

学位論文の要約

氏名

梶 健太郎

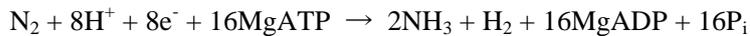
学位論文題目

共生窒素固定放線菌*Frankia*の遺伝学的研究手法の確立

序論

窒素固定の原理

生物が生育するためには窒素養分が必須である。窒素養分は代謝され、様々な生体化合物、例えばDNAやタンパク質の合成に用いられる。大気中にはおよそ78%の窒素ガスが含まれるが、窒素ガスは非常に安定な分子であるため、ほとんどの生物はそれを直接養分として利用できない。窒素ガスを生物が利用できる形態に変換することを窒素固定という。地球上で固定窒素の主要な供給源は、ハーバー・ボッシュ法による工業的窒素固定と生物的窒素固定によるものである。生物的窒素固定は真性細菌と古細菌によって行われる。その反応は以下のとおりである (56)。



窒素分子中の窒素原子は三重結合で強固に結合しており、窒素固定反応には多くのエネルギーが必要とされる。ニトロゲナーゼという酵素が触媒となり、この結合を還元する (56)。

窒素固定細菌

窒素を固定し窒素養分が乏しい環境でも生育できる生物をジアゾ栄養生物と呼ぶ。真正細菌と古細菌に属する様々な生物がジアゾ栄養生物に属する。*Clostridium pasteurianum*は最初に単離されたジアゾ栄養生物である (28)。このバクテリアは偏性嫌気性菌である。一方、*Bacillus polymyxa*や*Rhodospirillum rubrum*は通性好気性のグラム陽性菌であり、有酸素下で窒素固定を行う (15)。このようなジアゾ栄養生物は有酸素下でニトロゲナーゼが失活しないよう、ニトロゲナーゼを酸素から保護している (67) (29)。*Azotobacter*属も通性好気性の窒素固定細菌としてよく知られている。土壌に広く分布しており細胞表面にアルギン酸の防護膜を形成することで酸素を遮断している (54)。

*Chroococcales*目や*Oscillatoriales*目、*Nostocales*目に分類される多細胞性の藍藻（シアノバクテリア）は窒素固定を行う。*Nostocales*目はヘテロシストと呼ばれる細胞を分化し、窒素固定の場とする。シアノバクテリアは光合成を行うが、ヘテロシストは酸素を放出するphotosystem IIを欠いている。ヘテロシストの外膜はglycolipidsとpolysaccharidesの層に覆われている (43)。Glycolipidsは酸素から細胞を防護し、polysaccharidesはglycolipidsの層を安定化させると考えられる。このように窒素固定の場である特別な器官は基本的に酸素から隔絶されている。

共生窒素固定

共生窒素固定細菌は、宿主植物の細胞に共生し、宿主の根に根粒という器官を形成し窒素固定を行う (22)。根粒中の酸素分圧は低レベルに保たれている (50)。これは根粒中のニトロゲナーゼを保護する作用である。窒素分子は窒素固定細菌のニトロゲナーゼにより還元されてアンモニアとなり、宿主植物に窒素養分として供給される。共生窒素固定細菌は、窒素固定反応を駆動するエネルギー源として宿主より光合成産物を受け取る。この共生の結果、宿主植物は窒素養分が少ない土壌でも旺盛に生育

できる。

代表的な共生窒素固定細菌である根粒菌は、*Rhizobium*、*Bradyrhizobium*、*Mesorhizobium*、*Sinorhizobium*、*Azorhizobium*の細菌属を含み、マメ科植物を宿主とする。

根粒菌は、*S. meliloti*はアルファルファと、*B. japonicum*はダイズと共生するというように、厳密な宿主特異性を持つ。この宿主特異性は、植物の根から分泌されるフラボノイドを認識して、根粒菌が*nod*遺伝子群を活性化することで成り立つと考えられている。*nod*遺伝子群により合成、分泌されるリポキトオリゴ糖をNod factorと呼ぶ。Nod factorは 10^{-9} ~ 10^{-12} Mといった低濃度で宿主植物に根毛の変形、前感染糸形成や皮層細胞分裂を引き起し根粒形成へと導く。Nod factorは β -1,4結合したN-アセチル-D-グルコサミンを基本骨格としている。キチン合成酵素のNodCにより基本骨格が形成され、NodBが非還元末端の糖残基を脱アセチル化しNodAによりアシル基が付加される。これらに関わる遺伝子の転写を調節する*nodD*も含め、*nodA*~*nodD*はどの根粒菌にも存在する。このようにNod factorは根粒形成に必須のシグナル分子だが、構造が決定された当初その受容機構は判明していなかった。現在はNod factor受容体 (NFR) によって受容されることが判明している。植物種によりNFRの受容体ドメインであるLysMドメインは異なり、これが宿主特異性を生み出していると考えられる。LysMドメインは病原糸状菌を認識する機能があり、ここからNod factor受容体に進化したと考えられる。NFRがNodファクターを受容すると、特異的なシグナル伝達経路が活性化される。この経路には少なくとも8つのタンパク質が関わっていることが知られており、根粒菌だけでなく菌根菌共生にも用いられることがわかっている。故にこのシグナル伝達経路は共通共生経路と呼ばれる。共通共生経路のシグナル伝達については多くが判明しているが、NFRから共通共生経路を活性化させるシグナルは不明であり、菌根菌のシグナルであるMycファクターではなぜ根粒を作らないのかといった点など多くの研究課題がある。

Frankia

放線菌の一種であるグラム陽性菌*Frankia*は、宿主植物の根に根粒を形成し、窒素固定を行う (5)。*Frankia*は、前述の根粒菌と同様に宿主より光合成産物を受け取り、大気中の窒素分子をニトロゲナーゼにより還元し宿主植物に窒素養分として供給する。*Frankia*の宿主はアクチノリザル植物と呼ばれ、8科23属およそ300種が確認されている (5)。その内訳は、ブナ目 (*Fagales*) ではカバノキ科 (*Betulaceae*) のハンノキ属 (*Alnus*)、ヤマモモ科 (*Myricaceae*) のヤマモモ属 (*Myrica*)、モクマオウ科 (*Casuarinaceae*) のモクマオウ属 (*Casuarina*) など、バラ目 (*Rosales*) ではグミ科 (*Elaeagnaceae*) のグミ属 (*Elaeagnus*) など、ウリ目 (*Cucurbitales*) ではドクウツギ科 (*Coriariaceae*) ドクウツギ属 (*Coriaria*) といった木本植物である (45)。例外的にダティスカ科 (*Datisceae*) のダティスカ属 (*Datisca*) は草本植物である (45)。このように*Frankia*の宿主範囲はとても広いのが特徴である。

アクチノリザル植物は湿潤、乾燥、冷帯、熱帯地域を含め非常に広範囲に分布するため、*Frankia*の窒素固定量は共生窒素固定の中でも大きな割合を占めると思われる。ヤシャブシは植生遷移において、木本植物が侵入しにくい初期段階から生育するので、荒地回復に貢献している。

根への*Frankia*の感染様式は2タイプある。細胞内感染と細胞間感染である (64)。細胞内感染では*Frankia*は宿主の根毛から感染する (7)。アクチノリザル植物はマメ科植物と同様の共通共生経路を持ち (23)、感染初期に根毛変形を起こす場合がある。それは*Frankia*から分泌された物質によると考えられるが、現在のところ根毛変形に関わる物質は不明である (18)。*Frankia*は変形した根毛の細胞壁を貫通し、根の皮層細胞に菌糸を伸ばして侵入する。感染細胞に近接した皮層細胞は感染細胞から分離し、感染細胞は根粒原基を形成する。根粒原基は内鞘に向けて膨れ上がり成熟した根粒へと成長する。成

熟した根粒は窒素固定を開始する。一方、細胞間感染は*Elaeagnus*や*Discaria*,*Ceanothus*属の植物種で観察される。細胞間感染では変形根毛の感染糸からの*Frankia*の侵入は観察されていない (36) (35) (62)。

*Frankia*の細胞は3種の形態に分化する。菌糸、孢子嚢、そしてベシクルである (Fig. 1A)。菌糸は一般的な放線菌のように細胞が繊維状に連なり、一定の間隔をおいて分枝する。BAP-T液体培地 (32) で培養した*Frankia* sp. strain HFPCcI3 (CcI3株) の菌糸のサイズは幅約1 μm 、直径約2.4 μm である (Fig. 1B)。菌糸中の細胞同士は細胞隔壁で区分されている (Fig. 1B)。孢子嚢は孢子を内包する器官である。孢子形成は窒素やリン酸など生育に必須の養分が欠乏した環境で起こる。*Alnus*、*Comptonia*、*Myrica*の根粒中では*Frankia*は孢子を形成することがあるが (63) (37) (60)、他のアクチノリザル植物ではそのような現象は確認されていない (5)。ベシクルは窒素固定の場である。ベシクルの直径は酸素レベルに左右されるが、2~6 μm 程度である (51)。また、ベシクルを電子顕微鏡で観察したところ17から94の脂質多重膜に包まれていたことが分かった (20)。ベシクルの脂質多重膜の主な構成成分は2つある。ひとつはホパノイド脂質 (bacteriohopantetrol) であり、もうひとつはそのフェニル酢酸モノエステルである (8)。ホパノイド脂質はベシクルに特異的に見られる化合物ではなく、広くバクテリア界に存在する (42)。根粒中のベシクルは宿主により様々な形態を取る。例えば*Alnus*や*Elaeagnus*では多細胞の球状ベシクル、*Ceanothus*や*Dryas*では単細胞のベシクル、*Myrica*では多細胞の棍棒状のベシクル、*Coriaria*や*Datisca*では糸状のベシクルを形成する (6)。例外的に*Casuarina*や*Allocasuarina*の根粒中ではベシクルの形成は起こらない。ベシクル形成のしくみについてはよく分かっていない。

2007年に3株の*Frankia*でゲノムの全塩基配列が決定された (46)。*Casuarina glauca*から単離された*Frankia* sp. CcI3株のゲノムサイズは5.43 Mbpで4499の遺伝子を持つ。*Alnus crispa*から単離されたACN14a株のゲノムサイズは7.5 Mbpで6786の遺伝子を持つ。*Elaeagnus angustifolia*から単離されたEAN1pec株のゲノムサイズは9.03 Mbpで7976の遺伝子を持つ。これらのゲノムのGC含量は順に70.07%、72.83%、70.94%と他のバクテリアに比べて高い数値を示す。また近年ゲノムプロジェクトにより、*Elaeagnus umbellata*から単離されたEu1c株が8.82 Mbp (3)、*Elaeagnus angustifolia*から単離されたBMG5.12株が7.59 Mbp (47)、*Alnus nitida*から単離されたQA3株が7.59 Mbp (57)、*Discaria trinervis*から単離されたBUC110501株が7.89 Mbp (65)、*Coriaria nepalensis*から単離されたCN3株が9.96 Mbp (19)、*Casuarina cunninghamiana*とから単離されたCcI6株が5.58 Mbp (49)、*Elaeagnus umbellata*から単離されたEUN1f株が9.35 Mbp、北アメリカの森林土壌から単離されたIso899株が5.1 Mbpのゲノムサイズを持つことが判明している。

*Frankia*の形質転換

共生窒素固定という共通の能力を持つにも関わらず、*Frankia*と根粒菌は大きく異なる性質を持つ。しかし根粒菌とは対照的に、*Frankia*の共生についての遺伝子レベルでの知見は極めて少ない。その理由の一つは、*Frankia*では形質転換法が確立しておらず、遺伝子操作が困難だからである。遺伝子の機能解析には大きく分けて順遺伝学的手法と逆遺伝学的手法の2つがある。順遺伝学的手法は、まず窒素固定ができないなどといった特定の形質を示す変異体を単離する。変異体に形質転換により野生株のゲノムライブラリーを導入して変異表現型が相補された株を得る。そして相補株に導入されたゲノムライブラリークローンの塩基配列を解析し、変異部位を特定することでその変異表現型の原因となる遺伝子を同定する。逆遺伝学的手法は、相同性や発現パターン等から特定の生命現象に関わる遺伝子を予測し、相同組換えによる形質転換によりその遺伝子を破壊する。この変異株で対象の形質の異常が確認されれば、その遺伝子とその生命現象に関与することが証明できる。どちらもメジャーな分子遺

伝学的手法として広く用いられているが、*Frankia*では現在どちらも実施不可能である。順遺伝学的手法の問題点として、*Frankia*の菌糸は多細胞性であり、劣性の変異体の単離が困難であることがあげられる (61) (31)。さらにゲノムライブラリーの導入や、逆遺伝学的解析における遺伝子破壊には形質転換が必須であるが、その方法は確立されていない (5) (12) (39) (59) (38)。よって*Frankia*の分子遺伝学的解析のためには、形質転換法の確立が必須である。本章では*Frankia*の形質転換法の確立のため、遺伝子導入法、マーカー遺伝子、導入遺伝子の維持方法について検討した。これまでに、エレクトロポレーション法により*Frankia*細胞内へのプラスミド導入に成功したという報告があるが (12)、形質転換体の単離はできなかった。本研究において私は、*Casuarina*属や*Myrica*属の植物と共生するCcI3株の形質転換法の確立に取り組んだ。CcI3株の全ゲノム配列は決定されており (45)、そのサイズは約5.4 Mbで、4499のopen reading frame (ORF) を持つ。ゲノムのGC含量が70.1%と非常に高いため、プロモーター配列やコドン使用頻度の違いから一般的な選択マーカー遺伝子の発現が困難であると予想される。よって、*Frankia*自身の高発現遺伝子 (*infC*) のプロモーターをマーカー遺伝子の発現に用いた (32)。ターミネーターはCcI3株のホスフォセリンアミノトランスフェラーゼのものを用いた (32)。マーカー遺伝子にはコドン使用頻度が比較的CcI3株に近いenhanced green fluorescence protein遺伝子 (*eGFP*) やテトラサイクリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、同義コドンの使用頻度をCcI3株に最適化した人工合成ゲンタマイシン耐性遺伝子 (33) を用いた。

