

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450098

研究課題名(和文) 放線菌における窒素固定の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of nitrogen fixation in actinobacteria

研究代表者

九町 健一 (KUCHO, Ken-ichi)

鹿児島大学・理工学域理学系・准教授

研究者番号：70404473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：フランキア(Frankia属)は窒素固定能を持つ放線菌であり、窒素固定に特化した球状構造体(ベシクル)を発達させる、窒素固定(nif)遺伝子の発現調節系が他の窒素固定細菌と異なる等の特有の性質を持つ。

私たちは窒素固定の行えないフランキアの変異株を49単離した。それらはベシクルの数やサイズ、膜厚に異常を示した。また、ほとんどの変異株でnif遺伝子の発現が大幅に低下していた。よってこれらの変異株は、ベシクルの分化やnif遺伝子の転写制御に関わる遺伝子の変異していると考えられた。変異株と復帰変異株のゲノム解析を行うことにより、1つの変異株については変異原因遺伝子を特定することができた。

研究成果の概要(英文)：Frankia spp. are nitrogen-fixing actinobacteria and have several unique properties. Frankia develops vesicles, which are spherical multicellular structure devoted to nitrogen fixation. Frankia genomes do not contain regulatory genes for nitrogen-fixation (nif) genes that are typically found in other nitrogen-fixing bacteria.

We isolated 49 Frankia mutants that cannot fix nitrogen. These mutants included those showed aberrant vesicle phenotypes (less number, smaller size, thinner envelope) and reduced nif gene expression. They are considered to carry mutations in genes involved in vesicle differentiation and nif gene regulation. We analyzed genomes of mutants and revertants, and specified a gene that is responsible for the mutant phenotype.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：順遺伝学 突然変異株 ゲノム解析 窒素固定 放線菌 酸素防御 転写制御

1. 研究開始当初の背景

窒素 (N) は、DNA やタンパク質に代表される数多くの生体分子に含まれる生命に必須の元素である。生体内の窒素原子は、もとをたどれば大気中の窒素ガス分子に由来する。窒素ガスは窒素固定生物によりアンモニアに変換され、アンモニアは植物や菌類・細菌類により有機態の窒素化合物に変換される。これらは食物連鎖を経て最終的にその頂点に位置する高等動物に利用される。これまで知られている窒素固定生物はすべて細菌であり、様々な分類群 (プロテオバクテリア、シアノバクテリア、放線菌、光合成細菌、古細菌など) に散在する。窒素固定酵素およびその成熟に関わる遺伝子 (*nif* 遺伝子) は、すべての窒素固定細菌で保存されており、アンモニアが欠乏したときのみ発現が誘導される。また、窒素固定酵素は酸素により容易に失活するという特性を持つ。これらの共通点とは対照的に、*nif* 遺伝子の発現調節機構や酸素に対する防御機構は生物種間での多様性が高く、未解明な部分が多い。

フランキア (*Frankia* 属) は、窒素固定能を持つ放線菌であり、他の窒素固定細菌にはない珍しい特徴を持つ。フランキアは菌糸として生育するが、アンモニアが欠乏すると菌糸の先端にベシクルと呼ばれる独特な窒素固定専用の球状構造体を分化させる (図 1A)。ベシクルは酸素透過性の低いホパノイド脂質の多重膜で覆われており (図 1B)、内部の酸素濃度が低く保たれ、窒素固定酵素は失活を免れる。ベシクル形成のメカニズムやそれに関わる遺伝子はまったくわかっていない。

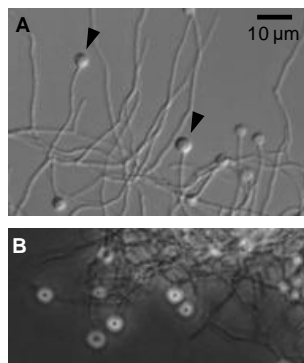


図1 ベシクルの顕微鏡写真. (A) 微分干渉顕微鏡による観察. 矢印がベシクル. (B) 位相差顕微鏡による観察. ベシクル膜がリング状の光として観察される.

