根粒菌の根粒形成遺伝子の構造と機能†

東 四 郎, 小林不二夫

(鹿児島大学理学部)

根粒菌 (*Rhizobium* および *Bradyrhizobium*) はマメ科植物の根に感染し、根粒を形成する。根粒細胞中での根粒菌はバクテロイドに変化し、菌の保有しているニトロゲナーゼ (nitrogenase) 遺伝子 (*nif* genes) を発現させ、そのニトロゲナーゼにより、大気中の窒素をアンモニアに固定、窒素源として宿主植物に提供する。宿主となるべき植物と感染する菌種とは厳密な宿主特異的關係がある。たとえば、クロロバ菌 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) はクロロバのグループに、ダイズ菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) はダイズの仲間だけに感染し、根粒を形成、窒素固定を行う。マメ科植物と感染菌の宿主特異的關係は菌の保持する遺伝子的特異性に負っている。自然環境下において根粒菌は植物の周りの土壌中で増殖し、多くの場合植物の根の根毛を通じて植物内に侵入するが、この最初の段階で、感染菌と植物の間でシグナル応答というきわめて生物学的現象が起こる。

1. 根粒形成遺伝子 (*nod* gene)

根粒菌の感染に関する遺伝子群は *nod* genes と呼ばれる。根粒菌は増殖速度により fast growing と slow growing 群の2群に大別でき、それぞれ *nod* gene の存在様式が異なる。fast growing 群に属するクロロバ菌やアルファルファ菌 (*R. meliloti*) ではこの *nod* gene は主染色体とは別に、共生プラスミド (pSym) と呼ばれる 200~1500 kb の巨大プラスミド上に存在する。Slow growing 群に属する菌の代表としてのダイズ菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) では *nod* gene は主染色体上にあって、窒素固定に関する遺伝子群の cluster I および cluster II の上に所在している。図1に示すように菌種により若干の配列の相違はあるが、全体のプロフィールは共通している。

(1) コモン遺伝子群 (common *nod* gene) とその他の遺伝子 根粒形成遺伝子群のなかで、菌種間で共通している遺伝子 *nodABC* (*IJ*) を common *nod* gene と称し、発現生成されたタンパク質の機能もほぼ共通している (表1)。*nodABC* は種間では相互に交換することが可能な遺伝子群で、根粒形成には絶対に必要な遺伝子である。*nod* gene 群の他の遺伝子は遺伝子内に欠陥があっても、根粒形成に時間がかかったり、根粒数が減少したりする変異にとどまる。*nodABC* の変異菌は根粒菌感染の最初の兆候である根毛のカーリング (Hac) の現象、根毛細胞内および根粒組織中の感染糸形成 (Inf) さらに根粒形成 (Nod) がみられない。また、*nodIJ* は根粒形成と関係があり、ATP binding protein として働くものと考えられている。*nodABC* は後述の Nod factor の骨格の形成に不可欠な遺伝子であり、根毛の先端部分のカーリングのほか、根毛の変形 Had (root hair deformation) や根の肥厚短小化 Tsr (thick and short root) をもたらす。根の皮層細胞の分裂にはさらに、*nodFEL* 遺伝子産物による *nodABC* 産物への化学的修飾が必須である。*nod* gene の生化学的役割については不明な点が多いが、遺伝子の data base が充実してきたため相同性のある遺伝子について多数報告されている (表1)。

(2) 宿主を決定する遺伝子 (*hsn*-gene) 先述したように、根粒菌は一般に宿主特異性を有することが知られている。実用的にはこの宿主特異性を利用した交互接種法 (cross inoculation test) により菌種を決定している。宿主特異性にかかわる遺伝子を *R. meliloti* についてみると表1中 *hsn* 遺伝子とも称される *nodFE*, *nodG* および *nodH* があげられる。*nodFE* は根粒形成と関係するが、*nodF* は acyl-carrier protein (ACP), *nodE* は β -ketoacyl synthases と homologous な gene であるとの報告がある⁽¹⁾。この遺伝子群に欠陥があると感染糸形成 (Inf) がみられない。また、根粒形成に要する時間が遅くなり (Nod^d, delay), 極端な場合は根粒が形成され

