

共生窒素固定放線菌フランキア

九町 健一

フランキア (*Frankia*) は放線菌目に属する土壌細菌で、増殖は遅く(世代時間 = 1~2日)、形質転換は行えない。ゲノムのGC含量が70%以上ときわめて高く、PCRや外来遺伝子の発現の障害となる。多細胞性であるため単一細胞由来のコロニーの単離が難しく、突然変異株のスクリーニングも一筋縄ではいかない……。このようにフランキアは、世間で隆盛をきわめるいわゆるモデル生物とは正反対の、実験生物としては欠点だらけの細菌だ。それにも関わらずフランキアを研究するのは、他の細菌にはない重要な特徴があるからだ。本稿ではそれらに焦点を当て、フランキアの魅力について紹介したい。

フランキアとアクチノリザル植物との共生窒素固定

窒素はすべての生物に必須の元素である。大気の約8割は窒素分子 (N_2) で占められるが、これを利用できる生物はごく一部の細菌に限られる。これらは窒素固定細菌と呼ばれ、 N_2 をアンモニアに還元する。アンモニアは細菌や菌類、植物により有機化合物に同化され、食物連鎖により動物にまで転流される。地球上で固定される窒素のおよそ6割は生物窒素固定によるので、元をたどれば私たちの体に含まれる窒素原子の半分以上は窒素固定細菌に由来するということ

になる。

窒素固定細菌の一部は植物と共生する。もっとも高度な共生系では、根粒という専門器官が根に形成される(図1)。根粒中で共生細菌が合成したアンモニアは宿主植物に供給されるため、これらの植物は窒素養分の乏しい土地でも旺盛に生育する(図2)。根粒共生窒素固定を行う細菌は、根粒菌とフランキアの2種類が知られている。根粒菌はグラム陰性細菌であり、マメ科の植物と共生する。一方、フランキアはグラム陽性の放線菌であり、根粒菌とは系統分類的にきわめて遠縁だ。フランキアは多細胞性の菌糸として生育し、胞子を形成する(図3)。フランキアの共生宿主はアクチノリザル植物と総称され、8科にわたる200以上の植物種を含む(表1)。これらはダテスカ科を除きすべて樹木である。熱帯から冷帯まで幅広い気候で生育する多様な樹種を含み、日本にはハンノキ属 (*Alnus*)、ヤマモモ属 (*Myrica*)、グミ属 (*Elaeagnus*)、ドクウツギ属 (*Coriaria*)の植物が自生する¹⁾。マメ科植物とアクチノリザル植物は近縁であり、いずれもバラ亜綱のRosid Iクレードに含まれる²⁾。

森林再生での役割と環境回復への利用

アクチノリザル植物は攪乱された森林の再生において

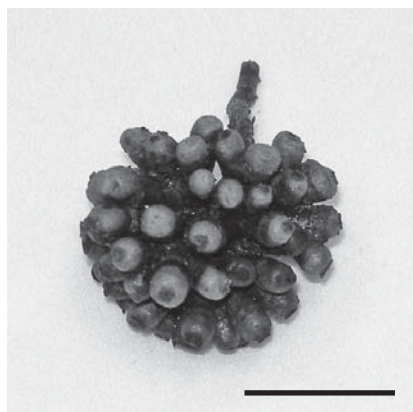


図1. ヤシヤブシ (*Alnus firma*) の根粒。多数の根粒がクラスターを形成している。2012年5月鹿児島県桜島で採取。バーは1 cm。



図2. フランキアによるオオバヤシヤブシ (*Alnus sieboldiana*) の生育促進。窒素養分を含まない土壌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)。

