYBR-Green) によって発現量を調べた。

相対発現量は、ダイズ根粒菌のハウスキーピング遺伝子 (*sigA*) の発現量を基準とし、3 反復の平均値±標準偏差を示した。

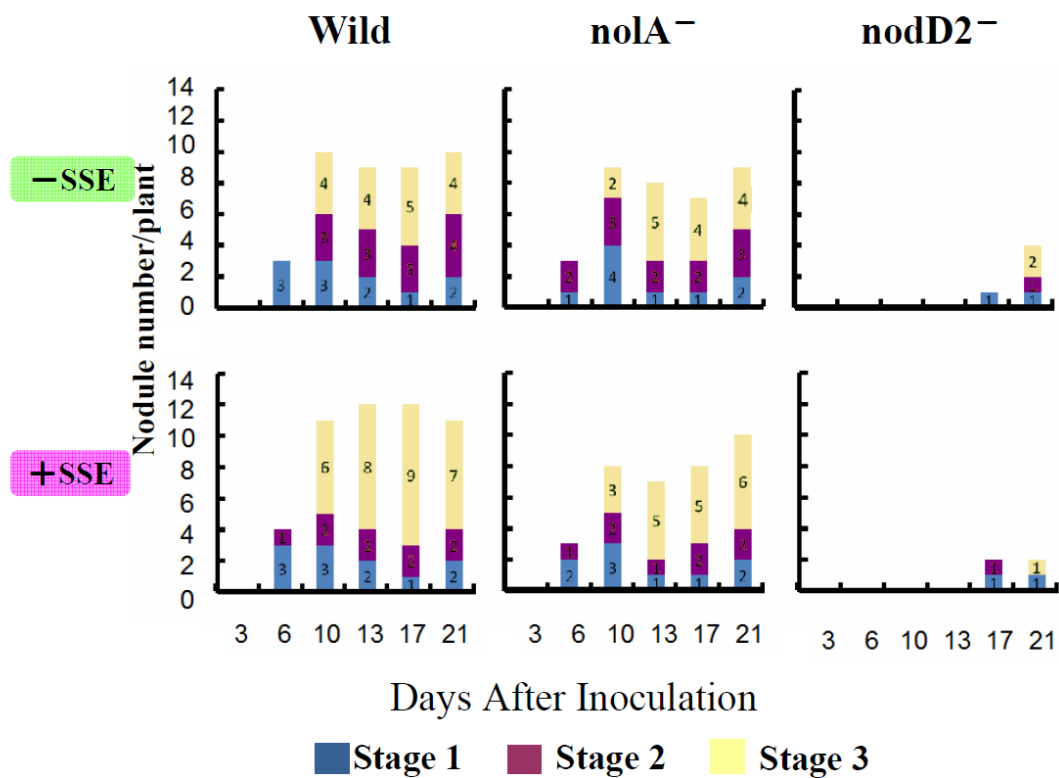


Fig. 10. *nola* と *nodD2* 変異株の根粒の着生数と成熟度の経時的変化

ダイズ種子（エンレイ）に菌体（ $10^7$ cfu）を接種し温室で栽培した。同時に SSE で  $30^{\circ}\text{C}$ 、12 時間処理した菌体で接種試験を行い、接種 3 日目以降に 1 植物体当たりの根粒の着生数と成熟度を調べた。成熟度は根粒の  $0.2\text{mm}$  以下を stage 1、 $0.2\sim 0.5\text{mm}$  を stage 2、 $0.5\text{mm}$  以上を stage 3 とした。

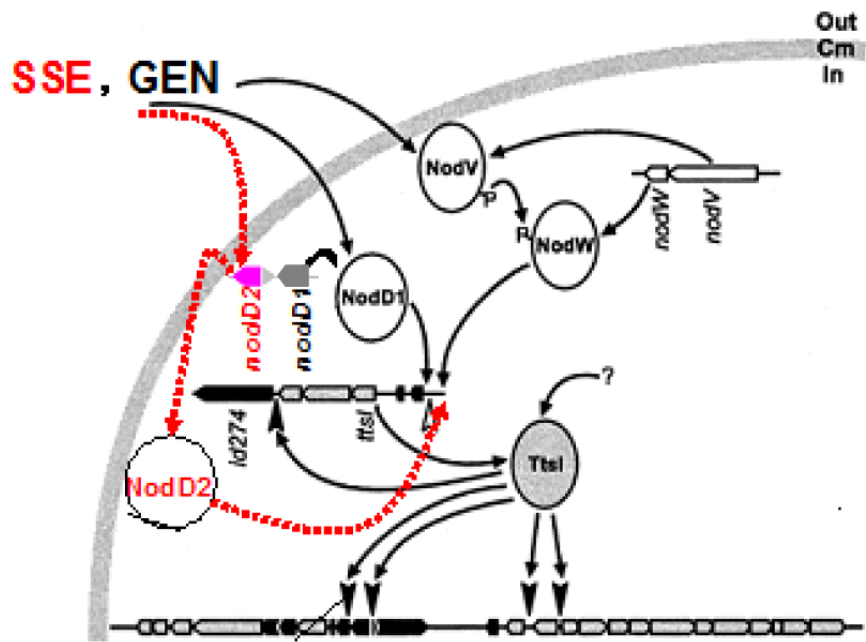


Fig. 11. NodD2 を介した T3SS の発現モデル

Fig.1 を改変し、SSE が NodD2 を介して T3SS が誘導する経路を赤の矢印で示した。



Table 1. 本実験で用いたオリゴヌクレオチド

Oligonucleotides <sup>a</sup>	sequence	Source or reference
bll1714( <i>nodW</i> ) F/R	5'-GCTGATGAACAAGCAGGTAG-3'/5'-TCGCTCATTCTGATCAAGTC-3'	This study
bll2023( <i>nodD1</i> ) F/R	5'-CACATCCGTCACCTACAAC-3'/5'-GCAGTCACTGTCAGAGGAAT-3'	This study
bll2021( <i>nodD2</i> ) F/R	5'-CTAATAACTGAGCGCAACCT-3'/5'-TGAGCTCAAGACAACCTTCG-3'	This study
bll2019( <i>nolA</i> ) F/R	5'-CTGAAGGTACTTGCACGATT-3'/5'-AGCAAGGCTGATCCTCCAAT-3'	This study
bll1843( <i>tsI</i> ) F/R	5'-ACTACCACCTCGTACTGCTG-3'/5'-GCTGAGATCATTGAGACTGC-3'	This study
bll7349( <i>sigA</i> ) F/R	5'-CTGGTGTGCTTCTTCATGT-3'/5'-CTTCCACTTGTGTACTCGTC-3'	This study

<sup>a</sup>遺伝子番号はRhizobaseに基づいた (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>)(42)

## 考察

根粒菌の一般的な培養温度である 30°C の条件下で、SSE、及び genistein に応答するダイズ根粒菌遺伝子の網羅的な発現解析が行われた結果、共生領域にある 4 つの大きな遺伝子領域 (EC-I~IV) が強く誘導発現されることが見出された (86)。本研究では、低温条件 (15°C) で SSE、及び genistein に応答する EC-I~IV の発現を調べ、30°C の発現プロファイルと比較した結果、低温 (15°C) の条件では、EC-III の発現時期のみ著しく遅滞すること、及び、発現は genistein よりも SSE で強く誘導されることが明らかになった。低温 (15°C) と常温の条件で根粒着生時期を比較すると、低温 (15°C) では常温に比べ、およそ 10 日間の遅滞が見られた (Fig. 3)。低温 (15°C) で、type III secretion system (T3SS) を含む EC-III の発現のみ遅滞したことから、低温 (15°C) における根粒着生時期の遅滞は、T3SS の発現の遅滞が原因である可能性が強く示唆された。Krause ら (44) は、根粒菌の T3SS の変異株は、ダイズの根粒着生が遅れたことを報告している。

一方、低温 (15°C) 条件でも、EC-I (*no1K/noeL/nodM/noeD* など)、EC-II (*nodWW* など)、及び EC-IV (*nodDIYABCSUIJ* など) は 30°C と同様に発現したことから、T3SS の発現は NodD1 及び NodVW により誘導される、という従来のパラダイム (50) だけでは、T3SS の誘導発現の仕組みを説明できないことを示している。本研究の結果、SSE 存在下では、*nodD2* 遺伝子と *no1A* 遺伝子の顕著な誘導発現が、T3SS の発現と共に生じたこと (Figs. 6, 7)、及び、*nodD2* 変異株では、SSE 存在下でも T3SS の発現が全く見られなかったこと (Fig. 8) から、SSE 存在下では、*nodD2* と *no1A* 遺伝子、特に *nodD2* 遺伝子の誘導発現が T3SS の十分な発現に関与している可能性が強く示唆された。

*nodD2* 遺伝子は LysR family transcriptional regulator、*noIA* 遺伝子は MerR family transcriptional regulator に属しており、NodD2 は NodA により誘導され、*nodYABCSUIJ* オペロンの発現を抑制することが報告されている (60)。また、*nodD2*、*noIA* 遺伝子の発現と *nodYABCSUIJ* オペロンの発現抑制は、根粒菌の菌密度の上昇に伴って生じることが報告されている (61)。根粒菌では、菌密度の上昇に伴う *noIA*、*nodD2* 遺伝子の発現と T3SS の発現との関連に関する報告はないが、植物内生菌 *Pantoea agglomerans* では、菌密度の上昇により誘導される転写調節遺伝子が破壊されると、T3SS の発現が低下することが報告されている (11)。SSE は genistein や daidzein 等の flavonoid をはじめ、アミノ酸や有機酸等の栄養物も十分に含まれているため (60kari)、それらを栄養源として根粒菌の増殖が促進されると考えられることから、SSE 存在下では、根粒菌の菌密度が上昇した結果、*noIA*、*nodD2* 遺伝子が誘導発現し、T3SS の十分な発現に関与している可能性が考えられた。

*nodD2* 変異株では、SSE 存在下で *nodD1* と *nodW* の発現が誘導されたが、*ttsI* 遺伝子 (T3SS 制御遺伝子) は発現しなかった (Figs. 8,9)。Krause らが示した genistein による T3SS の誘導発現モデルでは、*nodD1*、*nodW* の発現が誘導されると、NodD1、NodW が *ttsI* のプロモーター領域に存在する *nod box* に結合し、*ttsI* の転写が始まる (44)。従って、本研究の結果は、従来から知られている NodD1、NodW に加え、NodD2 も *ttsI* の発現、即ち、T3SS の構築に重要な因子であることを強く示している。ただ、*noIA* 変異株でも *nodD2* の発現が誘導されたことから (Figs. 8,9)、少なくとも SSE 存在下では、*nodD2* の誘導発現には、*noIA* を介さない経路が存在することを示している。

*nodD2* 変異株で形成された根粒数は親株よりも著しく低下し、その着生時期も遅滞した。また、SSE で根粒菌を前処理しても、根粒の着生数とその着生時

期は無処理の場合と類似していた (Fig. 10)。一方、*no1A* 変異株の場合では、根粒の数とその着生時期は親株と類似していた。これらの結果は、*nodD2* 遺伝子が破壊され T3SS 遺伝子の発現が遅滞した結果、根粒の数とその着生時期が遅滞した可能性を強く示唆しており、ダイズと根粒菌の正常な共生関係の構築には、*nodD2* を介した T3SS の構築が重要であることを示している。

北海道のような寒冷地で根粒菌を利用する場合、低温条件でも根粒の着生時期が遅滞しない技術は、マメ収量の増加に重要であると考えられる。今後、*nodD2* を介した T3SS の発現メカニズムが解明され、低温条件でも T3SS を遅滞することなく発現することが可能になれば、共生の分子応答メカニズムの解明のみならず、寒冷地におけるマメ生産の向上に大きく貢献できると期待される。

