

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 柴田 哲

現在、発展途上国を中心として、世界人口は、急速な増加を示している。そのため、世界の食糧の安定供給に深刻な問題が起こることは確実で、安定、かつ、多くの食糧資源を確保する方法の確立が重要視されている。現在、環境調和型の持続的農業が注目され、生物窒素固定が注目されている。その中でも、生物窒素固定量の約半分以上を占めるマメ科植物と根粒菌によって営まれている、共生窒素固定が最も注目され、世界中で様々な研究が行なわれている。このマメ科植物と根粒菌の共生窒素固定を農業生産に有効に利用することは環境調和型の持続的作物生産体系の確立のために必要不可欠な課題と考えられている。そのためにもマメ科植物と根粒菌の間で行なわれている複雑な相互作用を解明することは重要である。現在、植物側ではノジュリン遺伝子と呼ばれる根粒に強く発現する遺伝子が幾つか単離されている。しかし、どのような遺伝子が根粒形成過程に関与するのかについては、まだ解明されていない部分が多く残されている。

本論文ではこのような背景をもとに、共生菌である *Azorhizobium caulinodans* ORS571 に感染されることによって根粒ばかりでなく茎粒も形成する特徴を備え、さらに、茎粒が茎に突起状態で存在し、肉眼で容易に確認できる不定根という部位に形成するため、共生菌の感染部位を感染前に特定できる利点を備えている西アフリカ、セネガル原産のマメ科植物である *Sesbania rostrata* を用いて茎粒形成過程において、発現が変化する新たな遺伝子群を、できる限り多く単離し、解析することを行った。

第1章の序論に続く第2章では、differential display 法等によって茎粒形成過程において発現が変化する遺伝子群のスクリーニングを行ない、その結果を述べている。RI とシークエンスゲルを用いて 16 種類のランダムプライマーと Oligo-dT プライマーの 3'-末端側に A, G, C を付加した 3 種類のプライマーの組み合わせで行った differential display 法によって、共生菌接種後、遺伝子発現が変化すると思われる differential displayed fragments を合計 71 回収し、シークエンスを行ない、*SrDD* とした。次に、non - RI でアガロースゲルによって 16 種類のランダムプライマーのみを用い、発芽後 3 週間経過した植物の共生菌未接種、接種後 1, 4, 7, 14 日目の試料を用い differential display 法を行い、茎粒形成過程に発現が変化すると思われる differential displayed fragments を 17 回収し、シークエンスを行ない、*ddSr* とした。さらに、茎粒から 22 の cDNA を回収し、シークエンスを行ない、*SrNOD* とした。取得された *SrDD*、*ddSr*、*SrNOD* について特異的にプライマーを設計し、茎粒形成過程において簡易の RT-PCR 解析を行った結果、9 つの *SrDD*、11 の *ddSr*、16 の *SrNOD* が茎粒形成過程にともない遺伝子発現に変化を示すことが予想された。さらに、RACE 法によって上記の *SrDD*、*ddSr*、*SrNOD* について、cDNA の全長解析を行なった結果、21 の cDNA について全長解析に成功した。

第3章では、全長解析に成功した21のcDNAについてゲノミックサザンハイブリダイゼーション解析を行なった。さらに、semiquantitative RT-PCR サザンハイブリダイゼーションによって、莖粒、根粒形成過程における遺伝子発現解析と遺伝子発現部位の器官特異性について根、莖、葉、花、つぼみ、さや、根粒、莖粒の試料を用いて調べた。その結果、16のcDNAが莖粒あるいは根粒形成過程において、遺伝子発現が変化することを明らかとした。これら16のcDNAのうち11のcDNAについては*S. rostrata*以外のマメ科植物を含めて、根粒、莖粒形成過程における詳しい遺伝子解析は本論文が初めてである。そのうちで、現在のデータベースに登録されている遺伝子と有為な相同性を示さなかった3種類の*SrNOD 7*は莖粒および根粒に特異的であることが明らかとなった。そのため、*SrNOD 7*は新規のノジュリン遺伝子と考えられた。また、*myo*-inositol-1-phosphate synthase と推定される *ddSr 3*も莖粒と根粒における遺伝子発現が他の器官に比べて明らかに強いことからノジュリン遺伝子と考えられた。glycogen synthase kinase 3 と予想される *SrDD 9-1* や acyl-coA dehydrogenase と推定される *ddSr 7* は莖粒や根粒形成過程ばかりでなく花芽形成にも関与していることが示された。さらに、*S. rostrata* の根粒形成過程において、S-adenosyl-L-methionine synthase と予想される *SrNOD 8* が根粒の細胞分裂が盛んな時期に、根粒において遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。*SrNOD 8* は *S. rostrata* の根粒形成過程において、遺伝子発現が抑制される遺伝子として最初の遺伝子である。

以上、本論文は根粒形成過程に関わる新たな遺伝子を数多く単離し、その発現解析を行ない、共生生物窒素固定における根粒形成過程について有用な知見を得たもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値があるものと認めた。