

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 塚田 周平

生物窒素固定は自然界の窒素循環において重要な役割を担っている。特に細菌が植物の根に共生して形成される根粒で行われる窒素固定は作物生産に深く係ることから重要な研究対象となってきた。この研究では、根粒菌 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 とマメ科植物 *Sesbania rostrata* の共生系を用いて、根粒菌の Lon プロテアーゼの根粒形成および成熟に果たす役割を解明しようと試みた。

論文は 4 章より構成されている。*A. caulinodans-Sesbania rostrata* 共生系では、*A. caulinodans* ORS571 の転写後制御因子 Lon プロテアーゼをコードする *lon* 遺伝子の破壊により、茎粒形成に異常が起こることが明らかになっている。そこで、序論に続く第 2 章では、*A. caulinodans* ORS571 の Lon プロテアーゼをコードすると考えられる *lon* 遺伝子 (AZC_1610) の欠損変異株を作製し、表現型を調べた。*lon* 遺伝子を欠損した ORS571 Δ *lon* 株を *S. rostrata* に接種したところ、未成熟な茎粒が形成された。この表現型は、完全な *lon* 遺伝子を相補することで復帰した。窒素固定活性を示すアセチレン還元能には、非共生時には野生型株との有意な差は認められなかったが、共生時には ORS571 Δ *lon* 株を接種した茎粒は窒素固定活性を持たなかった。また、*lon* 遺伝子と *lacZ* 遺伝子の転写融合株を接種し、 β ガラクトシダーゼ活性局在を観察したところ、感染糸内、および感染細胞内の双方において *lon* 遺伝子が発現していることが確認された。光学顕微鏡によって *lon* 欠損株接種後 12 日目の茎粒を観察したところ、野生型株と異なり、感染糸は観察されるものの感染細胞はほとんど観察されず、感染領域と考えられる領域も不均一な形態の細胞で占められていた。また、感染ポケットに菌が蓄積し、肥大している様子が観察された。さらに透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、ORS571 Δ *lon* 株が感染した植物細胞はほとんどが液胞で占められており、正常なバクテロイドとは異なる形態の菌体が観察された。また、感染糸には菌が蓄積していた。これらは光学顕微鏡での観察を裏付けた。さらに、*lon* 遺伝子のプロモーター領域を、茎粒中で強く発現が上昇する *nifH1* 遺伝子のプロモーター領域と置換した株を接種したところ、一部の茎粒では表現型の回復が見られたが、表現型が回復しない茎粒も観察された。これらの結果から、ORS571 Δ *lon* 株が感染した茎粒では、植物細胞への侵入直後のバクテロイド化からバクテロイドの維持に異常が起きていることが示唆された。また、根粒形成に影響を与えられとされる菌体外多糖 (EPS) 合成量を調べたところ、ORS571 Δ *lon* 株では異常がみられたことから、EPS 含量が表現型と関係している可能性も考えられた。

一般に Lon プロテアーゼは、不要なタンパク質の分解のみならず特定のタンパク質を分解することで転写後制御因子として機能することが知られている。そこで、第 3 章では ORS571 Δ *lon* 株においてどのような遺伝子発現の変化が生ずるか、網羅的発現解析をマイクロアレイを用いて行うことで、Lon プロテアーゼによる遺伝子発現制御の特徴を明らかにすることを試みた。まず、*A. caulinodans* 野生株 ORS571 の共生時における遺伝子発現を解析した。富栄養および貧栄養培

地中での生育時、フラボノイド添加時、および共生時の *A. caulinodans* ORS571 の全推定 ORF の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、*A. caulinodans* ORS571 の共生時における遺伝子発現の特徴を明らかとした。窒素固定を担う *nif* および *fix* 遺伝子の発現が共生時に著しく上昇すると同時に、C4 ジカルボン酸など硝化酵素の活性を維持するために必要と考えられる物質の輸送が積極的に行われており、また、有機硫黄化合物の輸送や代謝を担う遺伝子群の発現も上昇していた。共生アイランド内では、共生時のみならずフラボノイド添加時でも発現が上昇するトランスポザース遺伝子が存在することが明らかになった。これは他の根粒菌では報告されておらず、*A. caulinodans* ORS571 に特徴的であると考えられた。つぎに、ORS571 Δlon 株について遺伝子発現を調べた。ORS571 Δlon 株の形成する莖粒では、バクテロイドがほとんど存在せず、単離することができないため、富栄養および貧栄養培地中の生育における発現解析を行った。得られた発現プロファイルをもとに野生型株の発現解析結果との二群間比較を行った結果、非共生時に Lon プロテアーゼの欠損によって発現が影響され、かつ野生型株の網羅的解析から莖粒形成においてその発現調節が重要と考えられる遺伝子が複数見出された。これらには、EPS の合成に関わると考えられる遺伝子群が含まれており、これは ORS571 Δlon 株の EPS 合成量調節の異常と関連していると考えられる。また、*fixNOQP* 遺伝子群の発現にも影響があった。これらの遺伝子群は転写因子 FixK によって制御されていることが知られており、Lon プロテアーゼが FixK による制御に関与していることが予想された。*fixNOQP* 遺伝子と同様な発現パターンを示す遺伝子群について翻訳開始点から上流 500bp の配列を解析したところ FixK ボックスと考えられるコンセンサス配列 TTGA-N6-TCAA を保持する遺伝子が複数見出された。ここから、*A. caulinodans* ORS571 において FixK がより広範囲にわたる遺伝子の制御を行う可能性が示唆された。また、転写因子 CtrA が発現に関与すると考えられる遺伝子群の発現も *lon* 遺伝子の破壊によって影響を受けており、また一部の遺伝子の上流には CtrA ボックス TTAA-N7-TTAA が保存されていたため、Lon プロテアーゼは FixK や CtrA などの制御下にある遺伝子の発現に影響を及ぼすことが予想された。ビオチン生合成遺伝子をはじめとして、莖粒中で必須であるものの ORS571 Δlon 株では発現が低下するものが含まれた。また、ORS571 Δlon 株のみで発現が上昇しており、植物病原細菌の病原性に関与するとされる *rebB* 遺伝子の発現が、*lon* 遺伝子の破壊によって上昇していた。このことから、Lon プロテアーゼの機能には、共生関係を促進する遺伝子の発現を誘導する機能、および共生関係を阻害する遺伝子の発現を抑制する機能の 2 つの機能を持つことが示唆された。

以上、本論文は根粒菌の Lon プロテアーゼが根粒形成にどのように関与するか、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。