

## *Bradyrhizobium japonicum* カタラーゼ遺伝子の クローニング方法の確立

白川 雪香・井川 香子・佐藤 哲也・大和田琢二

(受理：1998年5月18日)

Establishment of cloning techniques of catalase  
gene in *Bradyrhizobium japonicum*

Yukika SHIRAKAWA, Keiko IGAWA,  
Tetsuya SATO, and Takuji OHWADA

### 摘 要

*Bradyrhizobium* 属の6菌株についてカタラーゼ活性を測定し、最も活性の高かった *B. japonicum* USDA 110 株からカタラーゼ遺伝子のクローニングを試みた。全DNAを制限酵素(*EcoRI*)で処理し、生じたDNA断片をショ糖密度勾配遠心法により分画した。DNA画分(2~16kb)についてコスミド(Chromid9-36)を用いて *in vitro* パッケージングし、大腸菌カタラーゼ欠損変異株 (*Escherichia coli* UM255) へ導入した。0.3%過酸化水素( $H_2O_2$ )溶液を直接コロニーの縁に添加し、泡を生じたコロニーをカタラーゼ遺伝子を持つ形質転換株としてスクリーニングした結果、およそ1/400の割合で目的の形質転換株が得られた。この中には、*B. japonicum* USDA110株と同程度のカタラーゼ活性を持つ形質転換株が見られたことから、カタラーゼ遺伝子のクローニングが確認された。

キーワード：*Bradyrhizobium*, カタラーゼ, クローニング, *in vitro* パッケージング

### 緒 言

根粒菌はマメ科植物の根に感染して根粒を形成する窒素固定細菌として知られ、根粒中で変形或いは巨大化してバクテロイドへと分化し、ニトロゲナーゼを生産する<sup>1)</sup>。この酵素により、空気中の分子状窒素はアンモニアとして固定され、アミノ酸に転換された後、窒素源として宿主植物に提供される。一方、根粒菌は宿主植物が生産する光合成産物をエネルギー

源として利用しており、いわゆる共生関係を保っている。窒素固定過程には大量のエネルギー(ATP)が必要とされ、主にミトコンドリア内膜における酸化的リン酸化反応により得ていると考えられている。従って、効率的にエネルギーを生産するためには酸化的な環境が不可欠であるが、ニトロゲナーゼは酸素に対する感受性が高く、分子状酸素で容易に失活してしまうことが知られており、一方では強い還元状態が維持されている<sup>2,3)</sup>。このため根粒内では活性

酸素が生じやすいと考えられている。

好気性生物の多くは  $O_2$  の  $H_2O$  への還元を利用してエネルギーを獲得していると考えられ、極めて反応性が高い活性酸素と呼ばれるいくつかの中間産物が生成される。 $O_2$  が還元されてスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\cdot O_2^-$ ) となり、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD: EC 1.15.1.1) による過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の生成や、 $\cdot O_2^-$ 、 $H_2O_2$  の相互作用によって、更に反応性の高いヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) や一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の生成が知られている<sup>4,5)</sup>。根粒内でも、窒素固定の過程で  $\cdot O_2^-$  がフェレドキシン、レグヘモグロビン、ヒドロゲナーゼの関与する反応で生じ<sup>6)</sup>、更にスーパーオキシドジスムターゼによって  $\cdot O_2^-$  が消去される過程で  $H_2O_2$  が生成されると考えられている<sup>7)</sup>。また、尿酸をアラントインに変換する尿酸オキシダーゼの反応を経て、 $H_2O_2$  が生成される系も報告されている<sup>8)</sup>。特にレグヘモグロビンはこれらの活性酸素の主な発生源であると考えられ、レグヘモグロビンの自動酸化により  $\cdot O_2^-$  を生成し<sup>9)</sup>、 $H_2O_2$  との作用により  $\cdot OH$  を生成すると考えられている<sup>10)</sup>。

