

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770053

研究課題名（和文）：窒素固定放線菌フランキアの共生関連遺伝子の研究

研究課題名（英文）：Symbiosis-related genes of the nitrogen-fixing bacterium *Frankia*

研究代表者：九町 健一 (KUCHO KEN-ICHI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：70404473

研究成果の概要（和文）：フランキアは樹木の根に共生して根粒を形成させ、そこで窒素固定を行う能力をもつバクテリアだ。この共生窒素固定能により、フランキアは樹木の生育を促進する。本研究では、フランキアの共生に必要な遺伝子を同定することを目的として、フランキアの遺伝子操作法の確立に取り組んだ。また、根粒中でさかんにはたらいっている（発現量の高い）遺伝子を網羅的に同定した。

研究成果の概要（英文）：*Frankia* is a nitrogen-fixing bacterium having an ability to make symbiosis with trees. Symbiosis occurs in nodules formed on roots in which *Frankia* fixes nitrogen and supplies the products to the host plant to promote its growth. In order to identify *Frankia* genes involved in the symbiosis, I attempted to establish transformation system of *Frankia* and globally identified *Frankia* genes induced in nodule.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：【生物学】

科研費の分科・細目：【基礎生物学・植物分子生物・生理学】

キーワード：共生・窒素固定・形質転換・マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

窒素は全ての生物に必須な元素だ。大気の約8割は窒素ガス（ $N_2$ ）だ。しかし、窒素ガスは非常に安定な分子であり、ほとんどの生物はこれを利用できない。一部の植物は根の根粒と呼ばれる器官に窒素固定細菌を共生させることにより大気中の窒素分子をアンモニアに還元（固定）し、自らの養分として利用できる。この性質からこれらの植物は窒素栄養の乏しいやせた土地でも旺盛に生長するため、古くから緑化や治山に用いられて

きた。共生窒素固定を行うバクテリアは主に2つのグループに分けられる。マメ科植物と共生する根粒菌と、アクチノリザル植物と共生する放線菌の一種フランキアだ。根粒菌-マメ科植物共生についての研究は古くから盛んであり、多くの知見が得られている。対照的にフランキア-アクチノリザル植物共生の研究は大きく立ち遅れており、とりわけ遺伝子レベルの研究はほとんど進んでいない。アクチノリザル植物の例としてはヤシャブシ、モクマオウ、グミ、ヤマモモなどが有

名であり、そのほとんどは樹木である。よってフランキア-アクチノリザル植物共生の研究は森林再生による CO<sub>2</sub> 削減という観点からも非常に重要である。

遺伝子レベルの研究を進めるためには、フランキアの遺伝子を人工的にはたらかなくしたり、逆に強制的にはたらかせたりすることが重要だ。なぜならば、人工的に遺伝子のはたらきを変えたことにより共生の特徴が変化することを観察してはじめてその遺伝子が共生に関わっていることを証明できるからだ。そのためには、特定の遺伝子をフランキアの染色体（あるいは細胞質）に導入し、安定に維持することが必要だ。この操作は一般的に形質転換と呼ばれる。

## 2. 研究の目的

フランキアの共生に関わる遺伝子の同定に必要な以下の研究に取り組む。

(1) フランキアの形質転換法を確立する

(2) 根粒中に共生しているフランキアすべての遺伝子の働き度合い（発現量）を調べる。よくはたらいっている（高い発現量を示す）遺伝子は共生に重要な働きを持つと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子操作法の確立