選択マーカー遺伝子の選択

ほとんどのアミノ酸はそれをコードする複数の同義コドンを持つ。しかし生物種によって同義コドンの使用頻度には偏りがある (58)。使用頻度の低い同義コドンに対応するtRNAの発現量は低いことが知られている。よって形質転換に用いるマーカー遺伝子のコドン使用頻度は対象の生物に近いことが望ましい。当研究室で所有する抗生物質耐性遺伝子のうち、ハイグロマイシン、カナマイシン耐性遺伝子はCcI3株のリボソームタンパク質遺伝子に対して比較的高いCAIを示した (Table 1)。しかしCcI3株はハイグロマイシン、カナマイシンに耐性を持つのでこれらを使用することはできなかった。蛍光は観察が容易なので、蛍光マーカー遺伝子の使用は形質転換の成否を短時間で判別できる。*eGFP*は放線菌で発現した実績のある蛍光マーカー遺伝子で、CcI3株ともコドン使用の類似度が高く、発現が期待された。これらの理由から本実験では*eGFP*、テトラサイクリン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として使用した。

*Frankia*に導入した外来遺伝子は5日で分解されることが報告されている (12)。プラスミドを持つ*Frankia*は存在するが (44)、それを用いた形質転換も成功しなかった (12)。よって私は外来遺伝子の維持には染色体への導入が適していると判断した。CcI3株染色体へのマーカー遺伝子の挿入は相同組換えによって試みた。マーカー遺伝子の挿入部位は遺伝子間領域であり、形質転換によるCcI3株の遺伝子に対する影響はないと考えられた。

*eGFP*を用いた形質転換

*eGFP*は蛍光マーカー遺伝子である (11)。私はCcI3株のtranslation initiation factor 3 (Franci3_3182) 遺伝子 (*infC*) のプロモーターを*eGFP*遺伝子に連結した。翻訳に関わる*infC*のプロモーターは活性が高いと考えられ、GFP蛍光の観察を容易にすると期待された。上流の遺伝子の終止コドンから*infC*遺伝子の開始コドン直前までをプロモーター領域として選択した。しかしゲノムプロジェクトにより予測された*infC*遺伝子の開始コドンGTGの27 bp下流にも開始コドンとして機能しうるGTGが確認された (Fig. 2)。よって上流の遺伝子の終始コドンの直後から1つ目の*infC*のGTGコドンまでの配列をP_{infC-S}、それ

より27 bp長い、2つ目のGTGコドンまでの配列をP_{infC-1}とした (32)。それぞれのプロモーター領域を*eGFP*に連結し、形質転換用コンストラクトpKKF1およびpKKF2を作製した。形質転換用コンストラクトのマーカ―遺伝子は相同組換えにより遺伝子間領域 (Franci3_1696 とFranci3_1697の間) に組み込まれるよう、上流と下流にそれぞれ4 kbの相同組換え用アームを付加した (32)。これらをエレクトロポレーション法によりCcI3株に導入し36時間後に観察したが、蛍光は見られなかった。RT-PCRにより*eGFP*の転写産物が検出されたことから今回のエレクトロポレーションの条件で細胞内にコンストラクトDNAは導入され、マーカ―遺伝子は転写されていることが分かった (Fig. 3)。それにもかかわらずGFP蛍光が検出されなかった理由として、タンパク質の蓄積量が十分ではなかったのではないかと考えた。

テトラサイクリン耐性遺伝子を用いた形質転換

CcI3株はテトラサイクリンに感受性であり、BAP-T液体培地では5 µg / mLのテトラサイクリンにより生育は阻害される。P_{infC-s} と*tet^R*を連結した融合マーカ―遺伝子を含むコンストラクトDNA形質転換用コンストラクトDNA pKKF3と、P_{infC-1} と*tet^R*を連結した形質転換用コンストラクトpKKF4をエレクトロポレーションによりCcI3株に導入した (32)。この操作を行ったCcI3株の細胞をそれぞれKKF3およびKKF4と定義した。同時にコンストラクトDNAを用いずにエレクトロポレーションを施したコントロール実験も行った (no DNA)。5 µg / mLのテトラサイクリンを含むBAP-T液体培地で24~33日間培養したところ、KKF3の菌濃度はno DNAの菌濃度と有意な差は示さなかった。一方、KKF4はno DNAやKKF3に比べ有意に高い菌体濃度まで増殖した (Fig. 4A)。これは、pKKF3のプロモーターはpKKF4のものより27 bp短く (Fig. 2)、本来の転写開始点を含んでいないからだと考えられた。この結果よりP_{infC-1}は*Frankia*細胞内で転写および翻訳活性を示すことがわかった。選択培地中で生育した細胞からゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型としてPCR法によりマーカ―遺伝子の有無を確認した。この結果、KKF3およびKKF4では期待されるサイズのバンドが検出され、細胞中にマーカ―遺伝子が存在することが確認された (Fig. 4B)。 *tet^R*が相同組換えによりCcI3株の染色体に挿入されているかを確認するため、相同組換えに用いた染色体領域の42 bp上流にアニールするプライマーと (LAout)、 *tet^R*にアニールするプライマー (Tet-f2) を用いたPCRを行った (Fig. 5A)。相同組換えによりマーカ―遺伝子が染色体に挿入されていた場合、このPCRにより4.2 kbのシグナルが得られる。PCRの結果、KKF3とKKF4の両方で予測された4.2 kbのシグナルが得られた (Fig. 5B)。これらの形質転換細胞を新たな抗生物質入りの液体培地で継代培養したところ、いずれも野生株細胞 (WT) と比べ有意に濃い濃度で増殖した。しかし細胞内のマーカ―遺伝子の量は1細胞あたり1コピー以下に減少していた (Fig. 6A)。次に、KKF4から抽出したゲノムDNAを用いて*tet^R*をプローブとしてサザンブロット解析を試みた。AscIとPstI-KpnIによる消化はpKKF4の外側の染色体部位を切断し、pKKF4が染色体に挿入されている場合それぞれ7.6 kb、12.2 kbのシグナルが得られると期待される (Fig. 7A)。一方PuvIIはマーカ―遺伝子の両端を切断し、pKKF4の染色体への導入の有無にかかわらず2.2 kbのシグナルが得られる。しかしAscIとPstI-KpnIで消化したKKF4ゲノムでは、期待された位置にバンドは得られず、スメアーなシグナルが検出された。PuvIIで消化したKKF4ゲノムもスメアーなシグナルを示したが、2.2 kbのバンドも検出され、完全長の*tet^R*遺伝子が存在することが確認された。以上の結果より相同組換えによる染色体へのマーカ―遺伝子の挿入はほとんど起こっておらず、細胞に導入された形質転換用コンストラクトは様々なサイズに分解されたことがわかった (Fig. 7B)。

KKF3およびKKF4は一過的ではあるが抗生物質耐性を示したことから、*tet^R*はマーカ―遺伝子として

有用である。しかし継代培養で増殖した細胞のごく一部にしか tet^R は含まれなかったことから、細胞質に残存したプラスミドDNA由来の抗生物質耐性遺伝子が発現した可能性や (Fig. 7)、spontaneous mutantが出現した可能性が考えられた。またFrankiaは細胞同士が連結しているため、耐性遺伝子の翻訳産物が細胞間を伝播し、マーカー遺伝子を持たない細胞も抗生物質耐性を獲得した可能性も考えられる。

ゲンタマイシン耐性遺伝子を用いた形質転換

CcI3株はゲンタマイシンに感受性であり、BAP-T液体培地では75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシンにより生育は阻害される。P_{infC-s}と gm^R とを連結した融合マーカー遺伝子を含むコンストラクトDNA pKKF5と、P_{infC-1}と gm^R とを連結した融合マーカー遺伝子を含むコンストラクトDNAであるpKKF6をエレクトロポレーションによりCcI3株に導入した (32)。この操作を行ったCcI3株の細胞をそれぞれKKF5およびKKF6と定義した。75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゲンタマイシンを含むBAP-T液体培地で19日間培養したところ、1回の実験においてKKF5およびKKF6はno DNAに比べ高い菌濃度で増殖した。しかし以降同様の実験を4回行ったが、再現性は得られなかった (Fig. 8A)。これは gm^R のCAIが tet^R より低いために翻訳効率が低く、十分なゲンタマイシン耐性タンパク質が蓄積しなかったことが原因と考えられた。よって gm^R はマーカー遺伝子として用いることは難しいと考えられた。選択培地中で増殖した細胞からゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCR法によりマーカー遺伝子の有無を確認した。KKF6のゲノム抽出は失敗したため以後の実験はKKF5でのみ行った。この結果、KKF5の細胞中にマーカー遺伝子が存在することが確認された (Fig. 8B)。 gm^R が相同組換えによりCcI3株のゲノムに導入されているかを確認するため、相同組換えに用いた染色体領域の42 bp上流にアニールするプライマー (LAout) と、 gm^R にアニールするプライマー (Gm-f2)を用いたPCRを行った (Fig. 5A)。その結果、期待されたサイズの断片の増幅がみられた (Fig. 5C)。また、KKF5を新たな抗生物質入りの液体培地で継代培養したところ、WTと比べ有意に早く増殖した。しかし細胞内のマーカー遺伝子の量は1細胞あたり1コピー以下に減少していた (Fig. 6B) ことから (Fig. 6B)、やはり相同組換えによる形質転換は困難と思われた。ゲンタマイシンは原核生物のリボソームの30Sサブユニットに結合し、タンパク質の合成を阻害する (69)。選択培地中に存在する非形質転換細胞の一部が、リボソームのゲンタマイシン結合部位に変異を起こし、ゲンタマイシンに耐性を持った可能性が考えられる。これらの細胞は形質転換細胞より高い抗生物質耐性を持ち、選択培地中でより早く増殖したと思われる。ゆえに継代培養時に形質転換体が相対的に減少したのではないかと考えられた。

コドン使用頻度をCcI3株に最適化したマーカー遺伝子

継代培養中に、自然の突然変異によりマーカー遺伝子を持たずに抗生物質耐性を獲得した細胞

(spontaneous resistant) が出現すると考えられた。spontaneous resistantはマーカー遺伝子をもつ細胞より早く増殖し、その結果マーカー遺伝子を持つ形質転換細胞が培養液中で相対的に減少したと考えられた。マーカー遺伝子の抗生物質耐性をspontaneous resistantの抗生物質耐性より高めれば、継代培養による形質転換細胞の減少を回避できるかもしれないと考えた。そこで gm^R の178コドンのうち、107コドンをCcI3株で1番目または2番目に多く用いられている同義コドンに変換した人工合成遺伝子 fgm^R を作製した (Fig. 9)。 fgm^R のCAIは当研究室が所有する抗生物質耐性遺伝子の中で最も高い値0.825 (33)を示した (Table 1)。 fgm^R をP_{infC-1}と連結した融合遺伝子を含む形質転換用コンストラクトpKKF9を作製した。pKKF9とコドン未変換の gm^R を含むpKKF6とをエレクトロポレーションによりCcI3株に導入し、ゲンタマイシンを含む液体培地中で14~42日間培養した。その結果、pKKF9ではpKKF6と比べ、形質

転換成功率および選択培地中での生育ともに有意な向上が見られた (Fig. 10)。このことから、コドン使用頻度を *Frankia* に最適化したマーカー遺伝子を用いることで、*Frankia* により高い抗生物質耐性を付与できることが分かった。この原因は、コドン使用頻度の最適化により *Frankia* 細胞内でのマーカー遺伝子の翻訳効率が高まったことにあると考えられた。

しかし、*fgm^R* を用いても、継代培養によるマーカー遺伝子の減少は避けられなかった。また、サザンブロット解析では、染色体上には *fgm^R* 由来のシグナルはほとんど確認されなかったことから、相同組換えの効率は低く、染色体にマーカー遺伝子が導入された細胞はまれであったと考えられる。それにもかかわらずゲンタマイシンに対し耐性を示す細胞が出現したのは *tet^R* と同様の理由が考えられる (Fig. 7)。

高発現遺伝子の予測とそのプロモーターの利用

マーカー遺伝子に連結するプロモーターをより活性の高いものに代えることにより、マーカー遺伝子の抗生物質耐性を高めようと試みた。転写活性の高いプロモーターを探索するため、free living 状態の *Frankia alni* ACN14a 株のマイクロアレイデータを利用した (1)。マイクロアレイのシグナル値が高い遺伝子のプロモーター活性は高いと予想した。このマイクロアレイデータにおいて、*infC* は 61 番目に高いシグナル値を示した (Table 2)。よってシグナル値が 1 番目から 60 番目までの遺伝子に着目し、それらの遺伝子地図を作成した。この遺伝子地図を参考にして転写単位 (オペロンまたは単独遺伝子) の先頭に位置する遺伝子を選択した。このような遺伝子の upstream にはプロモーターが存在すると期待される。これらの遺伝子に対してノーザンブロット解析を行った結果、FRAAL3771、FRAAL4031、FRAAL5161 の 3 遺伝子において予測通りの転写単位を構成することが確認できた (41) (Fig. 11)。これら 3 遺伝子のプロモーター領域を *tet^R* と連結した新たな形質転換用コンストラクトを作製し、それぞれ pKKF10、pKKF11、pKKF12 とした。これらをエレクトロポレーション法により CcI3 株に導入し、テトラサイクリンを含む液体培地中で 34~58 日間培養した。その結果、いずれの形質転換体でも増殖が見られたが、pKKF4 と比べ形質転換の成功率および選択培地での菌体濃度に有意な向上は見られなかった (Fig. 12)。それほど転写活性が高くないプロモーターを持つ遺伝子でも、転写産物の分解速度が遅ければ、蓄積量が増加して高いシグナル値を示す可能性がある。よって高シグナル値を示した遺伝子が必ずしも高発現プロモーターをもつとは限らない。今回の実験で用いたプロモーターは、このような理由から高い転写活性を有していなかったのかもしれない。もしくは *P_{infC-1}* の活性は既にマーカー遺伝子の発現に十分であり、高発現プロモーターを用いても有意な差が見られなかったのかもしれない。

