

窒素は作物にとって重要な肥料成分の一つであり、窒素肥料を生産するために大量のエネルギーが消費されている。マメ科植物などが行う細菌との共生窒素固定能力を、イネやコムギなど非マメ科植物に付与する技術開発は持続型農業の重要な課題になっている。このためには、共生窒素固定のメカニズムの解明は必要不可欠な課題と考えられる。本論文では、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系、特に根粒の成熟と維持のメカニズムをマメ科モデル植物ミヤコグサ-*Mesorhizobium Ioti* の系を用いて解明を行った。

論文は4章より構成されている。序論に続く第2章では、ミヤコグサの根粒の成熟・維持に関与する遺伝子を網羅的に取得することを目指し、変異誘導化合物である EMS を用いて変異体を多数作出して、根粒の成熟・維持に異常を示す変異株を選抜し、これらについてマップペースクローニングおよび候補遺伝子の塩基配列解読により原因遺伝子の特定を行った。スクリーニングの結果、根粒非形成(Nod-)変異株 18 株、無効根粒形成 (Fix-) 変異株 30 株以上、根粒過剰着生 (Fix++) 変異株 2 株を取得した。Nod-変異株について原因遺伝子の染色体上での位置を調べるため、かずさ DNA 研究所ホームページ (<http://www.kazusa.or.jp>) に記載されている SSR マーカーを使用してマッピングを行い、さらに候補遺伝子については塩基配列を解読して変異部位を確認した。その結果、Nup85 遺伝子変異 2 株、Nup133 変異 4 株、Pollux 変異 6 株、CCaMK、SymPK、Castor、Nin、Nfr1、Nfr5 の変異株それぞれ 1 株ずつが取得された。Fix-変異株については、30 株以上取得されたが、これらの中で生育が阻害される変異株や根粒数が野生株と比べて若干少ない変異株は研究対象から除外し、生育が良い変異株 6 株を研究対象として研究を行った。この結果、Ign1 変異 2 株、Sst1 変異 2 株、Sym7 変異 1 株、Sen1 変異 1 株が取得された。Fix++変異株についてマッピングと遺伝子解読により OL2168 変異株の原因遺伝子は Har1 であると判明した。もう一つの Fix++株 OL945 変異株の原因遺伝子は第 1 染色体の 53. 7~61. 4cM 付近にマップされ、この領域に根粒形成に関与する遺伝子座が報告されていないことから新規遺伝子であると判断した。

第3章では、取得された根粒過剰着生株の過剰着生のメカニズムの解明を進めた。根粒過剰着生変異株 OL945 について経時的に根粒数を調べた結果、野生型株より約 5~10 倍多く形成された。接ぎ木実験で野生型株 MG-20 を接ぎ穂として OL945 変異株を台木として接合した場合、根粒過剰着生が観察された。逆に野生型株 MG-20 を台木として OL945 変異株を接ぎ穂として接合した場合は正常な根粒が形成された。このことから OL945 変異株の根粒過剰着生は根の遺伝子型によって決定されることが明らかとなった。そこで、OL945 変異株の根粒過剰着生の原因遺伝子座を Rdh(Root determined hypernodulation)1 と命名した。つぎに、窒素を十分含む土壌 (クレハ培土) で Ljrdh1 の生育を播種後 13 週間 (根粒菌接種後 12 週間) にわたって調べた。この結果、播種後 13 週後の種子と豆巢の乾燥重

量は野生型株 MG-20 より 55.9%重く、豆果数は 52.8%多いという結果を得た。このことから、Rdh1 遺伝子が将来マメ科作物の生産量増加のために役立つ有用遺伝子である可能性が示唆された。つぎに、Ljrdh1 と Ljhar1 について植物の病害応答が根粒の過剰着生に関係するかを調べるため、10 種類の病害応答に関連する遺伝子について発現解析を行った。根粒菌接種後 2 日目、4 日目、7 日目、14 日目に病害応答遺伝子の発現を解析した結果、Ljrdh1 と Ljhar1 の根粒過剰着生変異株は野生型株よりほぼ全ての病害応答遺伝子の発現が栽培期間を通じて弱かった。このことから根粒過剰着生は根の病害応答が抑制されていることが原因となっている可能性が示唆された。

第 4 章では取得された Fix-変異株 Ljign1 株の窒素固定不全のメカニズムの解明を進めた。研究室で作製された根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株の LPS 合成関連遺伝子破壊株について、これらの株の感染が植物の Nodulin 遺伝子や病害応答遺伝子の発現に与える影響を調べた。多数の LPS 合成関連遺伝子破壊株の中で、Ljign1 変異株に rfbD 欠損根粒菌株を感染した時、野生株を感染させた場合より著しく窒素固定能が高いことが分り、この原因の解明を進めた。rfbD 欠損根粒菌株から LPS を抽出してその構造を調べた結果、S-LPS では変化が観察されなかったが、R-LPS では糖鎖が短くなっていることが確認された。このことから rfbD 欠損根粒菌株の LPS はコア多糖の部分に変化している可能性が高いと考えられた。また、Ljign1 変異株に rfbD 欠損根粒菌株を感染させた根粒で感染細胞を光学顕微鏡で観察した結果、感染細胞は野生型株に野生型根粒菌を感染した株と同じような正常な根粒が形成された。遺伝子発現解析から Ljign1 変異株では根粒形成に関わる遺伝子群 (Nodulin 遺伝子群) の発現誘導が著しく低下することが判明した。また、Ljign1 変異株に rfbD 欠損根粒菌株を感染した株の根粒形成関与遺伝子群の発現解析結果から Nodullin 遺伝子群の発現誘導には根粒菌の LPS の構造が影響を与えていると結論づけた。

以上、本論文はミヤコグサの根粒成熟、維持および過剰着生のメカニズムの解明を進めたものであり、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。