

## 二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年4月 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 鹿児島大学・大学院理工学研究科

(ふりがな)

職・氏名 准教授 九町 健一

1. 事業名 相手国（フランス）との共同研究 振興会対応機関（CNRS）

2. 研究課題名 窒素固定細菌フランキアと植物との共生の分子基盤

3. 全採用期間

平成21年4月1日 ～ 平成23年3月31日（2年0ヶ月）

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000千円

初年度経費 2,500千円、 2年度経費 2,500千円、 3年度経費 0千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 300千円

## 5. 研究組織

### (1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
くちようけんいち 九町健一	鹿児島大学大学院理工学研究科・准教授	マイクロアレイ解析、細胞表層多糖の解析、形質転換、孢子誘導・発芽
うちうみとしき 内海俊樹	鹿児島大学大学院理工学研究科・教授	細胞表層多糖の解析、ストレス耐性フランクシア株の単離
はしもとまさひと 橋本雅仁	鹿児島大学大学院理工学研究科・准教授	細胞表層多糖の解析
やまうらまさとし 山浦真稔	鹿児島大学大学院理工学研究科・博士後期課程	マイクロアレイ解析、形質転換、孢子誘導・発芽
むらかみえいち 村上英一	鹿児島大学大学院理工学研究科・博士後期課程	細胞表層多糖の解析
いしはらひろのぶ 石原寛信	鹿児島大学大学院理工学研究科・博士後期課程	形質転換
かこいけんたろう 梶健太郎	鹿児島大学大学院理工学研究科・博士後期課程	マイクロアレイ解析、形質転換

### (2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 Lyon University, team leader (DR1 CNRS), Philippe Normand

### (3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○Philippe Normand	Lyon University, DR1 CNRS	マイクロアレイ解析、細胞表層多糖の解析、形質転換、孢子誘導・発芽
Petar Pujic	Lyon University・IR2 CNRS	マイクロアレイ解析、細胞表層多糖の解析、形質転換
Nicole Alloisio	Lyon University・CR1 CNRS	マイクロアレイ解析
Pascale Fournier	Lyon University・technician	細胞表層多糖の解析、形質転換、孢子誘導・発芽
Anne-Emmanuelle Hay	Lyon University・Lecturer	細胞表層多糖の解析

## 6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

窒素は植物の生育に必須な元素だ。大気中の約8割を占める窒素分子は非常に安定であるため、植物はこれを直接利用できない。土壌放線菌フランキアは、ハンノキやヤマモモ、グミなどのアクチノリザル植物と呼ばれるグループの樹木の根に共生し、窒素分子を植物が利用可能なアンモニアに変換して植物に供給する。フランキアとの共生によりこれらの樹木は貧栄養土壌でも旺盛に生長できる。本プロジェクトでは、フランキアとアクチノリザル植物との共生の分子メカニズムを解明するため、以下のような課題に取り組んだ。

### (1) ハンノキに着生した根粒中のフランキアの網羅的遺伝子発現解析

*Frankia alni* ACN14a 株のマイクロアレイを用いて、宿主樹木であるセイヨウヤマハンノキ (*Alnus glutinosa*) に着生した根粒中での全遺伝子の発現を、非共生状態のものと比較した。その結果、根粒中で有意に発現レベルが変動している 292 の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には、これまで共生窒素固定への関与が知られていた遺伝子も含まれたことから、実験手法の妥当性が確認できた。加えて、これまで根粒中での誘導が知られていなかった、転写制御やシグナル伝達、タンパク質輸送、細胞表面多糖の生合成に関わる遺伝子も新規に同定され、共生窒素固定への関与が示唆された。根粒中で発現が誘導される遺伝子は、ゲノムの全体にほぼ均一に分布していた。マメ科植物と共生する共生窒素固定細菌である根粒菌では、根粒誘導性遺伝子は共生アイランドや共生プラスミドと呼ばれる特定のゲノム領域に集中していることが知られているが、我々の結果からフランキアではそれとは様相が大きく異なることが明らかになった。根粒中の遺伝子発現を他の宿主樹木 (*Alnus nepalensis*, *Myrica gale*, *Morella rubra*) でも解析したところ、*A. glutinosa* を含む 4 種の宿主樹木間で根粒中での遺伝子発現パターンは非常によく似ていた。根粒中での遺伝子発現パターンをフランキアと根粒菌との間で比較し、両者は大きく異なることを明らかにした。フランキアでは、根粒菌では見られない、翻訳およびエネルギー代謝に関連する遺伝子の活性化が起こっていた。

### (2) フランキアの細胞表面多糖の解析

根粒菌では細胞表面に局在するリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) が、宿主植物による適合根粒菌種の認識に関わることが知られている。またフランキアの細胞表面多糖は、自然界でも非常に稀な 2-O-メチルマンノースを含む。これらの事実は、フランキアの細胞表面多糖が宿主植物に対する共生シグナル因子として機能する可能性を示唆する。そこで、*Frankia* ACN14a 株の細胞表面多糖の構造解析に取り組んだ。細胞表面多糖を温水フェノール法により抽出し、疎水性カラムクロマトグラフィーにより OS1 および OS2 の 2 つの粗精製画分を得た。両画分とも 2-O-メチルマンノース、ラムノース、リブロース、マンノース、ガラクトース、グルコースを含み、OS2 は脂肪酸を含むリポ多糖様の構造を持つことがわかった。2-O-メチルマンノースの含有量は OS2 画分のほうが高かった。また予備的ながら、これらの多糖画分が共生に特徴的な現象である宿主植物の根毛変形を誘導するというデータを得た。

### (3) フランキアの形質転換法の確立

共生のメカニズムを遺伝子レベルで解明するためには、形質転換が行えることが必須だが、フランキアの形質転換は長年の努力にも関わらず成功していない。フランキアにコドン使用頻度が近いゲンタマイシン耐性遺伝子 (*fgm<sup>R</sup>*) と緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*eGFP*) をそれぞれフランキアの高発現プロモーター (翻訳開始因子 3 および 16S リボソーム RNA 遺伝子のプロモーター) に連結した融合遺伝子を作製した。これらの融合マーカー遺伝子が相同組換えまたは放線菌ファージ  $\Phi$ C31 のインテグラーゼにより染色体に組み込まれるようにデザインしたコンストラクト DNA を作製した。コンストラクト DNA を *Frankia* ACN14a 株および CcI3 株にエレクトロポレーションにより導入した。細胞をゲンタマイシンを含む培地で培養したが、形質転換体は得られなかった。

### (4) その他

単細胞由来の形質転換コロニーを得るために、フランキアの孢子誘導及び発芽の条件検討を行った。