

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Sirinapa Chungopast
審査委員	主査 野村 美加 副査 岩崎 貢三 副査 松枝 直人 副査 市村 和也 副査 田島 茂行

論文名

Functional analysis of nodule senescence in *Lotus japonicus*
inoculated with *Mesorhizobium loti*.
(ミヤコグサ根粒菌感染による根粒老化の機能解析)

審査結果の要旨

マメ科植物は根粒菌が感染すると根に根粒を形成する。根粒菌は植物細胞内へ侵入するとバクテロイドとして分化し、宿主マメ科植物と協調して効率よく窒素固定を行っている。老化に従い、窒素固定能は減少し多くの遺伝子発現の挙動が観察される。本研究ではマメ科植物ミヤコグサを利用し、根粒老化のメカニズムを解明することを目的とした。

本論文の概要は以下の通りである。

- 1) 共生窒素固定で生成したアンモニアは植物側へ輸送され、グルタミン合成酵素 (GS) によってグルタミン酸をグルタミンに変換することで有機化合物として同化される。本研究では根粒菌の GS に着目しその機能について調べた。根粒菌の GS は isogene を構成している。STM (Signature Tagged mutagenesis) 変異体のなかからそれぞれの GS 遺伝子に変異がある GS 変異株を検索し、それら変異体の共生窒素固定能について調べた。その結果、GSI 変異体をミヤコグサに感染させると着生した根粒は緑色で小さく、窒素固定活性が低くなりその結果葉も黄化が観察された。この結果から根粒菌 GSI 酵素が欠損すると早期老化現象が確認され、根粒菌 GSI は共生に重要であることが明らかとなった。
- 2) 根粒老化について詳細に調べるために、マイクロアレー解析を行い網羅的な発現を調べた。共生窒素固定活性が高い根粒菌感染後 2 週目および 4 週目の根粒と、老化が確認できる 8 週目の根粒から RNA を抽出して解析を行った。RNA-seq の解析から、根粒菌感染後 2 週目で発現する 20,165 個の遺伝子を選抜した。1 遺伝子に対し 60mer の 2 プローブ作成後、アジレント社の 4×44K プレーートをカスタムアレイにより作成した。その結果、根粒菌感染後 8 週目に 2 倍以上発現が誘導する遺伝子 641 個を決定した。NCBI の euKaryotic Orthologous Groups (KOGs) に応じて機能カテゴリー別に分類した結果、55.4%の遺伝子が既知の遺伝子と相同性を示した。この遺伝子群には老化誘導性遺伝子、NAC domain containing protein, 老化誘導型 heat shock protein, cysteine protease などが含まれることが明らかとなった。一方、老化時に発現が 2 倍以上減少する遺伝子として 416 個同

定した。この遺伝子群には共生窒素固定に必要な遺伝子が同定できた。得られた結果の信頼性を確認するために32個の遺伝子についてはRT-PCRにより確認を行った。

- 3) マイクロアレー解析の結果からフェリチン遺伝子に着目した。フェリチンは鉄含有タンパク質として知られているが老化により発現が増加する遺伝子として同定した。根粒の鉄含量を測定した結果、老化に伴い鉄含量が減少していることが明らかとなった。レグヘモグロビタンパク質は、根粒全タンパク質の10-30%を占めるヘムタンパク質である。しかし老化時に鉄が遊離しフェリチンとして地上部に転流しているのではないかと考えた。根粒を鉄イオン、また、NOドナーであるSNPを含む培地で育てるとフェリチン遺伝子発現が増加し、また、高濃度の鉄イオンを含む培地で育てた根粒はNOが発生している事が明らかとなった。以上の結果より鉄イオンはNOシグナルを介してフェリチン遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。老化により必要なくなったレグヘモグロビンは鉄を遊離し、フェリチンとして地上部へ転流していることを示唆する結果となった。

以上のように、本論文ではマメ科植物ミヤコグサを用いて根粒老化により誘導する遺伝子を明らかにしており、今後の研究につながる価値ある新しい知見を得ている。

本論文に関する公開審査会は2015年2月7日、愛媛大学農学部で開催され、申請者の論文発表と質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査委員会において慎重な審議を行った結果、審査委員全員一致して本論文が博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。