## 第 2 章

### ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の新規ゲノム領域 (BjG30) の発現解析

#### 緒論

根粒菌はマメ科植物と共生する共生窒素固定細菌として知られ、空中にある分子状の窒素を生物が利用可能なアンモニアに固定することができるグラム陰性桿菌である。マメ科植物では、根粒菌が生産・分泌する Nod ファクターと呼ばれるリポキチンオリゴサッカライドをダイズの Nod factor receptor (NFR) が受容し、根粒及び感染糸の形成が開始される (32, 43, 79)。植物由来の flavonoid 化合物は 4000 種類以上存在し、マメ科植物から放出される isoflavon 類、flavone 類、flavanone 類の flavonoid により、根粒菌の持つ Nod ファクター生産に関わる *nod* 遺伝子群が誘導される。Nod ファクターの基本骨格は、全ての根粒菌に共通に存在する共通の *nod* 遺伝子、*nodABC* により合成され、種により特異的な *nod* 遺伝子により側鎖を修飾される (42, 66, 73)。*Bradyrhizobium* では、flavonoid は NodD1 (LysR family transcriptional regulator) と NodWV (two-component regulatory system) に認識され、下流の *nod* 遺伝子群を誘導する (17, 53)。特に NodD1 は、下流の遺伝子のプロモーター領域にある 47bp の *nod* box に結合し、転写を促進させていることが明らかになっている (66)。*nod* 遺伝子を誘導する flavonoid は根粒菌の種によって異なり、*Bradyrhizobium japonicum* は isoflavone である genistein や daidzein により誘導される。一方、flavone である luteolin と、flavanone で

ある naringenin は、それぞれ、*Sinorhizobium melitoli* と、*Sinorhizobium fredii* の *nod* 遺伝子を誘導するが、*Bradyrhizobium* の *nod* 遺伝子は誘導せず (36, 64)、根粒菌の種による各種 flavonoid に対する応答の違いは、宿主特異性に関係があることが示唆されている (6, 73)。

flavonoid は *nod* 遺伝子の発現を誘導する一方で、生育阻害などの抗菌作用を持つことが知られている。植物由来の pterocarpan 類は、ピシウム菌 *Pythium graminicola*、黒あざ病菌 *Rhizoctonia solani*、株枯病菌 *Nectria haematococca* 等に対して、生育の阻害効果が報告されている (33)。flavonol の quercetin は、II 型 topoisomerase に属する DNA gyrase に対して強い阻害作用を持ち、アカパンカビ *Neurospora crassa* の生育を抑制すること (33, 69)、また、isoflavone の genistein は、II 型 topoisomerase である topoisomerase IV に対する阻害作用が確認されており、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio harveyi* 及び *Bacillus subtilis* に対する増殖抑制効果が報告されている (7, 82, 84)。

Flavonoid に対する耐性に関わる機能として、植物病原菌の中には、薬剤排出ポンプが見い出されている。火傷病菌 *Erwinia amylovora*、根頭癌腫病菌 *Agrobacterium tumefaciens*、トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* には、植物由来の flavonoid である quercetin、coumestrol、naringenin 等に対する耐性があり、RND 型薬剤排出ポンプによることが明らかになっている (9, 62, 83)。これらの RND 型薬剤排出ポンプをコードする遺伝子は、植物由来の flavonoid により誘導され、近傍には TetR family transcriptional regulator (TFR) がコードされている特徴がある (9, 62, 83)。*P. syringae* の TFR には、flavonoid が結合すること、及び、薬剤排出ポンプ MexAB-OprM の発現を制御する機能のあることが明らかになっている (83)。これらの RND 型薬

剤排出ポンプを変異させた株では、病原性や植物体内での生育が阻害されることから、RND 型薬剤排出ポンプは、植物由来の抗菌物質に対する耐性に関与していると推測されている (83)。

Flavonoid は、根粒菌とマメ科植物の共生系で *nod* 遺伝子の誘導に利用されている反面、genistein、daidzein、及び coumestrol (20  $\mu$ M) の存在下で根粒菌を培養すると増殖が抑制されたことから、根粒菌に対して抗菌作用のあることが報告された (49)。根粒菌でも、flavonoid に対する耐性に関わる薬剤排出ポンプが見い出された。2000 年に、*Rhizobium etli* において、flavonoid で誘導される薬剤排出ポンプ RmrAB が見い出された (28)。RmrAB は、flavonoid やサリチル酸に対する耐性に関わり、*rmrAB* が変異すると根粒着生が抑制されることが明らかになった。2011 年の Eda らの報告では、*Sinorhizobium melitoli* の RND 型薬剤排出ポンプ SmeAB が欠失変異すると、抗生物質や flavonoid 等に対する耐性が低下し、宿主植物のアルファルファとの共生系において、親株に対する競合能が低下することが報告された (21)。また、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* は、ゲノム中に 24 個の RND 型薬剤排出ポンプがコードされており (51)、Lang らが 2008 年に報告した *Bradyrhizobium* のマイクロアレイ解析の結果では、genisteinn で 8 時間処理後に誘導発現が認められた 101 個の遺伝子の内、RND 型薬剤排出ポンプをコードする遺伝子 *freCAB* (b114319、b114320、b114321) が報告されている (47)。*freCAB* に隣接する *frrA* (blr4322) は TFR であり、その遺伝子産物の FrrA は genistein と結合し、リプレッサーとして *freCAB* の発現を制御することが報告されている。更に、*freCAB*、または *frrA* のいずれの遺伝子が欠失しても、ダイズにおける根粒着生には影響が見られなかったことが報告されている (88)。

*B. japonicum* USDA110 ゲノムのクローンライブラリーより作成されたマクロ

アレイを用いて、ダイズ種子抽出物 (SSE) と genistein で誘導発現するダイズ根粒菌遺伝子の網羅的な発現解析が行われた (86, 87)。その結果、共生領域外で、genistein 処理後 30 分で強く誘導発現されるゲノム領域 (7.73–7.75Mb) が見い出された。この領域には 17 個の遺伝子 (b117017–b117020) が含まれ、TFR (blr7023, b117024) と RND 型薬剤排出ポンプ (b117019, b117020)、ポリヒドロキシ酪酸代謝関連酵素 (blr7028, blr7029) をコードしていると考えられた。本章では、BjG30 に含まれる遺伝子の誘導発現プロファイルを詳細に調べるとともに、遺伝子変異株のダイズにおける根粒形成や窒素固定能を検討し、薬剤排出ポンプ、PHB 代謝系、及びそれらの制御 TetR に関わる遺伝子の発現と共生における役割を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 使用菌株及び培養方法

本実験で使用した菌株を Table 2 に示した。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の各菌株は yeast-mannitol broth (YMB) 培地 (39) で 30°C、大腸菌 *Escherichia coli* は Luria-Bertani (LB) 培地で、37°C でそれぞれ培養した。tri-parental mating では、*Bradyrhizobium japonicum* は終濃度 0.1% (w/v) arabinose を加えた HM 培地 (20) で培養し、選択培地には Arabinose-gluconate (AG) 培地 (74) を用いた。各培地には菌株により抗生物質を適宜加えた。即ち、*B. japonicum* 各菌株には chloramphenicol 30 µg/ml、streptomycin 50 µg/ml を、*E. coli* 各菌株には kanamycin 50 µg/ml、streptomycin 50 µg/ml を培地に加えた。



## 2. 菌体の genistein 誘導

*B. japonicum* USDA110 は chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml) を加えた 20ml の YMB 培地で、3 日間、30°C、130rpm で振とう培養した。これを 200ml の YMB 培地に加え、対数増殖期 ( $OD_{600} \doteq 0.4$ ) まで 30°C、130rpm で振とう培養した。genistein による *B. japonicum* の誘導は以下の様に行った。即ち、抗生物質を含まない YMB 培地で  $OD_{600} \doteq 0.1$  になるように培養菌液を希釈し、genistein (終濃度 0~10  $\mu$ M) を培地に加え、30°C、130rpm で 0~60 分間振とう培養した。

## 3. 菌体 RNA の抽出

結晶フェノール 35g を三角フラスコ (200ml) に入れ、65°Cの恒温槽で融解させ、700ml の 99.5%ethanol と混合し、5% (w/v) フェノール/ethanol とした。菌液を誘導処理した後、mRNA の分解を最小限に抑えるため、速やかに-20°Cの 5% (w/v) フェノール/ethanol を菌液 200ml に対し等量を加え混合した後、250ml 容ステンレス遠沈管で遠心分離 (9,000rpm 15 分) し、上清を捨てピペッティングにより 1.5ml 容チューブに集菌し、-80°Cで凍結保存した。

氷上に置いたオートクレーブ済みの乳鉢中に、超純水 200  $\mu$ l を加えた菌ペレットを入れ、さらに液体窒素を加えて菌体を凍結させ乳棒で十分に磨り潰した。そして ISOGEN-LS (Nippon Gene) を 1ml 加え 20 分以上、混合液が完全に融解するまで乳棒で混合した。そしてピペットで混合液をガラスホモジナイザーに移し、ペッスルで 100 回程度上下に往復する操作で細胞を完全に破砕した。これを 1.5ml 容チューブに移し、常温に 5 分間静置後、クロロホルム 200  $\mu$ l を加え、15 秒間ボルテックスで混合し、常温に 5 分間静置した。そして 15000rpm、15 分、4°Cで遠心分離し、上層 (RNA 層) だけをピペットで新しい

2ml 容チューブに移した。そして回収した RNA 層に等量のイソプロパノールを加え $-20^{\circ}\text{C}$ に一晩置き、遠心分離 (15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) し、RNA を沈殿させた。上清を捨て、RNA のペレットに 80%ethanol を 1ml 加え遠心分離し、もう一度同じ操作を繰り返し RNA の洗浄を行った。上清を捨て最後に残った RNA のペレットを 5 分間クリーンベンチ中で乾燥させ、超純水  $50\mu\text{l}$  に溶解させた。

#### 4. total RNA の精製

RNA 溶液  $50\mu\text{l}$  に対して DNaseI (5 units/ $\mu\text{l}$ 、TaKaRa) を  $2.3\mu\text{l}$ 、付属の  $10\times$ buffer を  $5.8\mu\text{l}$  加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分反応させ DNA を除去した。そして超純水を  $200\mu\text{l}$ 、ISOGEN-LS を  $750\mu\text{l}$  加え混合後、常温に 5 分間静置した。そしてクロロホルム  $200\mu\text{l}$  を加え、15 秒間ボルテックスで混合し、常温に 5 分間静置した。そして遠心分離 (15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) し、上層 (RNA 層) だけをピペットで新しい 2ml 容チューブに移した。そして回収した RNA 層に等量のイソプロパノールを加えて $-20^{\circ}\text{C}$ に一晩置き、遠心分離 (15000rpm、15 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) し、RNA を沈殿させた。RNA の抽出時と同様に RNA の洗浄を行ない、 $50\mu\text{l}$  の total RNA 溶液を得た。

#### 5. 定量的 RT-PCR 解析

遺伝子の相対発現量を、単離した totalRNA を鋳型にし、定量的 RT-PCR で測定した。定量的 RT-PCR は、反応液に QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit(Qiagen)を、核酸増幅には MiniOpticon™ Version 3.1(Bio-Rad)を用いた。定量的 RT-PCR に用いた Forward 及び Reverse Primer のオリゴヌクレオチド配列は Table 1 に示した。RT-PCR 反応では、1 反応あたりに RT-PCR Mater Mix  $7.5\mu\text{l}$ 、Forward Primer  $0.3\mu\text{l}$ 、Reverse Primer  $0.3\mu\text{l}$ 、Quanti Tect RT

Mix 0.15 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O 3.75 $\mu$ l を混合し、RNA 溶液(100ng/3 $\mu$ l)を 3 $\mu$ l 加えた。RT-PCR 反応は 95°C・15 分、(94°C・15 秒、55°C・30 秒、72°C・30 秒)×35 サイクルで行った。相対発現量の解析には CFX Manager(Bio-Rad)を使用し、Bio-Rad 社 Real-time PCR Application Guide に従い、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で、相対発現量を求めた。*B. japonicum* のハウスキーピング遺伝子 *sigA* (b117349)は、本実験の誘導条件では発現に有意的な差が無いことを確認し、発現量の基準として用いた。

## 6. 根粒菌遺伝子破壊株の構築

### 6-1 *B. japonicum* USDA110 クローンの単離

*B. japonicum* USDA110 の遺伝子破壊に用いた plasmid を Table 1 に示した。  
*B. japonicum* USDA110 の コスミドクローンライブラリーより pKS800::*brc02044*、pKS800::*brc00911* から、目的遺伝子領域を単離した。pKS800::*brc02044* は *NheI* で、pKS800::*brc00911* は *HindIII* で 37°C、1 時間処理した。処理した DNA 試料はアガロースゲル電気泳動 (アガロース濃度 0.8%) により、pKS800::*brc00911* からは *blr7026* から *blr7029* までを含む 12.1kbp の DNA 断片を単離した。同様に pKS800::*brc02044* からは *b117019* から *b117021* を含む 11.1Kbp の DNA 断片を単離した。アガロースゲルからの DNA 断片の単離には MonoFas DNA 精製キット I (GLサイエンス) を用いた。

