

研究論文

ダイズ根粒菌の外来遺伝子獲得に関する菌株間差異の解析

城 惣吉・山本昭洋・吉田ナオト・佐伯雄一

宮崎大学農学部応用生物科学科生物機能科学講座

(2009年11月26日 受理)

Analysis of exogenous gene acquisition among *Bradyrhizobium* strains

Sokichi SHIRO, Akihiro YAMAMOTO, Naoto YOSHIDA, Yuichi SAEKI

Division of Biotechnology and Biochemistry, Department of Biochemistry and Applied Biosciences,
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki.

Summary : The study of the bradyrhizobial adaptation for pH and temperature of the soil is an important subject to reveal the mechanism of the indigenization and the predominance of bradyrhizobia in various environmental conditions. In this study, we examined the horizontal gene transfer about the exogenous gene acquisition relevant the adaptability to the environmental gradient of bradyrhizobia by the hydrogel exposure method and the diparental mating method.

Five *Bradyrhizobium* strains (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, 110, 124, 135, *B. elkanii* USDA 76^T) and a transposon (Tn5) vector including the *gfp* (green fluorescence protein) gene as maker gene were used in this study. For the hydrogel exposure method, strains tested and marker gene were mixed with nano-sized acicular clay minerals, and performed the gene transfer by hydrogel exposure. On the other hand, for the diparental mating method, *Escherichia coli* strain S17-1 that held the maker gene and each *Bradyrhizobium* strains were mixed, and performed the gene transfer by the diparental mating. In the hydrogel exposure method, we were not able to obtain the *Bradyrhizobium* strains showing the fluorescence character of GFP. On the other hand, in the diparental mating, we were able to obtain transformed clones. Furthermore, the rates of viable cell by each strains tested were different when we investigated survival characteristic of bradyrhizobia by hydrogel exposure.

From these results, about the exogenous gene acquisitions of bradyrhizobia, it is suggested that the possibility by the conjugation of between bacteria was higher than possibility of physicochemical horizontal gene transfer by puncture of nano-sized acicular clay minerals.

Key words : Bradyrhizobia, Diparental mating method, Horizontal gene transfer, Hydrogel exposure method,
Nano-sized acicular clay mineral.

I. 緒言

窒素は大気中の約80%を占めており、植物のアミノ酸やたんぱく質などを構成する要素であるため多量に要求される必須元素の一つである。しか

しながら、植物自身は大気中に存在する窒素を直接利用することはできず、化学肥料や堆肥に含まれるアンモニア態窒素や硝酸態窒素を吸収する。近年、この化学肥料等の多量施肥により、植物に

吸収されなかった硝酸態窒素が雨水により地下へと流亡し、地下水や河川の汚染といった環境負荷の原因となっている。一方、ダイズ栽培においては、ダイズ根粒菌による共生窒素固定の寄与により、化学肥料等を多量に必要としないため環境負荷が小さく、また、高窒素固定能を有する有用ダイズ根粒菌の接種により収量の増加が可能な作物である。しかし、有用ダイズ根粒菌の接種には、土着ダイズ根粒菌との競合により宿主植物への感染が抑制されてしまうという問題があり、実際にはその効果が明瞭でないことが現状である。有用ダイズ根粒菌の占有率を高め、宿主植物への感染を向上させる接種技術を確立するためには、土着ダイズ根粒菌の分布や生態についての研究が必要であると考えられている。

先行研究において、ベトナムのアルカリ性土壌では、*Bradyrhizobium japonicum* USDA 135に近縁な菌株と*Sinorhizobium fredii*が優占し(Saeki *et al.* 2005)、沖縄の酸性土壌では*B. japonicum* USDA 6^T系統株と*B. elkanii*が多く存在し、アルカリ性土壌では*S. fredii*が局在していることが明らかとなっている(Suzuki *et al.* 2008)。また、日本の中性から酸性土壌では*B. japonicum*と*B. elkanii*が存在し、その土壌中での占有率は日本の北から南へと一定の生態的地位(ニッチ)を示しながら変遷していることが示唆されている(Saeki *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2008)。しかしながら、このような分布を示すダイズ根粒菌の環境傾度への適応性に関しては不明な点が多く、土壌のpHや温度などの環境傾度に対する適応機構の獲得様式の解明は大きな課題となっている。この適応機構の獲得については、遺伝子の水平伝播が考えられるが、遺伝子の水平伝播と環境適応性に関しても不明な点が多い。

根粒菌における遺伝子の水平伝播については、ダイズ根粒菌である*B. japonicum*から*B. elkanii*へと根粒形成(*nod*)遺伝子が、4℃という低温条件下で効率的に水平伝播していることが報告されている(Minamisawa *et al.* 2002)。ブラジルのサバンナ土壌(Cerrados)の高温、乾燥、酸性土壌といった環境ストレス条件下においても、ダイズ根粒菌間で*nod*遺伝子と窒素固定(*nif*)遺伝子が水平伝播していたことが明らかとなっている(Bracellos *et al.* 2007)。また、大腸菌にお

