

共生細菌フランキアを用いた窒素供給改善による 樹木の光合成促進

Promotion of photosynthesis of woods by developing nitrogen availability using *Frankia*

鹿児島大学理学部生命化学科 助教 九町健一

Ken-ichi KUCHO

Faculty of Science, Assistant Professor, Department of Chemistry and Science,
Kagoshima University

研究の概要

窒素は生体に必須の元素であり、植物ではクロロフィルや CO₂ 固定酵素の構成元素として光合成に重要な役割を担っている。ゆえに樹木への窒素の供給効率を高めれば、光合成能を促進することができると考えられる。ヤシヤブシやモクマオウなどのアクチノリザル植物と呼ばれる樹木は、根の根粒という器官にフランキアという窒素固定を行う放線菌を共生させることにより、大気中に無尽蔵に存在する窒素分子を自らの栄養源として利用できる。フランキアの宿主特異性を決定している遺伝子を同定し、これを改変することにより宿主範囲を拡大することができれば、多種多様な樹木の窒素栄養獲得能を向上させることが可能となり、森林再生を加速化し大気中 CO₂ の削減に貢献することができる。本研究はこの計画を実現するための基盤を整えることを目的とする。具体的には、フランキアの共生に関わる候補遺伝子のリストアップと、形質転換(遺伝子破壊)系の確立を行う。

Abstract

Nitrogen is an essential element for living organisms. In plant, nitrogen plays a important role as a constituent of chlorophyll. Therefore it is possible to promote photosynthetic activity by enhancing efficiency of nitrogen supply. Actinorhizal plants such as *Alnus* and *Casuarina* establish symbiosis in root nodules with a nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* and utilize N₂ molecule in atmosphere as a nitrogen source. Actinorhizal plants grow rapidly even under nitrogen-limited conditions. However, *Frankia* can establish symbiosis with only limited species of woods. If we can extend the host range by modifying *Frankia* genes that determine the host-specificity, it is possible to contribute to reduce the atmospheric CO₂ level by enhancing growth of a wide variety of woods. In this research, we identify candidate genes related to symbiosis and establish a genetic transformation method in *Frankia* to reach the final goal.

1. 研究目的

土壌放線菌の一種であるフランキアは、ヤシヤブシやモクマオウ、ヤマモモ等のアクチノリザル樹木と共生し、根に根粒を形成させる。フランキアは根粒中で窒素固定反応を行い、その産物を宿主植物に供給する。フランキアの共生窒素固定による樹木に対する光合成および生長促進の効果は非常に大きい(図1)。本研究では、フランキアの

宿主範囲を拡大して様々な樹木の光合成能を促進することを将来的な目標とし、その第一段階としてフランキアにおいて共生相手の認識に関与する候補遺伝子(共生関連候補遺伝子)の探索を試みる。また、将来的にフランキアの遺伝子操作を行うために必須である形質転換法の確立にも取り組む。光合成能の促進という課題に対しては、光合成装置自身の改良という手法をとるのが一般

的だが、十分な窒素栄養が供給されなければクロロフィルやCO₂固定酵素の生合成が妨げられ、改良の効果は発揮されない。本研究課題の特色は、植物の窒素栄養獲得能の向上というポイントに着目した点と、共生という自然界に本来備わる巧妙な仕組みを生かす方針であるといえる。

共生窒素固定を行うバクテリアはフランキアの他に根粒菌が知られている。根粒菌はマメ科植物と共生し、その宿主特異性を決定するメカニズムは詳細に解明されている。根粒菌は宿主植物の根から分泌される特異的なフラボノイドを認識し、Nod factor と呼ばれるリポキトオリゴ糖の合成に関わる遺伝子群の発現を活性化する。異なる種の根粒菌は異なる Nod factor を合成し、宿主植物は共生相手の根粒菌の産生する Nod factor にのみ反応して共生を許容する。対照的にフランキアは、増殖速度が遅い、形質転換ができないなどの理由から研究人口が少なく、共生に関連する遺伝子の研究はほとんど進んでいない。フランキアと根粒菌とは進化系統的には非常に離れているにも関わらず、共生窒素固定という共通の特殊能力を有している。一方では、根粒菌はマメ科植物と、フランキアはアクチノリザル樹木と共生するという宿主の違いも存在する。この共通点と相違点を遺伝子のレベルで説明することは、学問的に非常に重要な課題である。