nif 遺伝子のアンモニアに応答した転写調節機構は、主にプロテオバクテリアで詳しく研究されており、*nifA* と *rpoN* という2つの遺伝子が重要な役割を担う。興味深いことに、フランキアのゲノム中にはこれらの遺伝子は存在せず、独自の発現制御系を進化させたと考えられた。

フランキアは植物の根に根粒を形成して

共生窒素固定を行うこともできる。植物と共生窒素固定を行う細菌としては根粒菌が有名だが、フランキアの宿主植物は根粒菌のマメ科植物とは異なり、カバノキ科をはじめとする5科にわたる樹木である。これらの樹木は貧栄養の土地でも旺盛に生育することから、緑化や治山にしばしば用いられる。

私のグループは、フランキアの窒素固定や共生の分子機構を解明することを目指して研究を行ってきた。これまでに、マイクロアレイ解析によりアンモニア欠乏状態や根粒中で特異的に発現量が上昇する遺伝子を網羅的に同定した (Alloisio et al. 2010)。これらの遺伝子の中には、転写因子や RNA ポリメラーゼのシグマ因子が含まれ、窒素固定能の制御に関与する可能性が示唆された。また、分子遺伝学的に目的の遺伝子を同定できる体制を整えるため、形質転換法や (Kucho et al. 2009; Kucho et al. 2013)、変異株スクリーニング法の確立 (Kakoi et al. 2014) にも取り組んできた。

2. 研究の目的

本課題では、フランキアにおいて窒素固定に関わる遺伝子を、分子遺伝学的に同定することを目的として研究を進めた。すなわち、窒素固定が行えない変異株をスクリーニングし、その異常表現型の原因となっている変異 (= 遺伝子) を同定するという戦略である。

3. 研究の方法

変異株のスクリーニング

Kucho et al. (2017) に記載した方法で行った。まず、*Frankia casuarinae* CcI3 株の菌糸をニトロソグアニジンまたはガンマ線により変異処理した。菌糸をアンモニアを含む (N+) 液体培地に植菌し、数週間培養した。超音波ホモジナイザーを用いて菌糸を断片化した。これを 5 μm 孔のフィルター (Ultrafree centrifugal filter unit, Millipore) でろ過し、単一遺伝子型の細胞からなる短い菌糸断片を精製した。これを N+ 固体培地に植菌し、コロニーが形成されるまで1ヶ月程度培養した。

出現したコロニーを、ガラスビーズとアンモニアを含まない (N-) 液体培地に入った8連 PCR チューブに入れ、激しくボルテックスした。コロニー懸濁液を N+ 培地および N- 培地に植菌し、1ヶ月以上培養した。N- 培地で増殖しなかったコロニーを窒素固定変異株候補とし、それらに対応した N+ 培地上のコロニーを釣菌した。

変異株の表現型の解析

N- 液体培地での増殖速度と窒素固定活性 (アセチレン還元活性) を測定することにより、候補株が確かに窒素固定能を欠損していることを確認した。窒素固定変異株のベシクルの大きさと膜厚は、微分干渉顕微鏡および位相差顕微鏡により観察した。また、ベシクルの数も計測した。さらに、TaqMan リアル

タイム RT-PCR により、3 種類の *nif* 遺伝子 (*nifE*、*nifH*、*nifV*) の N-条件での発現を調べた。

変異株のゲノム解析

9 株 (N10E6、N3H4、N4H4、N6F4、N7C9、N9D9、G21E10、G23C4、G23D3) についてはゲノム解析を行い、ゲノム中の変異塩基をリストアップした。6 株についてはニューハンプシャー大学の Louis Tisa 博士に、3 株については BGI Japan 株式会社解析を依頼した。

変異原因遺伝子の同定

変異原因遺伝子を同定するために、変異株細胞をアンモニアを含まない固体培地または液体培地で培養し、復帰変異株または復帰変異細胞集団を選択培養した。これらのゲノムを解析し、親変異株が持つ変異のうち復帰変異株 (細胞集団) が持たないものを探索した。このような変異は、変異表現型の原因であると期待される。

