

糸状性ラン色細胞の分子遺伝学的研究

京 都 大 学 : 富 谷 朗 子
派 遣 期 間 : 2002 年 8 月 20 日 ~ 2003 年 3 月 23 日
研 究 機 関 : Division of Microbiology, School of Biochemistry and
Molecular Biology University of Leeds
Leeds LS2 9JT, United Kingdom
研 究 指 導 者 : Dr. David G. Adams

研究課題 糸状性ラン色細菌の分子遺伝学的研究
派遣者 富谷朗子
所属機関・身分 京都大学総合博物館 特別研究員 PD
派遣研究機関 英国リーズ大学, 生化学・分子生物学科,
微生物教室, D. G. Adams 研究室
渡航期間 2002年8月20日～2003年3月23日

1. 研究目的

Nostoc sp. を材料にホルモゴニア形成期におこる同調的細胞分裂を制御する遺伝子の単離と解析を通じて、糸状性ラン色細菌の分子遺伝学的実験手法を習得する。

2. はじめに

ラン(藍)色細菌はラン藻、シアノバクテリアとも呼ばれ、酸素発生型光合成を行なう原核生物である。ラン色細菌は地球上に最初に出現した酸素発生型光合成生物であり、その起源は少なくとも27億年前(Brocks *et al.*, 1999)にさかのぼると考えられている。ラン色細菌は現在まで数十億年にわたって、酸素の発生、有機物の生産によって地球環境や生態圏に大きな影響を及ぼしてきた。ラン色細菌は形態的な多様性、生理学的な適応力に富み、発生学・生態学的にも興味深い対象である。また、ラン色細菌の中には窒素固定を通じて植物と共生するものがあることから、農学的にも重要である。こうしたラン色細菌のさまざまな特徴を解明するためには、分子遺伝学が強力な実験手法となる。これまで、国内でのラン色細菌の分子遺伝学研究は、主に *Synechocystis* sp.などの単細胞性ラン色細菌を用いて行なわれてきた。しかし、これらは、細胞の分化や植物との共生を行わないため、ラン色細菌の持つ複雑で多様な特徴を研究することはできな

った。

そこで、本派遣では、窒素固定能をもち、細胞の分化、共生を行なうラン色細菌で唯一の実験系である *Nostoc* sp. の分子遺伝学的手法の習得を目指した。*Nostoc* sp. は条件的従属栄養性で、栄養細胞が異質細胞、アキネート、ホルモゴニアなどに細胞分化し、植物と共生関係を結ぶことが知られている(Cohen *et al.*, 1994)。この実験生物にはトランスポゾンによる変異体の作成、トランス配列による相補、特定配列をターゲットにした変異体の作成といった実験技術が利用できる。さらに最近、このラン色細菌の全ゲノム配列が決定され、新規遺伝子の単離が迅速に行なえるようになった。

本派遣では、糸状性ラン色細菌のホルモゴニア形成に着目し、それに関与する遺伝子の単離とその解析を通じて、分子遺伝学的実験手法の修得を目指した。ホルモゴニアは、環境条件の変化により誘導される、運動性を持つ一時的な細胞形態で、植物との共生の開始に大きな役割を果たしている。ホルモゴニア形成は発生学的、生態学的、また農学的にも重要な課題であるが、その分子的背景はよくわかっていなかった。

3. 実験材料・方法

ラン色細菌 *Nostoc punctiforme* ATCC29133 株の単離株を使用した。培地は BG11 を用い、必要に応じて培地を 1.5%の精製寒天で固化した。野生株および突然変異体の培養は、30℃、白色蛍光灯の継続的照射下で行った。液体培地を用いた際には、120 rev/min で振動培養した。

まず、*Nostoc* のホルモゴニア形成を誘導する環境条件を特定するために、*Nostoc* ATCC29133 株の培養条件を変化させた際の形態の変化を、光学顕微鏡を用いて経時的に観察した。*Nostoc* 29133 株のホルモゴニアは、顕著な運動性を示さないために、栄養細胞からなる糸状体との見分けがつきにくいこと、またホルモゴニアを誘導する安定した実験手法が確立していないことから、本予備

調査が不可欠であった。調べた条件は、培地中の糖および硝酸体の有無、照射する光の光質、培地の硬度、共生宿主である植物の影響、などである。対照として、培地中の糖の除去により安定してホルモゴニアが誘導される *Nostoc* sp. LBG 1株を用いた。