† Structure and Functions of Rhizobial *nod* genes. Shiro HIGASHI and Fuzio KOBAYASHI (Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University, Kagoshima 890)

表 1 根粒菌の根粒形成遺伝子群

<i>nod</i> genes	Characteristics	Mutants phenotypes	Homologous genes	Rt	Rv	Rm	Bj
<i>nodD(D1)</i>	NodD は, flavonoid と複合体を形成後, プロモーターを活性化し転写を促す. Constitutive に発現する調節遺伝子.	Nod ⁻		○	○	○	○
<i>nodD 2</i>	<i>nodD1</i> または, <i>nodD3</i> のエンハンサー的役割を持つ. 調節遺伝子の役割は薄い. EPS 合成にも付加的役割を持つ.					○	
<i>nodD 3</i>	<i>nodD 3-SyrM</i> は, luteolin なしに <i>nod</i> operon の転写を促進する. しかも, <i>nodD 1-nodD 2</i> (luteolin) よりも 3~4 倍の遺伝子発現を行うことから重要な activator である.					○	
<i>nodABC</i>	common <i>nod</i> genes と呼ばれる. シグナル分子 (NodRm-1, NodRlv-IV, NodRlv-V) の合成に必要な遺伝子で, 他の <i>Rhizobium</i> 属と交換可能.	Hac ⁻ , Inf ⁻ , Nod ⁻	chitin synthase III	○	○	○	○
<i>nodIJ(IIa)</i>	<i>nodABC</i> operon 上に存在. <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> のヒスチジン-マルトース輸送系と相同性がある. 感染糸形成の効率に関連がある.	Nod ⁻ or d(Rt, Rv), Hac ⁺⁺ , Inf ⁺ , Nod ^d	ATP binding protein	○	○	○	○
<i>nodF</i>	宿主特異的遺伝子. <i>Escherichia coli</i> の acyl-carrier protein (ACP) と相同性があり, 4'-phosphopantethein 補欠分子族を保有する. Acyl 基を転移する.	Nod ^d	acyl-carrier protein	○	○	○	
<i>nodE</i>	宿主特異的遺伝子. 膜内在性のタンパクをコードしており, Rv と Rt 間で 78% の相同性がある. 同一オペロンに存在する <i>nodF</i> と共同で機能すると思われる. 不飽和脂肪酸の合成に関与すると考えられる.	Nod ⁻ (Rt, Rv), Hac ⁺ , Inf ⁻ , Nod ^d (Rm)	β-ketoacyl synthases	○	○	○	
<i>nodG</i>	宿主特異的遺伝子. 感染糸形成と迅速な根粒形成にかかわる遺伝子.	Hac ^d , Inf ⁻ , Nod ^d	dehydrogenases			○	
<i>nodH</i>	宿主特異的遺伝子. NodRm-1 へ acetyl 基を付加する役割を持つ. <i>nodFEGH</i> は, Rm では <i>hsnABCD</i> と呼ぶことがある.	Hac ^s , Inf ⁻ , Nod ⁻	acetyl transferases			○	
<i>nodLMN</i>	<i>nodL</i> は, acetyl 基を転移する遺伝子(Rv). <i>nodM</i> は, negative に働く cv.-specific な遺伝子である (Rt). 根粒形成の効率にかかわる.	Nod ⁻ or d (<i>nodL</i>), Hac ⁺ , Inf ⁺ , Nod ⁺	phosphoribosyl transferases	○	○		
<i>nodPQ</i>	<i>nod</i> box を持っていないが, NodD1 存在下で luteolin で誘導される. <i>E. coli</i> の <i>cysD</i> , <i>cysN</i> とそれぞれ相同性がある. これは, ATP sulphurylase をコードしており, NodRm-1 へのスルホン基の付加を行う遺伝子である.	Hac ⁺⁺ , Inf ⁺ , Nod ^d	ATP sulphurylase			○	
<i>nodO</i>	根毛細胞への付着に関連があると示唆される. <i>nodFEL</i> の変異を補う遺伝子であることから, Rv の宿主特異性, NodRlv の合成はこの両経路により決定される.	Hac ⁺ , Inf ⁺ , Nod ⁺	haemolysin		○		
<i>nodT</i>	Rt では <i>nodABCIIJ</i> operon, Rv では <i>nodMN</i> operon の下流に存在. 細胞外にタンパクを分泌するシグナルペプチドに典型的な特徴を持つ. また, <i>nodM</i> に対し, positive に働く cv.-specific な遺伝子である (Rt).	Hac ⁺ , Inf ⁺ , Nod ⁺		○	○		
<i>nodX</i>	Rv TOM に存在. Afghanistan pea への根粒形成に必要. cv.-specific な遺伝子である.				○		
<i>syrM</i>	symbiotic regulator. 調節遺伝子. LysR-NodD family と相同性がある. NodD3 の転写をコントロールしている.		LysR-NodD family			○	
<i>nolA</i>	Genotype specific nodulation gene.					○	
<i>nodS, U, Y, Z</i>	現在までに詳細な報告はない.						○

