

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05772

研究課題名（和文）Frankia属放線菌の酸素耐性窒素固定器官の分化機構の解明

研究課題名（英文）Differentiation of oxygen-tolerant nitrogen-fixing organ in the actinobacterium Frankia

研究代表者

九町 健一（KUCHO, Ken-ichi）

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号：70404473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、窒素固定能を持つ放線菌Frankia属に焦点を当て、特有の窒素固定器官ベシクルの分化過程とその遺伝的基盤を解明することを目的として研究を行った。Frankiaは酸素濃度が高い環境でも窒素固定を行えるユニークな機能を持ち、ベシクルの形成はこの能力に不可欠である。本研究では、窒素固定能の喪失した変異体を用いてベシクルの表現型を詳細に解析した。加えてベシクル形成に関わる遺伝子を同定し、形質転換実験によりその機能の検証を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、窒素を固定する能力を持つ微生物Frankiaの特有な器官ベシクルの形成過程を詳しく調べ、それに関わる遺伝子についての知見を得た。これにより、植物が必要とする窒素養分を化学肥料に頼らず自然の方法で供給できる可能性が高まり、持続可能な農業や環境保全に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we focused on the actinobacteria genus Frankia, which possesses nitrogen-fixing ability, to elucidate the differentiation process and genetic basis of the vesicle. Frankia has a unique function that allows it to fix nitrogen even in high oxygen environments, and the formation of vesicles is essential for this ability. In this study, we analyzed phenotypes of vesicles in the mutants that lacked the ability to fix nitrogen. Additionally, we identified genes involved in vesicle formation and attempted to verify their function through complementation experiments.

研究分野：分子生物学

キーワード：窒素固定 放線菌 酸素 順遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素固定は大気中の窒素ガス(N_2)をアンモニア(NH_3)に還元する反応であり、生態系への窒素養分の供給に不可欠な生体反応である。これまで発見された窒素固定生物種はバクテリアに限られ、それらは多様な系統分類群に分布する。窒素固定細菌は土壌や海洋・湖水・動植物の体内など、さまざまなニッチに生息している。

Frankia 属は窒素固定能を持つ唯一の放線菌である。土壌に生息するが、ハンノキなどの非マメ科樹木の根に根粒を形成してその内部に共生することもできる。窒素固定反応を触媒する酵素であるニトロゲナーゼは酸素(O_2)で容易に失活するため、ほとんどの窒素固定細菌は嫌気条件でしか窒素固定を行えない。しかし *Frankia* は、酸素耐性を持つ球状の窒素固定器官(ベシクル)を

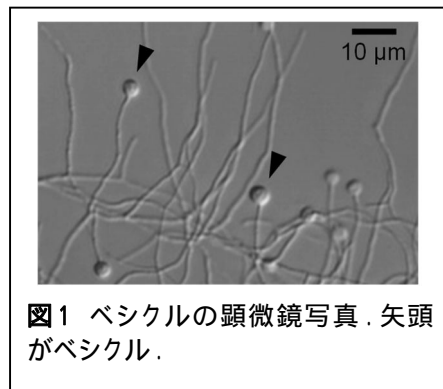


図1 ベシクルの顕微鏡写真。矢頭がベシクル。

菌糸先端に分化することにより(図1)、高酸素濃度下(20% [大気レベル] ~80%)でも高い窒素固定能を示す。ベシクルはホパノイド脂質からなる膜が数十層重なった外壁を持つ多細胞構造体であり、この厚い外壁がベシクル内部への酸素の透過を制限する。ニトロゲナーゼはベシクル内で特異的に発現するので、酸素失活を免れる。*Frankia* を好気かつアンモニア欠乏条件に移すと、一部の菌糸の伸長が停止し、先端が徐々に球状にふくらみ、外壁が発達し、内部でニトロゲナーゼの発現が起こる。このベシクル分化の一連のプロセスは、数日のうちに完了する。

2. 研究の目的

ベシクルを形成する窒素固定細菌は *Frankia* のみであり、我々はこの特徴的な器官分化にはどのような遺伝子が関わっているのか? その進化的起源は何か? という点に興味を持っている。ベシクル分化に関わる遺伝子を同定するため、ニトロソグアニジンとガンマ線を変異原として用いて *Frankia casuarinae* において好気条件で窒素固定を行えない変異体を多数単離した(Kucho et al. 2017)。これらの中には、ベシクルをほとんど形成できない変異体(LVM: Low Vesicle Mutant)と、ベシクルの大きさや数が野生株それほど変わらない変異体(SVM: Standard Vesicle Mutant)が含まれた。本課題ではこれらのベシクル変異体の表現型を詳細に解析することと、変異原因遺伝子を同定してベシクル分化における役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ベシクルの表現型解析

