

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Mallika Duangkhet
審査委員	主査 野村 美加 副査 京 正晴 副査 康 峪梅 副査 松枝 直人 副査 市村 和也

論文名

Symbiotic nitrogen fixation regulatory mechanism in *Lotus japonicus* and *Clitoria ternatea*  
(マメ科植物ミヤコグサおよびチョウマメにおける共生窒素固定制御機構)

審査結果の要旨

根粒菌はマメ科植物に感染すると根粒細胞内で窒素固定を行う。窒素固定酵素ニトロゲナーゼは酸素に非常に弱いため、植物はこの酵素が効率的に働くように根粒内の酸素分圧を低く維持しながら、根粒菌や植物が根粒内で好氣的なエネルギー生産を行うために酸素との親和性の高いレグヘモグロビンを誘導する。これら共生で誘導されるニトロゲナーゼやレグヘモグロビンはその構造に鉄を大量に保有している。ミヤコグサを用いたマイクロアレー解析の結果、根粒老化時に鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンが誘導されることから老化時には鉄イオンが遊離している可能性が高い。本研究ではミヤコグサを用いてフェリチンの発現誘導及びその機能解析を行うことを目的とした。

まず、根粒老化時に発現が誘導されるフェリチン(*LjFer1*)遺伝子の局在性を調べるためにプロモーター遺伝子の下流にGUS( $\beta$ -グルクロニダーゼ)遺伝子を融合し根粒における経時的発現を調べた。その結果、老化根粒細胞内で強く誘導されることが明らかとなった。*LjFer1*のプロモーター領域には14bpのIDRS (Iron-dependent regulatory sequence) が保存されていたことから*LjFer1*は鉄イオンにより誘導されると推測した。そこで鉄を含む培地で栽培後、根粒の*LjFer1*遺伝子の発現を調べた結果、予想通り鉄イオンにより*LjFer1*の発現が誘導された。この誘導は硫酸鉄(II)、クエン酸鉄(III)を用いても同様の結果が得られたことから2価、3価どちらの鉄でも誘導していると推測した。さらに、*Ljfer1*の発現はNO (nitric oxide) donorであるSNP (sodium nitroprusside)の濃度に依存すること、NO scavengerである cPTIO (Carboxy-PTIO)により抑制されることが明らかとなった。またNOは鉄イオン依存的に誘導された。以上の結果から、老化根粒ではタンパク質などから鉄イオンが遊離し、NOシグナルを介してフェリチンに遊離鉄を隔離していることが明らかとなった。

次に、根粒フェリチンの機能を明らかにするために*Ljfer1*を過剰発現した形質転換根粒とRNAi法により発現を抑制させた形質転換根粒を作成した。その結果、培地中の鉄濃度が高いとフェリチンを過剰発現した形質転換根粒では、窒素固定能が高く維持された。一方、鉄欠乏条件下では発現を抑制させたほうが高い窒素固定能を持つことが明らかとなった。アルカリ性土壌は作物の鉄の吸収が阻害されその生産性や人間の健康にとって世界的に深刻な問題となっている。このような土壌で根粒内のフェリチン蓄積量が調節できればマメ科植物の窒素固定能を高く維持することができることが考えられ、収量増産も期待できる。

マメ科植物の収量増産には植物の研究のみではなく共生している根粒菌の解明も必要である。特に、農業上重要なマメ科植物に共生している根粒菌を明らかとすることは微生物資材として利用するための重要課題である。チョウマメ (*Clitoria ternatea*) は熱帯・亜熱帯性マメ科植物であり東南アジア・インドなどが原産である。近年、抗-HIVとして薬剤としての利用価値も見いだされ、今後生産量の拡大が期待されるマメ科植物の一つである。しかしながらその根粒に共生する根粒菌については全く報告がない。そこでタイ王国チェンマイ地域で生育しているチョウマメ根粒から根粒菌を単離した。単離した根粒菌は、16S rRNA、ITS領域を解読しBLAST検索を行った。その結果ほとんどが*Bradyrhizobium elkanii*であることが明らかとなった。また、わずかではあるが*B. japonicum*も感染していた。単離した根粒菌を再度チョウマメに感染させ窒素固定活性を調べた結果、*B. elkanii*を感染させた根粒の方が*B. japonicum*を感染させた根粒より高い窒素固定能を有することが明らかとなった。

次にチョウマメとチョウマメ根粒菌の感染メカニズムを解明するためにダイズ根粒菌を感染させた。その結果ダイズ根粒菌*B. elkanii* USDA 61 はチョウマメに感染し大量に根粒を着生した。USDA61根粒菌がマメ科植物に根粒を着生させるためには、宿主特異性を決定づけるNod ファクターを介したシグナル以外にT3SS (III型分泌装置) を介して感染し、そこで分泌されるエフェクターが根粒形成を促進する。チョウマメとダイズ根粒菌USDA61の感染が成立したのはT3SSによるエフェクターが関与しているのではないかと推測し、USDA61のT3SS変異体をチョウマメに感染させると、予想通り根粒着生数が減少した。これらの結果からチョウマメと根粒菌の根粒形成には、根粒菌が分泌するNodファクターをシグナルとするだけでなく、T3SSによるエフェクターを介した根粒形成メカニズムが存在することが明らかとなった。

以上、申請者は本研究を通じて、マメ科植物根粒におけるフェリチンの誘導メカニズムを解明するとともにその機能について考察した。さらにタイ原産チョウマメ根粒に共生している根粒菌を単離した結果、*Bradyrhizobium elkanii*が主要な根粒菌であり、高い窒素固定能を有することを明らかにした。またチョウマメの根粒形成が成立するためには根粒菌から分泌されるNodファクターを介したシグナル以外に、T3SSにより分泌されるエフェクターにより根粒形成シグナルが誘導することが明らかとなった。

本学位論文の公開審査会は平成30年8月4日に香川大学農学部で実施され、口頭発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で本学位論文の内容を慎重に審査した結果、審査員全員一致して、博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。