いては、プラスミドが吸着した微細針状粘土鉱物の存在下で摩擦刺激を与えると、大腸菌に微細針状粘土鉱物が穿刺し、プラスミドが大腸菌中に取り込まれることによって、無生物的に形質転換体を得られることが明らかとなっており(Yoshida *et al.* 2002; Yoshida & Saeki 2004a; Yoshida & Saeki 2004b; Yoshida & Ide 2008)、土壌における微細針状粘土鉱物と細菌との摩擦刺激による遺伝子の水平伝播の可能性が示唆されている。

以上のことから、本研究ではダイズ根粒菌の環境傾度への適応機構の獲得様式に関して、いかなる条件が遺伝子の水平伝播を引き起こしているのか、特定環境下における外来遺伝子の獲得機構を調査することを目的としている。本研究を行うにあたり、地震や地滑り、農業現場での耕耘など自然条件下で起こりうる摩擦により、根粒菌が無生物的に外来遺伝子を獲得する可能性を検討するために、微細針状粘土鉱物と細菌をアガロース・ゲル上で滑り摩擦刺激を与えて、遺伝子導入する方法であるハイドロゲル曝露法(Yoshida *et al.* 2007; Yoshida 2007)と、細菌同士の接合により外来遺伝子を獲得する可能性を検討するために、二親接合法の2つの手法を用いて、ダイズ根粒菌の外来遺伝子獲得機構について調査した。

II. 材料および方法

1. ハイドロゲル曝露法によるダイズ根粒菌への*gfp*遺伝子導入試験

1) 試験菌株の培養

試験菌株(受容菌)として、ダイズ根粒菌*Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, USDA 110, USDA 124, USDA 135, *B. elkanii* USDA 76^Tの5菌株を用いた。はじめに、ダイズ根粒菌を培養するためのHM液体培地とHM平板培地を調製した(Sameshima *et al.* 2003)。1Lの蒸留水にNa₂HPO₄・12H₂O 0.3153 g, Na₂SO₄ 0.25 g, NH₄Cl 0.32 g, MgSO₄・7H₂O 0.18 g, FeCl₃・6H₂O 0.0067 g, CaCl₂・2H₂O 0.013 g, HEPES 1.3 g, MES 1.1 g, 乾燥酵母エキス(ナカライテスク) 0.25 g, L(+)アラビノース 1.0 gを加え、よく攪拌した後にpHを6.0, 6.8, 7.0, 8.0, 9.0, 10に調整した。平板培地用には、液体培地と同様に調製したものに1.5% (w/v) となるように寒天末(和光純薬工業)を加え、これらをオートクレー

ブにて121℃, 20分間で滅菌を行った。平板培地は、滅菌シャーレに20 mLずつ分注し固化させた。培地の調製後、試験菌株をpH 6-10のHM液体培地にて28℃で3日間それぞれ培養し、これをpH 6-10のHM平板培地へとそれぞれ植菌し、28℃で4日間培養した。

2) ハイドロゲル曝露

培養した試験菌株、針状粘土鉱物コロイド溶液である100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の粉末状セピオライト（和光純薬工業）コロイド溶液および50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のクリソタイル（Asbestos; 和光純薬工業）コロイド溶液、マーカー遺伝子として *gfp*（緑色蛍光タンパク質）遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含むトランスポゾンプラスミド Tn5 *gfp mut1*（巖原他 2002）、4 M NaClを用い、針状粘土鉱物コロイド溶液を調製した。まず、1.5 mL容マイクロチューブに針状粘土鉱物コロイド溶液を475 μL 、濃度を50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ に調整したプラスミドを1 μL 、4 M NaClを25 μL （終濃度200 mM）と順に加え、緩やかに攪拌した。この溶液に各pHで培養したダイズ根粒菌のコロニーを懸濁し、分光光度計にてOD₅₅₀が2以上となるように調整した。これを激しく攪拌し、針状粘土鉱物コロイド溶液とした。このコロイド溶液にGene Injector（高崎科学器械株）を用いて滑り摩擦刺激を与え、ダイズ根粒菌への遺伝子導入を行った。形質転換体の選択マーカーとして、カナマイシン（和光純薬工業）を用いた。また、滑り摩擦刺激処理後は2通りの方法でダイズ根粒菌を培養した。まず、2% (w/v) 寒天HM平板培地（pH 6.8）にカナマイシン（終濃度50 ppm）を塗布したものと塗布しないものをそれぞれ用意した。これらの平板培地上に50 μL コロイド溶液を添加し、スプレッター（ディスポーザブル・イノキュレーション・スプレッター 品番：86.1569.005, アシスト）とGene Injectorを用いて、垂直抗力40 gf/cm²、1分間の滑り摩擦刺激を与えた。カナマイシンを塗布した平板培地は、曝露後に28℃で10日間培養した。一方、カナマイシンを含まない平板培地は、曝露後にHM液体培地（pH 6.8）1 mLにて平板培地表面の菌体をスプレッターで回収し、その菌液を28℃で2世代時間（12時間）振盪培養した後、50 ppmカナマイシンを含む1.5% (w/v) 寒天HM平板培地（pH 6.8）に菌液50 μL を塗布し、28℃で10日間培養し