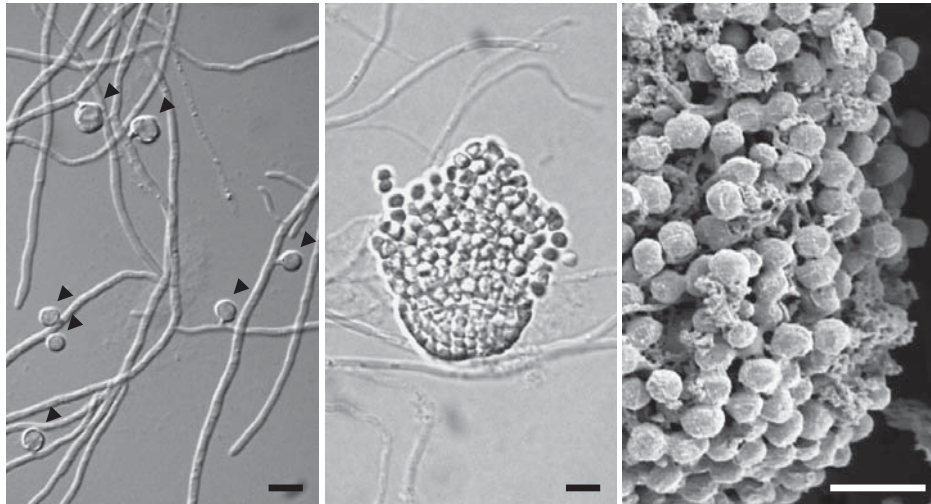


図3. フランキアの顕微鏡写真。(左) 非共生状態, 矢印はベシクル。(中央) 非共生状態, 胞子のう。(右) オオバヤシャブシの根粒内のフランキア. ほとんどがベシクルに分化している. パーは5 μm.

表1. アクチノリザル植物とフランキアの宿主範囲

目	科	属	共生菌 ^a
ブナ	カバノキ	<i>Alnus</i>	A
		<i>Comptonia</i>	A, E
		<i>Morella</i>	A, E
	ヤマモモ	<i>Myrica</i>	A
		<i>Allocasuarina</i>	C
		<i>Casuarina</i>	C
バラ	グミ	<i>Ceuthostoma</i>	nd
		<i>Gymnostoma</i>	E
		<i>Elaeagnus</i>	E
		<i>Hippophae</i>	E
		<i>Shepherdia</i>	E
		<i>Ceanothus</i>	R
ウリ	ドクウツギ	<i>Colletia</i>	E
		<i>Discaria</i>	E
		<i>Kentrothamnus</i>	E
		<i>Retanilla</i>	E
		<i>Trevoa</i>	E
		<i>Cercocarpus</i>	R
		<i>Chamaebatia</i>	R
		<i>Dryas</i>	R
		<i>Purshia</i>	R
		<i>Coriaria</i>	R
		<i>Datisca</i>	R

^aA, *Alnus* 株; C, *Casuarina* 株; E, *Elaeagnus* 株; R, Rosaceous 株; nd, not determined.

重要な役割を担う。火山の噴火や山火事、土砂崩れなどによる攪乱跡地は窒素養分に乏しいが、アクチノリザル植物はそのような土地で最初に生育する。これらの植物は、根や根粒からの浸出や落葉により周辺土壤に窒素養分を供給する。これにより窒素要求量の高い樹木の生育が可能となり、森林再生が進む。国内では、桜島や三宅

島の噴火により堆積した火山灰土壤にヤシャブシ (*Alnus firma*) などが生育している^{3,4)}。また、地震により大規模な土砂崩れの起こった御嶽山の山腹でもミヤマハンノキ (*Alnus maximowiczii*) などが確認されている⁵⁾。

アクチノリザル植物は、人間活動により破壊された環境の回復にも用いられる³⁾。林道工事後の法面補強などが代表的な用途だが、カナダのハイドロケベックダムでは緑化と補強を兼ねて堤体に *Alnus crispa* が植樹されている。カナダのアルバータ州では、タールサンドの廃土にハンノキを育てることで環境の回復を試みている。またセネガルのサヘル地域では、砂漠化を防ぐためにモクマオウ (*Casuarina equisetifolia*) の大規模な植樹が行われている。