Rt, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*; Rv, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Rm, *Rhizobium meliloti*; Bj, *Bradyrhizobium japonicum*.

図1 クローバ菌 (*R. l. bv. trifolii*), エンドウ菌 (*R. l. bv. viciae*), アルファルファ菌 (*R. meliloti*), ダイズ菌 (*B. japonicum*) の根粒形成遺伝子地図

ないことがある。

(3) *syrM* 遺伝子 Symbiotic regulator の略で, *R. meliloti* SU 47 株の *nodH* と *nodD3* との間に存在する遺伝子である⁽²⁾。 *nodD3* の転写に関係し, *SyrM* は *NodD3* と協同的に働く activator である。 *NodD1*, *NodD2* より 3~4 倍の *nod gene* 誘導能力を持つ。 Barnett と Long (1990) は *SyrM* のアミノ酸組成を明らかにし, *NodD* や *LysR* family のような調節遺伝子のアミノ酸組成と類似していることを報告している⁽²⁾。

(4) ダイズ根粒菌の *nolA* 遺伝子 宿主であるダイズによっては根粒菌の侵入を厳密に選別している品種もある⁽³⁾。つまり, あるダイズ品種では *Bradyrhizobium japonicum* の遺伝子中に *nolA gene* を保有している菌株だけが感染する。このような遺伝子を genotype specific nodulation gene と称している。このような遺伝子は原始的なエンドウ (野生型に近いタイプのエンドウ) Afghanistan pea に感染する *R. l. bv. viciae* TOM 株に存在する *nodX* と同様な働きであることが報告されている⁽⁴⁾。

2. 植物から分泌される *nod gene* の発現誘導シグナル物質

宿主植物の根から多くの種類のフラボン, フラボノン, イソフラボン, およびカルコン類が分泌され, それ

らのなかには根粒形成に不可欠なものがあることはよく知られた事実である⁽⁵⁻⁷⁾。また, これらの物質は宿主植物の種子の浸出液や根の組織の浸出液のなかにも含まれている。図1中 *nodD* の発現産物である *NodD* タンパク質は恒常的に産生されており, 根から分泌される上述のフラボノイド類と複合体を形成し, この複合体の形で *nod gene* の promoter (*nod box*) へ結合することにより *nod gene* の転写の速度を律している。このように, *NodD*-フラボノイド複合体による *NodD* 分子の形態変化は RNA-polymerase の転写をより効率よくするものである⁽⁸⁾。