た。培養後、蛍光顕微鏡（ECLIPSE E600, ニコン）で観察した。

3) PCR増幅によるGFPクローンの同定

ハイドロゲル曝露法で得られた *gfp* 遺伝子の蛍光形質を示すコロニーが受容菌として用いたダイズ根粒菌であるかを、16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域のPCR増幅により確認した (Saeki *et al.* 2004)。まず、蛍光形質を示すコロニーを分離し、HM平板培地（pH 6.8）に植菌し、28℃で5日間培養した。生育したコロニーをHM液体培地（pH 6.8）にて28℃, 4日間培養し、ゲノムDNA抽出を行った。ゲノムDNAの抽出はBL buffer法 (Hiraishi *et al.* 1995; Saeki *et al.* 2000) にて行った。1.5 mL HM液体培地（pH 6.8）培養液をマイクロチューブに移した後、卓上遠心機（DISKBOY, 倉敷紡績）で4,500 $\times g$ 、室温で3分間遠心し集菌した。上清を取り除き、0.9% NaCl 500 μL 加えてボルテックスし、再度4,500 $\times g$ 、室温で3分間遠心し集菌した。上清を取り除き、菌体のペレットを-20℃で20分間凍結させ、滅菌milliQ水を200 μL 加えて懸濁した。この懸濁液40 μL をマイクロチューブに移し、BL buffer（40 mM Tris-HCl, 1% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, pH 8.0）50 μL とProteinase K（1 mg mL⁻¹, ナカライテスク）10 μL を加えて懸濁した。これを60℃, 20分間インキュベートし、続いて95℃で5分間インキュベートした。その後、冷却遠心機（3500-RA-2724, 久保田商事）にて20,000 $\times g$ 、25℃にて10分間遠心し、上清を回収して、ゲノムDNA抽出液とした。ゲノムDNA抽出液を鋳型DNAとし、ITS領域のPCR増幅を行った。プライマーにはBra-ITS-F(5'-GACTGGGGTGAAGTCGTAAC-3'), Bra-ITS-R1(5'-ACGTCCTTCATCGCCTC-3') (Saeki *et al.* 2006) を使用し、PCRには *Ex Taq* DNAポリメラーゼ（タカラバイオ）を用いた。氷上で、*Ex Taq* DNAポリメラーゼ（5 U μL^{-1} ）0.4 μL 、*Ex Taq* 10 \times buffer 10 μL 、2.5 mM dNTP 8 μL 、10 μM プライマー 2 μL ずつ、および滅菌milliQ水78 μL をマイクロチューブで混合し、PCRチューブに24 μL ずつ分注し、抽出したゲノムDNA 1 μL をテンプレートとしてPCR反応液に加えた。この反応液をプログラムテンプレートコントローラー（PC-350, アステック

ク)にてPCRを行い、ITS領域を増幅させた。反応は94 で5分間変性させた後、94 で30秒、55 で30秒、72 で1分の30サイクルにて行った。PCR終了後、1% (w/v) アガロース・ゲルにて電気泳動を行い、泳動後にゲルを0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液 (ニッポンジーン) で染色し、トランスイルミネーター (UVP High Performance UV Transilluminator, UVP) 上でPCR産物のバンドを検出した。

2. ハイドロゲル曝露法におけるダイズ根粒菌の生残性

1) 試験菌株の培養

試験菌株にダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA 6^T, USDA 110, USDA 124, USDA 135, *B. elkanii* USDA 76^T の5菌株を用い、HM液体培地とHM平板培地のpHは6.8とし、-1-1)と同様の方法で培養した。また、試験菌株との対象菌株として、大腸菌 *Escherichia coli* XL1-BlueMRF^r 株 (STRATAGENE) を用いた。大腸菌を培養するために、LB液体培地およびLB平板培地を調製した。1 Lの蒸留水に乾燥酵母エキス 5 g, tryptone (ナカライテスク) 10 g, NaCl 10 gを加え、よく攪拌した後にpHを6.8に調整した。平板培地用には、液体培地と同様に調製したものに1.5% (w/v) となるように寒天末を加え、オートクレーブにて121 , 20分間の滅菌を行った。平板培地は、滅菌シャーレに20 mLずつ分注し、固化させた。培地の調製後、LB液体培地1.5 mLにカナマイシン (終濃度50 ppm), アンピシリン (終濃度100 ppm, ナカライテスク) を加えて、大腸菌を37 , 16時間振盪培養した後、カナマイシン (終濃度50 ppm), アンピシリン (終濃度100 ppm) を加えたLB平板培地に植菌して37 , 18時間培養した。