ベシクルの直径は、位相差顕微鏡観察像を ImageJ ソフトウェアにより解析することにより求めた。ベシクル外壁の厚さについては、暗視野顕微鏡像を目視により三段階で評価した。ベシクル内酸素濃度は、ベシクルを低酸素応答性蛍光色素 MAR(五稜化学)による染色により評価した。蛍光顕微鏡像を取得し、ImageJ によりベシクルの蛍光強度を定量化した。

(2) 回復株を用いた変異原因遺伝子の同定

窒素固定変異体を窒素源を含まない(N-)液体培地で数か月間培養した。生育した細胞をN-固体培地に塗布し、シングルコロニーを単離した。コロニーをスケールアップ培養し、窒素固定活性やベシクル直径、外壁厚などを評価し、確かに窒素固定能が回復していることを確認した。

回復株と変異株のゲノム解析を行い、それぞれに含まれる変異を同定した。両者を比較することにより、回復株において復帰変異やサプレッサー変異が起こった遺伝子を探索した。変異箇所はサンガー法による確認を行った。

(3) フランキアの形質転換

広宿主プラスミド pIGSAF(Gifford et al. 2019)に、同義コドンの使用頻度をフランキアに最適化したゲンタマイシン耐性遺伝子(*fgm^r*)にフランキアの翻訳開始因子3遺伝子のプロモーターを連結した人工合成遺伝子(Kucho et al. 2013)をクローニングすることにより、pFT14を構築した。pFT14をエレクトロポレーション法により *Frankia casuarinae* Cc13株に導入し、75 μ g/mlのゲンタマイシンを含む液体培地で選択培養を行った。生育した細胞からDNAを精製し、サザンブロット法によりプラスミドの存在を確認した。

(4) フランキアの転移遺伝子の同定

Frankia Cc13株を親株として、5-フルオロオロト酸を用いたポジティブスクリーニング法(Kakoi et al. 2014)により、*pyrE*または*pyrF*遺伝子に変異が起こりウラシル要求性を示す変異体を選択的に単離した。ウラシル要求性変異体の*pyrEF*遺伝子をPCRで増幅し塩基配列を決定することにより、含まれる変異を同定した。

4. 研究成果

(1) 窒素固定変異体のベシクルの表現型解析

ベシクルをほとんど形成できない変異体 (LVM) と、ベシクルの大きさや数が野生株それほど変わらない変異体 (SVM) について、ベシクルの表現型を詳細に解析した。5 株の LVM (G21E10, G23C4, G23D3, N7C9, N10E6) についてベシクル直径を計測した結果、G23C4 株以外の 4 株は野生株と比較して有意に小さかった (Asukai and Kucho 2020)。全ての変異株は、ベシクル外壁が野生株より薄かったことから (図 2) これらの変異体はベシクルの拡大や外壁の発達に関わる遺伝子に変異を持つことが予想された。

5 種の SVM (G17D5, G26C1, N3H4, N4H4, N9D9) についてベシクル外壁の厚さを調べた結果、全ての変異体は野生株と比較して外壁が薄かった。加えて、N3H4 株以外の 4 株はベシクル内の酸素濃度が有意に上昇していた (図 3)。従ってこれら 4 株では、外壁が薄いためにベシクル内部に酸素が流入し、窒素固定酵素が失活すると考えられた。

(2) 回復株を用いた変異原因遺伝子の同定

6 株の変異体 (G21E10, G23C4, G23G1, N3H4, N4H4, N9D9) において、ゲノム中に二次的な変異が起こることにより窒素固定表現型が正常に戻った回復株が複数単離された。回復株のゲノム解析により含まれる変異を同定し、それらを変異株の持つ変異と比較することにより、変異原因遺伝子の候補を探索した。具体的には、変異株では変異を含むが回復株ではその変異が野生型に戻っている遺伝子 (復帰変異候補遺伝子) と、変異株では変異を含み回復株では同遺伝子内に新たな変異が起きた遺伝子 (サプレッサー変異候補遺伝子) を探索した。

N3H4 株については NAD⁺ 合成酵素遺伝子 (Francisci_3146) に変異 (T584I) を持ち、回復株ではサプレッサー変異 (D584N) が起きていた (Kucho et al. 2023)。これら 2 カ所のアミノ酸は、立体構造上で相互作用していた (図 4)。N-条件下で NAD(H) 活性や細胞内 NAD(H) 濃度を測定した結果、いずれも変異株は野生株より著しく低く、回復株では回復が見られたため、この遺伝子が N3H4 変異株の変異原因遺伝子だと結論した。これはフランキアにおいて順遺伝学的に遺伝子を同定した初めての例である。