Frankia のプロトプラスト化

第二章で様々な手法を用いて形質転換を試みたが、安定な形質転換体を得ることはできなかった。その原因の一つとして遺伝子導入の効率が低いことが考えられる。*Frankia* はグラム陽性菌なので細胞壁が厚く、細胞穿孔が困難かもしれない。また菌糸が先端生長するため、先端の細胞以外にマーカー遺伝子が導入されてもほとんど増殖しないため、表現型が観察されないことも考えられる。遺伝子導入効率は、細胞壁の除去もしくは弱化を行うことで改善されるかもしれない。一般的に放線菌では、胞子や細胞のプロトプラスト化により菌糸を単細胞化する。*Frankia* のプロトプラスト化は報告があるが (61)、CcI3 株では成功していない。そこで私は、CcI3 株の菌糸の細胞壁を弱化するための培養条件や、他の放線菌で実績のある様々な細胞壁溶解酵素を検討し、細胞のプロトプラスト化を目指した。

グリシンを含むBAP-Tでの培養

*Frankia*の培養時にグリシンを加えると菌糸の細胞壁の強度が低下し、加水分解酵素に対する感受性が高まるという報告がある (61)。私はCcI3株をBAP-T液体培地と0.1%のグリシンを添加したBAP-T培地でそれぞれ培養し、菌糸に与える影響を調べた。グリシンを含むBAP-T液体培地においてCcI3株は増殖速度が遅く、菌糸も短かった (Fig. 13)。一方、グリシンの濃度が0.3%になると生育がほとんど見られず、十分な菌濃度を得ることは困難だった。以上の結果より、CcI3株においてプロトプラストを得るために最適なグリシン濃度は0.1%であると結論した。

酵素の検討

LysozymeとLabiaseでは細胞壁の分解が確認されたが、Achromopeptidaseではほとんど観察されなかった (Fig. 14)。しかしいずれの酵素を用いた場合でも明視野でのプロトプラストの観察は困難だった。そこで以降はDAPI染色によりプロトプラストを観察した。次に、培養液のグリシン濃度の、酵素による細胞壁分解への影響を調べた。グリシンを含まないBAP-T液体培地で培養したCcI3株細胞を、LysozymeまたはLabiaseで処理し、DAPI染色により観察したところ、プロトプラスト状の細胞が見られた (Fig. 15)。しかし細胞壁の分解度合いは両酵素とも酵素を用いないコントロールと比べて大きな差はなかった (Fig. 15)。0.1%のグリシンを含むBAP-Tで培養したCcI3株細胞をLysozymeまたはLabiaseで処理した時、最も多くのプロトプラスト状の細胞が観察された (Fig. 16)。0.3%のグリシンを含むBAP-Tで培養したCcI3株細胞を用いた場合、プロトプラストの数は0.1%のグリシンを含むBAP-Tで培養した場合に比べ減少した。一方Achromopeptidaseを用いた実験では、0.3%のグリシンを含むBAP-Tで培養したCcI3株細胞を用いた時に最も細胞壁が分解されていた (Fig. 16)。しかしこの培地においてCcI3株の生育速度は著しく低下した。CcI3株の細胞壁を分解する能力は、Labiaseが最も高いと思われる。しかしながらフィルターろ過後のろ液中には球状細胞は観察されなかった。ろ過時の遠心力が強すぎたか、培地の浸透圧が適してなかったのかもしれない。

プロトプラストのリジェネレーション

菌糸を完全に分解することはできなかったため、フィルターろ過により未消化の菌糸を除去した。ろ液をDAPI染色し、顕微鏡で観察したところ、菌糸は除かれたがプロトプラスト状の細胞はほとんど観察されなかった。ろ液を固体培地に滴下して培養したが、コロニーは得られなかった。*Frankia*のプロトプラストからのリジェネレーションにはtop agar法が用いられてきた (61)。しかし私は以前、CcI3株のtop agar法による培養を試みたが効率よくコロニーを得ることができなかった。そこで酵素処理した細胞は、フィルターで透過したあとにtop agarを用いずに直接CB培地に塗布した。菌糸の場合は、この培養方法でtop agar法と同等かそれ以上のコロニーが出現する。しかしコロニーを得ることはできなかった。ろ液にプロトプラストと思われる球状細胞がほとんど確認されなかったことから、ろ過中にプロトプラストが破壊されたのかもしれない。よってフィルターろ過により未消化の菌糸を除くのは困難である。他の菌糸の除去法として、コットンを用いたろ過法がある (48)。今後の実験ではこの方法を用いるのが良いのかもしれない。また、菌糸除去後の細胞懸濁液には細胞壁溶解酵素が多く含まれ、生育を阻害するおそれがある。top agar法を用いることで濾液中の酵素の濃度を薄め、細胞を保護することができるかと期待される。ゆえにプロトプラストのリジェネレーションを行うためにはtop agar法の確立が必要と思われる。

Frankiaの変異体の単離

CcI3株の相同組換えによる形質転換を試みたが成功には至らなかった。よってFrankiaの窒素固定や共生に関わる遺伝子を逆遺伝学的手法によって同定することは現状では難しい。そこで私は順遺伝学によりこれらの遺伝子を同定することを試みることにした。近年開発された次世代シーケンサーにより、生物のゲノム配列を短時間で決定することが可能となった。まず窒素固定や共生に異常を示すFrankiaの変異体を単離し、変異株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより決定する。そしてそれを野生株の配列と比較し、変異を持つ遺伝子を特定する。それらに対応する野生型の遺伝子を変異株に形質転換し変異表現型を相補する遺伝子を特定することで、変異原因遺伝子の同定が可能である。しかし現時点でFrankiaの変異体の単離法は確立されていない。機能獲得 (gain-of-function) 型の変異体を得たという報告はいくつかあるが (40)、機能欠失 (loss-of-function) 型の変異体の単離例はない。なぜならFrankiaは多細胞性の菌糸として生長するので、変異処理後の菌糸断片には変異細胞と野生型の細胞が混在しており、変異表現型が隠れてしまうからである。一般的な放線菌では、プロトプラストや胞子を用いて菌糸を単細胞化することでこの問題を解決する。いくつかのFrankia株で細胞のプロトプラスト化や胞子の発芽が報告されている (10, 61)。しかしCcI3株ではどちらも成功していない。

この章では、胞子やプロトプラストを用いることなく、単一の変異遺伝子型の細胞からなる菌糸を得る方法を開発し、loss-of-function型の変異体を得ることを試みた。

Loss-of-function型変異体の単離

Frankiaは多細胞性の菌糸として生育する。よって劣性を示すloss-of-function 型の変異細胞の表現型は、隣接する野生型細胞の優性の表現型に被り覆されてしまい、観察できない。それ故、loss-of-function型の変異体を単離するには、単一の変異遺伝子型の細胞のみで構成された菌糸断片を得なくてはならない。このような菌糸断片を得るため、私はFrankiaの菌糸が先端生長する特性に着目した。超音波により断片化された菌糸を変異処理し、一定時間液体培地で培養した。変異した菌糸先端の細胞は細胞分裂を起こし複製される。この操作により菌糸先端に同一の遺伝子型を持つ細胞が連なった状態を作り出すことができる。超音波処理によりこれらの菌糸を再び断片化した。各断片化細胞をポアサイズ5 μm のフィルターでろ過し、短く断片化された細胞を回収した。このろ過には、同一変異遺伝子型の細胞のみからなる菌糸断片が濃縮されていると期待される。

ろ過された菌糸断片の長さは大半が8から12 μm だった。CcI3株1細胞の長さはおよそ2.4 μm なので、ろ過後の菌糸断片に含まれる細胞数は3~5細胞と見積もられた。この操作により単一遺伝子型の菌糸断片が得られたかどうかを確認するため、ろ過菌液をCB固体培地で培養しコロニーを形成させた。13のコロニーからゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーで全塩基配列を解析した。13のコロニーのうち、9つは特定の変異表現型が見られなかったものを選んだ。残りの4つは変異表現型を示すものを選んだ (6A1、shiro1、shiro2、shiro3、後述)。いずれのコロニーにおいてもゲノムの約200回カバレッジ相当のシーケンスデータを得た。その結果、全てのコロニーにおいて、ほぼ全てのリードが変異塩基を示す塩基置換が見つかった (Table 3)。ごく一部のリードはWT型の塩基を示したが (Table 3)、これらは塩基配列の解析に伴うランダムエラーによるものと推測された。ゲノムあたりの変異の数は株により9~20だった。それぞれの株で2~15の独自の変異塩基が検出された (Fig. 17)。一方、予期していなかったことだが、複数の株において同一の変異が検出されることがあった (Fig. 17)。次世代シーケンサーの結果を確認するため、特異的なプライマー (Table 9) を用いて変異塩基の周辺領域をPCRにより増幅し、増幅断片を鋳型としてサンガー法によるシーケ

ンスを行った (55)。サンガーシーケンスにより確認した10コロニー中の38の塩基において、次世代シーケンサーの結果と全く同じ変異が検出された。重要なことに、サンガーシーケンスの波形データは変異塩基以外のシグナルを示さなかったことから、これらのコロニーは単一遺伝子型の細胞で構成されていると考えられた。

Loss-of-function型変異体の単離の1つの試みとして、私は窒素固定変異体のスクリーニングを行った。2,400コロニーをCB最少液体培地とCBminN-固体培地で培養した。3回のスクリーニングの後、私は6A1というCBminN-培地においてWTより増殖の遅い変異株を得た。WTと6A1を、アンモニアを含む培地 (CB最少液体培地) とアンモニアを含まない培地 (CBminN-液体培地) で培養し、生育速度を比較する実験を3回行った。そのうち1回は、CB最少液体培地では両株とも同程度に増殖し、CBminN-液体培地では6A1の増殖速度はWTより低かった。しかし残りの2回において、6A1の増殖速度はCB最少液体培地ではWTの半分程度であり、CBminN-液体培地中ではWTとほぼ同等だった。一方、CBminN-液体培地における窒素固定活性 (ARA) は、6A1株が有意にWTより低い値を示した。

CcI3株はCB培地において茶色の色素を合成する。2,400のコロニーのうち色素を合成しないコロニーが3つ見つかった (*shiro1*, *shiro2*, *shiro3*)。 *shiro1*と*shiro2*はEMSで処理した細胞から、*shiro3*はプロフラビンで処理した細胞から得られた。これらの形質は継代培養を行っても安定に受け継がれた。これら結果より、私が開発した方法は、単一遺伝子型の細胞からなる菌糸断片を得て、Loss-of-function型変異体を単離するために有用な方法であることがわかった。

選択圧のない培地で培養し、特定の表現型を示さない9つのコロニーを選択したにもかかわらず、その全てのゲノムに変異が確認された (Fig. 17)。このように高頻度で変異体コロニーが得られたことから、変異原処理によりほとんどの細胞に突然変異が引き起こされたと考えられる。原理的に、私の実験方法はヘテロな遺伝子型のコロニーを完全に除外できるわけではない。しかし解析した9個のコロニーにおいて、ヘテロな遺伝子型のコロニーは見つからず、すべて単一遺伝子型の細胞で構成されていた (Table 3)。変異処理したもともとの菌糸の長さに対する、先端で新たに伸長した同一遺伝子型の菌糸の長さの比が高いと、同一遺伝子型のコロニーが得られやすい。今回の実験で得られたコロニーには複数の遺伝子型を持つものは確認されなかったもので、その比の値は十分実用的なレベルで単一遺伝子型の菌糸が得られる程度の高さだったと思われる。加えて、選択圧を与えなくともこのような単一遺伝子型のコロニーが得られたことから、*Frankia*の菌糸は*Streptomyces*と違い多核細胞でないと考えられた (24)。

2,400の変異処理コロニーから、私は4つの変異体を単離した。そのうち3つ (*shiro1*, *shiro2*, *shiro3*) は細胞の色が白色になった色素異常変異体だった。液体培地で3回以上継代培養を行ってもこの形質は維持された。色素異常変異株の結果は、私が開発した断片化ろ過法が単一遺伝子型の菌糸を濃縮できることを示す強力な証拠である。もう1つの変異体6A1株は、アンモニア欠乏培地において増殖速度とARAがWTより低下した株である。しかしどちらの形質も完全に失われたわけではなかった (Fig. 17)。6A1株に起こった窒素固定に関する変異は致命的でなく、変異した遺伝子でも本質的な機能は保たれているのだろう。

shiro1, *shiro2*, *shiro3*株の色素合成に関する既知遺伝子および、6A1株の窒素固定に関する既知遺伝子には変異は確認されなかった (Table 3)。 *shiro1*と*shiro2*は、*Francci3_2727*と*Francci3_2745*遺伝子に共通した変異を持つことから、これらの遺伝子が色素合成に関わる可能性がある。*Frankia*にはメラニン色素を合成する株が確認されており (70)、CcI3株の色素もメラニン由来である可能性がある。

*Francci3_2745*はlysylphosphatidylglycerol生合成遺伝子としてアノテーションされている。このタンパク質はメラニン合成に関わっているかもしれない。一方6A1株においては、SOLiDで検出されなかった変異が窒素固定能の低下に関与しているのかもしれない。もしくは変異は全て検出されたが、検出された6A1株の変異した遺伝子が間接的に窒素固定に関わるものだった可能性もある。これらの仮説の検証のため、今後は更に多くの窒素固定変異体を本方法でスクリーニングする必要がある。

多くの場合、loss-of-function型変異体、例えば窒素固定変異体や共生変異体は生育に不利な表現型を示すため、単離が困難である。しかし私が開発した方法を用いればこのようなloss-of-function型変異体や表現型を示さないサイレント変異体を単離できるだろう。この結果、*Frankia*のようにモデル化されていない生物の分子遺伝学的解析に大きな進展をもたらすことが期待される。

Reference

1. Alloisio, N., C. Queiroux, P. Fournier, P. Pujic, P. Normand, D. Vallenet, C. Medigue, M. Yamaura, K. Kakoi, and K. Kucho. 2010. The *Frankia alni* symbiotic transcriptome. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:593-607.
2. Amin, A.R., M.G. Attur, G.D. Thakker, P.D. Patel, P.R. Vyas, R.N. Patel, I.R. Patel, and S.B. Abramson. 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14014-14019.
3. Baker, D., W. Newcomb, and J.G. Torrey. 1980. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. EuI1 (Actinomycetales). *Can. J. Microbiol.* 26:1072-1089.
4. Baltz, R.H. 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* 107:93-102.
5. Benson, D.R., and W.B. Silvester. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57:293-319.
6. Berg, R.H. 1999. Cytoplasmic bridge formation in the nodule apex of actinorhizal root nodules. *Can. J. Bot.* 77:1351-1357.
7. Berry, A.M., L. McIntyre, and M.E. McCully. 1986. Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. *Can. J. Bot.* 64:292-305.
8. Berry, A.M., O.T. Harriott, R.A. Moreau, S.F. Osman, D.R. Benson, and A.D. Jones. 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:6091-6094.
9. Brenner, S., L. Barnett, and F.H.C. Crick. 1961. The theory of mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 3:121-124.
10. Burleigh, S.H., and J.O. Dawson. 1991. *In vitro* sporulation of *Frankia* strain HFPCc13 from *Casuarina cunninghamiana*. *Can. J. Microbiol.* 37:897-901.
11. Cormack, B.P., G. Bertram, M. Egerton, N.A. Gow, S. Falkow, and A.J. Brown. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143:303-311.
12. Cournoyer, B., and P. Normand. 1992. Electroporation of *Frankia* intact cells to plasmid DNA. *Acta Oecologica* 13:369-378.