このようにして生成される活性酸素 ( $\cdot O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ ) は生体を構成する主要成分であるタンパク質の構造や機能、核酸や脂質に傷害を与えるため<sup>11,12)</sup>、活性酸素の生成と除去の不均衡が起これると酸素ストレスとなって細胞に大きな損傷を与えることになる<sup>13,14)</sup>。従って、活性酸素に対する防御機構はすべての好気性生物にとっては必須であると考えられ、活性酸素生成の抑制や蓄積された活性酸素の除去機構が知られている。根粒中では植物由来のアスコルビン酸-グルタチオンの反応系や、SOD、ペルオキシダーゼ、カタラーゼが機能していることが報告されている<sup>15)</sup>。特にカタラーゼは  $H_2O_2$  の  $H_2O$  と  $O_2$  への分解を触媒する酵素で、好氣的生育ができるほとんどの生物に存在し、種を越えて保存性が高いタンパク質であるといわれている<sup>16)</sup>。そのため、カタラーゼに関する研究は植物、動物、微生物を問わず幅広く行われており、細菌では主に *E. coli* を用いた研究が進んでいる。

著者らは、根粒菌 (フリーリビング細胞) のカタラーゼ活性は、好気性細菌であるにもかかわらず他の細菌群に比べて非常に低く、その結果  $H_2O_2$  に対す

る感受性が他の細菌群に比べて相対的に高いことを明らかにした<sup>17)</sup>。本報では根粒形成及び窒素固定過程におけるカタラーゼの役割を明らかにするために *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 のカタラーゼ遺伝子のクローニングを試みたので報告する。

## 実験方法

### 1. 菌株及び培地

根粒菌は *Bradyrhizobium japonicum* の 6 菌株 (USDA110, USDA1031, USDA109, S32, OUG 117, JIR33) を用いた。また、カタラーゼ欠損変異株は Dr. Peter C. Loewen (Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada) より分譲された変異株、*E. coli* UM255 (*proleu rpsL hsdM hsdR endI lacY katG2 katE12::Tn10 recA*) を使用した。

根粒菌の保存及び培養にはそれぞれマンニトールを炭素源とする YEM 或いは YEM-HM 培地を用いた<sup>18)</sup>。特に USDA110 株の保存には RDY 寒天培地 (グルコン酸ナトリウム 5 g, グルタミン酸 1 g, 酵母エキス 1 g, リン酸水素二カリウム 0.12g, リン酸二水素カリウム 0.12g, 硫酸マグネシウム 0.1g, 微量成分溶液 \* 1 ml, 寒天 15g/L 蒸留水, pH6.9) (\*: ほう酸 3 g, 硫酸マンガ 2.23g, 硫酸亜鉛 0.29g, 硫酸銅 0.125g, 塩化コバルト 0.045g, モリブデン酸ナトリウム 0.12g, 塩化鉄 0.2703g/L 蒸留水), 本培養には HM 培地 (HEPES 1.3g, MES 1.1g, アラビノース 1 g, 酵母エキス 0.5g, 塩化アンモニウム 0.32 g, 硫酸ナトリウム 0.25g, 硫酸マグネシウム 0.18g, リン酸水素二ナトリウム 0.125g, 塩化カルシウム 13 mg, 塩化鉄 4 mg/L 蒸留水, pH6.8) を用いた。また *E. coli* UM255 株及びその形質転換株には LB 或いは TY 培地<sup>19)</sup> を用い、必要に応じてテトラサイクリン (終濃度 20  $\mu$ g/ml), アンピシリン (終濃度 20  $\mu$ g/ml) を添加した。

### 2. 無細胞抽出液の調製及びタンパク質の定量<sup>20)</sup>

培養菌液を 10,000rpm, 4°C で 10 分間の遠心分離により集菌した後、菌体を 50mM リン酸緩衝液 (KPB: 50mM リン酸二水素カリウム 8.5ml, 50mM リン酸水素二カリウム 91.5ml, pH7.8) を用いて 3 回洗浄した。洗浄後、少量の 50mM KPB に懸濁して超音波処理 (200W, 2 分間  $\times$  8 回) により菌を破碎し酵素を



抽出した後、19,000rpm、4°Cで60分間遠心し、上清液を無細胞抽出液とした。試料中の蛋白質含量はBIO-RAD PROTEIN ASSAY (Bio-Rad) を用いて595nmの吸光値から定量した。標準蛋白質には牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

### 3. カタラーゼ活性の測定<sup>21)</sup>

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5  $\mu$ l, 蒸留水2.645ml, 0.5M KPB 0.3 ml を石英セル中で混合し、25°Cで3分間温度平衡させた後、試料の50 $\mu$ l を混合し、240nmの吸光値の変化を測定した。尚、酵素活性は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のモル吸光係数 (0.0436mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) から求めた。

