

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金森 紀仁

本論文では、セスバニアの茎・根粒形成のメカニズムの解明をめざして。また、茎・根粒形成解明のために用いたセスバニアは実験系として世界的にほとんど使用されていない植物であることから、実験手法の確立も主要研究課題とした。論文は6章で構成される。

第1章の序論に続く第2章から第4章では、マメ科植物に形成される根粒の形態比較を行っている。マメ科植物および非マメ科植物に形成する根粒は無定型根粒、有限型根粒、アクチノリザル根粒の3タイプに分類されている。この論文では、有限型根粒、無定型根粒、アクチノリザル根粒、セスバニア茎粒の形態の相違を従来の顕微鏡観察に加え、3次元立体再構築法を用いて、内部組織をコンピューター上で解析することで形態比較を行った。セスバニアは他のマメ科植物とは異なり、根粒に加え、茎粒を形成する。茎粒は茎に形成する不定根に根粒菌が侵入したときに形成されるが、セスバニアの茎粒は共生根粒菌接種後、約3日で明らかな茎粒原基が観察される。セスバニア茎・根粒ともに外観は有限型根粒と同じ球形をしている。本論文では、セスバニアの根粒の窒素固定領域は不定根由来の維管束を取り囲むようにドーナツ型や蹄鉄型の形態をしていることを明らかとした。この維管束を取り囲むように存在する窒素固定領域はアクチノリザル根粒と類似している。切片化した茎粒を蛍光顕微鏡により観察を行ったところ、セスバニア茎粒には窒素固定領域、不定根由来の維管束、茎粒維管束が観察され、不定根由来の維管束は窒素固定領域を貫くように伸びていた。セスバニア根粒の形態の特徴をまとめると、1) 球状の形態は有限型根粒に類似、2) 不定根由来の維管束はアクチノリザル根粒類似、3) 分裂域を持たない点は有限型に類似、4) 茎粒維管束が分岐している点は無定型に類似、5) 木部やペリサイクルの密集がない点は無定型とアクチノリザル根粒に類似、という特徴が認められた。以上のことからセスバニアの根・茎粒はこれまで知られている3つの分類に属さない新しいタイプの根粒と判断した。

第5章では、マメ科植物の根粒菌の感染と病原微生物に対する応答の相違を確かめるために病原菌応答のマーカーを作製し、発現の相違を調べた。この論文では、セスバニアの *PAL*, *GLU*, *CHS* をマーカー遺伝子として選んだ。これらはいずれも病原菌 *B. cinerea* を接種すると発現が誘導される遺伝子として分離されたものであるが、植物はこれらの遺伝子を複数保持しているため、一つの遺伝

子の発現を見ているとは断定できないが、病原菌応答のマーカーとして用いることは可能である。セสบانياに共生根粒菌 *A. caulinodans* ORS571 を接種した時、*PAL* および *CHS* は発現が誘導された。*PAL* および *CHS* は根粒菌接種後 2 時間から 1 日にかけて発現が上昇しているが、4 日、10 日後には発現が再び減少した。病原菌 *B. cinerea* を接種した場合、*GLU* の発現の上昇が確認できたが、根粒菌接種の場合、*GLU* の発現の誘導は見られなかった。*GLU* に関しては定常的な発現であり、明らかに病原菌応答と異なる反応を示したことから、病原菌と根粒菌のなんらかの認識機構が存在していることが明らかとなった。今回作製したマーカーを用いて障害応答や *A. rhizogenes* に対する応答を観察した。障害を与えた根において *PAL*, *CHS* 遺伝子の発現が誘導されたのに対し、*GLU* 遺伝子の発現は誘導されなかった。一方、茎においては *PAL*, *CHS* 遺伝子は定常発現なのに対し、*GLU* 遺伝子の発現は上昇した。*A. rhizogenes* を接種すると *PAL*, *GLU* 遺伝子の発現が誘導されたが *CHS* 遺伝子の発現誘導は確認できなかった。毛状根でも同様に *PAL*, *GLU* 遺伝子は *A. rhizogenes* を接種することで発現が誘導されているが *CHS* 遺伝子の発現誘導は確認できなかった。今回作製した病原菌応答のマーカーは根粒形成に加えて障害応答や *Agrobacterium rhizogenes* の感染時において病原菌応答と発現が異なっていた。

第 6 章では、セสบانياの培養細胞系および形質転換系の確立することを試みた。培養細胞はサイトカイニン (6-BA) 0.5 mg/l、オーキシシン(2,4-D) 1.0 mg/l および 2% ショ糖を含む MS 培地を用い、120 rpm, 30 °C の条件で得られた。作製した培養細胞に Nod ファクターを加えたところ、*enod40* は Nod ファクターを加えた条件で発現が確認された。しかし、培養細胞の状態により、根粒菌未接種の条件でも *enod40* の発現が観察されたことから、根粒形成メカニズム解明のための実験系に用いる培養細胞としては問題があると判断された。次に、*A. rhizogenes* による毛状根形成を介した形質転換法を試みた。毛状根は *A. rhizogenes* 2659 を感染させることによって誘導した。GUS 遺伝子を組み込んだ形質転換セสบانياの作出が可能であり、今後の研究に役立つものと考えられた。さらに、植物ホルモンフリーの MS 培地で毛状根の液体培養系を確立した。この毛状根は再分化させることなく継代培養が可能であった。今回作製した毛状根や毛状根を介した形質転換系は根粒形成メカニズムの研究に役立つものと期待される。

以上、本論文ではマメ科植物セสบانياの根粒形成に関する基礎的な研究を行ったものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。