ニトロソグアニジンによる変異体 (N4H4, N9D9) においては復帰変異候補箇所が複数見つかり、サンガー法による確認を進めている。ガンマ線による変異体 (G21E10, G23C4) においては原因変異箇所が見つからなかったが、内在性転移因子による挿入変異の可能性が示唆された (後述)。

(3) フランキアの形質転換

変異原因遺伝子の予測が正しいことを確かめるためには、形質転換による相補実験が必要である。すなわち野生型の変異原因遺伝子を変異株に導入し、表現型が正常に戻ることを確認する。フランキアの形質転換は長年行えなかったが、2019 年に米国の 2 つの研究室から成功例の報告があった。両者とも広宿主域プラスミドを用いたが、それぞれ大腸菌との接合またはエレクトロポレーションにより DNA 導入を行った。我々の研究室でも追試を行ったが、結果を再現することはできなかった。そこで独自に構築したコドン最適化ゲンタマイシン耐性遺伝子を広宿主域プラスミドに組込み、それをエレクトロポレーションにより *Frankia* 細胞に導入し、液体培地を用いて選択培養を行った。その結果、細胞は継代培養後も抗

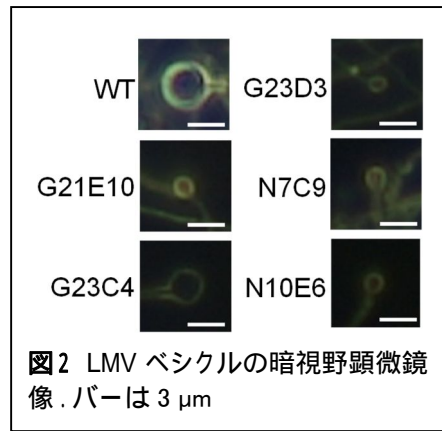


図 2 LMV ベシクルの暗視野顕微鏡像。バーは 3 μm

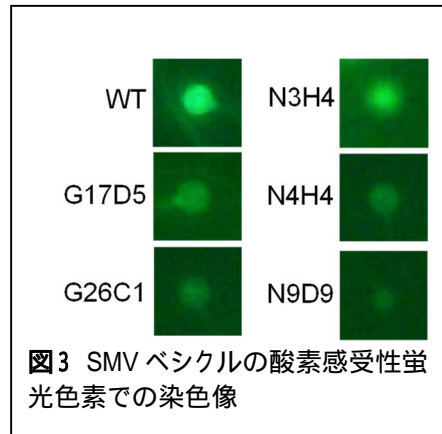


図 3 SMV ベシクルの酸素感受性蛍光色素での染色像

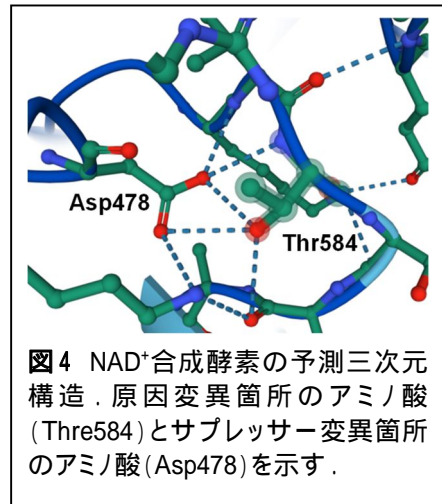


図 4 NAD⁺ 合成酵素の予測三次元構造。原因変異箇所のアミノ酸 (Thre584) とサプレッサー変異箇所のアミノ酸 (Asp478) を示す。

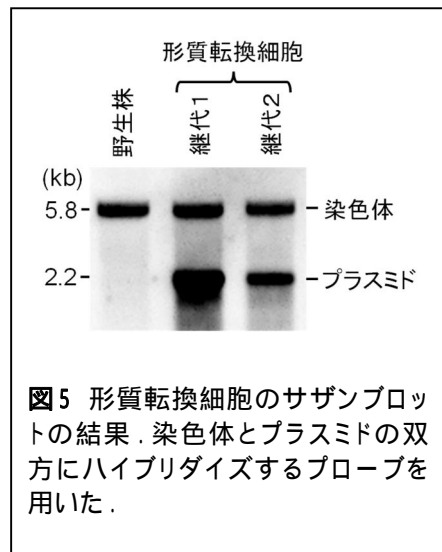


図 5 形質転換細胞のサザンブロットの結果。染色体とプラスミドの双方にハイブリダイズするプローブを用いた。

生物質耐性を示し、プラスミド DNA を保持していた (図 5)