13. Curatti, L., J.A. Hernandez, R.Y. Igarashi, B. Soboh, D. Zhao, and L.M. Rubio. 2007. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:17626-17631.
14. Deguchi, T. 2010. *Frankia*で機能するレポーター遺伝子の開発. 鹿児島大学, 卒業論文.
15. Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56:340-373.
16. Gentili, F., L.G. Wall, and K. Huss-Danell. 2006. Effects of phosphorus and nitrogen on nodulation are seen already at the stage of early cortical cell divisions in *Alnus incana*. *Ann. Bot.* 98:309-315.
17. Georgiadis, M.M., H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J.J. Kornuc, and D.C. Rees. 1992. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* 257:1653-1659.
18. Ghelue, M.V., E. Løvaas, E. Ringø, and B. Solheim. 1997. Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain ArI3. Production and specificity of root hair deformation factor (s). *Physiol. Plant.* 99:579-587.
19. Ghodhbane-Gtari, F., N. Beauchemin, D. Bruce, *et al.* 2013. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain CN3, an atypical, noninfective (Nod-) ineffective (Fix-) isolate from *Coriaria nepalensis*. *Genome Announc.* 1:e0008513.
20. Harriott, O.T., L. Khairallah, and D.R. Benson. 1991. Isolation and structure of the lipid envelopes from the nitrogen-fixing vesicles of *Frankia* sp. strain CpI1. *J. Bacteriol.* 173:2061-2067.
21. Hiraga, S. 1976. Novel F prime factors able to replicate in *Escherichia coli* Hfr strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:198-202.
22. Hirsch, A.M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
23. Hocher, V., N. Alloisio, F. Auguy, *et al.* 2011. Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiol.* 156:700-711.
24. Hopwood, D.A. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* 40:1-23.
25. Iwashita, M. 2009. コドン使用頻度を最適化したマーカー遺伝子を用いた共生窒素固定細菌 *Frankia* の形質転換. 鹿児島大学, 卒業論文.
26. Kakoi, K., M. Yamaura, T. Kamiharai, D. Tamari, M. Abe, T. Uchiumi, and K.I. Kucho. 2013. Isolation of Mutants of the Nitrogen-Fixing Actinomycete *Frankia*. *Microbes Environ.*
27. Kamiharai, A. 2012. インテグラーゼと接合を用いたフランキアの形質転換. 鹿児島大学, 卒業論文.
28. Kasap, M., and J.S. Chen. 2005. *Clostridium pasteurianum* W5 synthesizes two NifH-related polypeptides under nitrogen-fixing conditions. *Microbiology* 151:2353-2362.
29. Kavanagh, E.P., and S. Hill. 1993. Oxygen inhibition of nitrogenase activity in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 139 Pt 6:1307-1314.
30. Kim, B.H., and G.M. Gadd. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. Cambridge University press. Cambridge.
31. Krumholz, G.D., M.S. Chval, M.J. McBride, and L.S. Tisa. 2003. Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant Soil* 254:57-67.

32. Kucho, K., K. Kakoi, M. Yamaura, S. Higashi, T. Uchiumi, and M. Abe. 2009. Transient transformation of *Frankia* by fusion marker genes in liquid culture. *Microbes Environ.* 24:231-240.
33. Kucho, K., K. Kakoi, M. Yamaura, M. Iwashita, M. Abe, and T. Uchiumi. 2013. Codon-optimized antibiotic resistance gene improves efficiency of transient transformation in *Frankia*. *J. Biosci.* 38:713-717.
34. Kumar, K., R.A. Mella-Herrera, and J.W. Golden. 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000315.
35. Liu, Q., and A.M. Berry. 1991. Localization and characterization of pectic polysaccharides in roots and root nodules of *Ceanothus* spp. during intercellular infection by *Frankia*. *Protoplasma* 163:93-101.
36. Miller, I.M., and D.D. Baker. 1986. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. *Protoplasma* 131:82-91.
37. Monz, C.A., and C.R. Schwintzer. 1989. The physiology of spore-negative and spore-positive nodules of *Myrica* gale. *Plant Soil* 118:75-87.
38. Mullin, B.C., and C.S. An. 1990. The molecular genetics of *Frankia*, p. 195-214. In Schwintzer CR, Tjepkema JD (ed.), *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press, San Diego.
39. Myers, A.K., and L.S. Tisa. 2003. Effect of electroporation conditions on cell viability of *Frankia* Eu11c. *Plant Soil* 254:83-88.
40. Myers, A.K., and L.S. Tisa. 2004. Isolation of antibiotic-resistant and antimetabolite-resistant mutants of *Frankia* strains Eul1c and Cc1.17. *Can. J. Microbiol.* 50:261-267.
41. Nakanishi, Y. 2009. 共生窒素固定細菌*Frankia*の高転写活性プロモーターの探索. 鹿児島大学, 卒業論文.
42. Nalin, R., S.R. Putra, A.M. Domenach, M. Rohmer, F. Gourbiere, and A.M. Berry. 2000. High hopanoid/total lipids ratio in *Frankia* mycelia is not related to the nitrogen status. *Microbiology* 146:3013-3019.
43. Nicolaisen, K., A. Hahn, and E. Schleiff. 2009. The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC7120. *J. Basic Microbiol.* 49:5-24.
44. Normand, P., J.A. Downie, A.W. Johnston, T. Kieser, and M. Lalonde. 1985. Cloning of a multicopy plasmid from the actinorhizad nitrogen-fixing bacterium *Frankia* sp. and determination of its restriction map. *Gene* 34:367-370.
45. Normand, P., P. Lapiere, L.S. Tisa, *et al.* 2007. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.* 17:7-15.
46. Normand, P., C. Queiroux, L.S. Tisa, D.R. Benson, Z. Rouy, S. Cruveiller, and C. Médigue. 2007. Exploring the genomes of *Frankia*. *Physiol. Plant.* 130:331-343.
47. Nouioui, I., N. Beauchemin, M.N. Cantor, *et al.* 2013. Draft Genome Sequence of *Frankia* sp. Strain BMG5.12, a Nitrogen-Fixing Actinobacterium Isolated from Tunisian Soils. *Genome Announc.* 1.
48. Okanishi, M., K. Suzuki, and H. Umezawa. 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* 80:389-400.

49. Oshone, R., S.R. Mansour, and L.S. Tisa. 2013. Effect of salt stress on the physiology of *Frankia* sp strain CcI6. *J Biosci* 38:699-702.
50. Ott, T., J.T. van Dongen, C. Gunther, L. Krusell, G. Desbrosses, H. Vigeolas, V. Bock, T. Czechowski, P. Geigenberger, and M.K. Udvardi. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15:531-535.
51. Parsons, R., W.B. Silvester, S. Harris, W.T. Gruijters, and S. Bullivant. 1987. *Frankia* vesicles provide inducible and absolute oxygen protection for nitrogenase. *Plant Physiol.* 83:728-731.
52. Phornphisutthimas, S., N. Sudtachat, C. Bunyoo, P. Chotewutmontri, B. Panijpan, and A. Thamchaipenet. 2010. Development of an intergeneric conjugal transfer system for rimocidin-producing *Streptomyces rimosus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 50:530-536.
53. Ratan, A., W. Miller, J. Guillory, J. Stinson, S. Seshagiri, and S.C. Schuster. 2013. Comparison of sequencing platforms for single nucleotide variant calls in a human sample. *PLoS One* 8:e55089.
54. Sabra, W., A.P. Zeng, H. Lunsdorf, and W.D. Deckwer. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4037-4044.
55. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:5463-5467.
56. Seefeldt, L.C., B.M. Hoffman, and D.R. Dean. 2009. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* 78:701-722.
57. Sen, A., N. Beauchemin, D. Bruce, *et al.* 2013. Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain QA3, a nitrogen-fixing actinobacterium isolated from the root nodule of *Alnus nitida*. *Genome Announc.* 1:e0010313.
58. Sharp, P.M., and W.H. Li. 1987. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 15:1281-1295.
59. Simonet, P., P. Normand, A.M. Hirsch, and A.D.L. Akkermans. 1990. The genetics of the *Frankia*-actinorhizal symbiosis, p. 77-109. *In* Gresshoff PM (ed.), *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. CRC Press, Boca Raton.
60. Simonet, P., M. Bosco, C. Chapelon, A. Moiroud, and P. Normand. 1994. Molecular characterization of *Frankia* microsymbionts from spore-positive and spore-negative nodules in a natural alder stand. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1335-1341.
61. Tisa, L.S., and J.C. Ensign. 1987. Formation and regeneration of protoplasts of the actinorhizal nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:53-56.
62. Valverde, C., and L.G. Wall. 1999. Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (Rhamnaceae)-*Frankia* symbiosis. *Can. J. Bot.* 77:1302-1310.
63. Vandenbosch, K.A., and J.G. Torrey. 1984. Consequences of sporangial development for nodule function in root nodules of *comptonia peregrina* and *Myrica gale*. *Plant Physiol.* 76:556-560.
64. Wall, L.G., and K. Huss-Danell. 1997. Regulation of nodulation in *Alnus incana*-*Frankia* symbiosis. *Physiol. Plant.* 99:594-600.

65. Wall, L.G., N. Beauchemin, M.N. Cantor, *et al.* 2013. Draft Genome Sequence of *Frankia* sp. Strain BCU110501, a Nitrogen-Fixing Actinobacterium Isolated from Nodules of *Discaria trinevis*. *Genome Announc.* 1.
66. Weinman, J.J., F.F. Fellows, P.M. Gresshoff, J. Shine, and K.F. Scott. 1984. Structural analysis of the genes encoding the molybdenum-iron protein of nitrogenase in the *Parasponia rhizobium* strain ANU289. *Nucleic Acids Res.* 12:8329-8344.
67. Wong, P.P., and R.H. Burris. 1972. Nature of oxygen inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69:672-675.
68. Yamaura, M. 2011. Molecular genetics of *Frankia*-actinorhizal plants symbiosis. 鹿児島大学, 博士論文.
69. Yoshizawa, S., D. Fourmy, and J.D. Puglisi. 1998. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO. J.* 17:6437-6448.
70. Yuan, W., S.H. Burleigh, and J.O. Dawson. 2007. Melanin biosynthesis by *Frankia* strain CeI5. *Physiol. Plant.* 131:180-190.

Table 1 マーカー遺伝子のCAI

マーカー遺伝子	耐性を付与する抗生物質	CAI ^a
<i>eGFP</i>		0.855
<i>fgm^R</i>	ゲンタマイシン	0.825
<i>tet^R</i>	テトラサイクリン	0.425
<i>hyg^R</i>	ハイグロマイシン	0.356
<i>km^R</i>	カナマイシン	0.348
<i>gm^R</i>	ゲンタマイシン	0.325
<i>sp^R</i>	ストレプトマイシン	0.269
<i>cm^R</i>	クロラムフェニコール	0.253
<i>amp^R</i>	アンピシリン	0.220

^a Codon adaptation index.

Table 2ACN14a株における高発現遺伝子

順位	遺伝子名	コードするタンパク質	シグナル強度
1	FRAAL6824	Hypothetical protein	64,344
2	FRAAL3766	Hypothetical protein	63,170
3	FRAAL3775	Putative SAM-dependent methyltransferase	62,587
4	FRAAL4519	Conserved hypothetical protein	60,967
5	FRAAL2938	Putative protein kinase	60,024
6	<u>FRAAL4031</u>	<u>Molecular chaperone Hsp18</u>	59,467
7	FRAAL4623	Hypothetical protein	59,385
8	FRAAL0819	Hypothetical protein	58,723
9	FRAAL0818	Hypothetical protein	57,193
10	FRAAL4030	Hypothetical protein	56,807
11	FRAAL0817	Putative ATPase	53,696
12	FRAAL2699	Hypothetical protein	50,294
13	FRAAL0816	Hypothetical protein	45,358
14	FRAAL0451	Hypothetical protein	44,025
15	FRAAL0815	Hypothetical protein	43,890
16	FRAAL5431	Hypothetical protein	43,695
17	FRAAL3764	Putative sugar transport protein	41,521
18	FRAAL5025	Conserved hypothetical protein	41,473
19	FRAAL6331	Putative Type II restriction enzyme	39,808
20	<u>FRAAL3771</u>	<u>Conserved hypothetical protein</u>	37,687
21	FRAAL2056	GDP-D-mannose dehydratase	37,575
22	FRAAL0514	Hypothetical protein	37,444
23	FRAAL6224	Conserved hypothetical protein	37,314
24	FRAAL0131	Conserved hypothetical protein	34,279
25	FRAAL1720	Hypothetical protein; putative signal peptide	31,528
26	FRAAL3773	Methionine sulfoxide reductase	31,172
27	FRAAL1070	Hypothetical protein	30,430
28	<u>FRAAL5161</u>	<u>Glutamine synthetase</u>	29,548
29	FRAAL4865	Hypothetical protein	28,763
30	FRAAL5441	Hypothetical protein	28,654
31	FRAAL2023	Hypothetical protein	27,821
32	FRAAL5353	Putative ATP-dependent DNA helicase II	26,825
33	FRAAL0689	Putative DNA Modification methylase	26,534
34	FRAAL1304	Putative Protein-glutamate methyltransferase	25,542
35	FRAAL1781	30S ribosomal protein S1	25,318
36	FRAAL1024	Hypothetical protein	25,133
37	FRAAL6525	Putative CarD-like transcriptional regulator	24,988
38	FRAAL3763	Putative sugar transport protein	24,801
39	FRAAL5938	Hypothetical protein	24,796
40	FRAAL0515	Hypothetical protein	24,706
41	FRAAL0037	Hypothetical protein	22,882
42	FRAAL1101	Preprotein translocase, membrane component	22,868
43	FRAAL6213	Transcription elongation factor greA	22,495
44	FRAAL5837	Hypothetical protein	21,095
		⋮	
61	FRAAL5216	Protein chain initiation factor 3, IF3, InfC	17,169