### 4. DNA の調製<sup>22)</sup>

*B. japonicum* USDA110 を1.5mlのHM培地で振盪培養し (150rpm, 30°C, 72時間)、その菌液 (1.5 ml) をエッペンドルフチューブに入れ、10,000rpm, 4°Cで15分間、遠心して集菌した後、菌ペレットに0.5% N-ラウロイルサルコシン (TNE 緩衝液: 10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA, 0.15M 塩化ナトリウムで調製) の1.5mlを加えてよく懸濁してから遠心した。ペレットを TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA) 0.45 ml, 0.5M EDTA 6 $\mu$ l, 5% SDS (TE 緩衝液で調製) 0.15ml, プロテアーゼ K (2.5mg/ml) 0.15ml に懸濁した後、42°Cで1時間インキュベートし、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1(v/v) を加えて穏やかに混合する操作で除蛋白した。そして、10,000rpm, 4°Cで5分間遠心し、上層の水層を分取した (この操作を3回繰り返した)。上層の水層に、あらかじめ-20°Cで冷却しておいた2倍量のエタノール (99.9%) を静かに重層し、糸状に析出したDNAを10,000rpm, 4°Cで10分間遠心した後、ペレット (DNA) を吸引乾燥させてから10 $\mu$ lのMiliQ (MQ) 水に溶解した。

### 5. DNA 断片の調製

約100 $\mu$ gのDNAに10 $\times$ EcoRI用緩衝液10 $\mu$ l, EcoRI (宝酒造 [株]) 10 $\mu$ l (100U), MQ水50 $\mu$ lを混合し、37°Cで1時間インキュベートした。ミニゲルを用いた電気泳動によりDNAが部分分解されていることを確認した後、この溶液に5M酢酸アンモニウム10 $\mu$ l, エタノール300 $\mu$ lを加えて、-80°Cで30分間静置し、10,000rpm, 4°Cで15分間遠心した。そして、生じた沈殿を70%エタノールで洗浄した後、吸

引乾燥した試料を500 $\mu$ lのMQ水に溶解した。次に、遠心管 (1.3 $\times$ 9.5cm) にTNE緩衝液で調製した25%, 20%, 15%, 10%, 5% (w/v) のショ糖溶液をこの順に遠心管の底から2mlずつ重層し (5%は1.5ml), 最上層に試料溶液を重層した。超遠心分離機 (65P型: 日立製作所, スイングローター RPS 40-A) で20,000rpm, 15°Cで17時間遠心した後、下層からシリッジで0.5mlずつ分取した。あらかじめTAE緩衝液 (0.04M Tris-酢酸, 1mM EDTA (pH8.0)) で調製したTAEアガロースゲル (5.2 $\times$ 5.9cm, 終濃度1%) を用いて、分取した試料の10 $\mu$ lに1/5量のゲルローディング緩衝液タイプI (0.25%ブロムフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノールFF, 40% (w/v) ショ糖) を加え、Mupid電気泳動装置を用い、100Vで約40分間泳動した。泳動終了後、エチジウムブロミド溶液 (1 $\mu$ g/ml) 中に泳動ゲルを浸漬し、紫外線で泳動されたDNAを観察し、各画分に含まれるDNAサイズを調べた後、2~16kbのDNA断片を含む画分を回収し、コロジオンバックを用いてTNE緩衝液で一晩透析した。透析後の溶液を300 $\mu$ lずつ分注し、5M酢酸アンモニウム10 $\mu$ l, エタノール900 $\mu$ lを加えて-80°Cで30分間静置した後、10,000rpm, 4°Cで15分間遠心して生じた沈殿を70%エタノールで洗浄し、吸引乾燥した試料を10 $\mu$ lのMQ水に溶解した。

### 6. ライゲーションとパッケージング

分画、精製したDNA断片をニッポンジーン(株)マニュアルに従ってコスミド (Charomid 936: ニッポンジーン(株)) に挿入、パッケージングした。2 $\mu$ l (DNA量1 $\mu$ g) のCharomid9-36, 10 $\times$ EcoRI緩衝液5 $\mu$ l, EcoRI (宝酒造 [株]) 1 $\mu$ l (10U), MQ水42 $\mu$ lを混合し、37°Cで1時間インキュベートした後、1M塩化ナトリウム5 $\mu$ l, 150mM EDTA (pH7.5) 5 $\mu$ lを加えて10分間インキュベートした。このベクター溶液の全量に、調製した2~16kbのDNA断片溶液5 $\mu$ l (DNA量0.3 $\mu$ g), 5M酢酸アンモニウム6.5 $\mu$ lを加え混合した後、200 $\mu$ lのエタノールを加えて-80°Cで30分間静置し、10,000rpm, 4°Cで15分間遠心した。生じた沈殿を70%エタノール、そして99.9%エタノールで洗浄した後吸引乾燥し、5 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。そして、溶液I 10 $\mu$ l, 溶液II 5 $\mu$ l (Ligation kit: 宝酒造 [株]) を加え、26°Cで10