### 6-2 RND 欠失変異株 ( $\Delta$ RND 株) の構築

#### 6-2-1 pK18mob- [*NheI* frag] の構築

suicide vector pK18mob を *Xba* I で 37°C、1 時間処理し、pK18mob 断片を単離した。pK18mob 断片と、pKS800::*brc02044* を *NheI* 処理し、得られた 11.1Kbp

の DNA 断片を Ligation-Convenience Kit(ニッポンジーン)によりライゲーションし pK18mob- [*Nhe*I frag] を構築した。pK18mob- [*Nhe*I frag] はエレクトロポレーションにより *E. coli* JM109 へ導入した。エレクトロポレーション後の菌液は、Kanamycin 100  $\mu$ g/ml、IPTG 0.5mM、X-gal 0.02%(w/v)を含んだ LB 寒天培地に塗抹し、30°Cで 1 日間培養し、出現したコロニーの中から白色のものを選抜し、*E. coli* JM109 pK18mob- [*Nhe*I frag]とした。

#### 6-2-2 b117019-b117021 の破壊

pHP45 $\Omega$ を *Sma* I で 30°C、1 時間処理し、spectinomycin 及び streptomycin 耐性をコードする  $\Omega$ カセットを含んだ pHP45 $\Omega$ 断片 (2.1kbp : 以下  $\Omega$ カセット) を単離した。pK18mob [*Nhe*I frag] が導入された *E. coli* JM109 を 37°Cで一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)を用いて、pK18mob [*Nhe*I frag] を単離した。pK18mob [*Nhe*I frag] は *Bst*WI で 55°C、1 時間処理し、12.1Kbp の pK18mob [*Nhe*I frag]断片を単離した。pK18mob [*Nhe*I frag]断片は、Blunting-Convenience Kit により  $\Omega$ カセットとライゲーションし pK18mob [*Nhe*I frag]:: $\Omega$ を得た (Fig. 1)。pK18mob [*Nhe*I frag]:: $\Omega$ はエレクトロポレーションにより *E. coli* JM109 へ導入した。エレクトロポレーション後の菌液は、kanamycin 100  $\mu$ g/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地に塗抹し、37°Cで一晩培養し、*E. coli* JM109 pK18mob- [*Nhe*I frag]:: $\Omega$ を得た。

#### 6-2-3 接合伝達と破壊株の構築

pK18mob [*Nhe*I frag]:: $\Omega$ は triparental mating で *B. japonicum* USDA110 に導入した。供与菌として *E. coli* JM109 pK18mob [*Nhe*I frag]:: $\Omega$ は

kanamycin 100  $\mu$ g/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地で培養した。ヘルパーとして *E. coli* MM294 pRK2013 を kanamycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地で培養した。受容菌として *B. japonicum* USDA110 を chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml を含む HM 培地で培養した。各菌液は遠心分離 (10000rpm、3 分) し、上清を取り除いた。Saline で菌体を懸濁し、遠心分離、上清を取り除いた。この作業を三回行った。Saline 300  $\mu$ l で各菌体を懸濁し、各菌液 150  $\mu$ l を 1.5ml エッペンチューブ中で混合した。抗生物質を含まない HM 培地にメンブレンフィルター (A045F047A;ADVANTEC) を乗せ、その上に混合した菌液 50  $\mu$ l を滴下し、30°C、3 日間培養した。培養後、フィルター上の菌体を saline (0.85% NaCl) に懸濁し、chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む AG 寒天培地に塗抹し、30°C で 7 日間培養した。出現したコロニーの中から、kanamycin 感受性のものを b117019-b117021 破壊株 ( $\Delta$ RND) として単離した。

### 6-3 PHB 代謝変異株 ( $\Delta$ PHB 株) の構築

#### 6-3-1 pK18mob- [*Hind*III frag] の構築

suicide vector pK18mob を *Hind*III で 37°C、1 時間処理し、pK18mob 断片を単離した。pKS800::brc00911 を *Hind*III 処理し、得られた 11.1Kbp の DNA 断片と、pK18mob 断片を、Ligation-Convenience Kit(ニッポンジーン)によりライゲーションし pK18mob- [*Hind*III frag] を構築した。pK18mob- [*Hind*III frag] をエレクトロポレーション法により *E. coli* JM109 へ導入した。エレクトロポレーション後の菌液は、kanamycin 100  $\mu$ g/ml、IPTG 0.5mM、X-gal 0.02%(w/v)を含んだ LB 寒天培地に塗抹し、30°C で 1 日間培養し、出現したコロニーの中から白色を選抜し、*E. coli* JM109 pK18mob[*Nhe*I frag]として単離

した。

### 6-3-2 blr7026-blr7029 の破壊

*E. coli* JM109 pK18mob [*Hind*III frag] を 37°Cで一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて、pK18mob[*Hind*III frag] を単離した。pK18mob [*Hind*III frag] は *Eco*RV で 37 °C、1 時間処理し、12.8Kbp の pK18mob[*Hind*III frag] 断片を単離した。pK18mob[*Hind*III frag] 断片は、Blunting-Convenience Kit により  $\Omega$  カセットとライゲーションし pK18mob[*Hind*III frag]:: $\Omega$  (Fig. 1) を得た。pK18mob[*Hind*III frag]:: $\Omega$  はエレクトロポレーションにより *E. coli* JM109 へ導入した。エレクトロポレーション後の菌液は、kanamycin 100  $\mu$ g/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地に塗抹し、37°Cで一晩培養し、*E. coli* JM109 pK18mob[*Hind*III frag]:: $\Omega$  を得た。

### 6-3-3 接合伝達と破壊株の構築

pK18mob [*Hind*III frag]:: $\Omega$  を triparental mating で *B. japonicum* USDA110 に導入した。供与菌には *E. coli* JM109 pK18mob [*Hind*III frag]:: $\Omega$  を用い、kanamycin 100  $\mu$ g/ml、streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地で培養した。ヘルパーには、*E. coli* MM294 pRK2013 を用い、kanamycin 100  $\mu$ g/ml を含む LB 培地で培養した。受容菌には、*B. japonicum* USDA110 を用い、chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml を含む HM 培地で培養した。各菌液は遠心分離 (10000rpm、3 分) し、上清を取り除いた。saline (0.85% NaCl) で菌体を懸濁し、遠心分離後に上清を取り除いた。この操作を 3 回行った。saline (0.85% NaCl) 300  $\mu$ l で各菌体を懸濁し、各菌液 150  $\mu$ l を 1.5ml エッペンチューブ中

で混合した。抗生物質を含まない HM 培地にメンブレンフィルターを乗せ、その上に混合した菌液 50  $\mu$  l を滴下し、30°C、3 日間培養した。培養後、フィルター上の菌体を saline (0.85% NaCl) に懸濁し、chloramphenicol 30  $\mu$  g/ml、streptomycin 100  $\mu$  g/ml を含む AG 寒天培地に塗抹し、30°C で 7 日間培養した。形成されたコロニーから kanamycin 感受性のものを blr7026-blr7029 破壊株 ( $\Delta$ PHB) として単離した。

## 7. 宿主植物 (ダイズ) への接種試験

ダイズ種子 (*G. max* L. Merr. cv. Enrei) を 70% ethanol 中に 1 分間置き、その後に滅菌蒸留水で 3 回洗浄した。そして、次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 5%) 中に 2 分間置き、滅菌蒸留水で 6 回洗浄した。あらかじめ Norris-Date 氏液 (20) 30ml を入いれてオートクレーブ滅菌しておいたシードバッグに、殺菌洗浄した種子を置いた。接種する根粒菌は、必要に応じて加えられた抗生物質を含む YMB 培地 (20ml) で 4 日間振とう培養した。菌液を遠心分離 (4°C、8000rpm、5 分) し上清を除去後、滅菌した PBS (phosphate buffered saline; 5.14mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 116mM NaCl, 6.69mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH7.0) を 50ml 加えて懸濁した。この操作 3 回繰り返し菌体を洗浄後、PBS で  $10^7$  cfu/ml に調製した。調製した菌液を、種子あたり 1ml になるように接種し、グロースチャンバー (明期: 14 時間 23.5°C; 暗期: 10 時間 20°C) で接種後 40 日目まで栽培した。接種後 25 日目より 5 日間毎に植物体根に着生した根粒の数を計測した。接種後 40 日目に植物体を回収し、アセチレン還元活性を測定した。根粒を植物体から回収し、植物体とともに 60°C で 18 時間乾燥処理し、植物体及び根粒の乾燥重量を測定した。

## 8. アセチレン還元活性

1000ml 容プラスチックポットに植物体 2 個体を入れ、ゴム栓で密封した。ゴム栓からシリンジで空気を 100ml 抜きとり、アセチレンガスを 100ml 注入し、暗所で 30°C、30 分間静置した。1ml 容シリンジで容器内の空気を 1ml 抜き取り Porapak N (50/80 mesh:Waters) を装着したガスクロマトグラフィー (GC-8A : Shimadzu) を用いて、植物個体あたりのエチレン生成量を測定した。

## 9. 増殖測定試験

菌株・培養条件は RNA 抽出の処理と同じ方法で行った。本培養後菌の濁度を  $OD_{600} \doteq 0.1$  になるように YMB 培地で希釈し、増殖測定用 L 字試験管に 5ml ずつ分注した。その後各フラボノイド (終濃度  $5 \mu M$ ) を添加し誘導処理を行った。フラボノイド添加後、直ちに小型振盪培養装置 (TVS062CA:ADVANTEC) で測定した (30°C、30rpm、測定安定待ち 1 分、5 分毎に  $OD_{660}$  を測定)。



## 結果

### [1] BjG30 (薬剤排出ポンプ・PHB代謝系)の発現と共生における役割

#### 1. BjG30 の genistein/daidzein による誘導発現量の測定

マクロアレイ解析では、根粒菌遺伝子が 1 個以上含まれるクローン単位での相対発現量を測定しているため、遺伝子単位での相対発現量が定量出来ない。そこで、BjG30 に含まれる b117017 から b117033 までの 17 個の遺伝子の相対発現量を定量的 RT-PCR で測定した。各遺伝子の増幅に用いられたプライマーを Table 1 に示した。genistein を加え 30 分誘導後、各遺伝子の相対発現量を測定し、相対発現量を Fig. 12 に示した。b117017、blr7026、blr7031、b117032 を除き、24.6~213.9 倍に強く発現した。b117018 から b117020 及び b117025、blr7027 から blr7030 までの発現量は特に強く発現しており、BjG30 の各遺伝子の genistein に対する発現プロファイルは、マクロアレイ解析から得られたクローンの発現プロファイルと一致していた。次に、daidzein で 30 分誘導後に各遺伝子の相対発現量を測定した。その結果、BjG30 の全ての遺伝子の発現量は、genistein で誘導した場合よりも大きく低下し、最大でも 14.7 倍 (b117025) だった。また、等量の genistein と daidzein で 30 分間誘導後に各遺伝子の相対発現量を測定した結果、b117022 を除き、発現量は genistein 誘導時の 80~20%程度に減少した。この結果より、BjG30 は genistein に特異的に誘導され、その発現量は daidzein により競合的に阻害されることが明らかになった。

#### 2. BjG30 の 5-hydroxy/deoxy flavonoids による誘導発現量の測定

genisteinn の分子構造を daidzein と比較すると、genistein はフラボノイド骨格の 5 位が OH になっている。そこで、5-hydroxyflavonoids と 5-deoxyflavonoids を用いて BjG30 の相対発現量を比較した。5-hydroxyflavonoid には、isoflavone の genistein 及び biochanin、flavonol の kaempferol 及び quercetin、flavone の apigenin 及び luteolin、flavanone の naringenin を用いた。5-deoxyflavonoid には isoflavone の daidzein、formononetin 及び glycitein、coumestan の coumestrol を用いた。BjG30 より、Fig. 12 で genistein で強く誘導された bl17019、bl17025、blr7027、blr7029 を代表遺伝子として発現解析に用い、相対発現量を Fig. 13 に示した。その結果、naringenin を除き、全ての 5-hydroxyflavonoid で代表遺伝子が誘導された。quercetin での代表遺伝子の発現量は 161.1~205.2 倍で、genistein (148.3~213.9 倍)と同程度だった。biochain A での発現量は 44.6~141.0 倍、kaempferol は 27.5~60.9 倍、luteolin は 11.0~33.8 倍、apigenin は 4.4~9.2 倍であり、各 5-hydroxyflavonoid で発現量に差があった。一方、5-deoxyflavonoid では、代表遺伝子の発現は daidzein で 1.9~14.7 倍、formononetin で 4.6~29.6 倍であり、5 位が OH に置き換わった genistein、biochanin A に比べ、発現量は大きく低下した。coumestrol 及び glycitein でも、bl17019、bl17025 のみ誘導されたが、今回用いた 5-deoxyflavonoid では genisteinn のような強い誘導は見られなかった。以上の結果より、BjG30 は主に 5-hydroxyflavonoid の isoflavone、flavonol、flavone 類で誘導されることが示唆された。

