The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on nitrogen-fixing symbiosis between rhizobia and leguminous plants : Nodule development and flavonoid inducible regulon in rhizobia
Author(s)	小林, 肇
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44907
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　小林（こばやし）　肇（はじめ）

博士の専攻分野の名称　博　士（工　学）

学位記番号　第　18777　号

学位授与年月日　平成16年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

工学研究科応用生物工学専攻

学位論文名　Studies on nitrogen-fixing symbiosis between rhizobia and leguminous plants : Nodule development and flavonoid inducible regulon in rhizobia
（根粒菌とマメ科植物の窒素固定共生に関する研究：根粒発達とフラボノイドにより誘導される根粒菌のレギュロン）

論文審査委員　（主査）
教　授　室岡　義勝

（副査）
教　授　小林　昭雄　　教　授　原島　　俊　　教　授　福井　希一
教　授　卜部　　格　　教　授　関　　達治　　教　授　仁平　卓也
教　授　大竹　久夫　　教　授　金谷　茂則　　教　授　清水　　浩

論文内容の要旨

本論文は、地勢や作物の収穫高に重要な窒素固定共生系を理解し持続的食料生産と環境保全に寄与するため、生物共生のモデルである根粒の発達と宿主植物と根粒菌のクロストークにより誘導される遺伝子発現の制御機構および機能の解明を行ったものである。すなわち、生物共生情報伝達経路の植物からの信号伝達を受ける細菌側の調節タンパク質とこのタンパク質が活性化されて根粒形成因子を合成する一連の遺伝子発現を網羅的に解析し、幾つかの新しい知見を得ている。これらの知見は、生物共生情報工学の基礎として役立つものであるとともに、将来、米や小麦などの非マメ科植物に窒素固定能を付与する上での知見を与えるものである。論文は、緒論、本文、総括および結論の6章より構成されている。

第1章では、緒論として、本研究の背景となる根粒形成機構と宿主植物から分泌されるフラボノイドに応答して活性化する根粒菌の転写因子NodD、その認識配列 *nod*-box による制御機構と制御される遺伝子群の機能に関する現在までの知見と共に、本研究の目的について述べている。

第2章では、根粒内の DNA 合成と断片化を指標として、レンゲソウ根粒の多段階の発達を可視化により示している。また、栄養枯渇下の根粒では根粒菌が液胞中で分解される現象を観察している。

第3章では、広宿主域根粒菌 *Rhizobium* sp. NGR234 で特定された 19 個の根粒形成因子遺伝子発現にかかわる *nod*-box (NB1-NB19) の転写活性を LacZ 活性を指標に網羅的に解析している。フラボノイドにより 18 個の *nod*-box が NodD1 特異的に誘導され、それぞれ固有の発現様式を示している。特に NB15 を含む4つの *nod*-box の誘導は NodP2 に強く依存し後期に発現することを発見している。また、変異解析からに NB19 に制御されている *syrM*2 が *nodD*2 の発現に必要である事を見出し、フラボノイド誘導性制御カスケード機構の存在を示唆している。

第4章では、分析化学的手法により NGR234 のオーキシン生合成経路を見出している。さらに遺伝学的解析により NB15 により制御される *y4wEFG* オペロンはフラボノイド応答性であり根粒中でのオーキシン生成に必要である

事を示している。また多コピーのNodD2導入はNB15の転写活性とオーキシン生成を構成的にした事から、NodD2は特定の*nod*-boxからの転写をフラボノイドに依存せず活性化する事を示唆している。

第5章では、NGR234のフラボノイド応答性のTypeⅢ蛋白質分泌機構により分泌されるNopPをファージディスプレイ法によって検索し、変異解析により確認している。*nopP*変異はいくつかの宿主への根粒形成に影響を与えるが、他の蛋白質の分泌には影響を及ぼさない事からNopPは植物体内に注入されるエフェクターである可能性を示唆している。

第6章では、総論として、本研究から得られた知見を総括、問題点を述べている。また従来の知見と比較している。結論では本研究の成果、意義を要約し、今後の展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

根粒菌はマメ科植物の根に共生し窒素固定根粒の形成を誘導する能力から生物肥料として利用されている。窒素固定共生は両共生パートナーから発せられるシグナル交換により制御され、その成否は作物の収穫高に強く影響する。根粒菌の農業への応用においては常に農作物と根粒菌の親和性が問題となっている。本研究では最も多種のマメ科植物に根粒形成できる能力を持つ事が示されている*Rhizobium* sp. NGR234の根粒形成に関わる新たな機能を宿主の根から滲出されるフラボノイドにより誘導されるレギュロンに注目して明らかにしている。これら成果の要約は以下の通りである。

(1)DNA合成と断片化を指標として根粒の発達過程を明らかにしている。同時に、栄養枯渇状態の植物において根粒菌バクテロイドが植物により液胞の中で分解される硯象を新たに発見し、バクテロイドが栄養枯渇時には栄養貯蔵体として宿主植物に利用される可能性を提示している。

(2)共生において重要な役割を果たすフラボノイドにより誘導されるレギュロンの制御様式を網羅的解析により明らかにしている。その過程で18ものフラボノイド応答性プロモーター*nod*-boxがNGR234の中で機能していること、転写活性化因子NodD1とNodD2が異なる*nod*-boxをそれぞれ特異的に活性化すること、またそれらNodD1とNodD2が*nod*-boxによって制御されている他の転写活性化因子Ttslと SyrM2と制御カスケードを形成している事を発見している。

(3)NGR234が共生状態で植物の生育ホルモンであるオーキシンを生成すること、*nod*-box NB15により制御されているオペロン*y4wEFG*がそのオーキシンの生合成酵素をコードしていることが新たに示されている。根粒菌でフラボノイドにより誘導されるオーキシン生成の遺伝子が同定されたのは初めてである。この結果は根粒菌の根粒形成過程のさらなる理解を助けるとともに、根粒菌が窒素固定以外にも植物の生育を助長する能力があることを示唆している。

(4)ファージディスプレイ法を用いてNGR234のTypeⅢ蛋白質分泌機構により分泌される蛋白質NopPを新たに同定している。TypeⅢ分泌機構は植物やほ乳類の病原菌で広く見つかっており、病原性に強く寄与している。共生における根粒菌のTypeⅢ分泌機構の役割は病原菌と共生菌との宿主への感染機構の相違点と類似点を知る上でも非常に興味深い。

以上のように、本論文は広宿主域根粒菌NGR234のフラボノイドにより誘導されるレギュロンの制御機構を明らかにし、その機構が二つの新規の根粒菌シグナル、オーキシンとNopPの発硯を制御していることを示し、根粒形成の新たな側面と宿主特異性に関するいくつかの新しい知見を得ている。これは生物資源工学および共生情報工学の発展に少なからず寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。