商用木材としての用途はそれほど多くないが、ハンノキやケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) は建築材やパルプなどに使用される。アルダー (*Alnus rubra*) は楽器や家具の製作に好んで使われる。また近年はバイオマス燃料のソースとしても期待されている。

研究の歴史

19世紀終わりまでにハンノキは大気中の窒素を利用して生育し、根粒の細胞は菌糸様の構造物を含むことが知られていた。20世紀前半の詳細な顕微鏡観察により、共生菌は放線菌であることが明らかになった。共生菌の単離培養は長らく成功せず、絶対共生菌ではないかと考えられていた。1959年に Pommer が *Alnus glutinosa* の根粒から共生菌を単離したと報告したが⁶⁾、彼は継代培養に失敗してしまう。最初の成功例と一般に見なされているのは、1978年の Callaham らによる *Comptonia peregrina*

からのCpII株の単離培養である⁷⁾。フランキアの単離培養が困難をきわめた理由は、生育が遅いため雑菌が優先的に増殖しがちであること、生育に適した培地の確立が困難だったことなどが挙げられる。これ以降さまざまなアクチノリザル植物から数百の株が単離されたが、Rosaceous株（後述）の単離培養は現在でも成功していない。

*Frankia*という属名は、1886年Brunchorstにより提唱された⁸⁾。これは彼の師であるスイスの微生物学者A. B. Frankに由来する。その後1970年にBeckingがFrankiaceae科の代表属として記載したのをきっかけに、*Frankia*の属名は広く定着した⁹⁾。同時に彼は宿主範囲に基づいて決定した。しかし現在では*Frankia alni*以外の種名は用いられない。再接種してもどのアクチノリザル植物とも共生しない場合や、例外的な宿主範囲を示す場合などがあり、宿主範囲に基づく種名が混乱を招くからだ。このためフランキアは株名で呼ばれることがほとんどだ。

共生の過程

フランキアは、根毛の先端または根の表皮細胞の間隙から植物に感染する。感染の様式は植物に依存し、ブナ目では根毛感染が、バラ目とウリ目では細胞間隙からの感染が起こる¹⁰⁾。根毛感染の場合、フランキアが接触すると根毛が激しく変形する。次いで根毛細胞の内部に感染糸と呼ばれる管状の構造が形成され、それを通じて菌糸が植物細胞内に侵入する¹⁰⁾。細胞間隙から感染する植物では根毛変形や感染糸形成は起こらず、菌糸は細胞間隙を通じて根粒原基に到達し、そこで初めて植物細胞内に侵入する¹⁰⁾。根粒は内鞘（pericycle）から発生する。すなわち、アクチノリザル植物の根粒は側根と類似した器官である。

ベシクル

窒素固定酵素は酸素に弱く大気レベルの酸素濃度下では失活してしまうため、フランキアはベシクルと呼ばれる特殊な細胞を分化させることでこれを回避している（図3）。ベシクル細胞は数十層にもおよぶホパノイド脂質の多層膜で覆われており、酸素の透過が制限されて細胞内は微好気的な環境に保たれる¹¹⁾。窒素固定はベシクルで行われる。フランキアは非共生状態でも窒素固定を行うが、根粒内では非共生状態よりも高頻度でベシクル細胞の分化が起こる（図3）。ただしモクマオウの根粒は例外で、宿主植物がヘモグロビンタンパク質や細胞壁のリグニン化といった酸素防御機構を提供するため、ベシクル形成は起こらない¹¹⁾。