4. 研究成果

変異株のスクリーニング

ニトロソグアニジンで変異処理を行ったコロニーを 3534 個、ガンマ線で変異処理を行ったコロニーを 3248 個スクリーニングした結果、それぞれ 30 および 19 の窒素固定変異株候補が得られた。うち 18 株については、N-液体培地での増殖速度と窒素固定活性を調べた。17 株は N-培地でほとんど増殖せず、窒素固定活性も全く示さなかったことから、確かに窒素固定能を失った変異株であることが確認できた。

変異株の表現型の解析

一部の変異株は野生株と比べてベシクル数が大幅に減少していた (図 2)。また、ベシクルの大きさが小さい変異株や (図 3)、ベシクル膜が薄い変異株 (図 4) が見つかった。フランキアにおいて窒素固定変異株が単離されたのは世界で初めてであり、ベシクル形成の変異株もこれまで例を見ない。これらの変異株は、ベシクル原基の発生や、原基の成熟ベシクルへの発達に関わる遺伝子に変異を持つと予想される。特に 3 種の変異株 (N7C9、N10E6、G23D3) は、数・大きさ・膜厚いずれにおいても重篤な異常を示し、ベシクルの分化過程のかなり初期の段階に関わる遺伝子に変異を持つと考えられた。

17 種の変異株において、3 つの *nif* 遺伝子 (*nifE*、*nifH*、*nifV*) の N-条件での発現を調べた結果、多くの変異株において発現量が野生株より大幅に低下していた (図 5)。3 つの遺伝子は別々のオペロンに属しているが、これらの発現は常に同じように減少していた。よってこれら 3 遺伝子の発現は、同じ制御因子により調節されていることが予想された。

変異株のゲノム解析

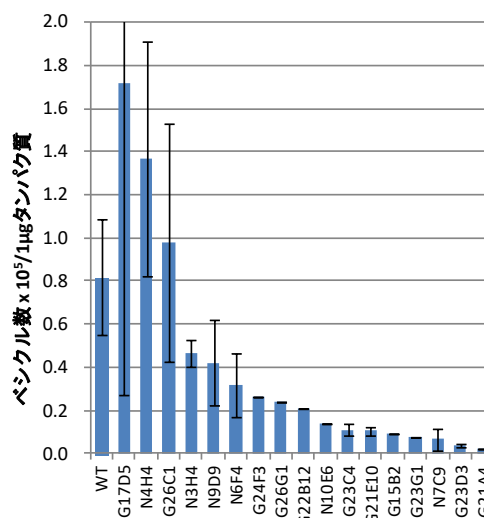


図2 ベシクルの数. WTは野生株を示す.

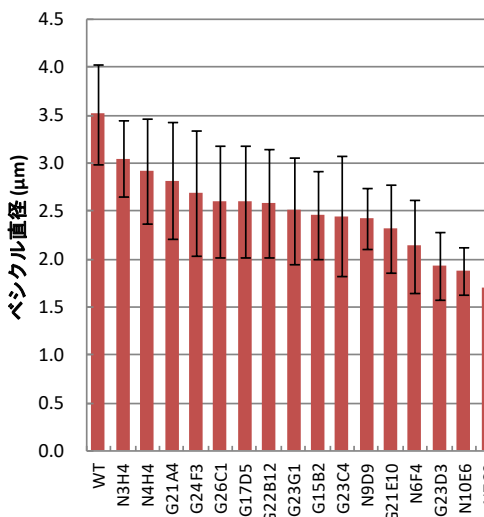


図3 ベシクルの直径. WTは野生株を示す.

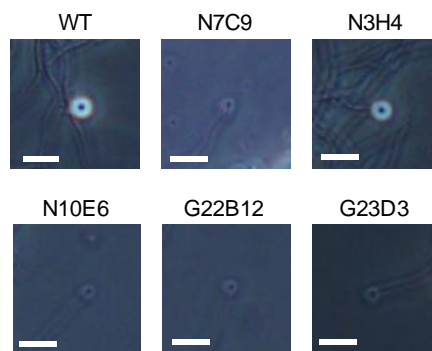


図4 ベシクルの位相差顕微鏡像. N7C9、N10E6、G22B12、G23D3はベシクル膜の薄い変異株. 白バーは10 μm. WTは野生株を示す.