続いて、プロモータ欠損 *luxAB* 遺伝子をコードする Tn5 由来の pRL1063a をプラスミドとして持つ大腸菌 HB101 株と *Nostoc* sp. との接合によって変異体を作成した(Wolk *et al.*, 1991)。変異体は抗生物質ネオマイシンで選択した。

得られたトランスポゾン変異体からホルモゴニア形成に異常を示す変異体を選別するために、ホルモゴニア誘導によって導入された遺伝子によって蛍光シグナルを発する個体を、CCDカメラを用いて検出を試みた。一方で、ホルモゴニア形成が誘導された後は暗所下でも同調的に細胞分裂を続けることを利用し、細胞分裂時に細胞壁形成を阻害する薬剤、ペニシリンを用いて、ホルモゴニア形成に異常を示す変異体を選別することを試みた。ペニシリンを使用するに当たり、加えるペニシリンの濃度、およびホルモゴニア誘導後ペニシリンを培地に加える時期と変異体の選別を行なう時期を最適化するための予備実験を行なった。

4. 結果

Nostoc LBG1株が培地中の糖の除去のほか、培地の硬度の変化によっても安定してホルモゴニアが誘導されるのに対し、*Nostoc* 29133株は糖および硝酸体の有無、培地の硬度の変化では、ホルモゴニアは誘導されなかった。一方で、赤色光および植物培養液によってホルモゴニアを形成することが確かめられた。特に *Anthoceros* の培養液を用いた場合は、誘導開始後少なくとも4時間後からはホルモゴニア形成が開始し、18時間後までには栄養細胞はホルモゴニアに分化していることがわかった。したがって、以後の実験では、*Anthoceros* の培養液によってホルモゴニアを誘導することとした。

接合を行ってから、約3週間で薬剤耐性遺伝子を持つ変異体のみが培地上に確認された。約4週間後、各コロニーが十分な大きさに育ったところで、変

異体を回収した。8回の変異体生成実験により合計約 300 個の独立な変異体を用意した。

得られた変異体群からホルモゴニア形成に異常を示す変異体を選別するために、植物培養液の投与によって蛍光シグナルを発する個体を検出する予定であったが、CCD カメラ用の解析ソフトを動作するコンピュータの故障により、この方法で変異体を単離することはできなかった。

一方で、ペニシリンを用いた予備実験からは、*Nostoc* 29133 株は 100-200 units のペニシリンを投与後、16 時間未満でホルモゴニアの細胞分裂に伴う細胞壁形成が完全に阻害される(死滅する)一方、ペニシリン処理した栄養細胞は 16 時間後でも細胞は生存していることがわかった。この条件で変異体群から目的の変異体を選別できる可能性が示されたので、同様の条件を用い、用意した *Nostoc* sp. の突然変異体約 300 個体からホルモゴニア形成に異常を示す個体の単離を試みた。しかし、時間の制約のため単離を完了するところまでは及ばなかった。

5. 今後の課題

本派遣により、糸状性ラン色細菌 *Nostoc* 29133 株のトランスポゾン突然変異体の作成法、および目的の変異体個体を選別する方法の基礎を習得することができた。特に、蛍光シグナルを高感度カメラを用いた実験方法は、さまざまな環境条件の変化によって引き起こされる現象の分子的な背景を明らかにするのに役立つ。これは、派遣者の目標とする、光合成生物の進化と環境条件の変遷の解明を進めていく上で非常に強力な手法となると考えられ、今後の研究に大いに活用したい。また、実験を通じて、ラン色細菌の形態形成や生理学的反応、植物との共生関係といった様々な特徴を扱うことができ、ラン色細菌の進化を広い視点から見直す契機になると考える。

今回の滞在では、時間の制約上、ホルモゴニア形成に関与する遺伝子を単離するところまで実験を終えることができなかったが、引き続き実験を進めて

おり、研究を完成させる予定である。そして将来的には、本派遣で習得した手法や知識を利用し、ラン色細菌の形態的・生理的な多様性を支える分子的機構を手がかりに、進化の問題や地史学的な環境変動との対応の解明に取り組んでいきたい。

6. 参考文献

- Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R. & Summons, R. E. (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285:1033-6.
- Cohen, M. F., Wallis, J. G., Campbell, E. L. & Meeks, J. C. (1994) Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. strain ATCC 29133, a filamentous cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives. *Microbiol.* 140: 3233-3240.
- Wolk C. P., Cai, Y. & Panoff, J.-M. (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 5355-5359.