①フランキアではたらく選択マーカー遺伝子の開発

フランキア細胞に遺伝子を導入する操作を行ったとしても、実際に遺伝子を受け取る細胞はごくわずかだ。よって、遺伝子を受け取った細胞を効率的に識別する方法が必要だ。一般的には抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子を同時に導入し、抗生物質耐性を獲得した細胞を単離するという方法が取られる。形質転換体を選択する目的で使われることから、このような用途に用いる抗生物質耐性遺伝子を、選択マーカー遺伝子と呼ぶ。フランキアの DNA は、グアニン (G) とシトシン (C) が極めて多く (70%以上)、遺伝暗号の使用頻度に大きな偏りがある。よって、遺伝暗号をフランキアに最適化した人工合成のゲンタマイシン耐性遺伝子を用いた。また、GC 含量の高い他のバクテリアで機能した実績のある抗生物質耐性遺伝子も数種類試した。これとは別に、フランキア自身の遺伝子を選択マーカーに用いる方法も試みた。まず、生育に必須なウラシルの生合成に必要な遺伝子 (*pyrF*) の突然変異株を単離した。そして、変異を持たない野生型の *pyrF* 遺伝子を野生株のフランキアから単離し、それを選択マーカーとして使用した。*pyrF* 変異株はウラシルを含まない培地では生育できないが、野生型 *pyrF* を獲得した形質転換体は、同培地で生育できるようになるはずだ。

②遺伝子をフランキア細胞に導入する方法の開発

2つの方法を試みた。1つ目はエレクトロポレーションと呼ばれる方法で、電気パルスを与えることで細胞膜に穴を開け、そこから DNA を取り込ませる方法だ。2つ目は接合と呼ばれる方法だ。自然界でバクテリアは、他のバクテリアに中空の管状の構造物を突き刺し、それを通して自らの DNA の一部を注入することが知られている。これは接合と呼ばれ、しばしば形質転換に利用される。

③遺伝子をフランキア細胞で維持する方法の開発

導入した DNA は、フランキアの細胞内で世代を超えて維持されなければならない。つまりこのことは、細胞分裂が起こる頻度と同等かそれ以上のペースで、導入した DNA が複製される必要があるということの意味する。これを達成するために、2つの方法を試みた。1つ目は染色体に導入する方法だ。染色体は細胞分裂時に必ず複製されるので、染色体に導入された遺伝子もそれにとまって複製されるという理屈だ。染色体に導入する方法として、相同組換えとファージのインテグラーゼの2つを試した。2つ目はプラスミド DNA を用いる方法だ。プラスミド DNA は染色体とは独立して複製される小型の DNA 分子だ。多くの場合、細胞分裂を上回るペースで複製されるため、1細胞中に複数分子含まれる。ただし、プラスミド DNA が複製されるためには複製起点と呼ばれる特殊な配列が必要であり、それはバクテリアによって異なるため、フランキアで機能する複製起点をもつプラスミド DNA を探す必要がある。今回は、フランキアの近縁のバクテリアで複製した実績のあるプラスミド DNA と、様々な種のバクテリアで複製する広宿主域プラスミド DNA を用いた。

(2) 根粒中で高発現する遺伝子の探索

フランキアをセイヨウヤマハンノキ、ネパールハンノキ、ヤマモモ、ヤチヤナギの4種の樹木に接種し、着生した根粒から全 RNA を精製した。これを蛍光色素で標識し、フランキアのそれぞれの遺伝子配列 (約 7000 種) をもつ DNA 断片 (プローブ) が含まれるマイクロアレイにセットした。各遺伝子の RNA 分子は、それと相補的な塩基配列をもつマイクロアレイ上のプローブと結合する。発現量が高い RNA 分子は、よりたくさん結合する。よって、各プローブの蛍光強度を測定することにより、各遺伝子の発現量が測定できる。同様の実験を、共生させずに単独で培養したフランキアでも行い、すべての遺伝子の発現量を共生時のものと比較した。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝子操作法の確立