太字下線はプロモーターを選択した遺伝子を示す。

Table 3 次世代シーケンサーにより検出された変異

Strain	Position (nt) ^a	Mutant base	WT base ^b	Coverage ^c	No. WT base ^d	Ratio of WT base ^e	ID ^f	Annotation
6A1	200831	T	C	1225	52	0.042	IGR Franci3_0169-Francic3_0170	
6A1	1011977	T	A	11	0	0.000	IGR Franci3_0868-Francic3_0869	
6A1	1172483	A	G	179	4	0.022	Francic3_0989	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding
6A1	1212645	A	G	397	16	0.040	Francic3_1017	hypothetical protein
6A1	1986198	T	C	891	46	0.052	Francic3_1652	NADPH-dependent FMN reductase
6A1	3340080	T	C	41	1	0.024	Francic3_2835	protein tyrosine/serine phosphatase
6A1	4262098	A	G	816	23	0.028	IGR Francic3_3562-Francic3_3563	
6A1	4476362	A	G	91	0	0.000	Francic3_3740	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
6A1	4508907	A	G	420	24	0.057	Francic3_3760	signal transduction histidine kinase
colony1	3444812	T	C	159	4	0.025	IGR Francic3_2923-Francic3_2924	
colony1	3610715	T	C	287	5	0.017	Francic3_3042	acyl-CoA dehydrogenase-like
colony1	3809698	C	T	4	0	0.000	Francic3_3216	hypothetical protein
colony1	3916026	T	C	20	2	0.100	Francic3_3305	Type IV secretory pathway VirD4 components-like
colony1	4384188	T	C	267	6	0.022	IGR Francic3_3662-Francic3_3663	
colony1	4549489	A	G	117	8	0.068	Francic3_3796	peptidase M16-like
colony1	4630236	T	C	40	1	0.025	Francic3_3866	NUDIX hydrolase
colony1	4649421	T	C	310	10	0.032	IGR Francic3_3885-Francic3_3886	
colony1	4814994	T	C	683	9	0.013	Francic3_4027	LuxR family transcriptional regulator
colony2	113563	A	C	9	1	0.111	Francic3_0092	hypothetical protein
colony2	214881	A	G	230	0	0.000	Francic3_0182	glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
colony2	245012	A	G	608	8	0.013	IGR Francic3_0205-Francic3_0207	
colony2	755715	T	C	96	2	0.021	Francic3_0660	geranylgeranyl reductase
colony2	909997	T	C	31	0	0.000	Francic3_0781	type II secretion system protein
colony2	1116519	T	C	401	5	0.012	Francic3_0947	FHA domain-containing protein
colony2	1251205	C	G	6	0	0.000	Francic3_1052	hypothetical protein
colony2	1776439	A	G	69	1	0.014	Francic3_1484	cysteine dioxygenase type I
colony2	1991103	C	T	6	1	0.167	Francic3_1657	glycerol kinase
colony2	2377470	G	T	4	0	0.000	Francic3_2022	transcriptional regulator
colony2	2440216	A	G	67	1	0.015	Francic3_2075	aminotransferase
colony2	2801764	T	C	151	2	0.013	Francic3_2413	major facilitator transporter
colony2	2910081	A	G	651	11	0.017	IGR Francic3_2466-Francic3_2467	
colony2	4075193	T	C	244	8	0.033	Francic3_3427	hypothetical protein
colony2	4217197	T	C	483	6	0.012	IGR Francic3_3528-Francic3_3530	
colony2	4318977	T	C	286	2	0.007	Francic3_3617	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
colony2	4902347	A	G	254	8	0.031	Francic3_4093	NUDIX hydrolase
colony2	4921610	T	C	374	4	0.011	Francic3_4118	hypothetical protein
colony2	4983255	C	T	4	1	0.250	Francic3_4179	hypothetical protein
colony2	5290936	G	C	4	1	0.250	Francic3_4425	serine/threonine protein kinase
colony3	755715	T	C	161	6	0.037	Francic3_0660	geranylgeranyl reductase
colony3	1116519	T	C	769	10	0.013	Francic3_0947	FHA domain-containing protein
colony3	1776439	A	G	128	2	0.016	Francic3_1484	cysteine dioxygenase type I
colony3	1993126	A	G	131	0	0.000	Francic3_1658	hypothetical protein
colony3	2195005	G	T	78	3	0.038	Francic3_1861	2-dehydropantoate 2-reductase
colony3	2318177	T	C	54	3	0.056	Francic3_1976	amino acid adenylation
colony3	2553579	T	C	1549	37	0.024	Francic3_2179	hypothetical protein
colony3	2801764	T	C	179	5	0.028	Francic3_2413	major facilitator transporter
colony3	2918202	T	C	1051	33	0.031	IGR Francic3_2473-Francic3_2474	
colony3	3425853	C	G	4	1	0.250	Francic3_2909	peptidase S9, prolyl oligopeptidase active site region
colony3	3999160	A	G	69	2	0.029	Francic3_3370	cobalamin B12-binding
colony3	4318977	T	C	539	13	0.024	Francic3_3617	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
colony3	4425344	T	C	76	2	0.026	Francic3_3688	hypothetical protein
colony3	4631958	T	C	97	3	0.031	Francic3_3869	hypothetical protein
colony3	5322012	A	G	134	2	0.015	Francic3_4451	acetyl-CoA acetyltransferase
colony4	140311	T	C	102	1	0.010	Francic3_0114	phage integrase
colony4	424544	G	C	5	1	0.200	Francic3_0362	hypothetical protein
colony4	755715	T	C	86	6	0.070	Francic3_0660	geranylgeranyl reductase
colony4	887559	T	C	7	1	0.143	Francic3_0762	putative integral membrane protein
colony4	1116519	T	C	570	11	0.019	Francic3_0947	FHA domain-containing protein
colony4	1177025	A	G	573	21	0.037	Francic3_0991	acyl transferase region
colony4	1446690	T	C	447	19	0.043	Francic3_1211	rod shape-determining protein MreB
colony4	1752341	C	G	4	1	0.250	Francic3_1460	peptidase C60, sortase A and B
colony4	1776439	A	G	62	4	0.065	Francic3_1484	cysteine dioxygenase type I
colony4	1790485	T	C	182	4	0.022	IGR Francic3_1495-Francic3_1496	
colony4	2078892	A	G	1025	21	0.020	Francic3_1745	hypothetical protein
colony4	2206561	T	C	230	7	0.030	Francic3_1871	hypothetical protein
colony4	2247733	C	T	23	2	0.087	Francic3_1913	OmpA/MotB
colony4	2801764	T	C	127	5	0.039	Francic3_2413	major facilitator transporter
colony4	3148274	A	G	139	1	0.007	Francic3_2666	MMPL
colony4	3473687	G	C	5	1	0.200	Francic3_2940	protein of unknown function DUF1524 RbfF
colony4	4193176	A	G	242	7	0.029	Francic3_3508	transcriptional regulator NrdR
colony4	4318977	T	C	358	10	0.028	Francic3_3617	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
colony4	4634847	C	A	4	1	0.250	Francic3_3872	hypothetical protein

Strain	Position (nt) ^a	Mutant base	WT base ^b	Coverage ^c	No. WT base ^d	Ratio of WT base ^e	ID ^f	Annotation
colony5	54308	A	G	103	10	0.097	Francci3_0044	serine/threonine protein kinase
colony5	141500	A	G	1675	67	0.040	Francci3_0114	phage integrase
colony5	498466	A	G	812	6	0.007	IGR Francci3_0419-Francci3_R0012	
colony5	629808	T	C	193	6	0.031	Francci3_0543	NADH-quinone oxidoreductase, F subunit
colony5	1450426	T	C	15	2	0.133	Francci3_1214	peptidoglycan glycosyltransferase
colony5	1515535	T	C	31	1	0.032	Francci3_1269	CBS
colony5	1943172	T	C	123	3	0.024	Francci3_1619	extracellular ligand-binding receptor
colony5	1960376	T	C	1096	43	0.039	Francci3_1631	excinuclease ABC subunit A
colony5	1965419	C	T	6	1	0.167	Francci3_1633	excinuclease ABC subunit C
colony5	2106877	A	G	147	9	0.061	IGR Francci3_1770-Francci3_1771	
colony5	2195005	G	T	28	4	0.143	Francci3_1861	2-dehydropantoate 2-reductase
colony5	2316337	A	G	985	46	0.047	IGR Francci3_1975-Francci3_1976	
colony5	2458991	A	G	110	8	0.073	Francci3_2090	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III
colony5	2930887	A	G	1865	43	0.023	IGR Francci3_2484-Francci3_2485	
colony5	2959308	T	C	1266	24	0.019	Francci3_2506	hydantoïnase B/oxoprolinase
colony5	3211711	A	G	157	6	0.038	Francci3_2727	hypothetical protein
colony5	3717464	A	G	242	4	0.017	Francci3_3143	L-glutamine synthetase
colony5	5202265	T	C	6	1	0.167	Francci3_4356	ATPase AAA-2
colony6	1712679	A	G	90	1	0.011	Francci3_1421	hypothetical protein
colony6	2440561	A	G	147	3	0.020	Francci3_2075	aminotransferase
colony6	3362356	T	C	221	4	0.018	Francci3_2851	beta-ketoacyl synthase
colony6	3444812	T	C	149	7	0.047	IGR Francci3_2923-Francci3_2924	
colony6	3610715	T	C	295	13	0.044	Francci3_3042	acyl-CoA dehydrogenase-like
colony6	3729412	A	G	35	1	0.029	Francci3_3150	hypothetical protein
colony6	3937737	C	G	3	1	0.333	Francci3_3323	hypothetical protein
colony6	4384188	T	C	369	9	0.024	IGR Francci3_3662-Francci3_3663	
colony6	4511418	G	A	5	1	0.200	Francci3_3762	dithiobiotin synthetase
colony6	4630236	T	C	49	0	0.000	Francci3_3866	NUDIX hydrolase
colony6	4649421	T	C	315	15	0.048	IGR Francci3_3885-Francci3_3886	
colony6	4814994	T	C	666	7	0.011	Francci3_4027	LuxR family transcriptional regulator
colony7	230604	A	G	114	0	0.000	Francci3_0194	hypothetical protein
colony7	491327	T	C	64	1	0.016	Francci3_0412	cell divisionFtsK/SpoIIIE
colony7	755715	T	C	78	0	0.000	Francci3_0660	geranylgeranyl reductase
colony7	948422	A	G	167	0	0.000	Francci3_0815	NUDIX hydrolase
colony7	1116519	T	C	87	2	0.023	Francci3_0947	FHA domain-containing protein
colony7	1431150	A	G	3	1	0.333	Francci3_1199	putative ATP-binding protein
colony7	1703462	A	G	31	0	0.000	Francci3_1413	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase
colony7	1776439	A	G	43	1	0.023	Francci3_1484	cysteine dioxygenase type I
colony7	1853798	A	G	231	2	0.009	IGR Francci3_1543-Francci3_1544	
colony7	2801764	T	C	53	0	0.000	Francci3_2413	major facilitator transporter
colony7	3621843	A	G	63	0	0.000	IGR Francci3_3055-Francci3_3056	
colony7	3714154	A	G	8	0	0.000	IGR Francci3_3140-Francci3_3141	
colony7	3816051	T	C	83	1	0.012	Francci3_3221	hypothetical protein
colony7	4318977	T	C	155	2	0.013	Francci3_3617	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
colony8	498466	A	G	167	0	0.000	IGR Francci3_0419-Francci3_R0012	
colony8	550578	G	C	10	1	0.100	Francci3_0470	histidine kinase
colony8	629808	T	C	43	0	0.000	Francci3_0543	NADH-quinone oxidoreductase, F subunit
colony8	1132805	A	G	121	2	0.017	Francci3_0959	hypothetical protein
colony8	1301931	A	T	12	0	0.000	Francci3_1089	transposase, IS4
colony8	2316337	A	G	168	1	0.006	IGR Francci3_1975-Francci3_1976	
colony8	2424161	T	C	56	2	0.036	IGR Francci3_2059-Francci3_2060	
colony8	2424201	T	C	9	1	0.111	Francci3_2060	hypothetical protein
colony8	2930887	A	G	397	2	0.005	IGR Francci3_2484-Francci3_2485	
colony8	3211711	A	G	59	1	0.017	Francci3_2727	hypothetical protein
colony8	4381115	T	C	8	1	0.125	Francci3_3660	putative transcriptional regulator
colony8	4457541	C	G	6	1	0.167	Francci3_3723	homoserine kinase
colony8	4903846	A	G	71	6	0.085	IGR Francci3_4094-Francci3_4095	
colony8	5391784	G	C	6	1	0.167	Francci3_4516	hypothetical protein
colony9	498466	A	G	516	1	0.002	IGR Francci3_0419-Francci3_R0012	
colony9	629808	T	C	200	0	0.000	Francci3_0543	NADH-quinone oxidoreductase, F subunit
colony9	880957	A	G	417	2	0.005	Francci3_0757	extracellular solute-binding protein
colony9	1564048	T	C	259	0	0.000	Francci3_1306	oxidoreductase-like
colony9	1582887	A	G	119	0	0.000	Francci3_1319	hypothetical protein
colony9	2316337	A	G	662	5	0.008	IGR Francci3_1975-Francci3_1976	
colony9	2930887	A	G	1121	12	0.011	IGR Francci3_2484-Francci3_2485	
colony9	3042202	A	G	124	3	0.024	Francci3_2576	hypothetical protein
colony9	3211711	A	G	140	0	0.000	Francci3_2727	hypothetical protein
colony9	3425584	C	G	5	0	0.000	Francci3_2909	peptidase S9, prolyl oligopeptidase active site region
colony9	4823021	C	A	6	0	0.000	Francci3_4037	molybdopterin adenylyltransferase
colony9	5129264	C	G	12	0	0.000	Francci3_4298	type II secretion system protein
shiro1	498466	A	G	427	0	0.000	IGR Francci3_0419-Francci3_R0012	
shiro1	1208408	T	C	217	9	0.041	Francci3_1014	hypothetical protein
shiro1	2316337	A	G	511	6	0.012	IGR Francci3_1975-Francci3_1976	
shiro1	2930887	A	G	851	10	0.012	IGR Francci3_2484-Francci3_2485	
shiro1	3026410	A	G	256	4	0.016	Francci3_2567	putative hydrolase
shiro1	3211711	A	G	98	3	0.031	Francci3_2727	hypothetical protein
shiro1	3235654	A	G	35	0	0.000	Francci3_2745	hypothetical protein