フランキアの宿主範囲の拡大を達成するためには数多くの基礎研究成果の蓄積を必要とするが、近年欧米では国を挙げてこの研究を推進しようとする動きがある。アメリカとフランスの国家機関により相次いでフランキア的全ゲノム配列が決定されたことは、それを如実に示すものである。本申請課題では、宿主範囲の拡大を達成する上でキーポイントとなる基礎技術と知識の確立に取り組んでおり、これが確立されれば国際的に重要なテーマの発展に大きく貢献できると期待される。

2. 研究経過

共生関連候補遺伝子の探索は、研究の良く進んでいる根粒菌とマメ科植物との共生の知見に基づいて行った。根粒菌とマメ科植物との共生では、植物の根から分泌されるフラボノイドを根粒菌が感知して共生に必要な遺伝子群の発現が活性化される。根から分泌されるフラボノイドは植物種により異なり、共生相手でない植物が分泌するフラボノイドに対してはこのような遺伝子発現の活性化は起こらない。同様な機構がフランキアとアクチノリザル植物との共生でも存在すると予想し、共生宿主のアクチノリザル植物の根分泌物で処理したフランキアで特異的に発現が上昇する遺伝子を、



図1 ヤシヤブシの生育に対するフランキアの効果。窒素飢餓状態でフランキアを接種せず栽培した植物(左)と接種を行った植物(右)。

suppression subtractive hybridization 法 (SSH 法) を用いて探索した。

根粒菌は、新たな遺伝子セットを他のバクテリアから水平伝播により獲得したことで共生窒素固定を行えるようになったと考えられている。このような遺伝子群は根粒菌ゲノムの特定の領域に密集して存在しており、共生アイランドまたは共生プラスミドと呼ばれる。フランキアでも水平伝播で得られた遺伝子が共生において重要な役割を担っている可能性がある。そこで、フランキアゲノム中にも共生アイランド様の領域が存在するかを検証した。

フランキアの形質転換法を確立することは、遺伝子レベルでの研究を進めていく上で必要不可欠である。フランキアの形質転換についてはこれまで数例の試みがあるが、成功には至っていない。我々は、フランキアは GC 含量が極めて高いので (70%以上)、プロモーター配列やコドン使用頻度が特殊であり、これまで用いられてきた大腸菌などで一般的に用いられる抗生物質耐性遺伝子が機能しないことが最大の原因であると予想した。そこでフランキアとコドン使用頻度が近いテトラサイクリン耐性遺伝子と、恒常的に高発現しているフランキア自身の translation initiation factor 3 (*infC*) 遺伝子のプロモーターとを連結した人工の選抜マーカー遺伝子を用いて形質転換を試みた。

3. 研究成果

1) SSH 法による宿主根分泌液特異的に発現が誘導される遺伝子の探索

Frankia sp. CcI3 株を、宿主植物であるモクマオウ *Casuarina glauca* と非宿主植物であるヤシヤブシ *Alnus glutinosa* の根分泌液でそれぞれ処理し、宿主植物の分泌液でのみ発現が誘導される遺伝子を SSH 法で探索した。この方法は元来真核生物の mRNA に対する方法として開発されたものであるため、我々は CcI3 株の total RNA から 23S と 16S リボソーム RNA を取り除いた後、RNA poly(A)ポリメラーゼを用いて poly(A)を付加し、真

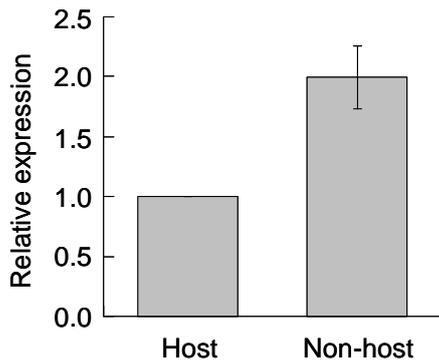


図2 *Francisci30437* 遺伝子の発現様式. 宿主(Host)および非宿主(Non-host)の根分泌液で処理した CcI3 株 RNA を鋳型とし、定量的 RT-PCR により発現量を調べた。

