



Title	Studies on Mesorhizobium loti Genes Involved in the Establishment of Symbiosis with Lotus japonicus
Author(s)	三島, 絵里奈
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49707">https://hdl.handle.net/11094/49707</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	三 島 絵 里 奈
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 6 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Studies on <i>Mesorhizobium loti</i> Genes Involved in the Establishment of Symbiosis with <i>Lotus japonicus</i> (宿主植物との共生成立に関わるミヤコグサ根粒菌遺伝子の研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福山 恵一 (副査) 教 授 金澤 浩 教 授 倉光 成紀 奈良女子大学教授 佐伯 和彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

【背景】マメ科植物と根粒菌とが行う窒素固定共生は、細菌が宿主植物の細胞内に侵入して共生する特徴をもつ。長年の研究にも関わらず、共生を成立させる分子機構については、多くの未解明の部分が残されている。本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を材料として、共生成立機構のさらなる理解を試みた。

【共生と菌体外多糖類合成能の二重変異を持つミヤコグサ根粒菌の作成と分子遺伝学的解析】根粒菌が細胞内に侵入する際に、植物は病原菌に対するものと類似の防御反応を行なう。根粒菌の菌体外多糖類 (EPS) は、これの抑制または回避に関わると考えられている。共生に関する EPS の働きを探ろうと、*M. loti* 野生株 MAFF303099 に Tn5 を導入し、EPS 合成 (Exo) と共生 (Fix) の二重変異株、HIA22 を作成した。しかし、HIA22 の Fix 形質、Exo 形質は、Tn5 挿入位置以外での欠失が原因であった。さらに、mlr5647 が、Fix 形質の原因遺伝子であり、アルギニン合成系のオルニチン-カルバモイル転移酵素をコードしていること、アルギニンが細胞内への侵入に必須であることを示した。これらの結果は、感染系内までは植物からのアミノ酸の供給で感染中の根粒菌の生存が維持されこと、しかし、供給される物質量では細胞内侵入に必要な量に満たないことを示すと考えられる。

【リコンビナーゼ標的となる新規レポーター遺伝子の開発による感染過程特異遺伝子の同定】共生に関する EPS の役割を解析するという試みは、アミノ酸合成異常株の獲得にとどまった。共生成立時に一過的に発現する遺伝子を検出する手法を開発すれば、共生に関わる EPS 合成遺伝子を含め、今まで同定されていない遺伝子が検出できるかもしれない。そこで、二段階レポーターシステム、FRIVET (Flip recombinant *in vivo* expression technology) 系を構築した。この系では、一次レポーター遺伝子として、味噌・醤油酵母由来の *R* recombinase 遺伝子を、二次レポーター遺伝子 (*resurrectable gene*) として、カナマイシン耐性遺伝子の内部にリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスペクチノマイシン耐性遺伝子を埋め込んだものを開発して使用した。*R* recombinase の発現により、二次レポーターの薬剤耐性が永久に切り替わる。MAFF303099 の一次レポーターライブラリー (約  $1.6 \times 10^4$  クローン) を作製し、FRIVET 系に適用し、共生遺伝子をもつクローンを 44 (同定済みの 4 共生遺伝子を含む) 選択した。検出された遺伝子群の中には、共生成立の途上で一過的に発現誘導され宿主特異性の決定に関わる mlr6361 が含まれていた。予期したタイプの新規な共生遺伝子の捕捉が可能であることが示された。

【まとめ】本研究を通じて、アルギニン合成遺伝子が共生に必須であること、また、40 遺伝子を新しく共生関連遺伝子として検出した。今後、FRIVET 系のライブラリーのクローン数の充実と検出遺伝子の詳細な評価などにより、共生成立機構について新しい知見が得られるものと信ずる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

根粒菌とマメ科植物とが営む共生窒素固定は相利共生の代表例であると同時に一種の複雑系である。三島君の学位論文の内容は、この相互認証に関わる根粒菌側の遺伝子の探索をマメ科モデル植物であるミヤコグサの根粒菌を材料として実施したものである。

学位申請論文第 1 章では、このような研究上の背景に関しての説明が為されている。

第 2 章において三島君は、ミヤコグサ根粒菌に対して Tn5 トランスポゾン導入による変異株群作製を行った。まず菌体外多糖類合成変異株を 30 株以上集めて、次にそれらの共生能を検定した結果、正常に共生できない 1 株を得た。期待に反して、この株がゲノム上の 20 以上の遺伝子を欠く株であった。しかし、欠失した領域には、菌体外多糖類の修飾に関わる転移酵素 (サルモネラ菌の O 抗原転移酵素の相同物) の遺伝子と、共生成立に必須なオルニチン-カルバモイル転移酵素の遺伝子 *argF* の 2 つが含まれていたことを明らかにした。

第 3 章において三島君は、前章での予想外の結果を受け、さらに幅広い共生成立遺伝子を同定するために、共生成立時に一過的に発現する遺伝子を検出する手法の開発・改良を行った。すなわち、二段階レポーターシステム RIVET (recombination based *in vivo* expression technology) について、1 次レポーターに味噌醤油酵母の配列特異のリコンビナーゼ遺伝子を用いるだけでなく、2 次レポーター遺伝子を新規に開発し、遺伝子発現を薬剤耐性の転換として検出する FRIVET (flip RIVET) 系を構築した。*nodA* と *nifH* 遺伝子を用いたモデル実験での確認実験の後、この系をミヤコグサ根粒菌の系に適応することにより、単生状態では発現せず、共生成立から共生維持の過程で発現する 44 の遺伝子領域を同定した。得られた領域の中には、共生過程で働く既知の 4 遺伝子領域を含む他、機能未知の遺伝子候補が 10 以上含まれ、今後の共生研究の土台となると判定される。

第 4 章においては、前 2 章を総括し、まず、FRIVET (flip recombination based *in vivo* expression technology) 系を開発する意義付けを、古典的な変異株取得の限界を踏まえて議論している。次に、菌体外多糖類合成能と、FRIVET 系適用の結果で得られた共生遺伝子候補のうち機能予測可能なものについて根粒形成様式と関連づけた議論を展開している。

以上、トランスポゾンを用いたランダム変異株の中から共生に関わる遺伝子を新規に見出した点、新規なプロモーター・トラップ系 (改良 RIVET 系) の開発を行い、共生成立に関わることが期待される遺伝子を複数捕捉することを通じて系の有効性を証明した点、これらの 2 点において十分に評価できる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。