Strain	Position (nt) ^a	Mutant base	WT base ^b	Coverage ^c	No. WT base ^d	Ratio of WT base ^e	ID ^f	Annotation
shiro2	498466	A	G	564	1	0.002	IGR Franci3_0419-Franci3_R0012	
shiro2	629808	T	C	121	2	0.017	Franci3_0543	NADH-quinone oxidoreductase, F subunit
shiro2	1423887	G	C	3	1	0.333	Franci3_1190	hypothetical protein
shiro2	2285845	C	G	11	0	0.000	Franci3_1945	(NiFe) hydrogenase maturation protein HypF
shiro2	2316337	A	G	628	7	0.011	IGR Franci3_1975-Franci3_1976	
shiro2	2768445	A	G	135	1	0.007	Franci3_2390	glycosyl transferase family protein
shiro2	2930887	A	G	1213	10	0.008	IGR Franci3_2484-Franci3_2485	
shiro2	3211711	A	G	114	0	0.000	Franci3_2727	hypothetical protein
shiro2	3235654	A	G	45	2	0.044	Franci3_2745	hypothetical protein
shiro2	3714154	A	G	9	0	0.000	IGR Franci3_3140-Franci3_3141	
shiro2	4949435	G	T	5	0	0.000	Franci3_4149	integrase
shiro3	398331	A	G	586	18	0.031	Franci3_0343	inner-membrane translocator
shiro3	755715	T	C	127	2	0.016	Franci3_0660	geranylgeranyl reductase
shiro3	1049059	A	C	135	2	0.015	Franci3_0906	Type IV secretory pathway VirD4 components-like
shiro3	1116519	T	C	398	4	0.010	Franci3_0947	FHA domain-containing protein
shiro3	1183365	A	G	1059	29	0.027	Franci3_0994	hypothetical protein
shiro3	1408614	T	C	137	6	0.044	Franci3_1178	AMP-dependent synthetase and ligase
shiro3	1868217	G	T	6	1	0.167	Franci3_1558	cell envelope-related transcriptional attenuator
shiro3	2145810	A	G	232	5	0.022	Franci3_1810	uncharacterized FAD-dependent dehydrogenase
shiro3	2161726	T	C	139	2	0.014	Franci3_1823	putative O-methyltransferase
shiro3	2801764	T	C	146	1	0.007	Franci3_2413	major facilitator transporter
shiro3	3174296	A	G	360	9	0.025	Franci3_2688	Rieske (2Fe-2S) protein
shiro3	3267212	T	C	124	1	0.008	Franci3_2770	4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase
shiro3	4309260	T	C	269	5	0.019	Franci3_3607	DEAD/DEAH box helicase-like
shiro3	4318977	T	C	355	2	0.006	Franci3_3617	diguanylate cyclase/phosphodiesterase
shiro3	4672005	A	G	641	9	0.014	IGR Franci3_3903-Franci3_3904	

^aPosition of the base in the reference genome sequence of *Frankia* CcI3 in public database (NC_007777) .

^bBase reported in the reference genome sequence.

^cTotal number of reads mapped on the base.

^dThe number of reads that showed WT base.

^eNo. WT base / Coverage.

^fIGR represents intergenic region.

Figures

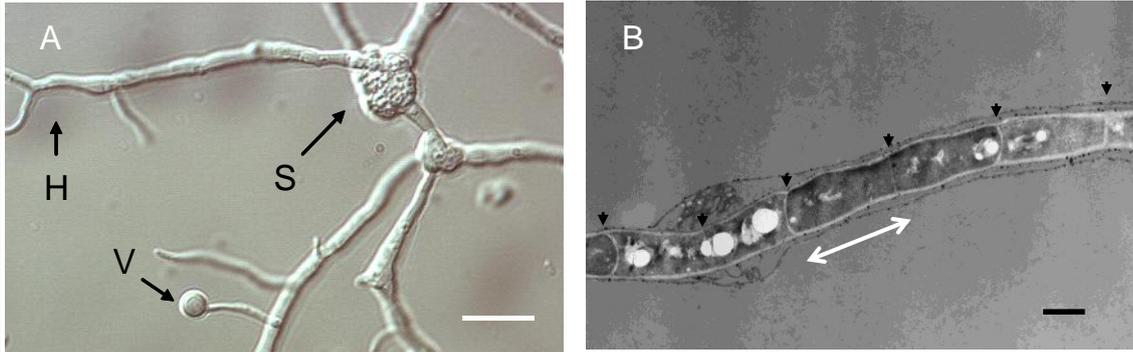


Fig. 1 *Frankia*細胞の形態

(A) *Frankia*の細胞は菌糸 (H)、胞子嚢 (S)、ベシクル (V) 3種の形態をとる。バーは10 μm を示す。(B) *Frankia. sp* CcI3株の菌糸の電子顕微鏡写真。黒い矢印は隔壁を示す。黒いバーは1 μm を、白い両矢印は1細胞の長さ (約2.4 μm) を示す。

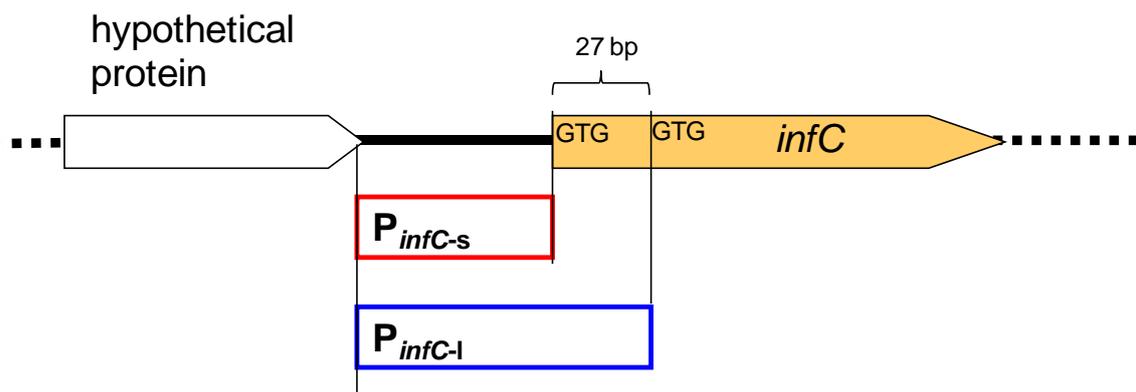


Fig. 2 プロモーターの概要

形質転換用コンストラクトに用いた2種類のプロモーターを示す。 P_{infC-s} は上流のhypothetical protein (Francci3_3183) の終止コドンの直後から*infC* (Francci3_3182) の1つ目の開始コドンと思われる配列直前までの316 bpの、 P_{infC-l} は27 bp下流の2つ目の開始コドンと思われる配列直前までの343 bpの領域である。

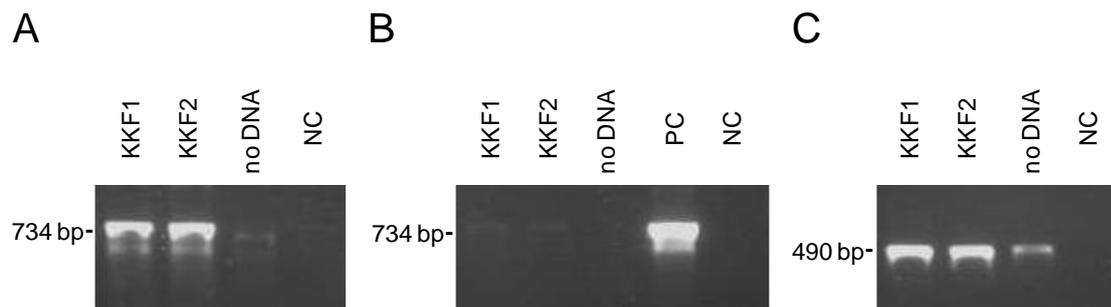


Fig. 3 *eGFP*のRT-PCR

(A) *eGFP*特異的プライマーを用いたRT-PCR。(B) *eGFP*特異的プライマーを用いた逆転写なしのPCR。(C) *infC*特異的プライマーを用いたRT-PCR。KKF1はpKKF1を用いてエレクトロポレーションを行った細胞のRNA。KKF2はpKKF2を用いてエレクトロポレーションを行った細胞のRNA。no DNAは形質転換コンストラクトDNAを加えずにエレクトロポレーションを行った細胞のRNA。PCではpKKF2を鋳型として使用した。NCは鋳型RNAの代わりに滅菌水を用いた。

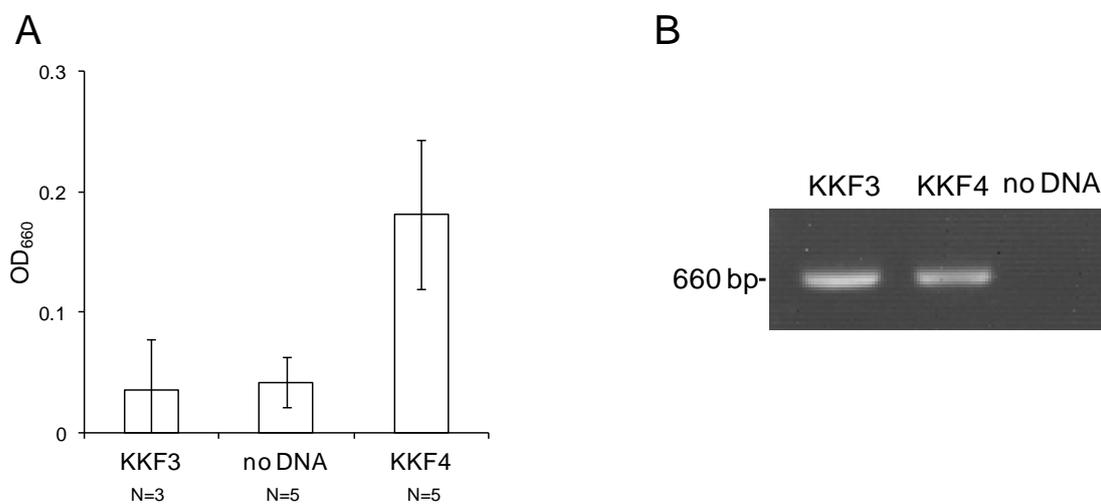


Fig. 4 テトラサイクリン耐性遺伝子を用いた形質転換

(A) 形質転換を行った細胞の選択培地での細胞濃度。バーは標準偏差を示す。(B) KKF3、KKF4、no DNAのゲノムDNAを用いたPCR。KKF3はpKKF3を導入した細胞を、KKF4はpKKF4を導入した細胞を、controlはプラスミドを用いずエレクトロポレーションのみを行った細胞を示す。

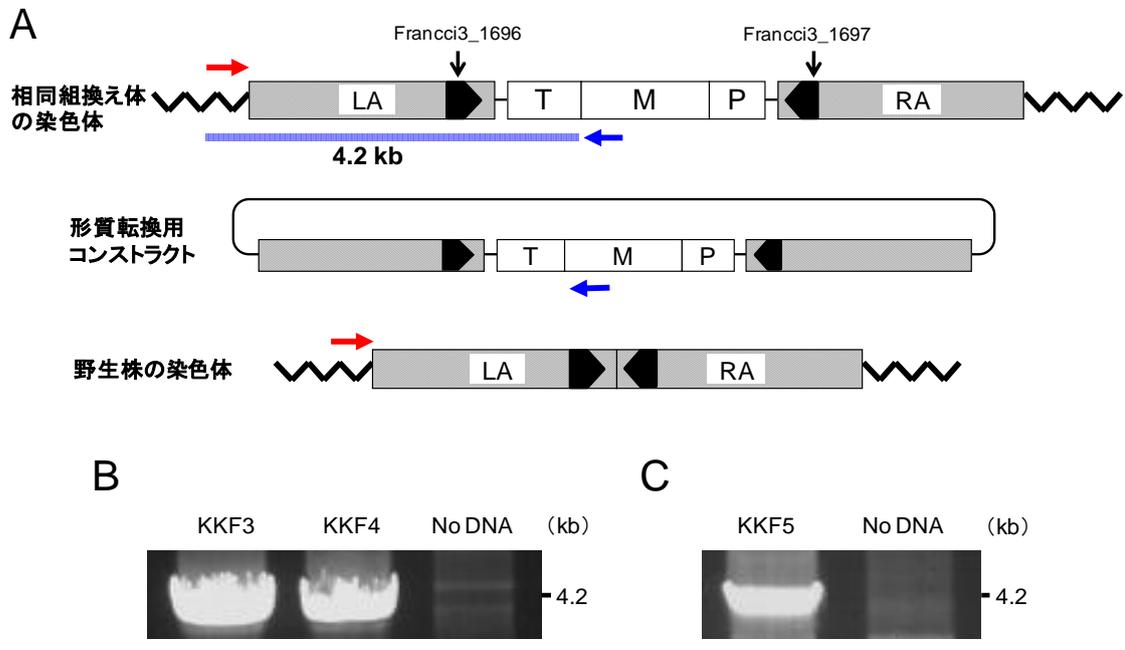


Fig. 5 染色体への相同組換えによるマーカー遺伝子の挿入の確認

(A) 相同組換え部位の模式図。斜線は相同組換え領域。赤の矢印はプライマーLAoutのアニール部位を、青の矢印はプライマーTet-f2もしくはGm-f2のアニール部位を示す。LAはleft armの略で、上流の相同組換え領域（4 kb）を示す。RAはright armの略で下流の相同組換え領域（4 kb）を示す。Pはプロモーターを、Mはマーカー遺伝子を、Tはターミネーターを示す。太い波線は相同組換え領域の外側のCc13株の染色体を示す。(B) KKF3、KKF4およびno DNAのゲノムDNAを用いたPCR。(C) KKF5およびno DNAのゲノムDNAを用いたPCR。