分間反応させた。ライゲーションの完了後、その5  $\mu$ l を水中で速やかに溶解させたパッケージング抽出液 (*In vitro* パッケージングキット LAMBDA INN: ニッポンジーン [株]) に混合し、22°Cで90分間静置した後、500  $\mu$ l のファージ緩衝液(塩化ナトリウム2.9 g, 硫酸マグネシウム1.0g, 1M Tris 緩衝液(pH7.5) 25ml, 2.5%ゼラチン2.5ml/500ml MQ 水) を加え DNA をパッケージングした。

#### 7. *E. coli* UM255 への導入とスクリーニング

宿主菌となる *E. coli* UM255 をテトラサイクリン (20  $\mu$ g/ml) を含む LB 培地で30°C, 24時間培養した後、培養菌液の1 ml を10,000rpm, 4°Cで15分間遠心、集菌し、細胞ペレットに10mM 塩化マグネシウム0.5ml を加えて懸濁し宿主細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液100  $\mu$ l に、先に調製したパッケージング液 100  $\mu$ l を混合し、22°Cで15分間静置した後 LB 培地 1ml を加えて37°Cで30分間培養し、20~30個のコロニーが生えるように適当に希釈した後、テトラサイクリン (20  $\mu$ g/ml) とアンピシリン (20  $\mu$ g/ml) を含む LB 寒天プレートに塗抹して37°Cで一晩培養した。

カタラーゼ活性を示す形質転換株のスクリーニングは Loewen らの方法<sup>23)</sup>に従って行った。即ち、コロニーの縁に0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を直接添加し、泡を生じたコロニーをカタラーゼ活性を持つ形質転換体として単離した。

#### 8. カタラーゼ遺伝子を含んだ Charomid 9-36の調製 (Mini Prep 法)<sup>24)</sup>

カタラーゼ活性を示した形質転換株をテトラサイクリンとアンピシリンを含む LB 培地で一晩培養した後、培養菌液 3 ml を10,000rpm, 4°Cで15分間で遠心、集菌し、ペレットを-80°Cで30分間静置した。これを溶液 I (グルコース0.9g, 2M Tris-HCl (pH8.0) 1.252ml, 0.25M EDTA (pH7.5) 4 ml/L) 100  $\mu$ l に懸濁し、リゾチム (10mg/ml) の3  $\mu$ l を加え、穏やかに混合した後、溶液 II (5 M 水酸化ナトリウム0.12ml, 10% SDS 0.3ml, 蒸留水2.58ml) 200  $\mu$ l を加えて水中に5分間静置した。溶液 III (5M 酢酸カリウム90ml, 氷酢酸17.25ml, 蒸留水42.75ml, pH4.8) 150  $\mu$ l を加えて水中に5分間静置した後、10,000rpm, 4°Cで10分間遠心した。そして、上清液に等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルア

ルコール=25:24:1 (v/v) を加えて穏やかに混合し、10,000rpm, 4°Cで5分間遠心した。上層(水層)にクロロホルム200  $\mu$ l を混合した後、10,000rpm, 4°Cで10分間遠心し、再度、上清液に99.5%エタノール 1 ml を加えて、-80°Cで30分間静置した。その後、10,000rpm, 4°Cで20分間遠心し、生じた沈殿を70%エタノールで洗浄した後、吸引乾燥した試料を10  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解した。