核生物型の mRNA を調製することにより原核生物への SSH 法の応用を試みた。宿主根分泌液で処理した CcI3 株にのみ添加したコントロール RNA の濃縮が確認されたことから、これらの工夫により原核生物にも SSH 法が応用できることが示された。SSH 後の cDNA をクローン化し、ランダムに数クローンの塩基配列を決定して定量的 RT-PCR により発現を確認した結果、偽陽性のクローンが含まれることが明らかになった。そこで、効率的に陽性クローンを選抜するために、ドットプロット法によるスクリーニングを行った。その結果、*Francisci30437* 遺伝子が宿主の根分泌液で特異的に発現が上昇していた(図2)。この遺伝子は *Pseudomonas fluorescens* のハロゲナーゼをコードする *prnC* 遺伝子に高い相同性を示した。*prnC* は *prnAB* と共にトリプトファンから抗菌性化合物 pyrrolonitrin を合成する酵素だが、CcI3 株ゲノムには *prnAB* に相同な遺伝子は存在しない。よって *Francisci30437* 遺伝子は pyrrolonitrin ではなく共生相手の認識に関与する何らかのシグナル化合物の合成に関わっているのかもしれない。

2) バイオインフォマティクス的手法によるフランキアの共生アイランドの探索

CcI3 株の全遺伝子について、根粒菌の共生アイランドもしくは共生プラスミドに含まれる遺伝子と相同性検索を行い、相同遺伝子のフランキア染色体上における分布を調べた。その結果、1箇所のみ相同遺伝子が高密度で存在する領域が見出された。しかしながら、その領域は根粒菌に比べて非常に狭かった。そこに含まれるのは窒素固定細菌が普遍的に持つ窒素固定酵素遺伝子群のみであり、宿主植物の認識や共生の維持に関わる遺伝子のホモログは存在しなかった。根粒菌の共生関連遺伝子に高い相同性を示す遺伝子はフランキアゲノム中にはそれほど多くないことも考え合

わせると、フランキアが根粒菌と同じ由来の外來 DNA を取り込んで共生能を獲得した可能性は極めて低いと考えられる。また、CcI3 株染色体の GC 含量を調査した結果、GC 含量が周囲に比べて顕著に低い領域は見つからなかった。この結果は、フランキアが根粒菌のように進化の過程で巨大な外來 DNA を取り込んだ可能性は低いことを示唆する。

3) DNA マイクロアレイによる根粒中で高発現を示す遺伝子の同定

バイオインフォマティクスの解析の結果から、フランキアの共生関連遺伝子は根粒菌のものとは異なっており、しかも染色体の特定の領域に集中しているわけではなさそうである。また、SSH 法で同定された宿主特異的発現を示す遺伝子は1つのみであり、根分泌液処理条件で発現が変動する遺伝子は非常に少ないことが予想された。よって、より効率的に共生関連遺伝子を探索するための新たな戦略が必要となった。根粒菌では、共生関連の遺伝子は共生器官である根粒中で高い発現を示すことが知られている。そこで、フランス・リヨン第一大学の Philippe Normand 博士との共同研究により、*Frankia sp. ACN14a* 株のマイクロアレイを使用して根粒中でのフランキア遺伝子の発現を網羅的に解析することにした。まず、材料である根粒 RNA の調製を行った。*ACN14a* 株を宿主植物であるハンノキ属の *Alnus glutinosa* と *Alnus nepalensis* およびヤマモモ属の *Myrica gale* と *Myrica rubra* に接種し、根粒を着生させた。フランキアの宿主植物は樹木であるため、生育が遅く、当初はアレイ解析に必要な大量の根粒を回収するのが非常に困難であったが、水耕栽培による根粒着生法を確立することにより、短期間で大量の根粒を得ることができた。得られた根粒から RNA を精製した。全ての根粒において質の高い RNA を十分量得ることができた。現在、約半分のサンプルについて解析を行っている。

4) フランキアの形質転換法の確立

5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE) 法による解析の結果、*infC* 遺伝子は2つの転写開始点を持つことが示唆された。そこで、上流側および下流側の転写開始点に対応する2つのプロモーター、 P_{infC-s} と P_{infC-l} を用いることにした。これらのプロモーターをテトラサイクリン耐性遺伝子 (Tet^R) またはゲンタマイシン耐性遺伝子 (Gm^R) に連結した人工選抜マーカー遺伝子を作製し、相同組換えによるフランキア染色体への導入を試みた。各コンストラクトをエレクトロポレーションにより CcI3 株に導入し、抗生物質を含む液体培地中で培養した。その結果、 Tet^R を含むコンストラクトでのみ抗

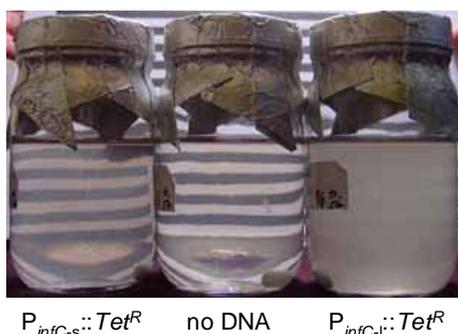


図3 テトラサイクリンを含む培地でのフランキアの生育.