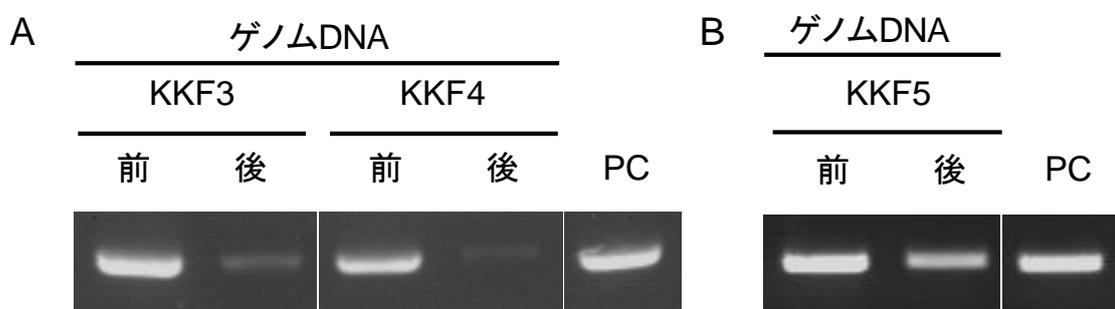


Fig. 6 PCRによる継代培養前後での形質転換細胞内のマーカー遺伝子の確認 (A) KKF3およびKKF4のゲノムDNAを100 ng用いたPCR。(B) KKF5のゲノムDNAを100 ng用いたPCR。前は継代培養前の形質転換細胞を、後は継代培養後の形質転換細胞を示す。PCは、ゲノムDNAと等モル量のコンストラクトDNAを鋳型として用いたPCR。

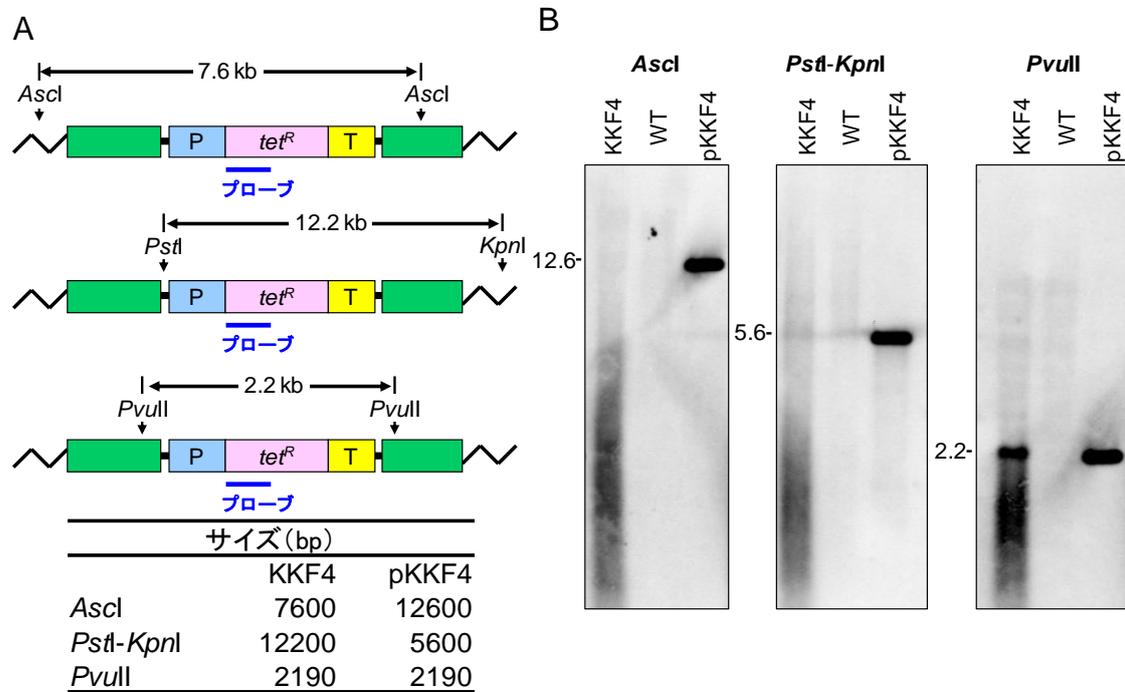


Fig. 7 KKF4のサザンブロット解析

KKF4とWTのゲノムDNAとpKKF4を各種酵素で消化しサザンブロットを行った。(A) 相同組換えによるマーカー遺伝子の挿入が起こった場合のKKF4染色体模式図。上段は*Ascl*、中段は*PstI*と*KpnI*、下段は*PvuII*の認識部位の位置を示す。(B) *tet^R*断片をプローブとしてサザンブロットを行った写真。数値はバンドのサイズ (kb) を示す。

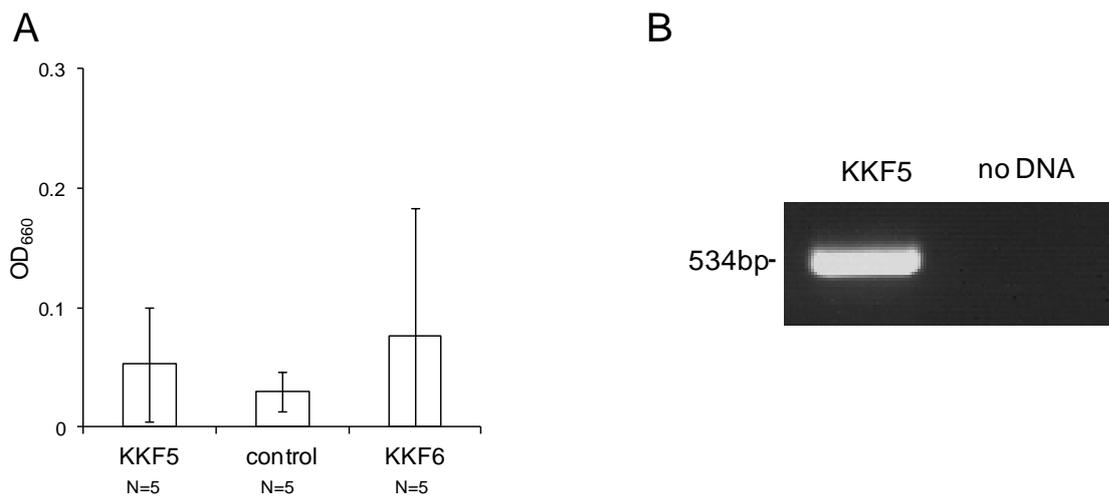


Fig. 8 ゲンタマイシン耐性遺伝子を用いた形質転換

(A) 形質転換を行った細胞の選択培地での細胞濃度。バーは標準偏差を示す。(B) KKF5とno DNAのゲノムを用いたPCR。KKF5はpKKF5を導入した細胞を、KKF6はpKKF6を導入した細胞を、controlはプラスミドを用いず電圧ポレーションのみを行った細胞を示す。

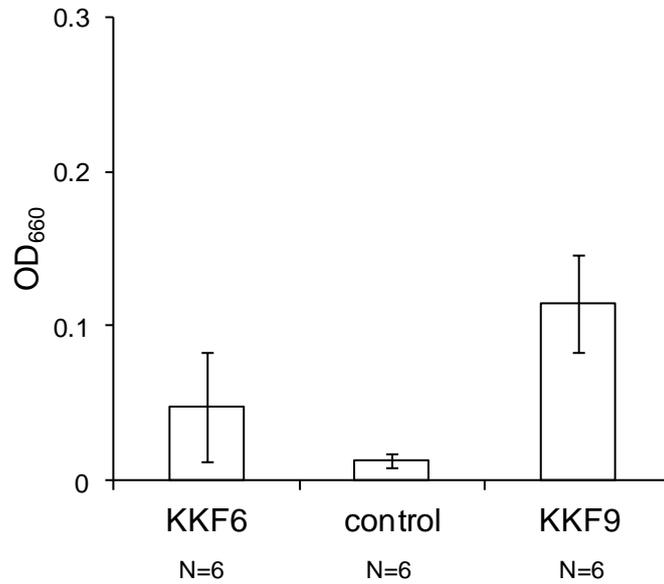
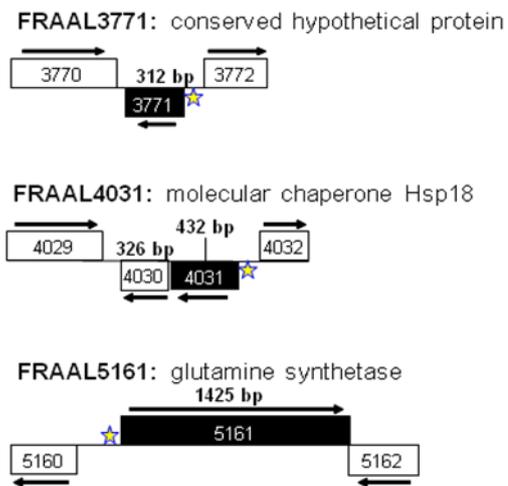


Fig. 10 ゲンタマイシン耐性遺伝子とコドン最適化したゲンタマイシン耐性遺伝子を用いた形質転換

棒グラフは選択培地中での細胞濃度を示す。バーは標準偏差を示す。KKF6はpKKF6を用いた形質転換細胞を、KKF9はpKKF9を用いた形質転換細胞を示す。controlはプラスミドを用いずエレクトロポレーションを行った結果を示す。

A



B

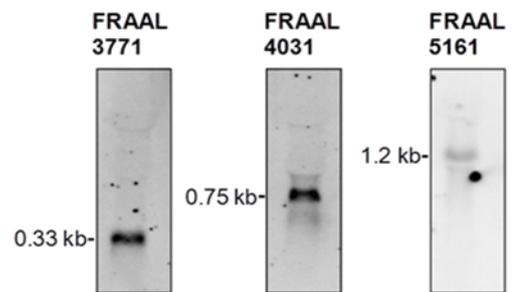


Fig. 11 高発現プロモーターの決定

(A) 3つの高発現遺伝子の周辺地図。☆はプロモーターの予測位置を、矢印は転写方向を、黒色の長方形は高発現遺伝子を示す。(B) ノーザンブロット法による転写産物のサイズの確認。

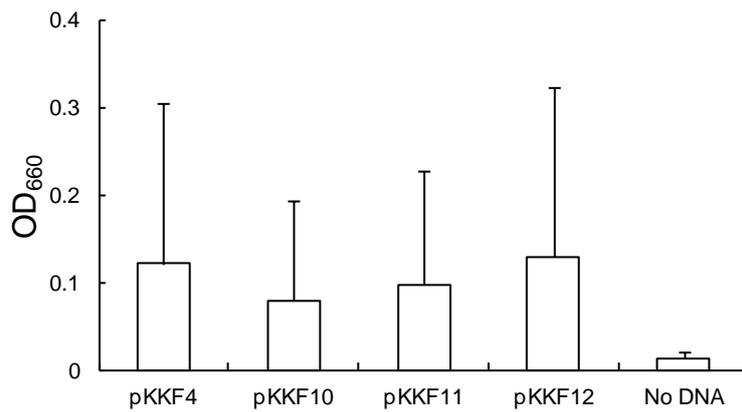


Fig. 12 高発現プロモーターを用いた形質転換用コンストラクトによる形質転換

選択培地中での細胞濃度のグラフ。バーは標準偏差を示す (n=4)。KKF4はpKKF4を導入した細胞を、KKF10はpKKF10を導入した細胞を、KKF11はpKKF11を導入した細胞を、KKF12はpKKF12を導入した細胞を示す。No DNAはプラスミドを用いずエレクトロポレーションのみを行った細胞を示す。

