

根粒菌のマメ科植物との共生成立に必須な転写因子の解析

みつい ひさゆき みなみさわきわむ
 ○三井 久幸 南澤 究 (東北大・院・生命科学)

〔目的〕 根粒菌は、マメ科植物に根粒形成を誘導し、その内部で共生窒素固定を行う土壌細菌の一群である。我々は、主な研究材料として、現状で分子遺伝学的知見の蓄積に最も富み、またゲノム全塩基配列が解読済みの根粒菌種 *Sinorhizobium meliloti* (アルファルファ根粒菌) や、宿主植物側の分子遺伝学研究のモデルであるミヤコグサ *Lotus japonicus* の共生相手で、やはりゲノム全塩基配列が解読済みの種 *Mesorhizobium loti* を取り上げている。そして、根粒菌の共生成立過程 (共生相手との相互認識・根粒形成誘導・感染・宿主細胞内への侵入・細胞内共生体 (バクテロイド) 特異的な細胞分化・窒素固定活性の発現 等々) の分子機構の全解明を目指している。以前の大会で、我々は、*S. meliloti* の *rpoH*₁ 遺伝子 (*E. coli* の RNA ポリメラーゼ・シグマ因子の一つ σ^{32} について、*S. meliloti* では 2 つの遺伝子 *rpoH*₁、*rpoH*₂ がそのホモログをコードしている) の変異株が共生能欠損 (Fix⁻) を示すことを報告した。本発表では、その変異の影響が根粒菌の生育や共生成立のどのような局面に現れるのか、また、どのような遺伝子の転写に影響するのか、等に関する解析結果を報告する。

〔方法〕 根粒菌の *nif/fix* 遺伝子の発現は、*lacZ* 融合遺伝子を用いて解析した。根粒菌変異株の各種試薬・条件に対する感受性は、ペーパーディスクや濃度勾配を施したプレート培地上での生育により評価した。熱ショックタンパク質 (Hsp) 遺伝子の転写解析には、根粒菌の全 RNA に対し、RNase プロテクションおよびプライマー伸長の各アッセイを適用した。

〔結果と考察〕 *S. meliloti* の *rpoH*₁ 変異株の共生に関する性質を調べた。*rpoH*₁ 変異株の根粒からは、野生株根粒に比べて著しく低い (植物当たりで 1 / 285) もの、一定のニトロゲナーゼ活性が検出された。また、変異株根粒内部では、根粒先端の直下の「根粒菌の宿主細胞への侵入が始まる」領域付近にバクテロイドの存在が見られたが、共生成立過程がより進行した根粒中央以降の領域の大多数の宿主細胞内では、バクテロイドの形態異常や細胞死が観察された。また、*rpoH*₁ 変異株では、培地の酸性 pH や界面活性剤等の添加に伴う生育阻害が、野生株の場合と比べ顕著に現れた。一方、一般に根粒菌の窒素固定遺伝子の転写誘導が見られる微好気培養を *rpoH*₁ 変異株に適用したところ、*nifH*、*nifA*、*fixN* といった遺伝子の発現誘導が野生株と同様に観察された。以上より、*rpoH*₁ 変異は感染過程やニトロゲナーゼの合成には影響せず、宿主細胞内侵入後の早期老化・細胞死が *rpoH*₁ 変異株の Fix⁻の実態であると考えられる。また、その原因は環境ストレスに対する高い感受性にあることが示唆される。次に、以前の結果に基づき、*S. meliloti* のゲノム中に存在する Hsp 遺伝子群の転写に対する *rpoH*₁ 変異の影響を解析した。その結果、*groESL*₅ (*S. meliloti* が有する 5 つの *groESL* ホモログの一つ) の転写が *rpoH*₁ 変異株で消失していることが判明した。しかし、*groESL*₅ 変異株は野生株と同様の共生能を示したことから、*rpoH*₁ 変異株の Fix⁻にかかわる遺伝子は別に存在すると判断した。

連絡先：三井 (hmitsui@ige.tohoku.ac.jp)