変異株のゲノムは約 30 から 400 の変異を含み、その数はニトロソグアニジン変異体のほうがガンマ線変異体よりも多い傾向がみられた。既知の窒素固定関連遺伝子に変異が

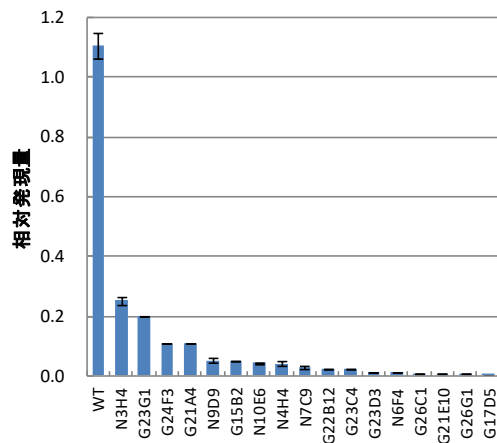


図5 N-条件における*nifH* 遺伝子の発現. WT は野生株を示す.

見られた株は1つのみ(N7C9株、*nifD*と*nifH*遺伝子)だったことから、今回単離された変異株はこれまで知られていない新規な遺伝子に変異を持つと期待された。

変異原因遺伝子の同定

フランキアの形質転換法は確立されていないため、コンプリメンテーション法により変異原因遺伝子を同定することはできない。そこで私は、復帰変異体を利用して変異原因遺伝子を同定しようと試みた。変異株の細胞集団中には、DNAの複製エラーにより原因変異が野生型の塩基に偶然変化し、窒素固定能が回復した復帰変異細胞がごくわずかながら含まれる。復帰変異株は、変異株の細胞集団をN-培地で培養することで、選択的に単離培養できる。復帰変異株のゲノム配列を解析し、変異株では変異型だが復帰変異株では野生型の箇所を同定する。その塩基を含む遺伝子は異常表現型の原因である遺伝子(変異原因遺伝子)だと考えられる。

6種の変異株については復帰変異株(細胞集団)を単離することに成功した。これらのゲノム解析を行った結果、1株(N3H4株)については変異原因遺伝子を特定することができた。他の株についてはゲノム解析のデータ量(カバレッジ数)が足りず、原因変異を特定できていないため、今後さらなる解析を行う予定である。

N3H4変異株は、野生株と比べて*nif*遺伝子の発現量がやや少ないが、ベシクル形成は正常である。興味深いことに、この変異株は宿主植物モクマオウ(*Caruarina glauca*)に根粒を着生することができなかった。非共生条件での窒素固定能が回復した7株の復帰変異株と1系統の復帰変異細胞集団を得た。これらはモクマオウとの共生窒素固定能も回復していたことから、窒素固定と共生の両方に関わる遺伝子に変異していると予想された。

5種の復帰変異株のゲノムを解析した結果、変異株で変異している塩基(116個)のうち、

すべての復帰変異株で野生型に戻っているという最も有望な塩基は存在しなかった。しかし奇妙なことに、全ての復帰変異株においてNAD⁺合成酵素遺伝子(Francci3_3146遺伝子)の478番目のAsp(Asp478)がAsnに置換されていた(Asp478Asn)。N3H4変異株ではこのFrancci3_3146遺伝子において、Thr584がIleに変異していた(Thr584Ile)。タンパク質の立体構造を予測したところ、478番目と584番目のアミノ酸は極めて近接しており、相互作用していると思われた。

以上の結果から、変異株ではThr584のIleへの置換によりAsp478との相互作用が損なわれ(立体構造が変化し)NAD⁺合成酵素活性が失われるが、復帰株ではAsp478がAsnに置換されることでIle584と相互作用できるようになり酵素活性が回復したと予想した。すなわち復帰変異株だと思っていたものは、サプレッサー株だと考えられた。NAD⁺およびその還元型であるNADHは、様々な生化学反応の電子受容体・供与体としての働きや呼吸鎖への電子供与体としての働きを持ち、生育に必須の化合物である。N3H4変異株はN-条件でこの化合物を合成できないため、窒素固定や共生に異常を示したと考えている。

