

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Supriadi
審査委員	主査 野村 美加
	副査 田淵 光昭
	副査 康 峪梅
	副査 松枝 直人
	副査 京 正晴

### 論文名

Study of biological nitrogen fixation in legume and non-legume plants  
(マメ科植物と非マメ科植物の生物的窒素固定の研究)

### 審査結果の要旨

植物は特定の微生物と共生を結ぶことで栄養を獲得している。植物の土壌微生物を利用した栄養獲得機構を解明することは、化学肥料を必要としない SDGs (持続可能な開発目標) の実現に向けた重要な研究課題の一つである。申請者はまず (1) マメ科植物ミヤコグサ根粒に蓄積するフェリチンの機能解析を行った。次に (2) 熱帯性マメ科植物チョウマメの根粒形成機構の解明を行った。最後に (3) イネ科植物サトウキビに共生する窒素固定菌の解明を行った。

#### (1) マメ科植物ミヤコグサ根粒に蓄積するフェリチンの機能解析

マメ科植物は根粒菌と共生し根粒を形成するが根粒内には大量の鉄が蓄積する。鉄はニトロゲナーゼやレグヘモグロビンなど根粒の主要な酵素やタンパク質に利用されている。フェリチンは不要な鉄イオンを蓄積するタンパク質であり、根粒老化に伴い細胞内に蓄積する。しかし若い根粒でもフェリチンは発現しており、鉄欠乏土壌でフェリチンが蓄積することは根粒内の窒素固定活性を高く維持するために効果的であるとは言い難い。これを検証するためにミヤコグサ毛状根形質転換体 (フェリチン過剰発現体とフェリチンの発現を抑制した RNAi 形質転換体) を作出し、様々な鉄濃度条件下で栽培した形質転換根粒の窒素固定を調べた。その結果、鉄欠乏下でフェリチン RNAi 形質転換体の根粒は高い窒素固定活性を示した。これは鉄欠乏条件下では根粒内に輸送された鉄が効率よくニトロゲナーゼやレグヘモグロビンに利用されたためではないかと推測した。一方フェリチン過剰発現形質転換体は、鉄の過剰条件下で窒素固定活性を高く維持することができた。以上の結果は、土壌中の鉄濃度に応じてフェリチンの蓄積量が異なるマメ科植物を選択的に選抜することは作物の生産性向上のために有効なアプローチであることを示唆している。

#### (2) 熱帯性マメ科植物チョウマメの根粒形成機構の解明

チョウマメの花は青い色をしており、タイでは健康食品として利用されている。近年、チョウマメの

花の抽出液から単離された環状ペプチドは、特徴的な構造をしていることが判明し、新規抗 HIV 剤や抗がん剤として注目されている。しかしながら、チョウマメの根粒菌との共生メカニズムについては殆ど研究が進んでいない。そこでまずチョウマメ根粒から根粒菌を単離し、16S rRNA, ITS 配列を解析した。その結果、チョウマメ根粒に共生する主要根粒菌は、*Bradyrhizobium elkanii* であることが明らかとなった。さらに 16S rRNA 系統解析により単離した根粒菌はダイズ根粒菌と相同性が高いことが判明した。様々なダイズ根粒から単離された根粒菌をチョウマメに感染させると、ダイズ根粒菌 *B. elkanii* USDA61 (USDA61) と共生が成立し、高い窒素固定活性をもつ根粒を形成した。ダイズには特定の根粒菌の根粒形成を抑制する *Rj* 遺伝子を保有する品種がある。*Rj4* 保有ダイズは USDA61 が分泌する 3 型分泌エフェクターにより根粒形成が抑制される。しかし USDA61 の 3 型分泌エフェクター変異株をチョウマメに感染させると根粒形成が阻害され、チョウマメでは USDA61 が分泌するエフェクターを介して根粒形成が誘導したのではないかと推測した。一方、*B. elkanii* USDA94 (USDA94) をチョウマメに感染させると根粒は形成しないが 3 型分泌エフェクター変異株を感染させると根粒を形成した。以上の結果、チョウマメは USDA61 が分泌する 3 型分泌エフェクターを介して根粒を誘導するが、USDA94 が分泌するエフェクターはチョウマメの根粒形成を阻害することが明らかとなった。しかし、チョウマメから単離した根粒菌はダイズに根粒を形成し、根粒菌が分泌するエフェクターはダイズの根粒形成に影響を与えないことが明らかとなった。

### (3) イネ科植物サトウキビに共生する窒素固定菌の解明

土壌細菌の中には植物を宿主として共生関係を築き窒素固定を行うものがある。サトウキビと共生する土壌細菌の中にも弱いながら窒素固定を行い植物に窒素源を提供している細菌が存在する。香川県と徳島県の県境で栽培されているサトウキビ (*Saccharum sinense*) は、細キビと言われ、熱帯地域で栽培されているサトウキビより背丈が低く、茎が小さくまた糖含量が少ない。しかしこの地域で栽培されているサトウキビは、和三盆の原料として使用されている。本研究では香川県産サトウキビ根とサトウキビが栽培されている土壌から土壌細菌の DNA を抽出し、16S rRNA のメタゲノム解析を行った。その結果、サトウキビ根から抽出した土壌細菌の DNA から 1259 種の operational taxonomic units (OTU) を同定し、土壌から抽出した土壌細菌 DNA から 3894 種を同定した。土壌と根の土壌細菌の  $\alpha$ -多様性は、有意に異なっており、根に共生している細菌と土壌から抽出した細菌の主要な細菌はプロテオバクテリアであり、それぞれ 50%以上、30%以上を占めた。また、サトウキビ根に共生するプロテオバクテリアの中に窒素固定細菌 (*Bradyrhizobium* sp, *Rhizobium* sp) が存在することが明らかとなった。そこでサトウキビ根から窒素固定細菌の単離を試み、マメ科植物に感染させた。その結果、有限根粒を形成するダイズだけでなく無限根粒を形成するインゲンにも共生し根粒を形成した。マメ科植物と根粒菌は高い宿主特異性を有することが知られているが、今回単離した根粒菌は、様々なマメ科植物に根粒を形成できた。このようにマメ科植物ではないサトウキビから単離した根粒菌は宿主特異性が低く様々なマメ科植物と共生できる可能性があり、バイオ肥料としての利用価値も高い。以上のように、本研究ではマメ科植物と非マメ科植物であるサトウキビの共生窒素固定メカニズムについて解明し、今後の研究につながる価値ある知見を得る事ができた。

本論文に関する公開審査会は、令和3年2月1日にリモートシステムを利用して開催され、論文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、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士(農学)の学位を授与するものと判定した。