2) 希釈平板法による菌数測定

培養したダイズ根粒菌および大腸菌を滅菌水に懸濁し、OD₅₅₀ を2以上に調整した。ボルテックスで攪拌した後、この菌液を基に滅菌水で10³から10⁷倍希釈液を調製した。各希釈液に3枚ずつHM平板培地およびLB平板培地を用意し、これに100 μL ずつ塗布し、根粒菌は28 で4日間、大腸菌は37 で24時間培養した後、コロニー数を計測した。

3) ハイドロゲル曝露

針状粘土鉱物には、クリソタイルを用いた。-1-2)と同様の方法で、プラスミドを除いた針状粘土鉱物コロイド溶液を調製した。-1-2)と同様の方法で、根粒菌および大腸菌に滑り摩擦刺激を与えた。ダイズ根粒菌については、2% (w/v) 寒天HM平板培地にカナマイシンを含まない方法で摩擦刺激を与え、平板培地表面の菌体を回収した。大腸菌については、カナマイシンを含まない2% (w/v) 寒天LB平板培地を用いて滑り摩擦処理を行い、LB液体培地1 mLにて平板培地表面の菌体をスプレッダーで回収した。ハイドロゲル曝露後のダイズ根粒菌および大腸菌の菌体を回収した後、この菌液から-2-2)と同様に希釈液を調製し、それぞれを平板培地に100 μL ずつ塗布した後、ダイズ根粒菌は28 で7日間、大腸菌は37 で24時間培養した後、コロニー数を計測した。

3. 二親接合法によるダイズ根粒菌への *gfp* 遺伝子導入試験

1) 試験菌株 (受容菌) および供与菌の培養

供与菌としてTn5 *gfp mut1* を保有する大腸菌 *E. coli* S17-1株を、受容菌としてダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA 6^T, USDA 110, USDA 124, USDA 135, *B. elkanii* USDA 76^T の5菌株を用いた。大腸菌とダイズ根粒菌を培養するために、LB液体培地とLB平板培地、HM液体培地 (pH 6.8) とHM平板培地 (pH 6.8) を用いた。HM液体培地2 mLにHM平板培地で培養したダイズ根粒菌5菌株のコロニーをそれぞれ懸濁し、28 で5日間振盪培養した。また、LB液体培地1.5 mLにカナマイシン (終濃度50 ppm), アンピシリン (終濃度100 ppm) を加え、LB平板培地で培養した大腸菌コロニーを懸濁し、37 で18時間振盪培養した。

2) 二親接合法

培養した各試験菌株を、卓上遠心機で4,500 $\times g$, 室温で3分間遠心し集菌した。上清を除去し、HM液体培地を50 μL ずつ加えて懸濁した後、混合し、100 μL の混合懸濁液とした、これをHM平板培地上に全量スポットし、30 で3日間培養した後、コロニーを掻き取り、HM液体培地を1 mLに加えて懸濁し、卓上遠心機で4,500 $\times g$,

室温で3分間遠心し集菌した。大腸菌はテトラサイクリン感受性、ダイズ根粒菌はテトラサイクリン耐性の形質を示す (Saeki *et al.* 2000) ため、この上清を除き、ペレット付近の菌液を、カナマイシン(終濃度50 ppm)と、テトラサイクリン(終濃度10 ppm, 和光純薬工業)を含むHM平板培地に塗布した。これらを28℃で7日間培養し、培養後、蛍光顕微鏡による観察を行い、*gfp*遺伝子由来の蛍光形質を示したコロニー数を計測した。

III. 結果および考察

本研究では、ダイズ根粒菌の環境適応性に関する様々な環境ストレス耐性機構の獲得様式に関連して、いかなる条件で遺伝子の水平伝播が起きているのか、ハイドロゲル曝露法と二親接合法によりダイズ根粒菌の外来遺伝子獲得について調査した。