また, 植物からの分泌物質とそれに応答する菌体とはある一定の関係があることがわかっている。たとえばエンドウ菌 (*R. l. bv. viciae*) *nod gene* 誘発にはエンドウ種子抽出液中の apigenin-7-O-glucoside, eriodictyol などや, 根の浸出液中にある 3, 5, 7, 3'-tetrahydroxy-4'-methoxy flavanone などが有効であることが見いだされている⁽⁹⁾。また, 菌接種植物の根からの浸出液のなかには liquiritigenin や 4', 7-dihydroxy-3'-methoxyflavanone や naringenin などが存在し, 接種菌と植物がお互いに対話していることを物語る事例が発見されている⁽¹⁰⁾。アルファルファからの chrysoeriol, luteolin と *R. meliloti*, クローバからの 4', 7-dihydroxyflavone, geraldone

図2 *V. sativa* と *R. l. bv. viciae* の共生初期におけるフラボノイドの役割 (Recourt⁽¹⁵⁾ より改写)
PAL, phenylalanine ammonia-lyase; CHS, chalcone synthase; EMT, eriodictyol methyltransferase.

と *R. l. bv. trifolii*, インゲンからの eriodictyol, naringenin と *R. l. bv. phaseoli*, ダイズからの daizein, genistein と *Bradyrhizobium japonicum* 等々, フラボノイド以外の物質たとえばステロイドと根粒菌の感染の関係⁽¹¹⁾など, この分野の研究は今後とも拡大の一途をたどることになる。

植物から得られるフラボノイド類とそれに応答する菌種との関係を明らかにするための方策として, *lacZ*-fusion plasmid を利用するのは常法である。たとえば *R. meliloti* 1021 株へ *nodC-lacZ* fusion plasmid pRmM57 を導入した変異株と, 植物から得られた被験物質を添加する。もし, NodD-フラボノイド複合体が形成され, プロモーターが活性化されれば, 基質として用いた 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) の galactose が切り離されて青色を呈する。遺伝子の転写

活性は, その青色の度合いで測定することができる⁽¹²⁾。また, Spaink ら (1992)⁽¹³⁾ は *Rhizobium* や *Bradyrhizobium* の *nod* gene 発現産物 (Nod metabolites) を検索するのに, ラジオアイソトープラベルした酢酸を取込ませ, 薄層クロマトグラフィーで追跡するという画期的な方法を考案した。この方法は根粒菌感染の研究に威力を発揮するであろう。

最近, Lerouge ら (1990)⁽¹⁴⁾ は *R. meliloti* とアルファルファとの感染系において, 宿主の感染受け入れを決定する物質が菌培養液に分泌されていることを報告し, その物質に NodRm-1, Ac-NodRm-1 および NodRm-2 と命名した。NodRm-1 は分子中に硫酸基を含む *N*-acetyl *N'**N''N'''*-triacyetyl-chitotetraose というリポオリゴ糖である。この物質は 10^{-11} M の濃度でバクテリアを接種することなしに宿主植物の根毛をカールさせ, 10^{-9} ~ 10^{-7}

Mのレベルの添加で根の組織の内皮細胞分裂を誘起し、直接感染菌がなくても疑似根粒を形成することが観察されている。さらに、Recourt ら (1992)⁽¹⁵⁾は *R. l. bv. viciae* とエンドウの一品種 *Nigra* の感染系で共生初期にみられる Nod factor とフラボノイドの役割について報告した。すなわち、感染菌が植物の根から分泌されるフラボンによって *nod* gene が活性化され、NodD がさらに増幅し、その結果、NodRlv-IV および NodRlv-V が菌体から分泌され、それが植物の組織内に侵入する。侵入したリボオリゴ糖はフラボノイドの合成系に関与する L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と chalcone synthase (CHS) および eriodictyol methyltransferase (EMT) の mRNA レベルを上昇させる。その結果、植物からのフラボノイドの分泌がさらに増大するというモデルである (図 2)。それぞれの宿主と菌種の間で図 2 で示したような関係が普遍的に根粒菌の感染過程で行われるとすれば、感染メカニズムの解明にも明かりがみえてくるであろう。