(4) フランキアの転移遺伝因子の同定

ガンマ線による窒素固定変異体では、復帰変異やサプレッサー変異が見つからなかったことから、insertion sequence (IS) などの転移遺伝因子による挿入変異が起きている可能性が考えられた。そこで、*Frankia* Ccl3 株を親株として、5-フルオロオロト酸を用いたポジティブスクリーニング法 (Kakoi et al. 2014) により、ウラシル要求性を示す変異体を選択的に単離した。32 のウラシル要求性変異体について *pyrEF* 遺伝子を PCR で増幅したところ、7 株において挿入変異が起きていた。塩基配列解析の結果、それらの挿入 DNA は IS4・IS66・IS110 であった。これはフランキアにおいてゲノム中の内在性 IS の転移を検出した初めての例である。

<引用文献>

1. Asukai K and Kucho K (2020) Characterization of vesicle differentiation mutants of *Frankia casuarinae*. *Microbes Environ*, 35:ME19150
2. Gifford I, Vance S, Nguyen G, Berry AM (2019) A stable genetic transformation system and implications of the type IV restriction system in the nitrogen-fixing plant endosymbiont *Frankia alni* ACN14a. *Front Microbiol*, 10:2230
3. Kakoi K, Yamaura M, Kamiharai T, Tamari D, Abe M, Uchiumi T, Kucho K (2014) Isolation of mutants of the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *Microbes Environ*, 29: 31-37
4. Kucho K, Asukai K, Nguyen TV (2023) NAD⁺ synthetase is required for free-living and symbiotic nitrogen fixation in the actinobacterium *Frankia casuarinae*. *Microbes Environ*, 38: ME22093
5. Kucho K, Kakoi K, Yamaura M, Iwashita M, Abe M, Uchiumi T (2013) Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *J Biosci*, 38: 713-717
6. Kucho K, Tamari D, Matsuyama S, Nabekura T and Tisa LS (2017) Nitrogen fixation mutants of the actinobacterium *Frankia casuarinae* Ccl3. *Microbes Environ*, 32: 344-351

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kucho Ken-Ichi, Tobita Hiroyuki, Utsumi Shunsuke, Uchiuni Toshiki, Yamanaka Takashi	4. 巻 27
2. 論文標題 Biology of actinorhizal symbiosis from genomics to ecology: the 20th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Forest Research	6. 最初と最後の頁 96-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13416979.2022.2036417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kucho Ken-Ichi, Hashimoto Masahito, Normand Philippe, Fournier Pascale, Pujic Petar	4. 巻 28
2. 論文標題 Structure of surface polysaccharides affects symbiotic nitrogen fixation in Frankia alni ACN14a	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Forest Research	6. 最初と最後の頁 152-158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13416979.2022.2136561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kucho Ken-ichi, Asukai Koya, Nguyen Thanh Van	4. 巻 38
2. 論文標題 NAD+ synthetase is required for free-living and symbiotic nitrogen fixation in the actinobacterium Frankia casuarinae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME22093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME22093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 九町健一	4. 巻 76
2. 論文標題 窒素固定放線菌の分子遺伝学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 土と微生物	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akukai K. and Kucho K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Characterization of vesicle differentiation mutants of Frankia casuarinae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes Environ.	6. 最初と最後の頁 ME19150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 九町健一
2. 発表標題 共生窒素固定放線菌Frankiaの分子遺伝学
3. 学会等名 日本土壤微生物学会2022年度大会 大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken-ichi Kucho
2. 発表標題 Genetic transformation of Frankia CcI3: in our laboratory's case
3. 学会等名 The 20th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken-ichi Kucho
2. 発表標題 Frankia mutants defective in nitrogen fixation and vesicle development
3. 学会等名 REGIONAL RESEARCH CONFERENCE on Bio-fertilizers and Bio-control Agents(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 九町健一
2. 発表標題 ベシクル分化に異常を示す窒素固定放線菌 <i>Frankia casuarinae</i> の変異体
3. 学会等名 植物微生物研究会第29回研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飛鳥井滉也
2. 発表標題 ベシクル分化に異常を示す窒素固定放線菌 <i>Frankia casuarinae</i> Ccl3
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 九町健一
2. 発表標題 共生・非共生状態での窒素固定能に異常を示す放線菌 <i>Frankia</i> の変異体
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koya Asukai
2. 発表標題 Vesicle differentiation mutant of the nitrogen-fixing actinobacterium <i>Frankia casuarinae</i> Ccl3
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Kucho
2. 発表標題 Mutant of Frankia casuariane defective in free-living and symbiotic nitrogen fixation
3. 学会等名 5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The 20th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants	開催年 2021年～2021年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of New Hampshire		