#### 9. Electroporation

*E. coli* UM255 を SOB 培地 (トリプトン20g, 酵母エキス 5 g, 塩化ナトリウム0.584g, 塩化カリウム0.186g/L 蒸留水, pH7.0) 400ml で対数後期まで培養し、50ml チューブ 4本を用いて集菌した。2本のチューブにまとめて、滅菌水で4回洗浄した後、1本のチューブにまとめて、再び滅菌水で1回洗浄し、10%グリセロール25ml で1回洗浄した後、10%グリセロール 1 ml に懸濁した。その80  $\mu$ l をエッペンドルフチューブに分注し、カタラーゼ遺伝子が挿入された Charomid 9-36の5  $\mu$ l と0°C, 1分間よく混合し、キューベットに入れてelectroporationを行った(0°C, 12.5kv/cm, 5msec)。そして即、冷却しておいた SOC (塩化マグネシウム20.33g, 硫酸マグネシウム24.65g/100ml, 1M グルコース) 1 ml を加え、37°Cで1時間インキュベートした後、LB プレート(テトラサイクリン, アンピシリンを含む)に塗抹し、生えてきたコロニーからカタラーゼ活性を持つ形質転換体を7の方法に従って単離し、カタラーゼ活性を測定した。

### 実験結果および考察

#### 1. 菌株の選択

*Bradyrhizobium japonicum* の6菌株について無細胞抽出液を調製し、カタラーゼ活性を測定した(Table 1)。その結果、*B. japonicum* USDA110の活性が最も高かった(29.3units/mg protein)。クローニングには活性の高い菌株を選択した方が有利であるため、この菌株からカタラーゼをコードする遺伝子をクローニングすることに決定した。

#### 2. DNA の単離及び分画

*B. japonicum* USDA110の全DNAを実験方法で述べた方法に従って単離し、制限酵素処理(*Eco*R I)によりDNA鎖の部分分解を行った。その後、バック



Table 1. Catalase activity among *Bradyrhizobium* strains grown in YEM-HM medium at 30°C aerobically

Strains	Catalase specific activity (units/mg protein)
<i>B. japonicum</i> S32	3.5
JIR33	10.9
OUG117	7.2
USDA110	29.3
USDA1031	4.7
USDA109	7.9

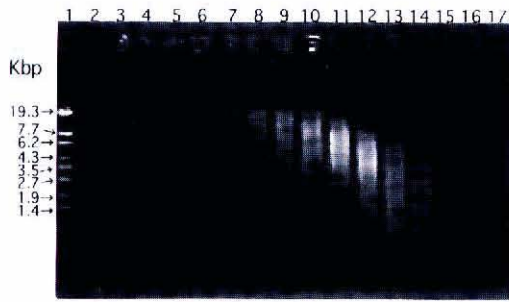


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *B. japonicum* USDA110 DNA digested with *EcoRI*. *EcoRI*-digested DNAs were fractionated by sucrose density-gradient centrifugation and 10  $\mu$ l of each fraction were applied on gel as described in Materials and Methods. Lane1:  $\lambda$ EcoT14-I digest molecular marker. Lane2~17: fraction numbers of *EcoRI*-digested DNAs

ージング可能な DNA 断片のサイズ (2~16kb) を回収するため、*EcoRI* 処理した全 DNA を、ショ糖密度勾配速心法で分画し、各画分についてアガロースゲル電気泳動を行った (Fig. 1)。その結果、DNA 断片の分画が確認され、Lane 5~10を回収した。試料はコロジオンパックにより透析、濃縮した。

### 3. Charomid 9-36へのライゲーション

Figure 2 に、DNA の *EcoRI* 断片と Charomid 9-36の混合反応液について、ライゲーション反応の前後における試料の電気泳動の結果を示した。反応前の結果は Lane 2 に示されているように、*EcoRI* 断片の画分と Charomid 9-36のバンドが見られた。一方、反応後では、Lane 3 で示したように、1本のバ

ンドが確認された。この結果から、ライゲーション反応が完了したことが確認された (Fig. 2)。Charomid 9-36は全長が36.0kbのコスミドで、クローニング部位に *EcoRI* 部位が一箇所存在する。Figure 1の Lane 5~10に分画された DNA 断片は Charomid 9-36の *EcoRI* 部位に挿入されたと考えられた。

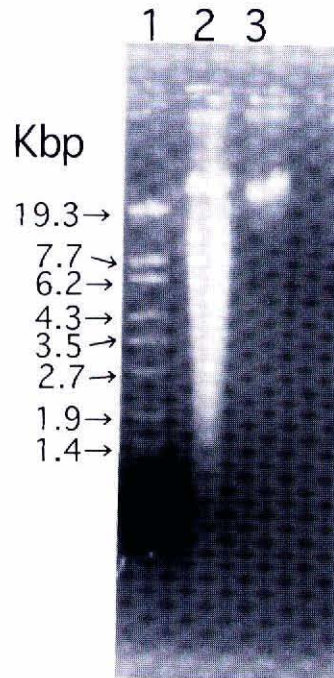


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of Charomid 9-36 containing *EcoRI* fragments (2~16kb) derived from chromosomal DNA of *B. japonicum* USDA110.

