

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

井木 太一郎

---

申請者氏名

近年、多くの細菌の全ゲノム塩基配列が解読されている。根粒菌についても約 10 種の菌株について全ゲノム塩基配列が報告された。ゲノム塩基配列情報から細菌の進化についてさまざまな解読が行われている。本論文では、根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 株のゲノム情報を用いて、窒素固定に関連する遺伝子の進化および機能の十分解明されていない GTPase の 1 つ *hflX* の機能解明を試みたものである。

本論文は 2 章よりなり、序論に続く第 1 章では根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 株の *nifH* 遺伝子の倍化に焦点をあて、倍化後の機能分化などに関するさまざまな実験を行って進化について考察している。この根粒菌の *nifH* は倍化によって *nifH1* と *nifH2* の 2 つが存在しているが、アミノ酸配列レベルでは 1 アミノ酸が異なっている。しかしながら、このアミノ酸を置換させたタンパク質のアセチレン還元活性に違いは見られなかった。それぞれの遺伝子の破壊株を作製して、アセチレン還元能で窒素固定活性を調べたところ、窒素固定活性が高まる低酸素ガス濃度（酸素ガス 3%）においては *NifH2* が有意に高い活性を示した。遺伝子の発現をレポーターを用いて調べたところ、酸素ガスの濃度に拘わらず常に *nifH1* のほうが *nifH2* より多量に発現されていることが確認された。このことから、*nifH1* は遺伝子発現では高いが、実際の窒素固定能に対する寄与度は低いという矛盾が存在した。遺伝子発現されている mRNA に対してノザン分析を行ったところ、*nifH1* はオペロンの下流に存在する *nifD* および *nifK* とつながった mRNA で存在し、*nifH2* 遺伝子は単独で切れた形で存在することが分かった。機能解析の結果、*nifH1* の下流には 1 個、*nifH2* の下流には 2 個のパリンドローム様構造が機能的に存在することが判明した。これらのことから、*nifH1* のパリンドロームは機能的であるものの、窒素固定細胞では機能していないと結論付けられた。倍化した *nifH* 遺伝子における解析により、パリンドローム構造に依存した mRNA の安定性が遺伝子発現レベルを決定していることを明らかとした。

第 2 章では、機能がほとんど解明されていない GTPase の 1 つである *HflX* について、*Azorhizobium caulinodans* ORS571 を用いて解明を試みた。*nifH1* の転写について、レポーターを用いて調べたところ、*hflX* が存在する株に対して *hflX* 破壊株では 3' 側

にパリンδροーム構造が存在する構造の *nifH1* の量を減少させた。このことから、*hflX* は *nifH1* の転写後の安定性に関与する可能性を示唆した。*hflX* のとによりには *hfq* が存在し、Hfq タンパク質は RNA シャペロンとして mRNA のポリ A 付加と関与しているとされている。細菌におけるポリ A 付加は mRNA の分解を促進するためのもので、*hfq* 遺伝子のとによりに存在する *hflx* が mRNA の分解の制御に関与する可能性は高い。

以上、本論文では根粒菌の窒素固定に関連する倍化した遺伝子の進化および機能が不明な GTPase の 1 つの機能の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。