<引用文献>

- Alloisio et al. The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact.* 2010 23:593-607
- Kakoi et al. Isolation of mutants of the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *Microbes Environ.* 2014 29:31-37
- Kucho et al. Transient transformation of *Frankia* by fusion marker genes in liquid culture. *Microbes Environ.* 2009 24:231-240
- Kucho et al. Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *J Biosci.* 2013 38:713-717
- Kucho et al. Nitrogen fixation mutants of the actinobacterium *Frankia casuarinae* CcI3. *Microbes Environ.* 2017 32:344-351

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Kucho K., Tamari D., Matsuyama S., Nabekura T., Tisa L.S., Nitrogen fixation mutants of the actinobacterium *Frankia casuarinae* CcI3, *Microbes Environ.*, 査読あり, vol.32, 2017, pp.344-351, 10.1264/jsme2.ME17099
- ② 九町健一, 窒素固定を行う放線菌, 土と微生物, 査読あり, vol.70, 2016, pp.17-22
- ③ Kucho K., Kamiharai T., Comprehensive identification of 5-methylcytosines in

Frankia genomes, Symbiosis, 査読あり,
vol.70, 2016, pp.31-36

- ④ Kucho K., Yamanaka T., Sasakawa H.,
Mansour S.R., Uchiumi T., Different
dynamics of genome content shuffling
among host-specificity groups of the
symbiotic actinobacterium *Frankia*, BMC
Genomics, 査読あり, vol.15, 2014, p.609
- ⑤ Kakoi K., Yamaura M., Kamiharai T.,
Tamari D., Abe M., Uchiumi T., Kucho K.,
Isolation of mutants of the nitrogen-fixing
actinomycete *Frankia*, Microbes Environ.,
査読あり, vol.29, No.1, 2014, pp.31-37

[学会発表] (計 8 件)

- ① 第 27 回植物微生物研究会, 国内会議,
2017 年 09 月, 放線菌フランキアの窒素
固定オペロンの転写調節機構
- ② 環境微生物系学会合同大会 2017, 国内会
議, 2017 年 08 月, 仙台市, 放線菌 *Frankia*
casuarinae の窒素固定変異株
- ③ 日本微生物生態学会第 31 回大会, 国内
会議, 2016 年 10 月, 横須賀市, 放線菌
フランキアの窒素固定変異株のスクリ
ーニングと特徴づけ
- ④ 日本微生物生態学会第 31 回大会, 国内
会議, 2016 年 10 月, 横須賀市, 山崩れ
によりかく乱された御嶽山における根
粒と根圏土壤中のフランキアの群集構
造
- ⑤ 日本微生物生態学会第 31 回大会, 国内
会議, 2016 年 10 月, 横須賀市, 放線菌
Frankia の細胞表層多糖の変化が窒素固
定と共生に及ぼす影響
- ⑥ 18th International meeting on *Frankia* and
actinorhizal plants, 国際会議, 2015 年 08
月, フランス, Influences of alteration of
surface polysaccharide in *Frankia* on
symbiotic nitrogen fixation
- ⑦ 18th International meeting on *Frankia* and
actinorhizal plants, 国際会議, 2015 年 08
月, フランス, Isolation and characterization
of nitrogen fixation mutants of *Frankia*
- ⑧ 18th International meeting on *Frankia* and
actinorhizal plants, 国際会議, 2015 年 08
月, フランス, Isolation and characterization
of *Frankia* mutants

[図書] (計 1 件)

- ① Alloisio N., Kucho K., Pujic P., and
Normand P., Wiley, Biological Nitrogen
Fixation, The *Frankia alni* Symbiotic
Transcriptome, 2015, pp.757-768

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kkucho/home>

6. 研究組織

(1)研究代表者

九町 健一 (KUCHO, Ken-ichi)

鹿児島大学・理工学域理学系・准教授

研究者番号 : 70404473

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし