

## 根圏微生物群におけるサーカディアンリズムの実証

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 応用分子微生物学 寺戸 菜穂

### 1. 背景と目的

サーカディアンリズムは24時間周期の内因性のリズムのことで様々な生理機能を調節する重要な働きを持つため、すべての真核生物に備わっている。一方原核生物でサーカディアンリズムの存在が実証されているのは、シアノバクテリアなどの光合成微生物のみである。しかし光が関与しない環境においても、24時間周期の変動は起こりうる。例えば植物根圏は、昼間は植物の根から光合成由来の有機物や酸素が供給され、夜間にはその供給が停止するため、日周変動環境と言える。このような環境下で生育する微生物もサーカディアンリズムを持っている方が優位に生育できると考えられる。さらにシアノバクテリアのサーカディアンリズムの中心遺伝子 (*kaiC*) が、根圏微生物を含む多くの原核生物にも保存されているという知見もこの仮説を支持する。本研究では、〈実験1〉根粒菌における *kaiC* ホモログの機能の解明、〈実験2〉光照射条件を変えたウキクサ根圏微生物の集積・単離培養の2つの実験により根圏微生物におけるサーカディアンリズムの存在を実証することを目的とする。

### 2. 方法と結果

〈実験1〉*kaiC* ホモログを持つ根圏微生物として、水田などに生育する *Aeschynomene indica* (クサネム) と共生し光合成活性を持つ根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 株を用いた。〈実験1-1. *kaiC* 破壊株の作製と野生株との比較実験〉pK18mobsacBを用いた遺伝子破壊法により *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 の2コピーの *kaiC* ホモログを欠損させた二重破壊株の作製に成功した。*kaiC* 遺伝子の機能を調べるために野生株と表現型に違いが出る培養条件を探索した。生育速度の観察・生育競争実験・炭素と酸素濃度制限下での生存能力の比較を行ったが、現在のところ明確な差がみられる条件は得られていない。〈実験1-2. 明暗サイクル・恒常明条件下での遺伝子発現解析〉サーカディアンリズムの制御下にある遺伝子は、恒常条件下でも日周期的な発現変動を示すことが知られている。そこで *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 株を明暗サイクルで培養したのちに恒常明条件下へと移し、継時的にサンプリングを行ったものからRNA抽出を行った。サーカディアンリズムに特徴的な発現変動を示す遺伝子の候補として *kaiC* に加え光合成やエネルギー代謝に関わる遺伝子に着目し、現在リアルタイムPCR法による発現解析を行っている。

〈実験2〉生育が速く培養が容易なコウキクサ (*Lemna minor*) をモデル植物として使用した。コウキクサを4つの異なる光照射条件 (7, 12, 17時間ごとの明暗サイクルと恒常明条件) で28日間培養し、光照射時に根から分泌される有機物を利用して増殖する根圏微生物の集積培養を試みた。集積培養後、コウキクサ全体からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を行った。この結果、12h/12hでのみ優占した微生物 (サーカディアンリズムを持つ可能性が高い) を14種、恒常明条件下でのみ優占した微生物 (増殖が速いだけの可能性が高い) を18種特定することができた。さらに集積後のサンプルから根圏微生物を計177株単離し、12h/12hおよび恒常明条件下で特異的に優占した微生物種に近縁 (rRNA 遺伝子配列の相同性99%以上) な微生物をそれぞれ3株、2株取得することに成功した。現在、これらの単離株を用いた競争培養実験により、サーカディアンリズムを有する可能性を検証している。