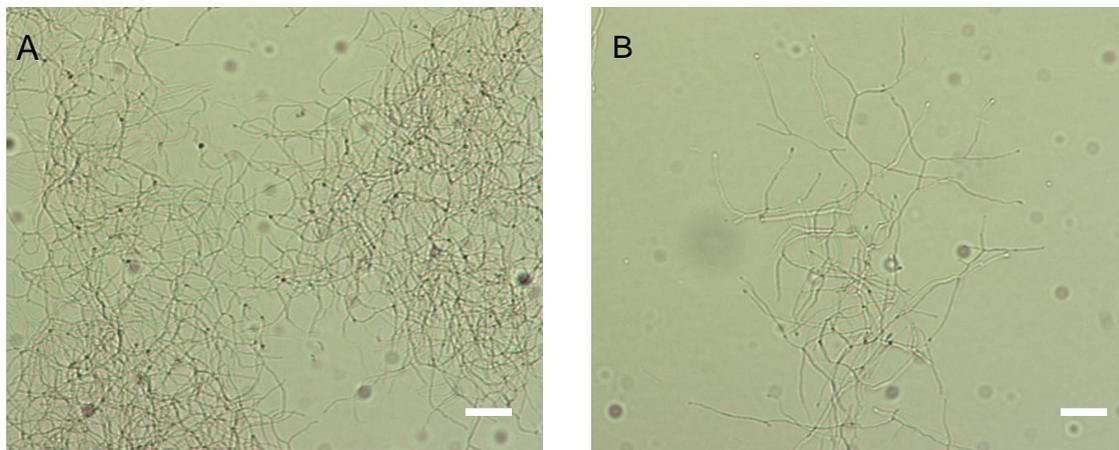


Fig. 13 CcI3株の菌糸の形態に対するグリシンの影響

(A) BAP-T培地で10日間培養したCcI3株、(B) 0.1%のグリシンを含むBAP-T培地で10日間培養したCcI3株。バーは20 μm を示す。

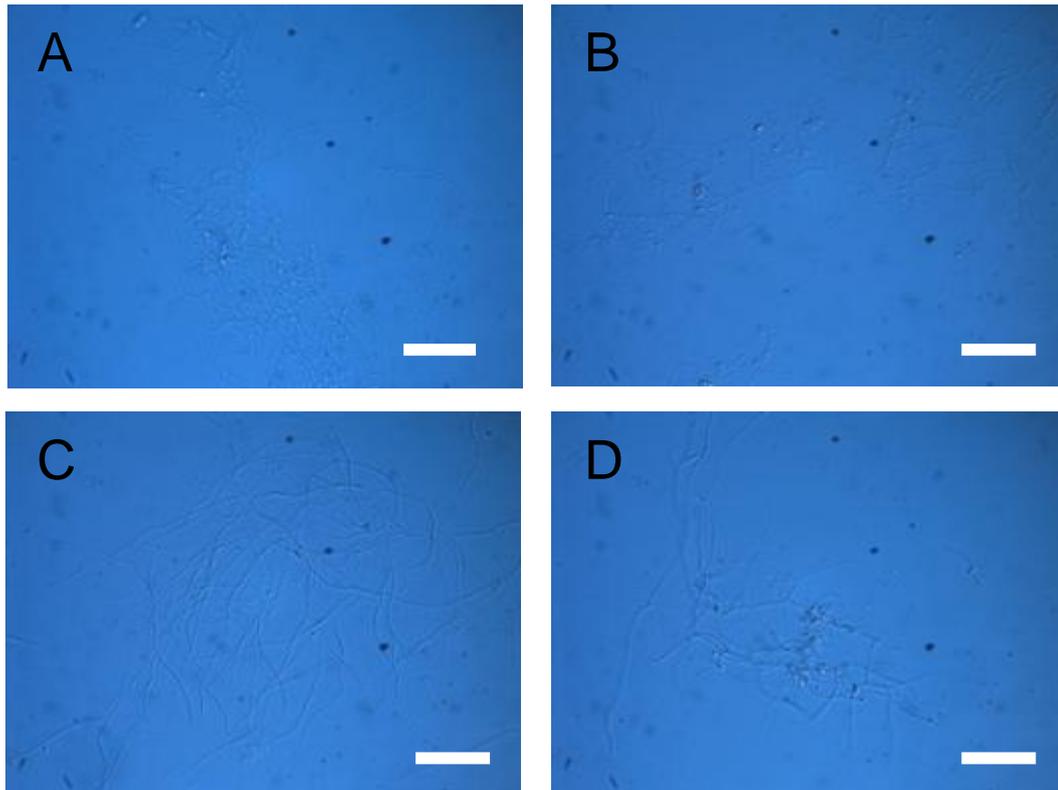


Fig. 14 細胞壁溶解酵素の種類による菌糸の分解の比較

(A) Lysozymeで処理したCcI3株菌糸、(B) Labiaseで処理したCcI3株菌糸、(C) Achropeptidaseで処理したCcI3株菌糸、(D) 酵素処理を行わなかったCcI3株菌糸。各酵素は250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の終濃度で用いた。菌糸は0.1%のグリシンを含むBAP-T液体培地で12日間培養したものをを用いた。バーは50 μm を示す。

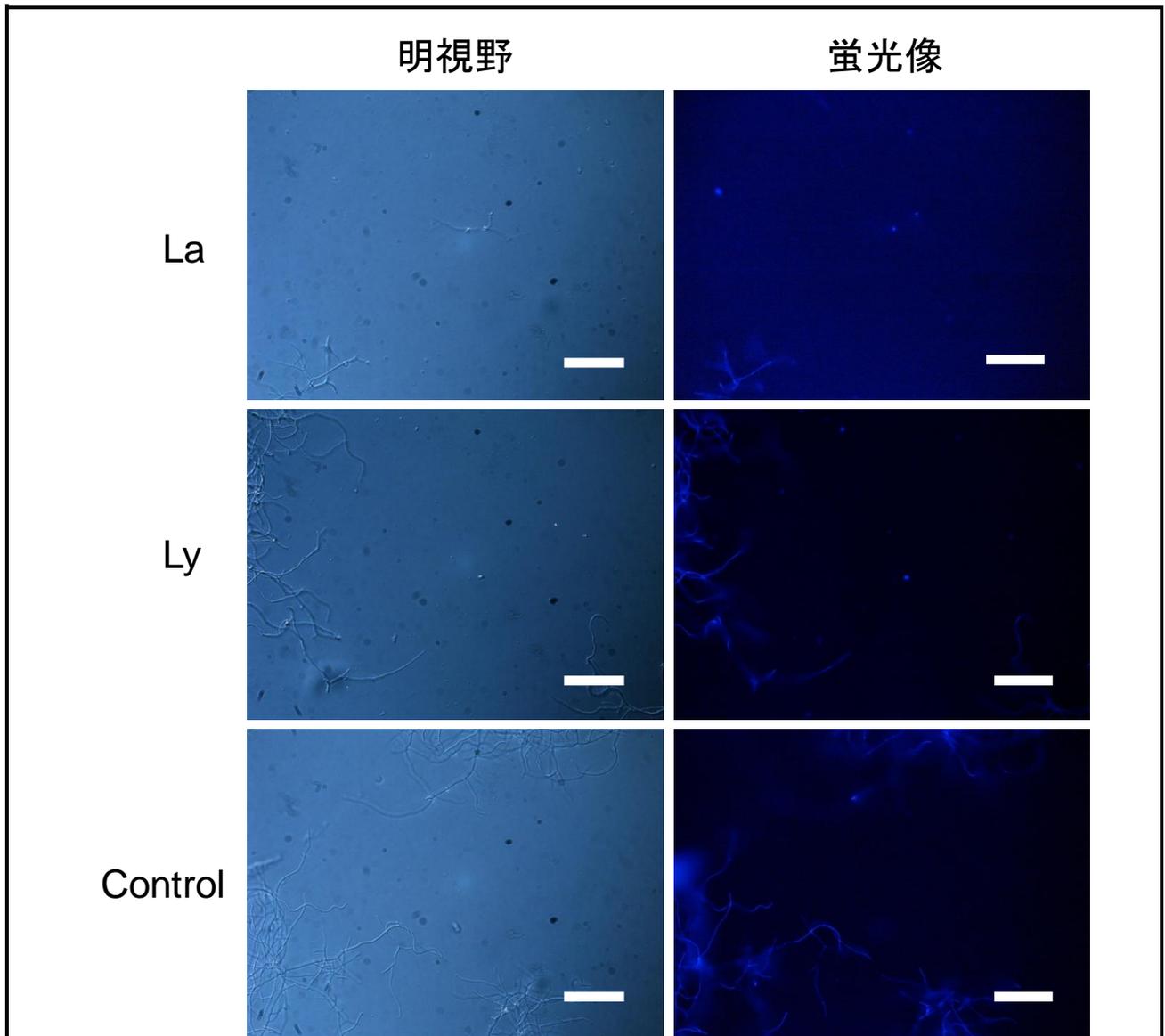


Fig. 15 グリシンを含まないBAP-T培養液を用いたプロトプラスト化

各細胞はそれぞれ100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の酵素で処理した。CcI3株菌糸はBAP-T液体培地で8日間培養したものを
用いた。左列は明視野像を、右列はDAPIの蛍光像を示す。バーは50 μm を示す。LaはLabiaseを、Lyは
lysozymeをcontrolは酵素なしの対照実験を示す。

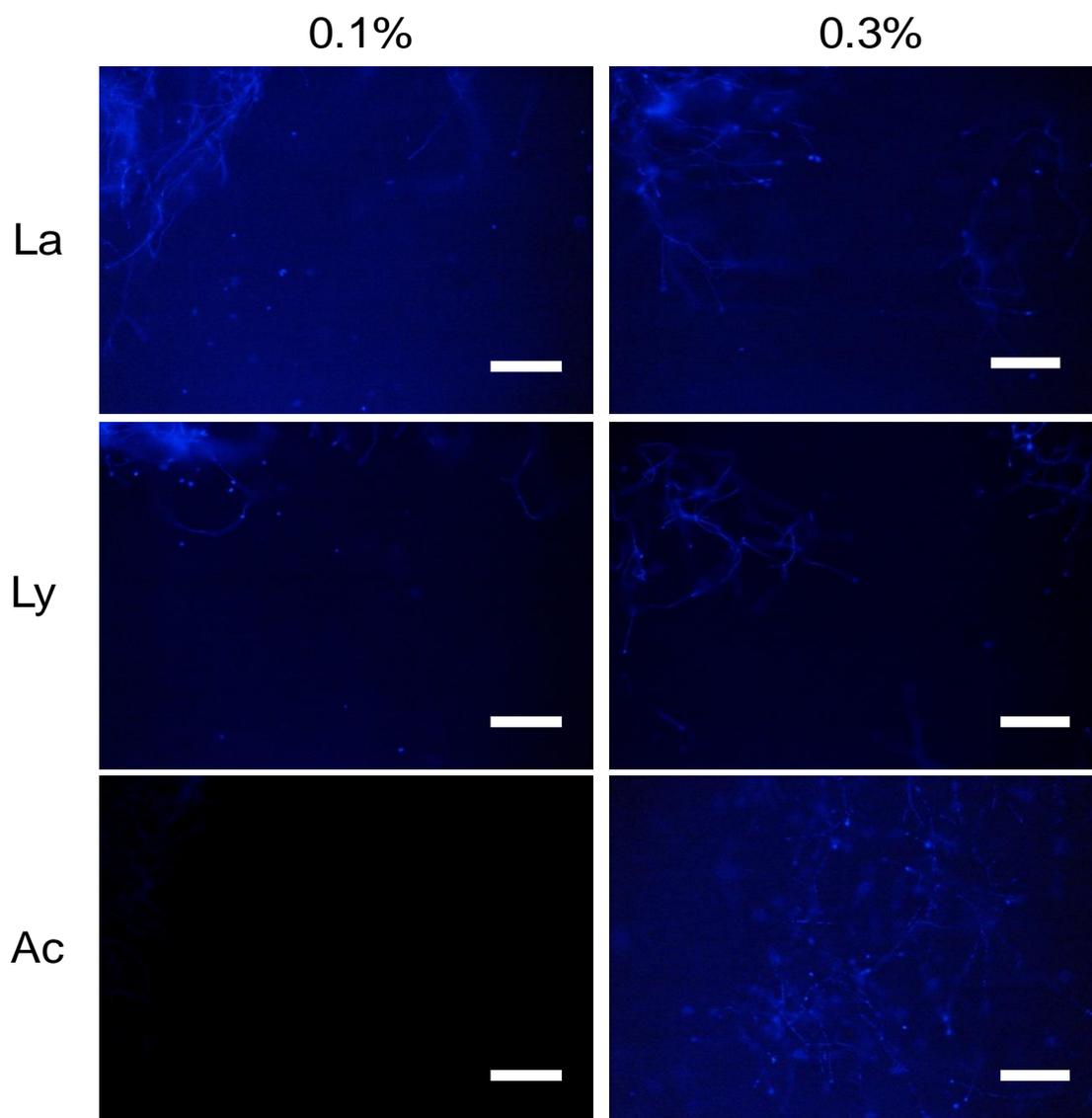


Fig. 16 グリシン濃度が各酵素の分解作用に与える影響

各酵素は100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の終濃度で用いた。CcI3株菌糸はBAP-T液体培地で8日間培養したものを用いた。左列は0.1%のグリシンを含むBAP-T培地で培養した細胞。右列は0.3%のグリシンを含むBAP-T培地で培養した細胞。バーは50 μm を示す。LaはLabiaseで処理したCcI3株菌糸を、LyはLysozymeで処理したCcI3株菌糸を、AcはAchromopeptidaseで処理したCcI3株菌糸を示す。

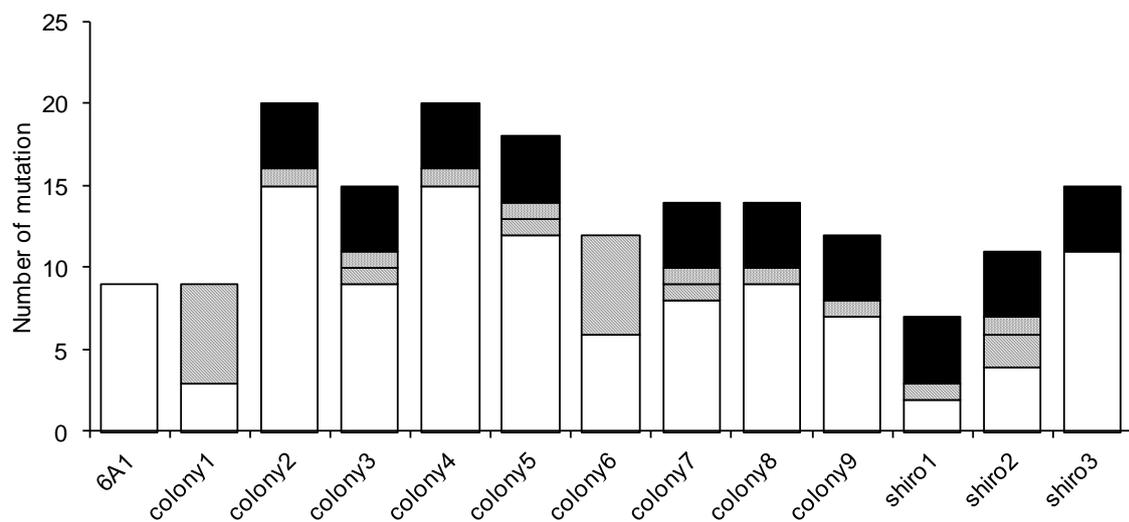


Fig. 17 変異体コロニーで検出された変異の数

白色のバーは一つの変異株でのみ観察された、その変異株特有の変異の数を示す。斜線のバーは2つの株で重複して検出された変異の数を示す。点描のバーは3つの株で重複して検出された変異の数を示す。黒色のバーは5つの株で重複して検出された変異の数を示す。