### 3. BjG30 の発現における genistein 濃度の影響

BjG30 遺伝子の発現における genistein 濃度の影響について調べるため OD<sub>600</sub>

≒0.1 に希釈した菌液に終濃度 0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10 $\mu$ M になるように genistein を添加し、30 分間誘導後、BjG30 の代表遺伝子 (bll7019、bll7025、blr7027、blr7029) と *nod* 遺伝子 *nodW*、*nodD1* の発現量を測定した (Fig. 14A)。その結果、BjG30 の代表遺伝子は genistein 濃度の上昇により相対発現量は増加し、bll7019、bll7025、blr7029 は 7.5  $\mu$ M で、blr7027 は 5  $\mu$ M で最大となった。それ以上の濃度では発現量は低下する傾向が見られた。一方 *nodW*、*nodD1* は genistein 濃度の上昇による発現量の変動は見られず、BjG30 の代表遺伝子の発現プロファイルとは異なっていた。

#### 4. BjG30 の発現における genistein 処理時間の影響

ダイズ根粒菌の培養菌液に genistein 5 $\mu$ M を添加し、それぞれ 1、5、15、30、60 分間誘導後、BjG30 の代表遺伝子、*nodW*、*nodD1* についてリアルタイム RT-PCR により相対発現量を測定した (Fig. 14B)。その結果、BjG30 の代表遺伝子は、genistein 処理後 5 分で強い誘導が確認された。bll7019、blr7027、blr7029 は処理後 15 分で、bll7025 は処理後 5 分から 15 分で発現は最大となった。処理後 30 分から 60 分における発現量は、bll7019、blr7017、bll7025、blr7029 のいずれでも、15 分よりも低下する傾向が見られた。一方、*nodW*、*nodD1* の発現量は処理後 15 分から 60 分にかけて上昇する傾向が見られた。この結果より、BjG30 は *nodW*、*nodD1* よりも早く genistein により誘導される遺伝子群であることが示唆された。

#### 5. 根粒形成における RND 及び PHB 破壊の影響

genisteinn 処理後 30 分で特に強く誘導される BjG30 遺伝子の内、bll7019、bll7020、bll7021 は薬剤排出ポンプを、blr7028、blr7029 は PHB 代謝に関わ

る遺伝子であると考えられた。そこで、b117019–b117021 の欠失変異株 ( $\Delta$ RND 株) と b1r7028–b1r7029 の欠失変異株 ( $\Delta$ PHB 株) を構築し、根粒形成に与える影響を調べた。 $\Delta$ RND 株、 $\Delta$ PHB 株及び USDA110(親株) をダイズに接種し、接種後 25 日、30 日、35 日、40 日に植物体一個体当たりの根粒数を測定した。40 日目に植物体一個体当たりの、根粒乾重量、アセチレン還元活性を測定した (Table 3)。両変異株を接種した場合の植物体一個体当たりの根粒乾重量は、親株を接種した時の約 75%に低下した。それに対して、植物体一個体当たりの根粒数は、接種後 25 日目 40 日目にかけて、 $\Delta$ RND 株を接種した植物体は、親株や  $\Delta$ PHB 株を接種した植物体よりも根粒重量が顕著に増加した。接種後 40 日目における根粒一個当たりの重量は、 $\Delta$ PHB 株では、親株より僅かに減少したが、 $\Delta$ RND 株では、親株の 54%に大きく減少した。植物体一個体当たりのアセチレン還元活性は、両変異株で、親株の 85~86%に減少した。一方、根粒一個当たりのアセチレン還元活性は、 $\Delta$ PHB 株では、親株と同程度だったが、 $\Delta$ RND 株では親株の 61%に減少した。

#### 6. $\Delta$ RND 株、及び $\Delta$ PHB 株の増殖における genistein、daidzein の影響

親株及び変異株の genistein 及び、daidzein に対する感受性を、増殖測定により評価した。親株及び  $\Delta$ RND、 $\Delta$ PHB 株を、genistein または daidzein を 2.5、5、10  $\mu$ M 加えた YMB 培地、及び何も加えない YMB 培地で 48 時間培養し、の  $OD_{660}$  を測定した。何も加えずに培養した場合の  $OD_{660}$  に対する genistein または daidzein を加えて培養した場合の  $OD_{660}$  の比率を求めた (Fig. 15)。親株及び両破壊株において、genistein 及び daidzein の濃度の上昇とともに増殖の低下が見られた。 $\Delta$ RND 株における genistein 存在下での  $OD_{660}$  は、2.5  $\mu$ M で genistein 無添加の 49.8%、5  $\mu$ M で 2.0%、10  $\mu$ M で 3.2%に減少し、親株、

及び  $\Delta$ PHB 株に比べ顕著だった。この結果より  $\Delta$ RND 株は genisteinn に対する感受性が強くなっていることが示唆された。一方、daidzein 2.5  $\mu$ M から 10  $\mu$ M 存在下での、親株及び両変異株の増殖は、無添加に対して 80.5%から 33.6%に減少したが、親株と両変異株では大きな差は見られなかった。これらの結果より、b117019-b117021 の破壊は genistein に対する感受性が向上するが、daidzein に対する感受性には影響しないことが明らかになった。以上の結果より、RND 型薬剤排出ポンプ (b117019-b117021) が、genistein を細胞外へ排出することに関わっている可能性が示唆された。

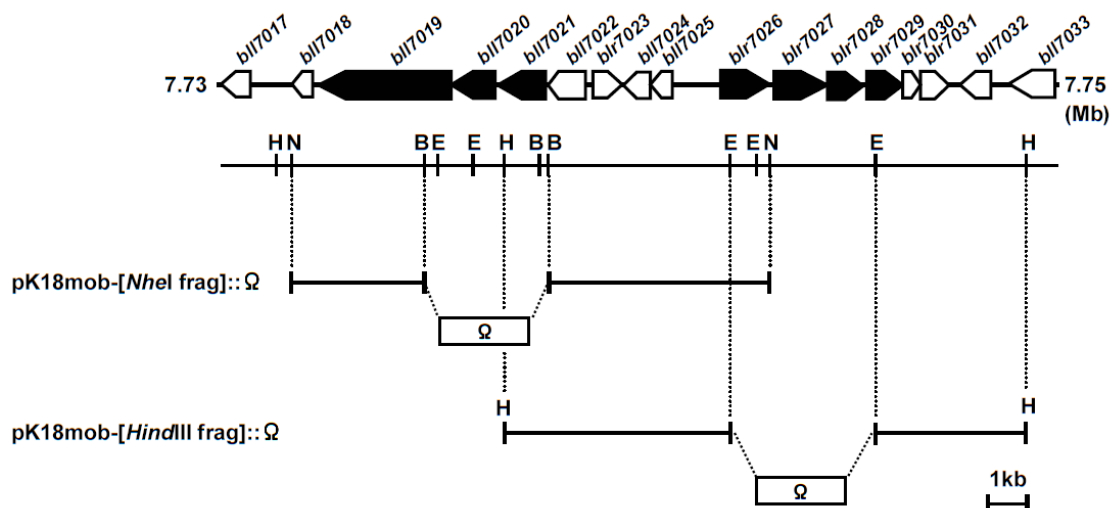


Fig. 11. bll7017 から bll7033 を含む B<sub>j</sub>G30 領域の遺伝子マップ及び、  
*B. japonicum* USDA110 破壊株構築に利用した制限酵素マップ

bll7019 から bll7021 並びに、blr7026 から blr7029 の欠失変異株の構築に  
 用いた組み換えプラスミド pK18mob-[NheI frag]::Ω 及び、pK18mob-[HindIII  
 frag]::Ω は、材料および方法【6】の通りに構築した。

B, *Bst*WI; E, *Eco*RV; H, *Hind*III; N, *Nhe*I. Gene annotation (Rhizobase,  
<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>): bll7017, LuxR family  
 transcriptional regulator; bll7018, unknown protein; bll7019,  
 AcrB/AcrD/AcrF family protein; bll7020, efflux protein; bll7021, HlyD  
 family secretion protein; bll7022, unknown protein; blr7023 and  
 bll7024, TetR family transcriptional regulators; bll7025, hypothetical  
 protein; blr7026, unknown protein; blr7027, hypothetical protein;  
 blr7028, acetoacetate decarboxylase; blr7029, β-hydroxybutyrate  
 dehydrogenase; blr7030, unknown protein; blr7031, hypothetical  
 protein; bll7032, putative cyclic NTP-binding protein; bll7033, LuxA-  
 like protein.

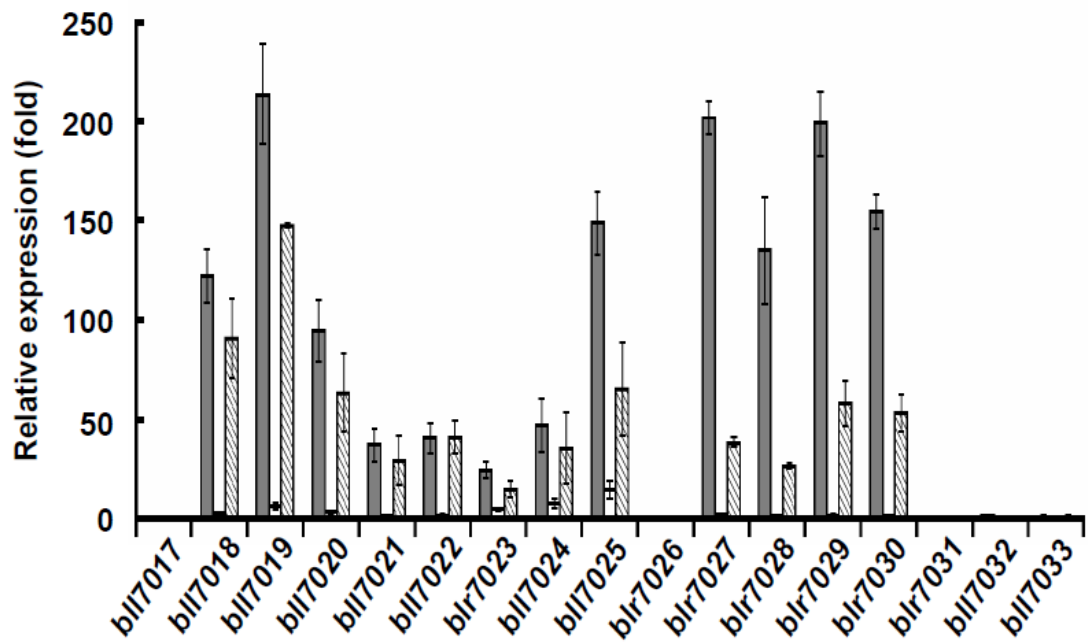


Fig. 12. B.jG30 の遺伝子発現における genistein、daidzein の影響

菌体を genistein(5µM) (■)、daidzein(5µM) (□)、genistein(5µM) + daidzein(5µM) (▨) で 30°C、30 分処理し、定量的 RT-PCR (SYBR-Green) によって発現量を調べた。相対発現量は、ダイズ根粒菌のハウスキーピング遺伝子 (*sigA*) の発現量を基準とし、3 反復の平均値±標準偏差を示した

