

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丸 幸弘

マメ科植物の根粒は内在する細菌が窒素固定反応を行うことによって、植物に窒素を供給している。熱帯性マメ科植物 (*Sesbania rostrata*) は根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 が共生し、根粒のみならず茎粒を形成する。この茎粒は成長が早く接種後約 10 日で成熟し、また茎粒は地上の不定根の部分にでき、あらかじめ部位を特定できるので観察するのが容易である。現在、根粒形成に関する研究は、根粒菌が植物体へ感染するまでの根粒形成初期過程の研究が中心であり、根粒原基が形成されて根粒菌が侵入した後、根粒が成熟し窒素固定を開始するまでの間にどのようなシグナル交換が起こり、遺伝子が発現しているかはほとんど解明されていない。本研究では *A. caulinodans* - *S. rostrata* 共生系の利点を利用し、未だ研究の進んでいない根粒成熟過程に関与する根粒菌の遺伝子の機能解明を試みた。

第 1 章の序章に続く第 2 章では、*A. caulinodans* ORS571 株の茎粒の成熟しない Tn5 変異株ライブラリーを作製し、これらの中から成熟しない菌株を選別した。約 1000 株の *A. caulinodans* の Tn5 挿入変異株を接種試験により選別し、茎粒が成熟しない変異型株を 7 株 (ORS571-C1, ORS571-C12, ORS571-C30, ORS571-C33, ORS571-C38, ORS571-C49) 単離した。さらに、得られた変異株によって形成される茎粒の内部形態を観察し、根粒菌が感染糸を伸ばし細胞内部に進入するが、その後成熟が止まり、茎粒が成熟するに至ることができない ORS571-C12, ORS571-C24 の 2 株に焦点を絞った。

第 3 章では、第 2 章で選抜された変異株の Tn5 挿入部位周辺の塩基配列を解読し、Tn5 の挿入が表現型の原因であることを相補試験で確認した。ここでは、挿入部位の遺伝子の全長と周辺部位の解析をするために、野生株のゲノムコスミドライブラリーを作成し、遺伝子の全長を含むシャロミドベクターのスクリーニングを行なった。それぞれのシャロミドベクターを primer walking シークエンスを行なうことで Tn5 挿入周辺部位 6813bp, 6921bp を解読した。FASTA 検索を行った結果、ORS571-C12 は挿入部位も含めて 6 つの推定 ORF が、ORS571-C24 は挿入部位も含めて 4 つの推定 ORF を見出した。ORS571-C12 は、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* の推定 ORF である bll2920, bll2921, bll2922, bll2923, bll2924, bll2925, bll2926 とそれぞれアミノ酸レベルで 72%, 81%, 82%, 74%, 79%, 87%, 85% の高い相同性を示した。ORS571-C24 は、*B. japonicum* の推定 ORF である bll4322, bll4321, bll4320, bll4319 とそれぞれアミノ酸レベルで 47%, 56%, 55%, 71% の高い相同性を示した。このことから、ORS571-C12 の挿入部位の周辺部位の一連の構造は ABC transporter を構成する一連のタンパク質であることが推測され、ORS571-C24 は resistance/nodulation/cell division (RND) family に属する Multi-drug efflux system を形成することが推測された。

第 4 章では、得られた変異株の表現型を電子顕微鏡観察、窒素固定能、LPS 組成などさ

さまざまな角度から検討した。根粒着生数を比較したところ、ORS571-C12 は野生株とほぼ同数の着生数を示したが、ORS571-C24 は野生株に比べ約 2 倍の無効根粒が形成された。アセチレン還元活性を用いて窒素固定能を確認した結果、それぞれの変異株を接種した茎粒では窒素固定能がないことが明らかとなった。電子顕微鏡により茎粒内部を詳細に観察したところ、野生株を接種した茎粒では感染細胞と非感染細胞が明確に別れ、感染細胞において数個の根粒菌がバクテロイド膜の中に存在し、活動を行っている様子が観察された。一方、ORS571-C12 では、バクテロイド膜の内部に 1 個しか存在せず、それぞればらばらに存在している様子が観察され、ORS571-C24 では、バクテロイドの形成が起こってはいるものの、感染細胞の細胞膜が細胞壁と解離し、細胞が縮小している感染細胞が見受けられ、感染細胞数も減少していた。さらに、過去にこのような表現形が LPS や EPS の構造の変化により起こるといった報告があるため、それぞれの変異型株の LPS を抽出し SDS-PAGE を行い銀染色により LPS の比較を行なった。その結果、LPS に異常は見られなかった。

第 5 章では、ORS571-C24 について、原因となっていると考えられる遺伝子の発現解析等を行った。ORS571-C24 のそれぞれの遺伝子を、*sreRABC* と命名し、これらの遺伝子を RT-PCR と遺伝子破壊を用いて解析した。この結果、*sreR* は何らかの形で *sreA* の発現を制御しており、*sreR* の変異によって *sreA* の発現が低下した可能性が示唆された。さらに、野生型株の Free-living と茎粒中のバクテロイドにおいて発現を比較することで、*sreA* の発現と茎粒形成との関連性を検討した。その結果、茎粒中のバクテロイドでは *sreA* の発現が Free-living 時よりも上昇していることが分かった。これらの結果から、*sreA* は根粒中で発現してなんらかの機能を果たし、ORS571-C24 では *sreR* の機能が不完全になることによって *sreA* の根粒中のバクテロイド内での発現が低下し、その発現低下によって茎粒形成に異常が生じている可能性が示唆された。

以上、本論文では根粒の成熟に関与する新規な遺伝子を見出し、その機能解明を試みたものであり、審査委員一同は学術上、応用上価値あるものと認め、博士（農学）の学位論文として十分な内容を含むものと認めた。