

リゾビトキシン生合成遺伝子の機能解析と非生産菌への導入

すがわら まさゆき おかざき しん のなか さとこ えづら ひろし みなみさわ きわむ

○菅原 雅之¹⁾、岡崎 伸¹⁾、野中 聡子²⁾、江面 浩²⁾、南澤 究¹⁾

1) 東北大・生命科学 2) 筑波大・生命環境科学

【目的】 根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* が生産するリゾビトキシン (RT) は、宿主植物のエチレン合成系にある ACC 合成酵素を特異的に阻害し、エチレンレベルを低下させることでマメ科植物への根粒形成を促進する因子であることが明らかにされている (Okazaki et al. 2004 Microbes. Environ. 19: 99-111)。本研究では、1) これまでに機能が調べられている *B. elkanii* USDA94 株の RT 生合成遺伝子 *rtxAC* の次に位置する *rtxD* の RT 生合成における機能を明らかにすること、2) RT 非生産菌 (根粒菌、*Agrobacterium*) への *rtx* 遺伝子群の導入による RT 生産能付与の可能性について明らかにすることを目的とした。

【方法】 1) *B. elkanii* USDA94 株の *rtxA* および *rtxD* へ、カナマイシン耐性遺伝子カセットを導入した挿入変異株 Δ *rtxA*, Δ *rtxD* を作製した。良く洗浄した野生株および Δ *rtxA*, Δ *rtxD* それぞれの菌体を、アミノ酸を含むリン酸バッファーに懸濁し、2 時間、30°C の条件下で震盪した。その後、懸濁液上清中の物質を PITC (イソチオシアン酸フェニル) 誘導体として LC/MS 分析にて RT 中間体であるセリノールを定量した。2) 約 9 kb の *rtx* 遺伝子群 (*rtxACDEFG*) を、広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 の *lac* プロモーター転写制御下にあるように導入した。プラスミドの RT 非生産菌への導入は、接合またはエレクトロポレーション法にて行い、抗生物質耐性および PCR 法により導入菌株を選別した。*rtx* 遺伝子の発現と RtxA タンパク質生産は、抗 RtxA 抗体を用いたウエスタンブロッティング解析にて検出し、RT およびその中間体 (セリノール、ジヒドロリゾビトキシン) の生産量は Tris-YMRT 培養液上清中の物質を、上述と同様に PITC 誘導体とし LC/MS 分析にて定量した。

【結果と考察】 1) *B. elkanii* 細胞へグルタミンを添加することでセリノール合成量が無添加に比べて増加した。セリノールはジヒドロキシアセトンリン酸からアミノ基転移反応を経て合成されるので、グルタミンのアミノ基が転移していることが示唆された。さらに Δ *rtxD* はグルタミン添加によるセリノール合成量が野生株に比べて低い値を示した。これまでセリノール合成酵素は *rtxA* のみがコードしていると考えられていたが、上述の結果および *rtxD* のアミノ酸配列がグルタミンアミドトランスフェラーゼと相同性があるという事実から、*rtxD* はグルタミンアミド基依存性のセリノール合成酵素をコードしている可能性が示唆された。本発表では *rtxA* および *rtxD* の機能分担について、¹⁵N 標識グルタミンを用いたトレーサー実験の結果も報告する。2) *rtx* 遺伝子群を含む pBBR::PlacRT を導入した *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 株および *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^r 株は、培地中において恒常的な RtxA タンパク質の生産を示し、少なくとも *A. tumefaciens* C58C1Rif^r(pBBR::PlacRT) 株は RT 生産能を示した。RT 生産能を有する *A. tumefaciens* は宿主植物のエチレンレベルを低下させることにより、植物形質転換効率の増加が期待される。

e-mail: masa@ige.tohoku.ac.jp (菅原 雅之)