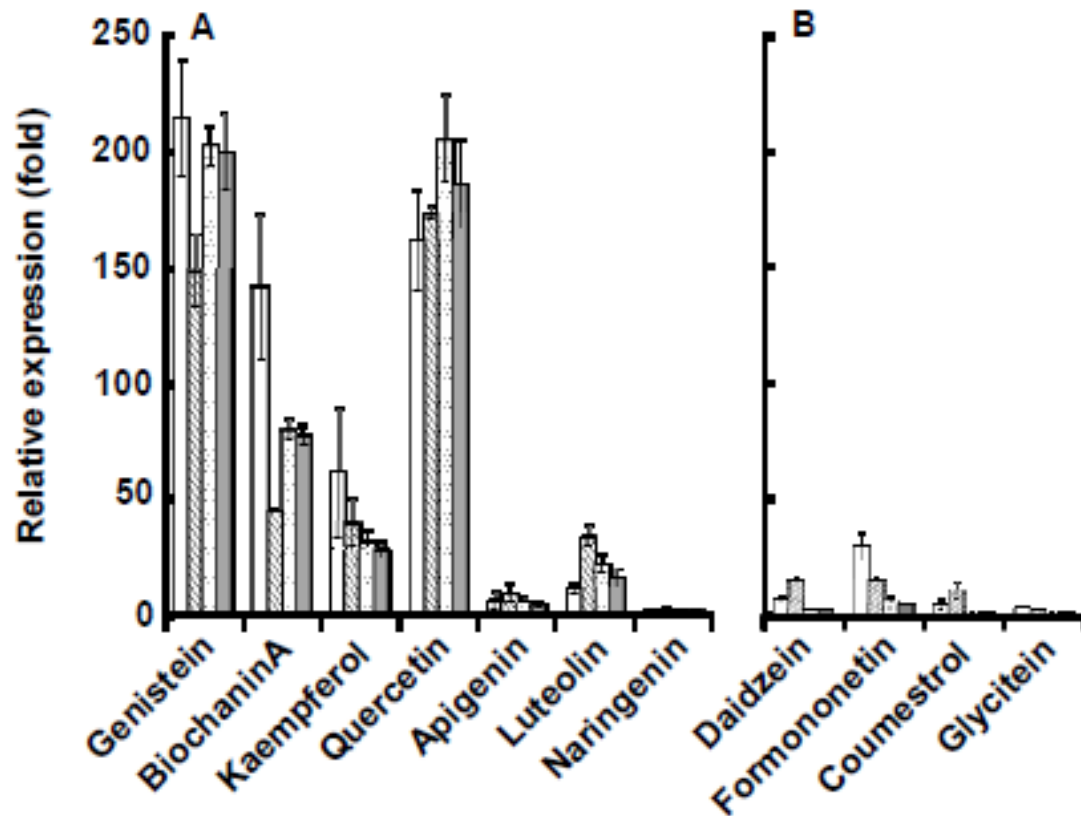


Fig. 13. BjG30 の遺伝子発現における 5-hydroxy 型、及び 5-deoxy 型フラボノイドの影響

菌体を 5-hydroxy (5  $\mu$ M) (A)、或は 5-deoxy (5  $\mu$ M) (B) で 30°C、30 分処理し、定量的 RT-PCR (SYBR-Green) によって、BjG30 の代表遺伝子 (□, bll17019; ▨, bll17025; ▩, blr7027 and ■, blr7029) 発現量を調べた。相対発現量は、ダイズ根粒菌のハウスキーピング遺伝子 (*sigA*) の発現量を基準とし、3 反復の平均値 ± 標準偏差を示した。



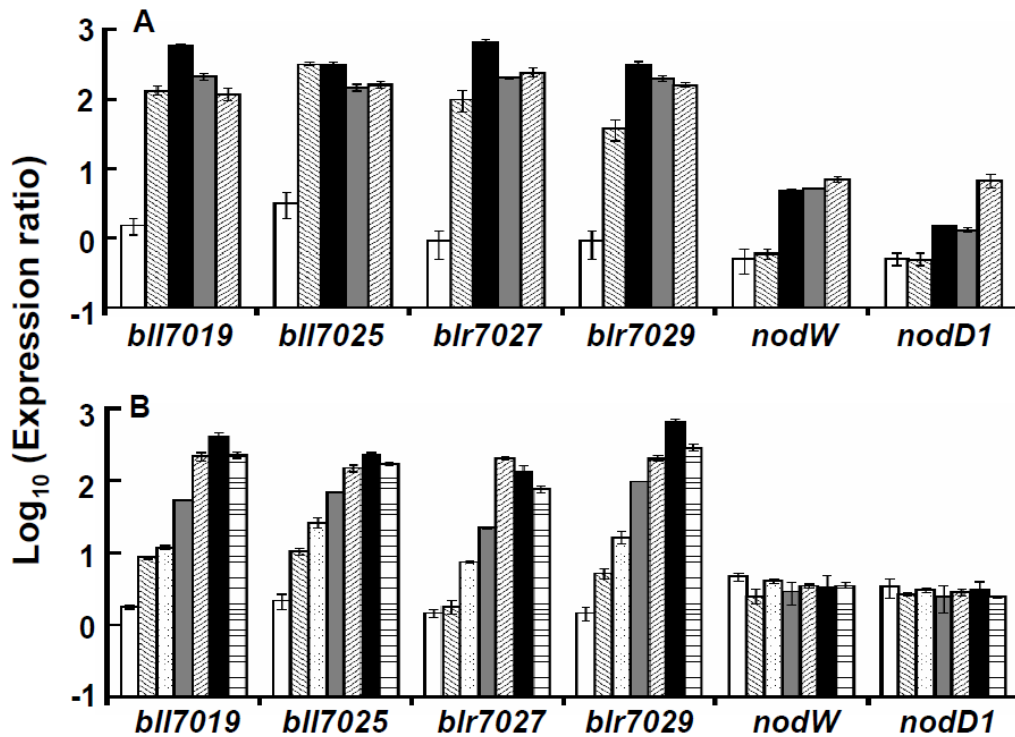


Fig. 14. BjG30 遺伝子と *nodW*, *nodD1* の発現量における genistein の濃度及び処理時間の影響

A : genisten 処理時間における BjG30 代表遺伝子 (*bll7019*, *bll7025*, *blr7027*, *blr7029*) と *nodD1*, *nodW* の発現プロファイルの比較。菌体を genistein (5 $\mu$ M) で 30 $^{\circ}$ C、1~60 分間処理し、定量的 RT-PCR で発現量を調べた。

□, 1 min; ▨, 5 min; ■, 15 min; ▩, 30 min; ▤, 60 min.

B : GEN 処理濃度における BjG30 代表遺伝子と *nodD1*, *nodW* の発現プロファイルの比較。菌体に GEN 0.1~10 $\mu$ M を添加し 30 $^{\circ}$ C で 30 分間処理し、定量的 RT-PCR で発現量を調べた。

□, 0.1  $\mu$ M; ▨, 0.5  $\mu$ M; ▩, 1.0  $\mu$ M; ■, 2.5  $\mu$ M; ▤, 5  $\mu$ M; ▥, 7.5  $\mu$ M; ▦, 10  $\mu$ M.

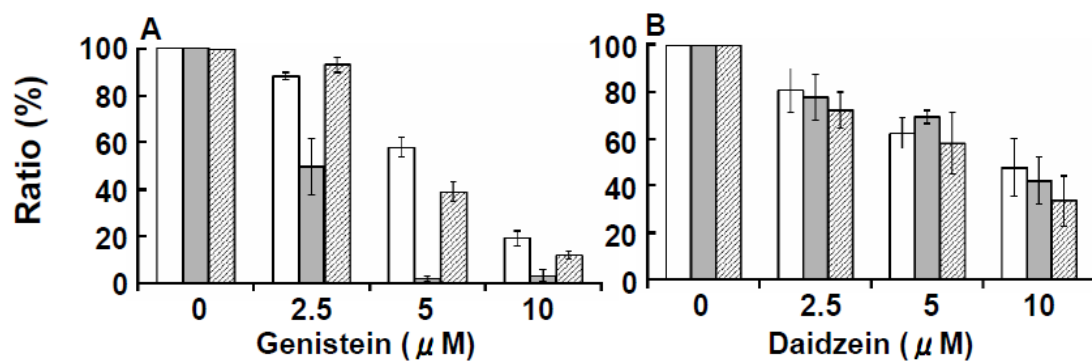


Fig. 15. ゲニステイン及びダイゼインに対する感受性における BjG30 遺伝子破壊の影響

YMB 培地で増殖した菌液の  $OD_{660}$  を 0.1 に調整後、genistein、或いは daidzien (0~10 μM) を含んだ YMB 培地で 30°C、48 時間振とう培養した。

Ratio(%) : genistein(daidzein) 存在下で 48 時間培養後の  $OD_{660}$  の、genistein(daidzein) を含まない場合の  $OD_{660}$  に対する比を求め、3 反復の平均値±標準偏差を示した。

□, wild type; ■, ΔRND mutant; ▨, ΔPHB mutant.

Table 2. 本実験で用いた菌株、プラスミド、オリゴヌクレオチド

Strain or plasmid	Characteristics or sequence	Source or reference
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains		
USDA110	Wild-type strain	USDA, Beltsville, MD
ΔRND mutant	Deletion of <i>bll7019-bll7021</i> of USDA110/insertion of Ω; Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	This study
ΔPHB mutant	Deletion of <i>blr7026-blr7029</i> of USDA110/insertion of Ω; Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA</i> , cloning strain	90
Plasmids <sup>a</sup>		
pK18mob	Mobilizable suicide vector; Km <sup>r</sup>	77
pHP45Ω	Plasmid carrying Ω cassette; Sm <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	70
pRK2013	ColE1 replicon carrying RK2 transfer genes; Km <sup>r</sup>	22
pK18mob-[ <i>Nhe</i> I frag]::Ω	pK18mob carrying Ω-inserted 11.1kb <i>Nhe</i> I fragment from brc02044 clone of USDA110	86, This study
pK18mob-[ <i>Hind</i> III frag]::Ω	pK18mob carrying Ω-inserted 12.2kb <i>Hind</i> III fragment from brc00911 clone of USDA110	86, This study
Oligonucleotides <sup>b</sup>		
bll7017 F/R	5'-ACACCTGCTTCTACGTCAAT-3'/5'-CTGAAGCCTTCGAGGATG-3'	This study
bll7018 F/R	5'-CACATCCGTCACCTACAAC-3'/5'-GCAGTCACTGTCAGAGGAAT-3'	This study
bll7019 F/R	5'-AACATCTATGCCTTACCAG-3'/5'-GGAGAATTTCGAGATAGATCACC-3'	This study
bll7020 F/R	5'-CGTCTGGATCGTCAATCA-3'/5'-CTGCTGATCCTGTTTCGATA-3'	This study
bll7021 F/R	5'-GGAAGTGTGAGAGTGAAGACC-3'/5'-CCTGCCTTGATCAACACTT-3'	This study
bll7022 F/R	5'-ATGCCGCGACTTACATT-3'/5'-GACAGCTTGACCTTGATCTC-3'	This study
blr7023 F/R	5'-AAGCTCATCGAGGAATCGTT-3'/5'-CGTCGCTTCATTCAAGAGTT-3'	This study
bll7024 F/R	5'-CAATGGATGCTTACCTCAG-3'/5'-TTAGCAGGCGGATCTGTAG-3'	This study
bll7025 F/R	5'-GCTCTATCGCAGCTTCAAT-3'/5'-GCAAGGTAGGTCTCGATGAT-3'	This study
blr7026 F/R	5'-CAGACATCAGCTTCGAGATA-3'/5'-AACTCCTGCTTGATCCACTT-3'	This study
blr7027 F/R	5'-GTCTACAACATCGTTCACCTG-3'/5'-GTGCTCTAGATCGAATGTGA-3'	This study
blr7028 F/R	5'-CCGCTCGTCAAGTATGAAT-3'/5'-GGAACATGCAGTGGTTGTAG-3'	This study
blr7029 F/R	5'-GTTCAAGTCAGCCTACGTC-3'/5'-GACCTCATCTCTTCTCATCTTG-3'	This study
blr7030 F/R	5'-ACTCTGCAGCATGGTATGA-3'/5'-ATGAGGAAGGAGCATTGAC-3'	This study
blr7031 F/R	5'-GCCCAGATGAAGACCTATT-3'/5'-GTCAGACTTCAGCTGCTTG-3'	This study
bll7032 F/R	5'-TGACGATGAGCAAGCTG-3'/5'-CTCATATGCGCCTTGACT-3'	This study
bll7033 F/R	5'-CTGGTGTCTGTTCTTCATGT-3'/5'-CTTCCACTGTTGTACTCGTC-3'	This study

<sup>a</sup>クローンのゲノム座標: brc02044, 7,723,981 to 7,747,611; brc00911, 7,735,146 to 7,758,873.

<sup>b</sup>遺伝子番号はRhizobaseに基づいた (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>)(42).

