

標的タンパク質候補のノックアウト株の作製は、Red/ET相同組換え法を用いる。この方法は、EPEC内での $\lambda$ ファージによる相同組換え機構を利用する方法である (Zhang, Y. *et al. Nature Genet.*, 1998, **20**, 123-128). pRed/ETベクターを形質転換させたEPEC内では、 $\lambda$ ファージ由来のRed遺伝子の発現によって、Red $\alpha$  (エクソヌクレアーゼ) と Red $\beta$  (DNA結合タンパク質) が生産される。これらにより、標的遺伝子の両端側の相同配列を持つ直鎖状の選択マーカー遺伝子と正確な相同組換えがEPECのゲノム内で起きることで、標的遺伝子を破壊する。さらに本方法は、制限酵素処理やライゲーション反応後のDNA精製が不要であり、標的タンパク質のサイズが大きい場合でも相同組換えによりノックアウト株が作製可能である。ノックアウト株作製後に各破壊株を用いて、III型分泌装置の活性発現を親株と比較することで、活性発現が消失もしくは減少する破壊株を同定する。

## 2) 標的タンパク質と aurodox/agarose-beads 化体の競合実験

標的タンパク質候補群をそれぞれ PCR により増幅し、

クローニングベクターに挿入後、配列を確認する。その後、大腸菌タンパク質発現ベクターに PCR 産物を挿入し、タンパク質発現ベクターを作製する。リコンビナントタンパク質は大腸菌 BL21 株で発現後に精製する。次に、リコンビナントタンパク質を aurodox で前処理後、aurodox/agarose-beads 化体とローテーターにより各種の条件 (前処理済のリコンビナントタンパク質と aurodox/agarose-beads の量比や、結合反応時の温度条件等) でインキュベーションし、競合実験を行う。Aurodox で競合作用が見られたものを真の標的タンパク質として同定する。その後、ビアコアを用いて標的タンパク質と aurodox の結合定数を算出する。ビアコアでの分子間相互作用が良好でない場合は、等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter: ITC) を利用した解析を行う。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

## ダイズ根粒菌変異株における細胞増殖速度促進機構の解析

東京農工大学大学院農学研究院 講師 大津直子

### 研究背景・目的

根粒菌は宿主植物の根に「根粒」と呼ばれる器官を形成し、その内部で窒素固定を行う。根粒内で根粒菌はバクテロイドという状態に分化し、窒素固定に必要な遺伝子を発現させる。根粒内にいる根粒菌はペリバクテロイド溶液 (PBS) に包まれており、PBS にはバクテロイド分化のための遺伝子発現を誘導する物質が含まれていると考えられる。報告者が所属する研究室では過去に、PBS 溶液を処理した際のダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の遺伝子発現変化をマクロアレイ法で解析したところ、バクテロイド分化の際の遺伝子発現変化と部分的に模擬していることを見出した (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2015)。またバクテロイド化と PBS 処理に共通して発現を抑制する遺伝子領域に blr7984 という TetR 型転写抑制因子があり、この転写因子が PBS に応答したバクテロイド化に関与する可能性が考えられた。そこで、この遺伝子の機能解析のために、blr7984 遺伝子破壊株が作成された。

blr7984 遺伝子破壊株は、野生型株よりも増殖が速いという形質を示した。また、blr7984 遺伝子破壊株の増殖期における遺伝子発現変化を野生型株と比較したところ、近

接する bll7983 遺伝子の発現が約 40 倍上昇していた。このことから bll7983 は、転写抑制因子である blr7984 による転写抑制のターゲットであり、blr7984 が破壊されたことにより bll7983 の発現が上昇したと考えられた。bll7983 は酸化物除去を行うグルタチオントランスフェラーゼをコードしている。過去に根粒菌ではグルタチオン合成の機能が低下すると、酸化物の増加により細胞増殖速度が減少することが報告されていることから (Harrison, *et al.*, 2005)、bll7983 の発現量が増加して、グルタチオンの酸化物除去の働きが上昇し、増殖速度上昇を引き起こした可能性が示唆された。しかし blr7984 破壊株では、bll7983 を含む blr7984 近傍の遺伝子の他に、糖の取りこみ、排出、代謝に関わる遺伝子の発現も上昇しており、エネルギー代謝が活発化したことで増殖速度が上昇した可能性も考えられた。blr7984 破壊株において細胞増殖が速まった原因が bll7983 の発現上昇であるかどうかを明らかにするためには、bll7983 を野生株において上昇させた際の、細胞増殖速度を調査する必要がある。そこで本研究では bll7983 過剰発現株を作成し、その増殖速度の測定を行うことにより、ダイズ根粒菌における細胞増殖速度を決定する因子を突き止めることを目的とした。

### 方法・結果

プラスミド pbjGroEL4:dsRed (Okubo *et al.*, 2013) よ

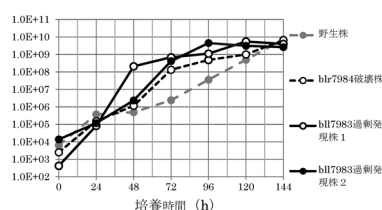


図1 bll7983過剰発現株の増速曲線（縦軸は菌数）。

り、強発現用プロモーターである pbjGroEL4 を増幅した。また *B. japonicum* USDA110株のゲノムより、bll7983の翻訳領域を増幅した。そしてこれら二つの増幅配列を pbjGroEL4:dsRed の *KpnI*-*SacI* 領域に挿入することにより、bll7983過剰発現用プラスミドを作成した。作成したプラスミドを、トリペアレンタルメイティング法により *B. japonicum* USDA110の野生型株に導入した。そしてストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性（導入遺伝子のマーカー）、ポリミキシン耐性（根粒菌選抜のマーカー）の抗生物質3重耐性を指標に、15株の形質転換株を選抜した。

得られた形質転換株を培養し、吸光度を指標に増殖速度を測定したところ、15株中14株において吸光度の上昇が野生型株よりも速かった。例外であった1株は、持いたベクターがトランスポゾンにより遺伝子をゲノムに挿入させるタイプであるため、遺伝子が挿入されたゲノム領域のためだと考えられた。

培養に伴う吸光度上昇が野生型株よりも速かった14株のうち2株について、希釈平板法で菌数を測定した（図1）。bll7983過剰発現株は2株とも培養に伴う菌数の増加が早

く、特に培養開始後24から72時間にかけての増加が早いことが分かった。これは blr7984破壊株と同様の特徴であった。

## 考 察

本研究の結果から、転写抑制因子である blr7984 の破壊株において増殖が速まった原因は、隣接する bll7983 の発現が上昇したことによるものであると考えられた。bll7983はグルタチオントランスフェラーゼをコードしていることから、この酵素がダイズ根粒菌の細胞増殖速度を制御する要因の一つであり、グルタチオンによる酸化物除去とダイズ根粒菌の増殖速度の関連が、強く示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Ohkama-Ohtsu N, Ichida S *et al.* (2015) Peribacteroid solution of soybean root nodules partly induces genomic loci for differentiation into bacteroids of free-living *Bradyrhizobium japonicum* cells. *Soil Sci. Plant. Nutr.*, DOI: 10.1080/00380768.2014.994470, in press.
- 2) Harrison J *et al.* (2005) Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **187**, 168-174.
- 3) Okubo T *et al.* (2013) Genome Analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 2542-2551.