まず、ハイドロゲル曝露法によるダイズ根粒菌への*gfp*遺伝子導入について調査した。pH 8.0で調製したHM培地で培養した*B. japonicum* USDA 6^Tにおいて、針状粘土鉱物をセピオライトにてハイドロゲル曝露を行ったところ、*gfp*遺伝子由来の蛍光形質を示したコロニーが観察された。この蛍光を示したコロニーは平板培地内で一つしか観察されず、同条件でハイドロゲル曝露を行った他の試験菌株では観察されなかった。このクローンが*B. japonicum* USDA 6^Tであるかを確認するために、ITS領域のPCR増幅による同定を行った。PCR産物のサイズを確認したところ異なるサイズであったため、*B. japonicum* USDA 6^Tとクローンは同一の細菌ではないと判断した。ハイドロゲル曝露法は、クリーンベンチ内で曝露を行えないため、コンタミネーションする可能性があり、*B. japonicum* USDA 6^Tとは異なる細菌のクローンを得たと考えられた。さらに、これ以降も針状粘土鉱物をクリソタイルに換えてハイドロゲル曝露法による遺伝子導入を続けたが、ダイズ根粒菌において*gfp*遺伝子由来の蛍光形質を示すコロニーを得ることはできなかった。ハイドロゲル曝露法は、プラスミドを吸着した微細針状粘土鉱物が菌体に突き刺さることで遺伝子が導入される。ハイドロゲル曝露後の細菌は、細胞分裂して娘細胞をつくる状態、生存しているが細胞分裂ができない状態、細胞が破裂し死

滅してしまう状態、の3つの状態へと移行する (Yoshida *et al.* 2002)。細菌が外来遺伝子を獲得するためには、この状態へと移行する必要があると考えられる。しかしながら、ダイズ根粒菌にお

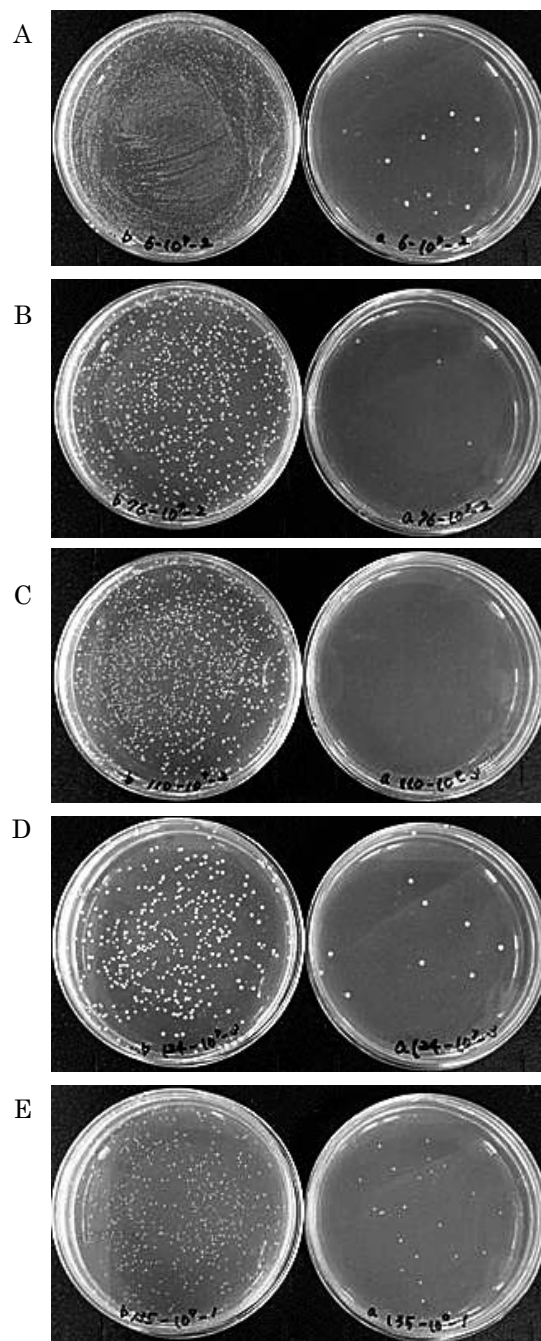


Fig. 1. The difference of survival trait of bradyrhizobia by the hydrogel exposure with nano-sized acicular clay minerals.

A : *B. japonicum* USDA 6^T, B : *B. elkanii* USDA 76^T, C : *B. japonicum* USDA 110, D : *B. japonicum* USDA 124, E : *B. japonicum* USDA 135, Left : before hydrogel exposure, Right : after hydrogel exposure.