Lane1:  $\lambda$ EcoT14-I digest molecular marker  
Lane2: Before ligation (mixture of Charomid 9-36 and *EcoRI* fragments)  
Lane3: After ligation of *EcoRI* fragments into Charomid 9-36

### 4. スクリーニング

ライゲーションが完了した Charomid 9-36を、カタラーゼ欠損変異株、*E. coli* UM255 に導入した。Figure 3 に形質転換株の各コロニーの縁に0.3%  $H_2O_2$  を添加した時の写真を示した。カタラーゼ遺伝子が挿入されていないコロニーは全く泡を生じなかったが、カタラーゼ遺伝子が挿入されたコロニーは泡を生じた (矢印)。およそ10,000個のコロニーをス

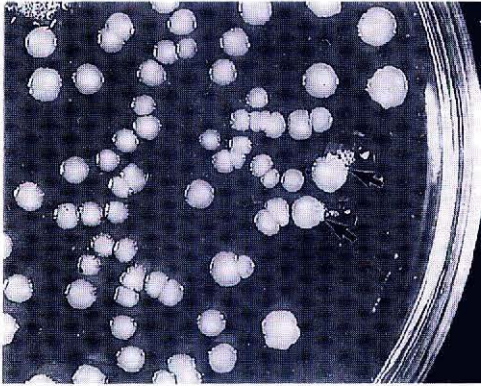


Fig. 3 *E. coli* UM255 transformants with catalase gene from *B. japonicum* USDA110 ligated to Charomid 9-36. Positive transformants are shown by the arrows.

クリーニングし、そのうち23個のコロニーをカタラーゼ陽性のコロニーとして単離した。これは、およそ400個のコロニーあたり1個の割合で陽性のコロニーが得られた計算であった。根粒菌の全DNA含量を4,500kbとすると、挿入されたDNA断片の平均サイズは9 kbなので、目的の遺伝子がシングルコピーである場合では予想される陽性コロニーの出現頻度は1/500と考えられる。本菌株には2つのカタラーゼアイソザイムが存在することが著者らの研究で明らかになっているが、得られた実験結果はおおよそ予測される陽性コロニーの出現頻度に添った値であると考えられた。単離されたコロニーのうち、20個のコロニーについて、それぞれのカタラーゼ活性を測定した (Table 2)。その結果、15の形質転換株においてカタラーゼ活性が認められた。活性値は1.05から22.74まで形質転換株によってばらつきがあったが、*E. coli* UM255-19のカタラーゼ活性 (22.74) は *B. japonicum* USDA110の活性値 (29.3) に近く、十分な活性を示したことから、*E. coli* UM255-19には *B. japonicum* USDA110由来のカタラーゼ遺伝子の読み取り枠 (open reading frame: ORF) がカタラーゼ活性を発現するのに十分な長さでクローニングされていることが推察された。

##### 5. カタラーゼ遺伝子の確認

*E. coli* UM255-19にクローニングされた遺伝子がカタラーゼをコードしていることを再度確認するた

め、*E. coli* UM255-19からプラスミドを調製した後、electroporation法により再び親株の *E. coli* UM255に導入し、前述と同様の方法でカタラーゼ活性を持つコロニーをスクリーニングした。その結果、単離された5個のコロニー全てにおいてカタラーゼ活性が認められ、そのうち3つの形質転換株 (UM255-19-1~3) にはUM255-19に近い活性が見られた (Tables 2, 3)。これらの結果から、*B. japonicum* USDA110のカタラーゼ遺伝子のクローニングが確認された。

Table 2. Determination of catalase activity in *E. coli* UM255 transformants

Strains	Catalase specific activity (units/mg protein)
<i>E. coli</i> UM255 (parent)	N.D.
UM255-1	N.D.
UM255-2	N.D.
UM255-3	3.86
UM255-4	12.14
UM255-5	6.30
UM255-6	N.D.
UM255-7	N.D.
UM255-8	1.05
UM255-9	6.83
UM255-10	4.12
UM255-11	N.D.
UM255-12	4.83
UM255-13	3.98
UM255-14	4.03
UM255-15	7.60
UM255-16	6.68
UM255-17	10.97
UM255-18	5.79
UM255-19	22.74
UM255-20	5.39