**Table 3.** 根粒着生数、根粒重量、窒素固定におけるRND、PHB破壊の影響

Inoculated strain	Nodule number [ A ]	Nodule dry weight [ B ]	[ B ] / [ A ]	Acetylene reduction activity(ARA)	
	(number/plant)	(mg/plant)	(mg/nodule)	$\mu\text{mol/h/plant}$	$\text{nmol/h/nodule}$
Wild-type	5.70 $\pm$ 0.82(a)	6.25 $\pm$ 0.42(a)	1.10 $\pm$ 0.09(a)	0.29 $\pm$ 0.08(a)	50.91 $\pm$ 6.43(a)
$\Delta$ RND mutant	8.00 $\pm$ 1.05(b)	4.72 $\pm$ 0.74(b)	0.59 $\pm$ 0.02(b)	0.25 $\pm$ 0.03(a)	30.99 $\pm$ 0.83(b)
$\Delta$ PHB mutant	5.14 $\pm$ 0.82(a)	4.68 $\pm$ 0.31(b)	0.91 $\pm$ 0.09(a)	0.25 $\pm$ 0.05(a)	48.61 $\pm$ 2.11(a)

各項目内の数値は、2回以上の反復の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。( )内のアルファベットが異なる数値間では、t検定(P<0.05)で有意差が認められた。

## 考察

BjG30 は、マクロアレイ解析により genistein 処理後 30 分で発現するゲノム領域として見出された。一方、genistien 処理後 30 分では、共生領域内では *nod* 遺伝子の内、*nodW*、*nodV* 含む領域で発現が見られた。*nod* 遺伝子と BjG30 に含まれる遺伝子の発現プロファイルを詳細に比較するため、定量的 RT-PCR により、BjG30 に含まれる遺伝子と、*nodW*、*nodD1* の genistein に対する発現プロファイルを詳細に調べた。genistein の誘導時間による発現プロファイルを調べた結果、BjG30 は genistein 処理後 5 分から発現し、*nodW*、*nodD1* よりも早期に発現が最大となり、genistein 濃度に対する発現プロファイルでは、BjG30 の発現は  $0.5 \mu\text{M}$  から発現が上昇し、genistein  $7.5 \mu\text{M}$  でおよそ最大となった (Fig. 14)。Fig. 4 において *nodW*、*nodD1* は  $0.1$  から  $10 \mu\text{M}$  にかけて発現に大きな変化は見られなかった。しかし、*nodABC* については genistein 濃度の上昇 ( $0.1$  から  $10 \mu\text{M}$ ) により発現は上昇することが報告されている (43)。

BjG30 は genistein や quercetin 等の 5-hydroxy 型フラボノイドで強く誘導され、daidzein や coumestrol 等の 5-deoxy 型フラボノイドではほとんど誘導されなかった (Fig. 13)。一方、*nodABC* の各 flavonoid に対する発現プロファイルは Kosslak らに調べられており、*nodABC* は genistein だけでなく daidzein でも同程度に強く誘導されたが、quercetin ではほとんど誘導されなかった (43)。これらの結果より、genistein 濃度、及び誘導時間、また flavonoid の種類による、BjG30 と *nod* 遺伝子の発現プロファイルは異なることが示唆された。さらに、BjG30 には *nod* box モチーフが存在しないため (47)、BjG30 の発現は、*nodD*、*nodW* による調節は受けず、blr7023 及び bl17024 にコードされる TetR family transcriptional regulator (TFR) を介して発現すると推測された。

ダイズ根粒菌 TFR においても、genistein を認識する TFR があり、*nodD*、*nodW* を介さずに遺伝子を誘導発現するモデルが考えられている (47)。BjG30 もこのモデルに当てはまると考えられる。しかし、*B. japonicum* においては、genistein 誘導 5 分で発現する TFR を含む領域は、今までに報告は無かった。また、*bl17019*、*bl17025*、*blr7027*、*blr7029* は互いによく似た発現プロファイルを示しており、同じ TFR により制御されていると考えられた。RND 型薬剤排出ポンプを破壊した  $\Delta$ RND では、genistein に対する感受性が強くなった (Fig. 15)。この結果は、BjG30 がコードする RND 型薬剤排出ポンプが、genistein 等の 5-hydroxyflavonoid を排出することで、genistein の毒性を回避している可能性を示した。グラム陰性菌 *Vibrio harveyi* とグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* では、genistein は daidzein よりも強く DNA や RNA、タンパク質合成を阻害することが知られている (82)。ダイズ根粒菌では、genistein (20  $\mu$ M) を添加すると、daidzein または coumestrol (20  $\mu$ M) を添加した場合よりも増殖が抑制された (49)。DNA topoisomerase II や tyrosine kinase の活性は genistein で阻害されるが、daidzein は genistein の様な阻害作用が無いことが知られている (3, 58)。DNA topoisomerase II の阻害は ATPase 部位に genistein が結合することで生じ、その結合には genistein の 5 位の OH 基が重要であることが示唆されている (4)。Fig. 13 で、BjG30 を誘導した genistin、biochanin、quercetin、kaempferol、luteolin、apigenin には Topoisomerase II を阻害した報告があるため、BjG30 にコードされる RND 型薬剤排出ポンプは、これらの 5-hydroxy 型の flavonoid の持つ DNA topoisomerase II に対する阻害により、細胞の増殖が妨げられるのを防ぐために、細胞外へ flavonoid を排出していると推測された (3, 4, 13, 58)。 $\Delta$ RND 株を接種したダイズでは、根粒一個の当たりの重量と、窒素固定能が大き

く減少した (Table 3)。しかし、 $\Delta$ RND 株における根粒数は、接種後 25 日目から 40 日目までにかけて親株よりも増加した。根粒重量と、窒素固定能の減少は、RND 型薬剤排出ポンプの破壊により、genistein が排出出来なくなり、細胞増殖の抑制が生じたためと考えられた。 $\Delta$ RND 株では根粒数が親株に比べ減少せず、増加したことで、BjG30 にコードされる RND 型薬剤排出ポンプは、根粒形成には関与していないと考えられた。Pueppke らの 1998 年の報告では、ダイズの根から分泌される daidzein、genistein、glycitein、coumestrol 等の flavonoid は pico molar 単位であり、根粒菌の *nod* 遺伝子は nano molar 単位の genistein、daidzein、coumestrol でも誘導されており、根圏における、根粒菌が flavonoid を受容し、*nod* ファクターを生産する過程では、flavonoid の濃度は非常に低濃度であることが示唆された (71)。BjG30 の発現が  $7.5 \mu\text{M}$  付近で最大となったことから (Fig. 14)、BjG30 の RND 型薬剤排出ポンプは根圏では強く発現しないと推測された。一方、Cho と Harper が 1991 年に、ダイズ根の acetone 抽出液から、根に含まれる genistein 含量を測定した結果、根の生重量当たりで  $20 \mu\text{g/g}$  であったため、根の内部は根圏より genistein は高濃度であり、BjG30 は根の内部に侵入し、根粒内で窒素固定を行うまでの過程で、発現すると推測された (71)。BjG30 とは異なる位置に存在する RND 型薬剤排出ポンプ BdeAB (*blr1515*、*blr1516*) を破壊すると、kanamycin 及び gentamycin に対する感受性が増し、ダイズとの共生では、根粒重量及び窒素固定能が減少するが、根粒数は増加する結果が報告されている (51)。この報告と、本研究の  $\Delta$ RND における接種試験の結果は、似た傾向を示している。さらに、BdeAB 破壊株では、根粒内の根粒菌の感染領域及び生菌数が親株よりも減少したことが確認されている (51)。

$\Delta$ PHB 変異をダイズに接種した結果、根粒重量が親株に比べ減少したが、根

粒数と窒素固定活性は親株に対する差は確認されなかった。acetoacetate decarboxylase と  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase は PHB から acetone の生産する経路に関わる酵素であり、根粒菌を接種したダイズでは、根粒で、acetone の生産、及び acetoacetate decarboxylase と  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase の活性が確認されている (80, 81)。BjG30 がコードする acetoacetate decarboxylase と  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase も、RND 型薬剤排出ポンプと同じく、根内部の genistein により誘導されると考えられるが、acetone の生産と窒素固定能との関連は、未だ未解明である (80)。acetoacetate decarboxylase は、プロトンを消費し、アセト酢酸をアセトンへ返還する脱炭酸反応である (35)。この脱炭酸反応は、プロトンを消費することで、細胞内の酸性ストレスを緩和する役目が知られている。例えば、*E. coli* 等は、glutamate decarboxylase により、グルタミン酸は脱炭酸反応により  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) を生産する過程での、プロトンの消費を利用し、細胞内の pH を調節している (10, 18)。対して、アルファルファと *Rhizobium meliloti* の共生では、バクテロイドは酸性条件に置かれているとされている (65)。また、RND 型薬剤排出ポンプは、プロトン濃度勾配により稼働し、プロトンを取り込み、薬剤を排出するため、排出ポンプの稼働により細胞内の pH は低下する可能性がある (59)。これに対して、acetoacetate decarboxylase を介したプロトン消費の脱炭酸反応により、細胞内の pH を一定に保とうとしている可能性がある。遺伝子破壊の標的である、blr7026、blr7027、blr7028 及び blr7029 の下流に存在する blr7030 は、親株では、genistein 処理後 30 分で 153.8 倍に誘導されたが、 $\Delta$ PHB では誘導は確認されなかった。blr7026、blr7027、blr7030 の機能は unknown のため、これらの遺伝子の欠失及び、発現の欠除が、共生に影響を与えている可能性があるため、これらの遺



伝子の機能の解明は検討していく必要がある。

以上の結果から、genistein 等の flavonoid は、根粒菌に対しては、*nod* 遺伝子の誘導物質として、宿主植物との共生を誘導する一方で、生育の阻害を引き起こす毒物としての作用を有していることが示唆された。本研究で見出された、*Bradyrhizobium* に存在するゲノム領域 BjG30 にコードされる薬剤排出ポンプは、flavonoid の濃度に応じてこれを排出することで、flavonoid が持つ毒性を避け、正常な共生の成立に関与していることが示唆された。

## 総合考察

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium* の共生領域に局在する *nod* 遺伝子群、及び T3SS 遺伝子群は、いずれもマメ科植物の放出する genistein、daidzein により誘導される事が知られている (15)。genistein、daidzein を認識し、*nod* 遺伝子群及び T3SS 遺伝子群の発現を誘導する転写調節遺伝子は *nodD1*, *nodV*, *nodW* が報告されている (44)。本研究では、マクロアレイ解析により、共生領域外に genistein により、*nodD1* 及び *nodV*, *NodW* より早期に誘導されるゲノム領域 BjG30 を見い出した。*nod* 遺伝子群、T3SS 遺伝子群、BjG30 は genistein で誘導されるという共通の特徴を持つが、本研究における発現解析により、T3SS 遺伝子群の発現には *nodD1* の他に *nodD2* の発現が必要である事が示唆された (Fig. 11)。そして BjG30 は、*nodD1* 及び *nodV*, *NodW* を介さず、genistein と TFR が結合することで誘導されると予測された。*nodD1*、*nodV*, *NodW* が BjG30 の発現に関わっているかを検証するためには、*nodD1* 破壊株及び *nodV*, *NodW* 破壊株で、genistein により親株と同様に BjG30 が誘導されるかを確かめる必要がある。そして、BjG30 の発現が、TFR (*blr7023* 及び *bl17024*) により制御されている事を検証するためには、*blr7023* 及び *bl17024* の破壊株を構築し、BjG30 の発現解析を行う必要がある。TFR はリプレッサーとして機能する事から (72)、*blr7023* 及び *bl17024* を破壊する事で、BjG30 が誘導されると予測される。

*nodD2* は菌密度の上昇により誘導され、*nodYABCSUIJ* オペロンの発現を抑制する事が報告されており (52)、*nodD2* が誘導されると、T3SS の発現の上昇と、*nod* 遺伝子群の抑制が行われていると考えられる。マメ科植物の flavonoid は根圏に放出される他に、根毛、根粒にも存在する事が確認されている (33)。そのため、*no1A*、*nodD2* を介した *nodYABCSUIJ* の抑制が破壊されると、通常根

粒中であっても、抑制されている *nod* 遺伝子群が発現する事が報告されている (26)。 *nod* 遺伝子群の抑制が行われなくなった根粒菌は、正常な根粒菌に比べ、根粒形成、窒素固定、根粒菌のバクテロイドへの分化が抑制される事が報告されているため、根粒中では *nodD2* を介して *nod* 遺伝子群を抑制する事、正常な共生を行う為に重要であると考えられる (26)。ダイズ根粒菌のバクテロイドでは、free living の状態に対して *nolA* 及び *nodD2* の発現は 19.5~30.2 倍に誘導されていることが報告されており (67)、バクテロイドに分化した根粒菌では *nodD2* が強く誘導され、*nodYABCSUIJ* を抑制している事が推測される。