いては の状態へと移行する割合が高いために、*gfp*遺伝子由来の蛍光形質を示すダイズ根粒菌を得ることができなかつたと考えられた。そこで、 の状態へと移行する原因の一つに、針状粘土鉱物の穿刺によるダイズ根粒菌の感受性が考えられたため、プラスミドを含まない条件下でハイドロゲル曝露を行い、ダイズ根粒菌の生残性を調査した。その結果、ハイドロゲル曝露による各試験菌株の生残性に差が認められた (Fig. 1, 2)。試験菌株で用いたダイズ根粒菌 5 菌株のうち *B. japonicum* USDA 135を除く 4 菌株が、比較対照として用いた大腸菌よりも低い生残性を示した (Fig. 2)。ダイズ根粒菌のうち、最も高い生残率を示したのは *B. japonicum* USDA 135であった。続いて、*B. japonicum* USDA 124, *B. elkanii* USDA 76^T, *B. japonicum* USDA 6^Tの順に低くなり、*B. japonicum* USDA 110については生残

性が認められなかつた。このことから、菌株によって針状粘土鉱物の穿刺に対する感受性が異なり、それが生残性に影響を与えていることが判明した。*B. japonicum* USDA 135については、大腸菌の生残率と有意な差がないことから針状粘土鉱物の穿刺に対する耐性を有すると考えられた。*B. japonicum* USDA 135株やその近縁株が粘土含量の高いアルカリ性土壌から分離されていることから (Saeki *et al.* 2005)、これらの菌株では、無生物的な外来遺伝子獲得機構が作用し、アルカリ耐性機構を獲得した可能性が考えられる。本実験で用いたハイドロゲル曝露法は、基本的に大腸菌への遺伝子導入技術として確立されたものであるため、今後はダイズ根粒菌の無生物的な外来遺伝子獲得機構の検討のために、ハイドロゲル曝露法の実験条件等の更なる検討が必要であると考えられた。

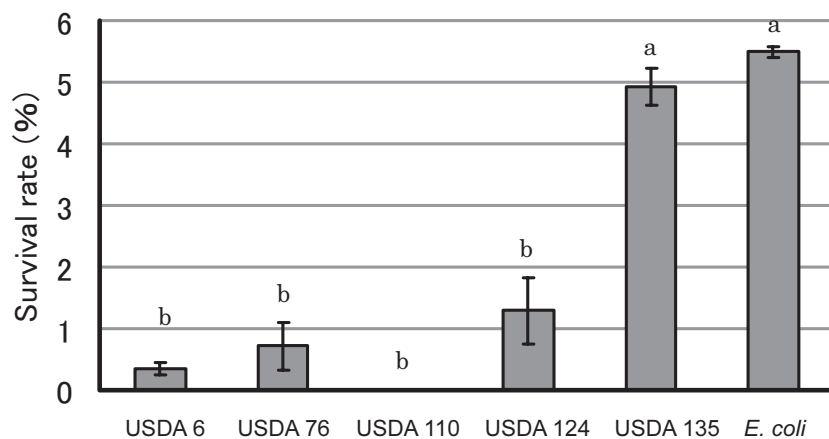


Fig. 2. Survival rates of bradyrhizobia by hydrogel exposure.

The value of this figure is the mean \pm standard error ($n=3$). Tukey's HSD test was applied for the significance test. Bars with different superscript letters are significantly different at $P < 0.01$.

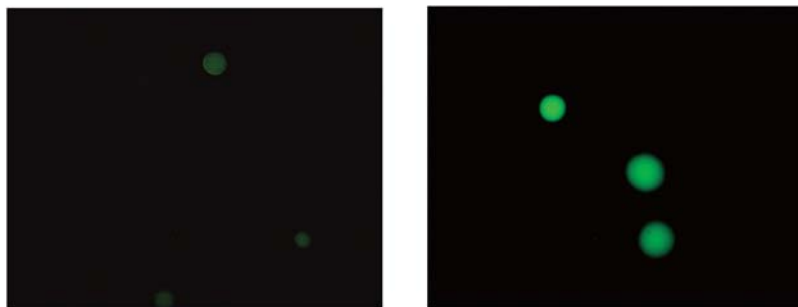


Fig. 3. The colony showing the fluorescence character of *gfp* gene.

The left figure is colony of the wild type strain, the right figure is colony showing the fluorescence character of *gfp* gene.

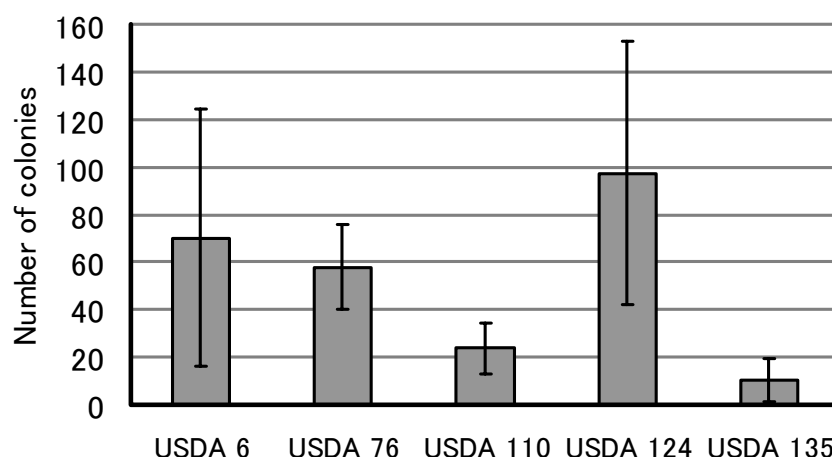


Fig. 4. The number of the colonies as for the fluorescence character of *gfp* gene acquired by the diparental mating method.