一方、根粒菌が植物細胞内に侵入すると植物は侵入刺激に対して敏感に反応する。植物の遺伝子が発現して、初期ノデュリン (ENOD) が生合成される⁽¹⁶⁾。そのなかでプロリンを多く含んでいるタンパク質が分泌され、これが細胞壁組成の一部となるものと考えられている。エンドウ根粒には2つのペンタペプチドとヒドロキシプロリンを多く含んでいる PsENOD 12 や、アラニン、グリシン、セリン含有量の高いタンパク質でアラビノガラクトンに結合する性質を持っている PsENOD 5 が発見されている。また、ENOD 2 も根粒の分裂組織の分化に関与しているタンパク質と考えられている。このような感染初期に出現し、根粒形成に先立って出現するタンパク質はいずれも根粒菌の産生する Nod factor により誘導されるものである。引き続き、レグヘモグロビンに代表される根粒内独特の後期ノデュリン (LNOD) や uricase, glutamine synthase や NOD 6⁽¹⁷⁾ などが根粒の成熟に伴って生産されることになる。

- (1) H. P. Spaink, D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold, and B. J. J. Lugtenberg : *Nature*, **354**, 125—130 (1991).
- (2) M. J. Barnett and S. R. Long : *J. Bacteriol.*, **172**, 3695—3700 (1990).
- (3) M. J. Sadowsky, P. B. Cregan, M. Gottfert, A. Sharma, D. Gerhold, F. Rodriguez-Quinones, H. H. Keyser, and G. Stacey : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 637—641 (1991).

- (4) E. O. Davis, J. Evans, and A. W. B. Johnston : *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 531—535 (1988).
- (5) G. Stacey, M. G. Shell, and N. Deshmene : in "Signal Molecules in Plant and Plant-Microbe Interactions, NATO ASI series, H 36," ed. by B. J. J. Lugtenberg, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 395—399.
- (6) J. A. Downie, C. Marie, A. K. Scheu, J. L. Firmin, K. E. Wilson, A. E. Davies, T. M. Mavridou, A. W. B. Johnston, and A. Economou : in "Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions," ed. by H. Hennecke and D. P. S. Verma, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1991, pp. 134—141.
- (7) M. Hungria, A. W. B. Johnston, and D. A. Phillips : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**, 199—203 (1992).
- (8) C. Wijffelman, H. Spaink, H. Schlaman, B. Zaat, K. Recourt, R. de Maagd, R. Okker, and B. J. J. Lugtenberg : in "Signal Molecules in Plant and Plant-Microbe Interactions, NATO ASI series, H 36," ed. by B. J. J. Lugtenberg, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 137—144.
- (9) S. A. J. Zaat, C. A. Wijffelman, H. P. Spaink, A. A. N. van Brussel, J. H. Okker, and B. J. J. Lugtenberg : *J. Bacteriol.*, **169**, 198—204 (1987).
- (10) K. Recourt, J. Schripsema, J. W. Kijne, A. A. N. van Brussel, and B. J. J. Lugtenberg : *Plant Mol. Biol.*, **16**, 841—852 (1991).
- (11) Z. Gyorgypal and A. Kondorosi : *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 337—340 (1991).
- (12) R. W. Innes, P. L. Kuempel, J. Plazinski, H. Canter-Cremers, B. G. Rolfe, and M. A. Djordjevic : *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 426—432 (1985).
- (13) H. P. Spaink, A. Aarts, G. Stacey, G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg, and E. P. Kennedy : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**, 72—80 (1992).
- (14) P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Prome, and J. Denarie : *Nature*, **344**, 781—784 (1990).
- (15) K. Recourt, A. J. van Tunen, L. A. Mur, A. A. N. van Brussel, and B. J. J. Lugtenberg : *Plant Mol. Biol.*, **19**, 411—420 (1992).
- (16) J.-P. Nap and T. Bisseling : *Science*, **250**, 948—954 (1990).
- (17) I. V. Kardailskii, F. Govers, T. Bisseling, I. A. Tikhonovich, and A. O. Zolenskii : *Mol. Biol.*, **25**, 1325—1328 (1991).