一方、T3SS 遺伝子群は、*Sinorhizobium fredii* USDA257 の T3SS より分泌されるタンパク *NolX* 及び、*Rhizobium* sp. Strain NGR234 の T3SS から分泌されるタンパク *Y4I0* が、感染糸内で分泌され、根粒菌が感染糸から植物細胞内へ移行する段階に関与している事が報告されている (46, 89)。この事から、ダイズ根根菌が、感染糸から、根粒の植物細胞内へ侵入する段階で、T3SS が機能している事が推測される。根粒菌の *nod* 遺伝子群及び T3SS 遺伝子群は、根圏だけではなく、感染糸及び根粒内に存在する flavonoid により誘導されると推測される。しかし、感染糸及び根粒内では、根粒菌の菌密度が高い状態にあるため (24)、菌密度の上昇を感知する事で、*nodD2* を介した *nod* 遺伝子群の適切な抑制と T3SS 遺伝子群の誘導を行っているかと推測される。

マクロアレイ解析により、T3SS は、30℃では SSE 処理後 12 時間に強く誘導されるという発現プロファイルを示した一方、BjG30 は、genistein 処理後 30 分で強く誘導されるという発現プロファイルを示した (Figs. 5, 12)。SSE 及び genistein による BjG30 と T3SS の発現プロファイルは異なる事から、BjG30 の発現には、T3SS 遺伝子群の様に *nodD2* の発現を必要としない事が示唆される。genistein 濃度による BjG30 の発現は、genistein 濃度の上昇とともに上昇し、

5~10  $\mu\text{M}$  で最も強く誘導された (Fig. 14B)。Smit らの報告では、*nodD1* が誘導されるには、0.5~1  $\mu\text{M}$  の genistein が必要であるとしている (78)。本研究で用いられた genistein 終濃度 2.5~10  $\mu\text{M}$  では、*Bradyrhizobium japonicum* の増殖に抑制が見られた (Fig. 15)。この事から、根粒菌の *nod* 遺伝子群を誘導し、増殖の抑制を最小限に抑えられる genistein 濃度は、1  $\mu\text{M}$  以下であると推測される。genistein 濃度の上昇により、BjG30 の発現が上昇した事より、BjG30 の RND 型薬剤排出ポンプは、genistein を排出する事で、*nod* 遺伝子の誘導に必要な細胞内の genistein 濃度を最小限に保つ役割を担っていると推測される。 $\Delta\text{RND}$  株は親株と比較して、genistein により強く抑制されたが (Fig. 15)、0.5~1  $\mu\text{M}$  の genistein 終濃度による根粒菌増殖への影響も検討する必要がある。ダイズに  $\Delta\text{RND}$  株を接種すると根粒数が親株に比べ増加した結果から (Table 3.)、 $\Delta\text{RND}$  株は RND 型薬剤排出ポンプの破壊により、根圏において genistein が親株よりも細胞内に蓄積すると予測される。それにより、*nod* 遺伝子群の発現が上昇し、Nod ファクターが多く生産されたため、根粒数が増加したと推測される。よって、 $\Delta\text{RND}$  株の細胞内の genistein 濃度、並びに genistein 濃度による *nod* 遺伝子群の発現プロファイルについて詳細に調べる必要があると考える。植物体内では、根圏よりも高濃度の genistein が存在し BjG30 の RND 型薬剤排出ポンプは最大現に発現していると考えられる。バクテロイドに分化した根粒菌から、BjG30 遺伝子の発現、及びタンパクは検出されていないが (16, 76)、感染糸内における根粒菌の網羅的な遺伝子発現については未開明であり、感染糸内では、強く BjG30 が誘導されている可能性がある。BjG30 の RND 型薬剤排出ポンプが破壊されると、感染糸内部での増殖が、高濃度の genistein により強く抑制されると予測される。そのため、実際の共生過程では、菌密度の上昇により誘導される *nodD2* 及び T3SS が、RND 型薬剤排出ポ

ンプの破壊により誘導されなくなる可能性がある。そのため、窒素固定やバクテロイドへの分化が阻害されると予測される。今後は、感染糸内及び、根粒内部の根粒菌の観察を行い、BjG30 破壊が、根粒菌共生過程へ及ぼす影響についてさらなる検討を行う必要があると考える。

また、ダイズが生産する flavonoid である glyceollin は、*Bradyrhizobium japonicum*、及び *Sinorhizobium fredii* に対して抗菌作用があり、genistein により耐性が誘導されることが報告されている(63)。glyceollin に対する耐性のメカニズムは未解明であるが、genistein と同じく BjG30 の RND 型薬剤排出ポンプにより排出されている可能性がある。よって glyceollin による BjG30 の誘導や、 $\Delta$ RND 株の glyceollin に対する感受性も調査する必要がある。

本研究の結果から、BjG30 にコードされる薬剤排出ポンプは genistein の毒性を避け、*nod* 遺伝子群及び T3SS 遺伝子群の発現に必要な最小限の濃度に、細胞内の genistein 量を調節している事が示唆された。根粒菌とマメ科植物の共生過程における、根粒菌の生育能の維持は、菌密度による *nod* 遺伝子群や T3SS 遺伝子群の適切な発現調節に重要であると考えられる。

## 参考文献

1. Alvarez-Ortega, C., J. Olivares, and J. L. Martinez. 2013. RND multidrug efflux pumps: what are they good for ?. *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2013.00007.
2. 安藤 象太郎, 大脇 良成, 後藤 国裕, 米山 忠克. 2005. エンドファイトイック窒素固定 第 3 タイプの植物-微生物窒素固定システム. *科学と生物*, 43:788-794.
3. Azuma, Y., Y. Onishi, Y. Onishi, Y. Sato, and H. Kizaki. 1995. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on topoisomerase activity and death of IL-2-dependent CTLL-2 cells. *J. Biochem.*, 118:312-318.
4. Bandele, J. O., and N. Osheroff. 2007. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$ . *Biochem.*, 46:6097-6108.
5. Belkheir, A. M., X. Zhou, and D. L. Smith. 1999. Response of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars to genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum*: nodulation and dry matter accumulation under canadian short season conditions. *J. Agron. Crop Sci.*, 185:167-1751.
6. Bender, G. L., M. Nayudu, K. K. L. Strange, and B. G. Rolfe. 1988. The *nodD1* gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the nonlegume *Parasponia*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1:259-268.
7. Bernard, F. -X., S. Sable, B. Cameron, J. Provost, J. -F. Desnottes, J. Crouzet, and F. Blanche. 1997. Glycosylated flavones as selective

inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:992-998.

8. Broughton, W. J., and X. Perret. 1999. Genealogy of Legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:305-311.

9. Burse, A., H. Weingart, and M. S. Ullrich. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microb Interact.*, 17:43-54.

10. Castanie-Cornet, M. P., and J. W. Foster. 2001. *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiol.*, 147:709-715.

11. Chalupowicz, L., I. Barash, M. Panijel, G. Sessa, and S. Manulissasson. 2009. Regulatory interactions between quorum-sensing, auxin, cytokinin, and the *hrp* regulon in relation to gall formation and epiphytic fitness of *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22:849-856.

12. Cole, A. M., and G. H. Elkan. 1973. Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4:248-253.

13. Constantinou, A., R. Metha, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan, and R. Moon. 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.*, 58:217-225.

14. Dart, P. J., and J. M. Day. 1971. Effects of incubation

temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant Soil.*, 35:167-184.

15. de Campos, S., B., W. J. Deakin, W. J. Broughton, and L. M. P. Passaglia. 2011. Roles of flavonoids and the transcriptional regulator TtsI in the activation of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587. *Microbiol.*, 157:627-635

16. Delmotte, N., C. H. Ahrens, C. Knief, E. Qeli, M. Koch, H.-M. Fischer, J. A. Vorholt, H. Hennecke, and G. Pessi. 2010 An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid metabolism in soybean root nodules. *Proteomics*, 10:1391-1400.

17. Deshmane, N., and G. Stacey. 1989. Identification of *Bradyrhizobium nod* genes involved in host-specific nodulation. *J. Bacteriol.*, 171:3324-3330.

18. Diez-Gonzalez, F., and Y. Karaibrahimoglu. 2004. Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Appl. Microbiol.*, 96:1237-1244.

19. Downie, J. A., and S. A. Walker. 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:483-489.

20. Dye, M. 1980. Function and maintenance of a *Rhizobium* collection, p.435-471. In N. S. S. Rao(Ed.), *Recent advance in biological nitrogen fixation*, Holmes and Meier Publishers Inc., New York.

21. Eda, S., H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2011. Involvement of the *smeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and



- contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol., 77:2855-2862.
22. Figurski, H. D., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76:1648-1652.
23. Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Brogton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature, 387:394-401.
24. Gage, D., J. 2002. Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 184:7042-7046.
25. Galibert, F, T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. -J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. -C. Yeh, and J. Batut. 2001. The Composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science, 293.668-672.

26. Garcia, M., J. Dunlap, J. Loh, and G. Stacey. 1996. Phenotypic characterization and regulation of *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7:625-635.
27. Gonzalez, V., R. I. Santamaria, P. Bustos, I. Hernandez-Gonzalez, A. Medrano-Soto, G. Moreno-Hagelsieb, S. C. Janga, M. A. Ramirez, V. Jimenez-Jacinto, J. Collado-Vides, and G. Davila. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:3834-3839.
28. Gonzalez-Pasayo, R., and E. Martinez-Romero. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13:572-577.
29. Gottfert, M., S. Rothlisberger, C. Kundig, C. Beck, R. Marty, and H. Henneke. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.*, 184:1405-1412.
30. Gottfert, M., J. W. Lamb, R. Gasser, J. Semenza, and H. Henneke. 1989. Mutational analysis of the *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes and further *nod* box-linked genomic DNA regions. *Mol. Gen. Genet.*, 215:407-415.
31. Gough, C. 2003. *Rhizobium* Symbiosis: Insight into Nod factor receptors. *Curr. Biol.*, 13:973-975.
32. Graham, T. L. 1990. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates.

Plant Physiol., 95:594-603.

33. Hassan, S., and U. Mathesius. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. J. Exp. Bot., 63:3429-3444.

34. 羽田野 隆介, 犬伏 和之. 2005. 続・環境負荷を予測する-モニタリングとモデリングの発展-, p.172-184, 博友社.

35. Highbarger, L. A., J. A. Gerlt, and G. L. Kenyon. 1996. Mechanism of the reaction catalyzed by acetoacetate decarboxylase. Importance of lysine 116 in determining the pKa of active-site lysine 115. Biochem., 35:41-46.

36. Hirsch, A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special ?. Plant Physiol., 127:1484-1492.

37. Ito, N., M. Itakura, S. Eda, K. Saeki, H. Oomori, T. Yokoyama, T. Kaneko, S. Tabata, T. ohwada, S. Tajima, T. Uchiumi, E. Masai, M. Tsuda, H. Mitsui, and k. Minamisawa. 2006. Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate and protocatechuate. Microbes Environ. 21:240-250.

38. Jones, F. R., and W. B. Tisdale. 1921. Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. J. Agric. Res. (Washington, D. C.), 22:17-37.

39. Jordan, D. C. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, p. 234-244. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Williams & Wilkins, London.

41. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, k. Kawashima, T. Kimura, Y. Kushida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res., 7:331-338.
42. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shi,po, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, and S. Tabata. 2002. complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res., 9:189-197.
43. Kossiak, R. M., R. Bookland, K. Barkei, and H. E. Paaren. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84:7428-7432.
44. Krause, A., A. Doerfel, and M. Gottfert. 2002. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact., 15:1228-1235.
45. Krishnan, H. B., J. Lorio, W. S. Kim, G. Jiang, K. Y. Kim, M. Deboer, S. G. Pueppke. 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system

in *Sinorhizobium fredii* USDA257. Mol. Plant-Microbe Interact., 16:617-625.

46. Krishnan, H. B. 2002. NodX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. J. Bacteriol., 184:831-839.

47. Lang, K., A. Lidemann, F. Hauser, and M. Gottfert. 2008. The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Genet. Genomics. 279:203-211.

48. Lee, K. -B., P. D. Backer, T. Aono. 2008. The genome of versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. BMC Genomics, 9:271.

49. Lee, H. I., J. H. Lee, K. H. Park, D. Sangurdekar, and W. S. Chang. 2012. Effect of soybean coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* nodulation ability, biofilm formation, and transcriptional profile. Appl. Environ. Microbiol., 78:2896-2903.