宿主特異性と共生相手の認識機構

土壌中には多種多様な細菌が生息するが、アクチノリザル植物はフランキアのみを識別して共生する。加えて、特定のフランキア株とアクチノリザル植物との間でしか共生が起こらないという宿主特異性も存在する。フランキアの宿主範囲は系統的な類縁関係と相関がある（表1）。16S rDNAの系統解析によりフランキアは4つのクラスターに分類され、それぞれAlnus, Casuarina, Elaeagnus, Rosaceous株と呼ばれる¹²⁾。Alnus株はハンノキ属（*Alnus*）とヤマモモ科の植物と共生する。Casuarina株はモクマオウ属（*Casuarina*）と*Allocasuarina*属という狭い範囲の植物と共生する。Elaeagnus株はグミ科・クロウメモドキ科およびヤマモモ科の植物と共生する。Rosaceous株はバラ科・ドクウツギ科およびダティスカ科の植物と共生する。

フランキアとアクチノリザル植物がお互いの共生相手を識別する仕組みはよくわかっていない。根粒菌-マメ科植物共生系での識別機構については研究が進んでおり、感染から根粒の発達、窒素固定能の発揮にいたる一連の過程で植物と根粒菌とが特異的な鍵分子を提示しあうことでお互いを認識する¹³⁾。植物側の鍵分子としてフラボノイドが、根粒菌側の鍵分子として細胞表層多糖やリポキトオリゴ糖の一種であるNod因子などが知られている。Nod因子は特に重要で、この合成能が損なわれると共生がまったく起こらない。Nod因子の生合成はN-アセチルグルコサミンの重合から始まる。ついで非還元末端の糖残基が脱アセチル化され、そこに脂肪酸が付加される。この基本骨格に根粒菌種により異なる修飾がなされる。基本骨格の合成には*nodABC*という3種類の遺伝子が必要とされ、一部の例外を除くすべての根粒菌はこの遺伝子群を持つ。2007年に3株のフランキアゲノムが決定された際*nodABC*の相同遺伝子の検索が行われたが、3つすべてを持つ株はなかった¹²⁾。また、相同遺伝子を持つ場合でも類似度は低かった。よって、フランキアの共生の鍵分子はNod因子ではないというのが大方の予想である。根粒菌の*nod*遺伝子変異体をフランキアのゲノムライブラリーを用いて相補する試みが成功しなかったこともこの予想を支持している¹⁴⁾。

フランキアとアクチノリザル植物との共生で働く鍵分子の候補がいくつか提唱されている³⁾。ただし、いずれの場合も決定的な証拠はない。フランキアの培養上清は共生の初期反応である根毛変形を引き起こす分子を含み、鍵分子としての役割が期待される。根毛変形因子はキチナーゼに耐性な親水性の化合物であり、キチン骨格をもつ疎水性のNod因子とは異なる分子だと予想され

る¹⁵⁾。オーキシンの一種フェニル酢酸は *A. glutinosa* に根粒様の構造を形成させる¹⁶⁾。すべてのフランキアは稀少な糖である 2-O-メチル-D-マンノースを含む¹⁷⁾。もしこれが細胞表層多糖に含まれれば、アクチノリザル植物がフランキアを認識する際に利用できる可能性がある。

植物側の鍵分子候補も報告されている。ヤチヤナギ (*Myrica gale*) の果実に含まれるフラボノイドは、この植物に共生するフランキア株の生育を特異的に促進する¹⁸⁾。果実が落ち種子が発芽する場所に向けてフランキアの菌糸の伸長を誘導する役割があるのかもしれない。

マメ科植物で Nod 因子のシグナル伝達に関わる受容体キナーゼ遺伝子 *symRK* はアクチノリザル植物にも存在し、フランキアとの共生に必須である¹⁹⁾。

形質転換

遺伝子レベルの研究を進めるためには形質転換が欠かせないが、これまでフランキアでは成功していない。エレクトロポレーションによりフランキア細胞に DNA を導入できることは古くから知られていた。筆者らは、フランキアのゲノムは GC 含量がきわめて高いため一般的なマーカー遺伝子が発現しにくいのではないかと予想し、フランキア自身の高発現プロモーターとフランキアにコドン使用頻度が類似した抗生物質耐性遺伝子との融合遺伝子を用いて形質転換を試みた²⁰⁾。フランキアは寒天培地での生育が悪いため、液体培地で形質転換体を選抜した。その結果、抗生物質耐性を示す細胞の増殖が見られ、一部ではマーカー遺伝子が相同組換えにより染色体に組込まれていた。しかしほとんどの細胞は、染色体に組込まれず細胞質に残存するマーカー遺伝子により耐性を示し、継代を重ねるごとにマーカー遺伝子は失われた。同時に自然の突然変異による耐性細胞の増殖が起こり、安定な形質転換コロニーは単離できなかった。