遺伝暗号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を人工合成し、形質転換を試みた。DNA はエレクトロポレーションにより細胞に導入した。耐性遺伝子は相同組換えにより染色体への導入を試みた。その結果、形質転換の成功率が向上した。よって、遺伝暗号の使用頻度がマッチすることはフランキア細胞内での遺伝子の発現に重要であることが分かった。しかし、得られた形質転換体は培養とともに選択マーカー遺伝子を失っていった。この原因として、突然変異により抗生物質耐性を獲得した細胞が出現した、培養しているうちに（フランキアは増殖が遅いため形質転換体が増殖するまで1ヶ月程度培養した）抗生物質の活性がなくなった、の2つが考えられた。これらの問題を解決するために、ウラシル合成に関わる *pyrF* 遺伝子をマーカーとした形質転換を試した。この方法では抗生物質を使用しないので、失活は問題にならない。また、自然の突然変異により選択培地で増殖した細胞を、*pyrF* の塩基配列を解析することで見分けられる。フランキア細胞を変異原で処理することにより、5株の *pyrF* 変異株を得ることができた。これらは1塩基の挿入または欠失変異を持っていた。*pyrF* 変異株に対して野生型の *pyrF* 遺伝子をマーカー遺伝子とした形質転換を行ったが、ウラシルを含まない選択培地で増殖した株はすべて形質転換体ではなく、変異が回復した復帰変異体だった。

相同組換えによる染色体への導入の効率が低いのではないかと考え、ファージのインテグラーゼ遺伝子を用いた染色体組み込みや、プラスミドDNAを利用した方法も試みた。しかしいずれの方法でも良好な結果はえられなかった。ファージのインテグラーゼに関しては、フランキア染色体に存在する挿入標的配列が、実際に機能することが大腸菌を用いた方法で確認できたので、他の条件を最適化することで成功につながられるのではないかと期待している。接合による形質転換も試みたが、成功には至らなかった。

バクテリアは一般に外来のDNAを切断する酵素（制限酵素）を持っている。自身のDNAはその制限酵素の切断配列にメチル化修飾がほどこされることにより切断から守られている。最近、フランキアの染色体DNAの特定の配列が高度にメチル化されていることを発見した。このことは、フランキアがこの配列を切断する制限酵素をもつことを示唆する。マーカー遺伝子にも同様のメチル化修飾をほどこすことで形質転換がうまくいくのではないかと期待して、実験を進めている。

#### (2) 根粒中で高発現する遺伝子の探索

調べた6607遺伝子中、166が根粒中で有意に高い発現量を示した。126は根粒中で発現が低下していた。根粒中で発現が高かった遺

伝子のなかには、窒素固定酵素遺伝子をはじめとするこれまで共生に必要なことが知られている遺伝子も多く含まれたことから、一連の実験がうまくいっていることが確認できた。解析を行った4種の樹木の根粒では、ほとんど同じ遺伝子の発現が高まっていたことから、共生の際には活発にはたらくフランキアの遺伝子は、樹木が変わってもほとんどおなじだということが予想された。根粒中で発現が高い遺伝子には、タンパク質合成や呼吸、クエン酸回路などの炭素代謝にかかわる遺伝子が多く含まれていたことから、共生窒素固定の際にはエネルギーを多く生産し、タンパク質合成を活発に行うための遺伝子が重要なことが示唆された。また、これまで他生物での研究結果をふくめても機能がわかっていない遺伝子が数多く含まれた。これらはフランキアと樹木との共生になんらかの役割をはたしている可能性がある。

#### 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4件)

- ① Kucho K, Hay A-E and Normand P (2010) The determinants of the actinorhizal symbiosis. *Microbes Environ*, 25: 241-252, doi:10.1264/jsme2.ME10143 (査読有り)
- ② Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, Pujic P, Normand P, Vallenet D, Medigue C, Yamaura M, Kakoi K and Kucho K (2010) The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact*, 23: 593-607, doi:10.1094/MPMI-23-5-0593 (査読有り)
- ③ Yamaura M, Uchiumi T, Higashi S, Abe M, Kucho K (2010) Identification by suppression subtractive hybridization of *Frankia* genes induced under nitrogen-fixing conditions. *Appl Environ Microbiol*, 76: 1962-1964, doi:10.1128/AEM.01813-09 (査読有り)
- ④ Kucho K, Kakoi K, Yamaura M, Higashi S, Uchiumi T and Abe M (2009) Transient transformation of *Frankia* by fusion marker genes in liquid culture. *Microbes Environ*, 24: 231-240 (査読有り)

