

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 横田 圭祐

---

根粒菌は土壤中に単生する時には窒素固定活性を示さず、宿主植物であるマメ科植物と共生することによって窒素固定能を発現する。窒素は作物栽培の最重要肥料成分であるが、その化学合成には多大なエネルギーを消費しており、この植物—微生物間で行われる共生窒素固定機能の有効利用は 21 世紀の持続型農業技術の開発において、イネなどの非マメ科植物への共生窒素固定機能付与といった応用技術開発を含め、非常に重要な課題であると考えられ、このためには根粒菌と共生窒素固定成立の分子機構を明らかにすることは必要不可欠である。本論文では、共生初期過程に引き続く根粒菌の感染プロセスと根粒組織形成、共生窒素固定発現に關与する宿主植物の遺伝的背景の解明を目的としてマメ科モデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根粒組織形成変異体及び共生窒素固定変異株を用いて変異原因遺伝子の同定及び機能解析を行った。

本論文は 3 章からなり、序論に続く第 1 章ではデンマークオーフス大学で取得された根粒形成不全変異体 4 系統 (*Sym10*、*Sym40*、*Sym43* および *Sym67*) のおよその遺伝子の位置を決めるマッピングを行った。この結果、*Sym40* は第 1 染色体下腕部、*Sym67*、*sym10* は第 4 染色体上腕部に位置することが分かり、これまでに報告されていない新規な根粒形成不全変異体であることが分かった。また、既にラフマッピングが終了していた *Sym43* については第 5 染色体上における詳細な遺伝子の位置を決定 (ファインマッピング) し、新規な変異体であることを確認した。

第 2 章では、1 章で用いた *Sym40* および *Sym67* について、クロモソームウォーキング及びファインマッピングによって遺伝子の特定を試みた。*Sym67* についてマップベースクローニングにおける交配パートナーであるミヤコグサ Miyakojima MG-20 と交配して得られた変異表現型を持つ F2 集団約 1100 株を解析した結果、*Sym67* 変異原因遺伝子を挟む近傍マーカー間の距離は約 1.2 cM であることが分かった。同様に *Sym40* について F2 集団約 300 株を解析した結果、*Sym40* 変異原因遺伝子を挟む近傍マーカー間の距離は約 2.0 cM であることが分かった。そこで、デンマークオーフス大学 Jens Stougaard 教授の研究グループが所有する再生固体由来ミヤコグサ Gifu 変異株ライブラリーの中で、既に変異原因遺伝子が単離されている変異株アリルにはミヤコグサ内在性レトロトランスポゾン (*Lotus retrotransposon 1*、LORE1) が挿入された

ことにより変異が引き起こされている変異株が少なくとも 3 株 (*LjNin*, *LjSymRK*, *LjNup133*) 見つかったことが報告されており、このことから LORE1 を用いた Sequence Specific Amplified Polymorphism (SSAP) 法による *Sym40*, *Sym67* 変異原因遺伝子単離を試みた。その結果、*Sym67* 親株及び Miyakojima と交配された変異表現型を持つ F2 集団 100 株について完全に連鎖された挿入バンドが確認され、LORE1 挿入部位配列解析の結果、*Sym67* 変異原因遺伝子はアクチン重合核となる Arp2/3 (actin-related protein 2/3) 複合体活性化因子である WAVE (WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) family verprolin homologous protein) 複合体に含まれる Nap (Nck-associated protein) 相同遺伝子であることが分かった。また、*Sym40* の根粒形成表現型は *Sym67* と非常に似ており、このことから *Sym40* は *Sym67* と同様にアクチン重合に関与する遺伝子に変異があることが推測された。*Sym40* は SSAP 法による変異原因遺伝子への LORE1 遺伝子挿入は確認されず、既に明らかにされていた *Sym40* 変異領域配列内に *Sym67* と同様に WAVE 複合体に含まれる Pir (p53-inducible mRNA) 相同遺伝子が確認された。そのため *Sym40* の Pir 相同遺伝子配列を確認したところ Pir 相同遺伝子エキソン部位に約 400 bp の欠損が確認され、*Sym40* 変異原因遺伝子は Pir 相同遺伝子であることが明らかとなった。

第 3 章では、*Sym40* および *Sym67* 変異体の表現型を観察し、アクチン重合の不全が根粒菌がマメ科植物に侵入した時に形成される感染糸の形成不全の原因となっていること、また、豆果の形成が悪く種子の数が少ないこと、トライコームの伸長不全などもアクチン重合の不全が原因となっている可能性を示唆した。

以上、本論文はミヤコグサの根粒の成熟に関与する新しい遺伝子を見出し、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。