The value of this figure is the mean \pm standard error (n=5). Tukey's HSD test was applied for the significance test.

次に、細菌同士の接合による二親接合法を用いて、根粒菌における外来遺伝子獲得の頻度を調査したところ、全試験菌株において比較的容易に *gfp* 遺伝子由来の蛍光形質を示したコロニーを獲得することができた (Fig. 3)。また、計 5 回の試験を行った際に得られたクローン数の平均値を比較した結果、有意な差は認められなかったものの、各試験菌株で差が認められる傾向にあった (Fig. 4)。二親接合法で得られた全クローン数は *B. japonicum* USDA 124 が最も多く、続いて *B. japonicum* USDA 6^T、*B. elkanii* USDA 76^T、*B. japonicum* USDA 110 の順で多かったことから、この 4 菌株は細菌同士の接合によって、比較的容易に外来遺伝子を獲得できると考えられた。一方、*B. japonicum* USDA 135 においては、獲得クローン数が最も少なく、5 回の試験中で蛍光形質を示したコロニーを得ることができたのは一度だけであったため、接合による外来遺伝子獲得の可能性は低いと考えられた。ハイドロゲル曝露法によるダイズ根粒菌の生残率と二親接合法により得られたクローン数の平均値を比較した結果、*B. japonicum* USDA 6^T、USDA 110、USDA 124、*B. elkanii* USDA 76^T においては、細菌同士の接合による外来遺伝子獲得の可能性が高く、*B. japonicum* USDA 135 においては、針状粘土鉱物の穿刺による無生物的な外来遺伝子獲得の可能性が高いと考えられた。本研究で用いた試験菌株は、*B. japonicum* USDA 6^T、USDA 110、*B. elkanii* USDA 76^T が中性から酸性土壌

で優占し (Saeki *et al.* 2006 ; Suzuki *et al.* 2008)、一方で、*B. japonicum* USDA 135 に近縁な菌株はアルカリ性土壌で優占している (Saeki *et al.* 2005)。また、pH 6.7 の弱酸性土壌および 4 という低温条件下において、種の異なる 2 種のダイズ根粒菌間で遺伝子の水平伝播が生じたと報告されている (Minamisawa *et al.* 1992 ; Minamisawa *et al.* 2002)。Barcellos *et al.* (2007) は、3 種のダイズ根粒菌 *B. elkanii*、*B. japonicum* および *Sinorhizobium fredii* とで遺伝子の水平伝播が起きていることを報告している。しかしながら、その遺伝子獲得の機構に関しては不明のままであり、根粒菌間の遺伝子の水平伝播や無生物的な外来遺伝子の獲得に関して、さらなる研究が必要である。

以上のように、土壤微生物であるダイズ根粒菌の環境適応性に関連した外来遺伝子の獲得機構には依然として不明な点が多いが、これまでの報告から、土壌の pH や温度がダイズ根粒菌の遺伝子の水平伝播に影響を与えていると考えられる。本研究結果から、アルカリ性土壌で優占する *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌では、微細針状粘土鉱物の穿刺による無生物的な遺伝子の水平伝播が起こり得る可能性が残るものの、中性から酸性土壌に生息する *Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌では、細菌同士の接合による遺伝子の水平伝播の頻度が高いと推察された。

要 約

ダイズ根粒菌の土着化、優占化のメカニズムを明らかにするためには、土壌のpHや温度に対する適応機構の獲得様式の解明が大きな課題となっている。本研究では、ダイズ根粒菌における環境傾度への適応性に関する外来遺伝子獲得機構について、ハイドロゲル曝露法と二親接合法によって検討を行った。

試験菌株としてダイズ根粒菌5菌株 (*B. japonicum* USDA 6^T, 110, 124, 135, *B. elkanii* USDA 76^T) を、マーカー遺伝子として *gfp* (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を含むトランスポゾン (Tn5) ベクターを用いた。これらを微細針状粘土鉱物と混在し、ハイドロゲル曝露による遺伝子導入を行った。また、ダイズ根粒菌5菌株とマーカー遺伝子を保有する大腸菌とを混在させ、二親接合法による遺伝子導入を行った。ハイドロゲル曝露法では、*gfp* 遺伝子由来の蛍光形質を示した菌株を得ることが出来なかったが、二親接合法では、*gfp* 遺伝子由来の蛍光形質を示した菌株を得ることが出来た。また、ハイドロゲル曝露によるダイズ根粒菌の生残性を調査してみたところ、試験菌株によって生残性に差が見られ、酸性-中性土壌に生息する根粒菌には高い感受性が認められた。