[学会発表] (計19件)

- ① 九町健一 樹木と共生する窒素固定放線菌フランキアのゲノム解析 科学技術交流財団研究会「ハイスループットスクー

- ニングと次世代DNAシーケンサーの相乗的応用」愛知 2011/11/11
- ② 松井勇磨, 梶健太郎, Peter Pujic, 東四郎, 阿部美紀子, Philippe Normand, 内海俊樹, 九町健一 プラスミドを用いたフランキアの形質転換 植物微生物研究会第21回研究交流会 岡山 2011/9/20
- ③ Yamaura M, Uchiimi T, Higashi S, Abe M and Kucho K. Isolation of uracil auxotrophic mutants in Frankia 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation Miyazaki 2010/9/20
- ④ Kucho K, Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, Pujic P, Yamaura M, Kakoi, K, Uchiimi T, Abe M and Normand P Symbiotic transcriptome of the nitrogen-fixing actinobacterium Frankia 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation Miyazaki 2010/9/20
- ⑤ Yamaura M, Uchiimi T, Higashi S, Abe M and Kucho K Isolation of uracil auxotrophic mutants in Frankia 16th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants ポルト 2010/9/6
- ⑥ Yamaura M, Higashi S, Uchiimi T, Abe M and Kucho K Use of high-activity promoters and a codon-optimized marker gene for Frankia transformation 16th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants ポルト 2010/9/6
- ⑦ Yamaura M, Kakoi K, Iwashita M, Abe M, Uchiimi T and Kucho K Recent trials for Frankia transformation 16th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants ポルト 2010/9/6
- ⑧ 九町健一, Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, Pujic P, Vallenet D, Medigue C, 山浦真稔, 梶健太郎, 内海俊樹, 阿部美紀子, Normand P 樹木と共生窒素固定を行う放線菌フランキアのトランスクリプトーム解析 日本植物生理学会第51回大会 熊本 2010/3/19
- ⑨ Kucho K Nitrogen-fixing Symbiosis between the Actinobacterium Frankia and Trees 7th Okazaki Biology Conferences 静岡 2010/1/13
- ⑩ 梶健太郎, 山浦真稔, 東四郎, 内海俊樹, 阿部美紀子, 九町健一 共生窒素固定細菌Frankiaの形質転換法への高発現プロモーターの利用 植物微生物研究会第19回研究交流会 長野 2009/9/20
- ⑪ Kucho K, Kakoi K, Yamaura M, Higashi S, Uchiimi T, Abe M Transformation of

- Frankia sp. strain CcI3 by fusion marker genes using liquid culture selection XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions ケベック 2009/7/21
- ⑫ 九町健一, 梶健太郎, 山浦真稔, 内海俊樹, 阿部美紀子 共生窒素固定細菌フランキアの形質転換法の確立 2009年度日本放線菌学会大会 秋田 2009/7/17
- ⑬ 梶健太郎, 山浦真稔, 東四郎, 内海俊樹, 阿部美紀子, 九町健一 共生窒素固定細菌Frankiaの形質転換法への高発現プロモーターの利用 第24回日本放線菌学会 秋田 2009/7/17
- ⑭ 山浦真稔, 東四郎, 内海俊樹, 阿部美紀子, 九町健一 Suppression subtractive hybridization法の細菌への応用 単生で窒素固定を行うFrankiaで特異的に誘導される遺伝子の探索 2009年度日本放線菌学会大会 秋田 2009/7/17

〔図書〕(計1件)

九町健一, 笹川英夫, 養賢堂, 土壤微生物実験法, 2012年, 印刷中

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

九町 健一 (KUCHO KEN-ICHI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号 : 70404473