今後の展望

アクチノリザル植物との共生に必要な鍵分子の合成や、ベシクル細胞の分化といったフランキア特有の形質に関わる遺伝子を同定することが筆者の目標である。そのために、試行錯誤を重ねて何としても形質転換法を確立したい。またフランキアは多細胞バクテリアであるため、突然変異体のスクリーニング法も工夫する必要がある。解決すべき課題は多いが、次世代シーケンサーなどの先端機器も活用して共生窒素固定における新たな知見を見いだしたい。

最後に

生物の特筆すべき特徴は、その共通性と多様性だ。生物はきわめて精巧な自己組織化と自己複製の能力を持つが、それらを体現する基本的なしくみはすべての生物で共通である。20世紀の生物学は、扱いやすいモデル生物を集中的に研究するというアプローチでこの共通のしくみの根幹を明らかにした。エンドウを用いたメンデル、ショウジョウバエを用いたモルガン、ファージと大腸菌を用いたデルブリュックとルリアの一派などが好例である。しかしその一方で、生物は驚くほど多様である。このことはそれぞれの生物のユニークな特徴に対応する遺伝子があることを意味するが、それらのほとんどは手付かずの状態だろう。地球上には1千万種以上もの生物が存在すると言われるが、分子生物学が始まってほんの60年足らずなのだから、個人的には21世紀の生物学の重要な課題は、その多様性のメカニズムを分子レベルで解明することだと考えている。特有の性質はどのような遺伝子で実現され、それらは進化的にどのような経緯で獲得されたのか、ということである。フランキアの共生窒素固定をその一例として捉えているからこそ、この難解な生物との格闘を懲りもせず続けている。

文 献

- 1) 山中高史ら：森林総合研究所研究報告, 7, 67 (2008).
- 2) Soltis, D. E. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2647 (1995).
- 3) Kucho, K. *et al.*: *Microbes Environ.*, **25**, 241 (2010).
- 4) 戸田浩人ら：日本緑化工学会誌, **34**, 21 (2008).
- 5) 藤本 潔ら：森林立地, **40**, 83 (1998).
- 6) Pommer, E. H.: *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **72**, 138 (1959).
- 7) Callaham, D. *et al.*: *Science*, **199**, 899 (1978).
- 8) Brunchorst, J.: *Untersuch. Bot. Institut. Tübingen*, **2**, 150 (1886–1888).
- 9) Becking, J. H.: *Int. J. System Bacteriol.*, **20**, 201 (1970).
- 10) Pawlowski, K. and Sprent, J. I.: *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, p.261, Springer (2008).
- 11) Silvester, W. B. *et al.*: *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, p.105, Springer (2008).
- 12) Normand, P. *et al.*: *Genome Res.*, **17**, 7 (2007).
- 13) 河内 宏：分子レベルからみた植物の耐病性, p.28, 秀潤社 (1997).
- 14) Reddy, A. *et al.*: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**, 62 (1992).
- 15) Cérémonie, H. *et al.*: *Can. J. Bot.*, **77**, 1293 (1999).
- 16) Hammad, Y. *et al.*: *Plant Soil*, **254**, 193 (2003).
- 17) Mort, A. *et al.*: *Can. J. Microbiol.*, **29**, 993 (1983).
- 18) Popovici, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2451 (2010).
- 19) Gherbi, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 4928 (2008).
- 20) Kucho, K. *et al.*: *Microbes Environ.*, **24**, 231 (2009).