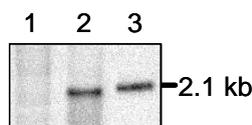


図4 サザンブロットの結果. レーン1:野生株ゲノム, 2: $P_{infC-i}::Tet^R$ コンストラクトによる形質転換株のゲノム, 3:コンストラクトのプラスミド DNA

生物質耐性を示す細胞の増殖が見られた(図3)。 Gm^R は Tet^R ほどコドン使用頻度がフランキアに似ておらず、翻訳が効率的に行われなかったからだと考えられる。また、 P_{infC-i} を含むコンストラクトは P_{infC-s} を含むものより増殖が速かった(図3)。このことは P_{infC-i} のほうが高い発現効率を示すことを示唆する。サザンブロット解析および PCR により、薬剤耐性細胞のゲノム中には Tet^R が含まれることが確認できた(図4)。さらに PCR により、相同組換えにより Tet^R が染色体に組込まれていることも確認できた(data not shown)。しかし、 Tet^R がゲノム中に組込まれて耐性を獲得した細胞は少なく、全体の約6分の1と推定された(data not shown)。このことから、薬剤耐性細胞の中には Tet^R の導入によらず自然に耐性を獲得したものが含まれることが示唆された。 Tet^R の導入により耐性を獲得した1細胞由来の株を得るために、エレクトロポレーション後の細胞をテトラサイクリンを含む固体培地上で培養した。コンストラクト DNA を加えてエレクトロポレーションを行ったプレートでは、DNA なしのコントロールプレートに比べて約2倍のコロニーが出現した。このことから、出現したコロニーの約半分が Tet^R の導入により耐性を獲得したものと予

想された。得られたコロニーをテトラサイクリンを含む培地で培養し、ゲノム DNA を精製して PCR による確認を行った。その結果、増殖した細胞のごく一部にしか Tet^R は含まれていなかった。

4. 今後の課題と発展

調製した全ての根粒 RNA についてマイクロアレイによる発現解析を行う。さらに、共生していない状態(単生)の ACN14a 株からも RNA を精製し、マイクロアレイ解析を行う。根粒中と単生のフランキアの間で遺伝子の発現量を比較し、4種類全ての宿主植物の根粒において発現が上昇している遺伝子を選び出す。このような遺伝子は共生に関わる機能をもつ可能性が極めて高い。これらの遺伝子の機能やゲノム上での分布様式を調べ、共生への関与について考察する。

形質転換については、単一コロニーを単離してもなお Tet^R を含まない耐性株が混入するという問題がある。テトラサイクリンはフランキアと近縁の *Streptomyces* 属の放線菌に由来するため、フランキアは比較的容易に自然耐性を獲得するのかもしれない。フランキアにコドン使用頻度を最適化したゲンタマイシン耐性遺伝子を合成したので、その検討も行いたい。また、現行の形質転換法は効率が低いという問題も有している。更に強力なフランキアのプロモーターやトランスポゾンによる染色体への導入を試み、効率の向上を図りたい。

5. 発表論文リスト

- 1) Suzuki A, Hara H, Kinoue T, Abe M, Uchiumi T, Kucho K, Higashi S, Hirsch AM, and Arima S. (2008) Split-root study of autoregulation of nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. **J Plant Res**, 121: 245-249.
- 2) Nakatsukasa H, Uchiumi T, Kucho K, Higashi S, and Abe M. (2008) Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to become symbiosis island in *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **in press**.
- 3) Suzuki A, Yamashita K, Ishihara M, Nakahara K, Abe M, Kucho K, Uchiumi T, and Arima S. (2008) Enhanced symbiotic nitrogen fixation of *Lotus japonicus* containing anti-sense β -1,3-glucanase gene. **in press**.