N.D.: not detected

Table 3. Determination of catalase activity in *E. coli* UM255 transformants

Strains	Catalase specific activity (units/mg protein)
<i>E. coli</i> UM255 (parent)	N.D.
UM255-19-1	20.32
UM255-19-2	18.54
UM255-19-3	21.75
UM255-19-4	10.65
UM255-19-5	6.73

N.D.: not detected



図表には示していないが、*E. coli* UM255-19 からプラスミドを調製し、*Eco*R I 処理をした後アガロースゲル電気泳動により挿入された DNA 断片のサイズを調べた結果、おおよそ 3.5kb の単一のバンドが見られたことから、挿入された DNA のサイズは約 3.5kb で、その中にカタラーゼ遺伝子の ORF が含まれていると考えられた。更に、Charomid のマルチクローニング部位でデザインされたプライマー (*Eco*R I-R, *Xba*I-F) を用いて、挿入された DNA 断片のサイズを推測した実験結果でも、3~3.5kb の位置に増幅された DNA バンドが電気泳動により確認された。

大腸菌はカタラーゼをコードする遺伝子について最もよく調べられている菌の一つで、*katG* によりコードされた HP I と *katE* によりコードされた HP II の 2 つのアイソザイムの存在が知られている<sup>25,26)</sup>。前者の遺伝子は ORF が 2.2kb、後者では 2.3kb であることが報告されている。根粒菌では *Rhizobium meliloti* のカタラーゼ遺伝子がクローニングされており、その ORF はおおよそ 1.8kb であると報告されている<sup>27)</sup>。従って、*Bradyrhizobium* 属のカタラーゼ遺伝子のサイズもおおよそこれらの範疇に入ることが予想され、本実験でクローニングされた約 3.5kb の DNA 断片にはカタラーゼ遺伝子の ORF が含まれていると考えられた。

以前、Herouart らは、*R. meliloti* のカタラーゼ欠損変異株を作成し、窒素固定能およびアセチレン還元能を親株と比較したところ、いずれも親株と有意な差が見られなかったことを報告した<sup>27)</sup>。しかし、著者らの研究室で菌株に *R. fredii* (ダイズ根粒菌) を用いてトランスポゾン (Tn5) のランダムな挿入によって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性株を作成し、窒素固定能およびアセチレン還元能を親株と比較したところ、得られた変異株のうち、根粒当たりの重量が親株のおよそ 2 倍に増加し、アセチレン還元能にも増加が見られた変異株が得られた<sup>28)</sup>。根粒菌の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性は細胞内のカタラーゼ活性に強く依存している<sup>17)</sup>、根粒菌のカタラーゼ活性を高めることによって有効な根粒菌を育種できる可能性が示唆されている。本実験で用いた遺伝子のクローニング方法は、カタラーゼ活性を完全に欠失した変異株を宿主に用い、*in vitro* パッケージング法によって長鎖の DNA を確実に高い頻度でクローニングできるため、大変優れた方法であると

考えられる。今後、クローニングされたカタラーゼ遺伝子の発現解析や発現ベクターを利用した高カタラーゼ株の育種にも貢献できることが期待される。

## 参 考 文 献

- 1) 東四郎, 小林不二夫, 根粒菌の根粒形成遺伝子の構造と機能. 日本農芸化学会誌, **67**, 1065-1069(1993).
- 2) Bergersen, F. J., Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legume. Annu. Rev. Plant Physiol., **22**, 121-140 (1971).
- 3) Eady, R. R., Smith, B. E., Cook, K. A., and Postgate, J. R., Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: purification and properties of component proteins. Biochem. J., **128**, 655-675(1972).
- 4) Fredovich, I., The biology of oxygen radicals. Science, **201**, 875-880 (1978).
- 5) Elstner, E. F., Oxygen activation and oxygen toxicity. Annu. Rev. Plant Physiol., **33**, 73-96(1982).
- 6) Dalton, D. A., Russell, S. A., Hanus, F. J., Pascoe, G. A., and Evans, H. J., Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 3811-3815 (1986).
- 7) Fredovich, I., Superoxide dismutase. Annu. Rev. Biochem., **44**, 147-159 (1975).
- 8) Reynolds, P. H. S., Boland, M. J., Blevins, D. G., Randall, D. D., and Schubert, K. R., Ureide biogenesis in leguminous plants. Trends Biochem. Sci., **7**, 366-368 (1982).
- 9) Puppo, A., Rigaud, J., and Job, D., Role of superoxide anion in leghemoglobin autooxidation. Plant Sci. Lett., **22**, 353-360(1981).
- 10) Puppo, A., and Halliwell, B., Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghemoglobin. Planta **173**, 405-410 (1988).
- 11) Sangpen, C., Skorn, M., Paiboon, V., Mayur-ee, F., Usual Growth Phase and Oxidative Stress Protection Enzyme, Catalase and Super-