50. Leibovitch, S., P. Migner, F. Zhang, and D. L. Smith. 2001. Evaluation of the effect of soyasignal technology on soybean yield [*Glycine max* (L.) Merr.] under field conditions over 6 years in eastern Canada and northern United States. J. Agron. Crop Sci., 187:281-292.

51. Lindemann, A., M. Kocj, G. Pessi, J. A. Muller, S. Balsiger, H. Hennecke, and H. M. Fischer. 2008. Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium*

*japonicum*. FEMS Microbiol. Lett., 312:8928-8943.

52. Loh, J., D. P. Lohar, B. Andersen, and G. Stacey. 2002. A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. J. Bacteriol., 184:1759-1766.

53. Loh, J., M. Garcia, and G. Stacey. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol., 197:3013-3020

54. Loh, J. T., J. P. -Y, Yuen-Tsai, M. G. Stacey, D. Lohar, A. Welborn, and G. Stacey. 2001. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. Mol. Microbiol., 42:37-46.

55. Loh, J., and G. Stacey. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol., 69:10-17.

56. Ludwig, W., R. Amann, E. Martinez-Romero, W. Schonhuber, S. Bauer, A. Neef and K.-H. Schleifer. 1998. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. Plant Soil, 204:1-19.

57. 牧野 功. 2008. 肥料製造技術の系統化, 国立科学博物館技術の系統化調査報告. 12:211-270.

58. Markovits, J., C. Linasier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J. M. Saucier, J. B. Le Pecq, and A. K. Larsen. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on

- mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.*, 49:5111-5117.
59. Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 178:5853-5859.
60. Okazaki, S., T. Kaneko, S. Sato, and K. Saeki. 2013. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Early Ed.
61. Oke, V., and S. R. Long. 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:641-646.
62. Palumbo, J. D., C. I. Kado, and D. A Phillips. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.*, 180:3107-3113.
63. Parniske, M., B. Ahlborn, and D. Werner. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in Soybean Rhizobia. *J. Bacteriol.*, 173:3432-3439.
64. Peck, M. C., R. F. Fisher, and S. R. Long. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 188:5417-5427.
65. Perez-Galdona, R., and M. L. Kahn. 1994. Effect of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. *Microbiol.*, 140:1231-1235.
66. Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Braughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:180-201.
67. Pessi, G., C. H. Ahrens, H. Rehrauer, A. Lidemann, F. Hauser, H. - M. Fischer, and H. Hennecke. 2007. Genome-wide transcript analysis of

- Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodule. Mol. Plant-Microbe Interact., 20:1353-1363.
68. Philips, D. A., and W. R. Streit. 1996. Plant-microbe interactions, Vol. 1, p.236-271. In G Stacey, and N. T. Keen (ed.), Chapman & Hall, New York.
69. Plaper, A., M. Golob, I. Hafner, M. Oblak, T. Solmajer, and R. Jerala. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 306:530-536.
70. Prentki, P., and H. M. Krisch. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene, 29:303-313.
71. Pueppke, S. G., M. C. Bolanos-Vasquez, D. Werner, M. -P. Bec-Ferte, J. -C. Prome, and H. B. Krishnan. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. Plant Physiol., 117:599-608.
72. Ramos, J., L., M. Martinez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M. T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes. 2005. The TetR Family of Transcriptional Repressors. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 69:326-356.
73. Rhijn, V. P., and J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol. Rev., 59:124-142.
74. Sadowsky, J. M., R. E. Tully, P. B. Cregan, and H. H. Keyser. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. Appl. Environ.



Microbiol., 53:2624-2630.

75. Sanjuan, J., P. Grob, M. Gottfert, H. Hennecke, and G. Stacey. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact., 7:71-77.
76. Sarma, A., D., and D. W. Emerich. 2005. Global protein expression pattern of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: a prelude to functional proteomics. Proteomics. 5:4170-4184.
77. Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Puhler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene. 145:69-73.
78. Smit, G., V. Puvanesarajah, R. W. Carlson, W. M. Barbou, G. Stacey. 1992. *Bradyrhizobium japonicum nodDI* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. J. Biol. Chem., 278:310-318.
79. Stafford, H., A. 1997. Role of flavonoids in symbiotic and defecse function in legume roots. Botanical Rev., 63:27-39.
80. Suganuma, N., R. Shimokawa, T. Katoh, and T. Nagai. 1993. Presence of acetone and acetoacetate decarboxylase in soybean root nodules. Soil Sci. Plant Nutr., 39:653-660.
81. Thomson, A. W., J. G. O'neill, and J. F. Wilkinson. 1976. Acetone production by *Methylobacteria*. Arch. Microbiol., 109:243-246.

82. Ulanowska, K., A. Tkaczyk, G. Konopa, and G. Wegrzyn. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, 184:271-278.
83. Vargas, P., A. Felipe, C. Michan, and M. T. Gallegos. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 24:1207-1219.
84. Verdrengh, M., L. V. Collins, P. Bergin, A. Tarkowski. 2004. Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. *Microbes Infect.*, 6:86-92.
85. Viprey, V., A. D. Greco, W. Golinowski, W. J. Broughton, and X. Perret. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.*, 28:1381-1389.
86. Wei, M., T. Yokoyama, K. Minamisawa, H. Mitsui, M. Itakura, T. Kaneko, S. Tabata, K. Saeki, H. Omori, S. Tajima, T. Uchiumi, M. Abe, and T. Ohwada. 2008. Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine Max* (L.) Merr. *DNA Res.*, 15:201-214.
87. Wei, M., K. Takeshima, T. Yokoyama, K. Minamisawa, H. Mitsui, M. Itakura, T. Kaneko, S. Tabata, K. Saeki, H. Oomori, S. Tajima, T. Uchiumi, M. Abe, S. Ishii, and T. Ohwada. 2010. Temperature-dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microb Interact.* 23:628-637.

88. Wenzel, M., K. Lang, T. Gunther, A. Bhandari, A. Weiss, P. Lulchev, E Szentgyorgyi, B. Kranzusch, and M. Gottfret. 2012. Characterization of the flavonoid-responsive regulator FrrA and its binding sites. *J. Bacteriol.* 194:2363–2370.
89. Yang, F., -J., L. -L. Cheng, L. Zhang, W. -J. Dai, Z. Liu, N. Yao, Z. -P. Xie, and C. Staehelin. Y410 of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 is a symbiotic determinant required for symbiosome differentiation. *J. Bacteriol.*, 191:735–746.
90. Yanisch-Perron, C., J. Vieora, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33:103–119.
91. Young, J. P. W., L. C. Crossman, A. W. B. Johnston, N. R. Thomson, Z. F. Ghazoui, K. H. Hull, M. Wexler, A. R. J. Curson, J. D. Todd, P. S. Poole, T. H. Mauchline, A. K. East, M. A. Quail, C. Churcher, C. Arrowsmith, I. Cherevach, T. Chillingworth, K. Clarke, A. Cronin, P. Davis, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabinowitsch, M. Sanders, M. Simmonds, S. Whitehead, and J. Parkhill. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.*, 7:R34.
92. Zahran, H., H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol Rev.*, 63:968–989.
93. Zhang, F., and D. L. Smith. 1994. Effects of low root zone

temperatures on the early stages of symbiosis establishment between soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) and *Bradyrhizobium japonicum*. J. Exp. Bot., 45:1467-1473.

94. Zhang, F., and D. L. Smith. 1996. Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root systems under suboptimal root zone temperatures. J. Exp. Bot., 47:785-792.

95. Zhang, F., and D. L. Smith. 1997. Application of genistein to inocula and soil to overcome low spring soil temperature inhibition of soybean nodulation and nitrogen fixation. Plant Soil., 192:141-151.

## 摘要

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* の共生に関わる遺伝子領域（共生領域）は、ダイズ (*Glycine max* L.) から放出される genistein (GEN) や daidzein (DAI) に応答して誘導発現し、その産物 (Nod factor) が根粒形成を誘導することにより、宿主との共生が始まる。本論文では、誘導される共生領域内の遺伝子領域 (type three secretion system : T3SS) と、共生領域外の新規遺伝子領域 (*B. japonicum* genistein-induced genes : BjG30) に着目し、誘導発現プロファイルの検討と共生における役割の解明を目的とした。

根粒菌全ゲノムをカバーするマクロアレイを用いて、ダイズ種子の抽出液 (SSE) と GEN に応答する根粒菌遺伝子の網羅的な発現解析を行なった結果、30°Cでは、12 時間以内に共生領域の巨大な 4 つの遺伝子群 (T3SS 合成に関わる EC-III、Nod factor 生産に関わる EC-I, EC-II, 及び EC-IV) が強く発現した。一方、15°Cでは、EC-III の発現時期は、EC-I, EC-II, EC-IV と比べて著しく遅滞し、SSE 処理後 48 時間だった。SSE による T3SS の発現は、*noIA* と *nodD2* の強い発現とともに誘導されたことから、SSE による T3SS の十分な発現には、*noIA*、或は *nodD2* が関わっている可能性が示唆された。そこで、マクロアレイと定量的 RT-PCR を用いて、*noIA*、或は *nodD2* 破壊株を SSE で処理した結果、*noIA* 破壊株の T3SS は発現したが、*nodD2* 変異株では発現しなかった。また、*noIA* 破壊株による根粒の着生時期は親株と有意な差は見られなかったが、*nodD2* 破壊株では、根粒の数と着生時期に重大な遅滞が生じた。これらの結果から、*nodD2* が、SSE による T3SS の十分な発現に強く関与していること、及び、T3SS の発現時期が根粒の着生時期に影響を与え、15°Cにおける根粒着生の遅滞は、*nodD2* を介した T3SS の発現遅滞が原因である可能性が示唆された。

一方、共生領域外では、GEN 処理後 30 分で強く誘導発現されるゲノム領域

BjG30 (7.73-7.75Mb) が見出された。BjG30 には、RND 型薬剤排出ポンプ (b117019, b117020)、TFR (blr7023, b117024)、ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 代謝関連酵素 (blr7028, blr7029) がコードされていた。BjG30 遺伝子の誘導発現プロファイルを定量的 RT-PCR で調べた結果、①GEN 等の 5-hydroxyflavonoid により発現が強く誘導されるが、DAI 等の 5-deoxyflavonoid では弱いこと、② *nod* 遺伝子群の調節遺伝子 (*nodW*, *nodDI*) の発現時期よりも早期に誘導されること、③GEN 濃度に依存し、7.5  $\mu$ M で発現量が最大になることが明らかになり、BjG30 の発現は *nodW*, *nodDI* を介さないと考えられた。RND 型薬剤排出ポンプの破壊株 ( $\Delta$ RND 株) と PHB 代謝関連酵素の破壊株 ( $\Delta$ PHB 株) を構築し、根粒形成における影響を調べた結果、いずれの破壊株でも根粒重に減少傾向が見られたが、特に  $\Delta$ RND 株の根粒重と窒素固定活性が著しく低下した。また、 $\Delta$ RND 株は GEN に対する感受性が向上するが、DAI に対する感受性には影響しなかったことから、RND 型薬剤排出ポンプは、GEN の細胞外排出に関わっている可能性が示唆された。GEN は、共生成立に重要なシグナル物質だが、抗菌活性も相持つ両刃の剣である。TFR 制御下の BjG30 は、薬剤排出ポンプを介して細胞内の GEN 濃度をある一定の範囲に保ち、flavonoid の毒性回避と共生の効率的なチューニングに機能すると考えられ、共生の分子機構に全く新たな概念を付与するものである。

## 謝辞

本学位論文の審査および研究指導をして頂きましたいただいた帯広畜産大学 食品科学研究部門 機能科学分野の大和田琢二先生、折笠善丈先生、岩手大学 農学部附属寒冷バイオシステム研究センター生体機能開発研究分野の上村松生先生に謹んで感謝申し上げます。さらに、本学位論文の審査に際しましては、弘前大学 農学生命科学部 生物学科の杉山修一先生にお世話になりました。

本研究に対し、様々な助言・助力を頂きました帯広畜産大学・食品科学研究部門・機能科学分野・得字圭彦先生、蘭州大学・生命科学学院・魏 敏先生、東京農工大・農学研究院・横山正先生、東北大学大学院・生命科学研究科・南沢究先生、板倉学氏、奈良女子大学・理学部・生物科学科・佐伯和彦先生に深く感謝申し上げます。実験に用いたダイズ根粒菌 Bjb3 株、及び  $\Delta 370$  株は、ミズーリ大学コロンビア校の Gary Stacey 先生より分譲して頂きました。謹んで感謝申し上げます。最後に、多くの協力を頂きました諸先輩方、同輩、後輩達にも心から感謝いたします。