以上の結果から、*Bradyrhizobium* 属ダイズ根粒菌の外来遺伝子の獲得は、微細針状粘土鉱物の穿孔による無生物的な外来遺伝子の獲得の可能性と比較して、細菌同士の接合による可能性が高いと考えられた。

キーワード：遺伝子水平伝播、ダイズ根粒菌、二親接合法、ハイドロゲル曝露法、微細針状粘土鉱物

謝 辞

本研究は科学研究費補助金・基盤研究C (No. 19580069) の助成を受けたものである。本研究を遂行するにあたり、トランスポゾン (Tn5 *gfp* mut1) を保有した大腸菌 *Escherichia coli* S17-1 株の分与および配列情報の提供に関して、九州大学農学研究科山川武夫准教授および鹿児島大学農学部境雅夫教授に深謝する。

引用文献

- Bracellos G. F., P. Menna, J. S. da Silva Batista, M. Hungria (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2635-2643.
- Hiraishi A., Y. Kamagata, K. Nakamura (1995) Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 523-529.
- 蔵原美穂・境 雅夫・高木滋樹・横山和平・丸本卓哉 (2002) ナス科植物青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) の土壌中での動態解析を目的とした生態マーカーの導入. *土と微生物* 56(1), 3-10.
- Minamisawa K., T. Seki, S. Onodera, M. Kubota, T. Asami (1992) Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2832-2839.
- Minamisawa K., M. Itakura, M. Suzuki, K. Ichige, T. Isawa, K. Yuhashi, H. Mitsui (2002) Horizontal transfer of nodulation genes in soils and microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. *Microbes Environ.*, **17**(2), 82-90.
- 森 敏・前 忠彦・米山忠克 (2001) 植物栄養学. 文永堂. 東京. pp. 91, 105, 228-229.
- Saeki Y., Akagi I., Takaki H., Nagatomo Y. (2000) Diversity of indigenous *Bradyrhizobium* strains isolated from three different *Rj*-soybean cultivars in terms of randomly amplified polymorphic DNA and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 917-926.
- Saeki Y., N. Aimi, M. Hashimoto, S. Tsukamoto, A. Kaneko, N. Yoshida, Y. Nagatomo, S. Akao (2004) Grouping of *Bradyrhizobium* USDA strains by sequence analysis of 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 517-525.
- Saeki Y., A. Kaneko, T. Hara, K. Suzuki, T. Yamakawa, M. T. Nguyen, Y. Nagatomo, S. Akao (2005) Phylogenetic analysis of soybean-nodulating rhizobia isolated from alkaline soils in Vietnam. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **51**, 1043-1052.
- Saeki Y., N. Aimi, S. Tsukamoto, T. Yamakawa, Y. Nagatomo, S. Akao (2006) Diversity and geographical distribution of indigenous soybean-

- nodulating bradyrhizobia in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 418-426.
- Sameshima R., T. Isawa, M. J. Sadowsky, T. Hamada, H. Kasai, A. Shutsrirung, H. Mitsui, K. Minamisawa (2003) Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of RS α , RS β and IS1631. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **44**, 191-202.
- Suzuki K., H. Oguro, T. Yamakawa, A. Yamamoto, S. Akao, Y. Saeki (2008) Diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating rhizobia in the Okinawa islands, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 237-246.
- Yoshida N., K. Kodama, K. Nakata, M. Yamashita, T. Miwa (2002) *Escherichia coli* cells penetrated by chrysotile fibers are transformed to antibiotics resistance by incorporation of exogenous plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **60**, 461-468.
- Yoshida N., Y. Saeki (2004a) Chestnut bur-shaped aggregates of chrysotile particles enable inoculation of *Escherichia coli* cells with plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 566-575.
- Yoshida N., Y. Saeki (2004b) Chrysotile fibers penetrate *Escherichia coli* cell membrane and cause cell bursting by sliding friction force on agar plates. *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 162-168.
- Yoshida N. (2007) Discovery and application of the Yoshida effect : nano-sized acicular materials enable penetration of bacterial cells by sliding friction force. *Recent Pat. Biotechnol.*, **1**, 194-201.
- Yoshida N., T. Nakajima-Kambe, K. Matsuki, T. Shigeno (2007) Novel plasmid transformation method mediated by chrysotile, sliding friction, and elastic body exposure. *Anal. Chem. Insights*, **2**, 9-15.
- Yoshida N., K. Ide (2008) Plasmid DNA is released from nano-sized acicular material surface by low molecular weight oligonucleotides : exogenous plasmid acquisition mechanism for penetration intermediates based on the Yoshida effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 813-821.