- oxide Dismutase, in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* bv. *oryzae*. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 393-396 (1995).
- 12) Greenberg, J. T., and Demple, B., Overproduction of peroxide-scavenging enzyme in *Escherichia coli* suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agent in *oxyR* mutants. EMBO J., **7**, 2611-2617 (1988).
- 13) Yahya, K., James, A. L., Importance of Anaerobic Superoxide Dismutase Synthesis in Facilitating Outgrowth of *Escherichia coli* upon Entry into an Aerobic Habitat. J. Bacteriol., **176**, 7653-7658 (1994).
- 14) Naclerio, G., Baccigalupi, L., Caruso, C., Felice, M. D., and Ricca, E., *Bacillus subtilis* Vegetative Catalase Is an Extracellular Enzyme. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 4471-4473 (1995).
- 15) Hassan, H. M., Fridovich, I., Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **253**, 6445-6450 (1978).
- 16) Mayfield, J. E., and Duvall, M. R., Anomalous Phylogenies Based on Bacterial Catalase Gene Sequences. J. Mol. Evol., **42**, 469-471 (1996).
- 17) 大和田琢二, 三浦賢紀, 南里栄, 白川雪香, 井川香子, 佐藤哲也, *Rhizobium fredii* USDA191 の過酸化水素感受性とカタラーゼ, ヘルオキシダーゼ活性について, 帯広畜産大学学術研究報告, 21巻1号, 17-25 (1998).
- 18) Michael, A. C., and Gerald, H. E., Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. Antimicrob. Ag. Chemother., **4**, 248-253 (1973).
- 19) Beringer, J. E., R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., **84**, 188-198 (1974).
- 20) Clara, R. W., and Knowles, R., Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol., **30**, 1222-1228 (1984).
- 21) Anonymous., Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J. pp. 43-45 (1972).
- 22) Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., and Ausubel, F. E., Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol., **149**, 114-122 (1982).
- 23) Loewen, P. C., Triggs, B. L., Genetic Mapping of *katF*, a Locus That with *katE* Affect the Synthesis of a Second Catalase Species in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **160**, 668-675 (1984).
- 24) Maniatis, T., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989).
- 25) Triggs-Raine, B. L., Doble, B. W., Mulvey, M. R., Sorby, P. A., and Loewen, P. C., Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **170**, 4415-4419 (1988).
- 26) Ossowski, I., Mulvey, M. R., Leco, P. A., Borys, A., and Loewen, P. C., Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HPII. J. Bacteriol., **173**, 514-520 (1991).
- 27) Herouart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frenedo, P., Touati, D., and Puppo, A., Cloning and Characterization of *katA* Gene of *Rhizobium meliloti* Encoding a Hydrogen peroxide-Inducible Catalase. J. Bacteriol., **178**, 6802-6809 (1996).
- 28) 大和田琢二, 三浦賢紀, 南里栄, 白川雪香, 井川香子, 佐藤哲也, *Rhizobium fredii* USDA191 の過酸化水素耐性変異株の根粒形成及び窒素固定機能について, 帯広畜産大学学術研究報告, 21巻1号, 27-35 (1998).



### Summary

In this study, cloning of the catalase gene derived from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 was tried to estimate the role of catalase on nodule formation and nitrogen fixation. After the fractionation of *Eco*R I-digested DNAs from *B. japonicum* USDA110, they were packaged into Charomid 9-36 and then transferred to *E. coli* UM 255 which lack the catalase activity. At a rate of 1 in 400 colonies, the transformants having catalase activity were found and some of them showed the catalase activity close to that of *B. japonicum* USDA 110, indicating that a part of catalase gene of *B. japonicum* USDA110 was successfully cloned.

**Key words :** *Bradyrhizobium*, catalase, cloning, *in vitro* packaging