



Title	Physiological roles of catalases and a superoxide dismutase in <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 for symbiosis
Author(s)	羽生, 真樹
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49715
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

【61】

氏 名	は 羽 生 真 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 6 9 5 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	Physiological roles of catalases and a superoxide dismutase in <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 for symbiosis (ミヤコグサ根粒菌のカタラーゼとスーパーオキシディスムターゼが共生で果たす役割について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福山 恵一 (副査) 教 授 長谷 俊治 准教授 増井 良治 奈良女子大学教授 佐伯 和彦

論 文 内 容 の 要 旨

根粒菌は土壤中での単生とマメ科植物との共生という 2 つの生活形態を取りうる好気微生物である。共生は多段階の相互認証を経て達成され、宿主細胞内部で根粒菌は窒素固定酵素ニトロゲナーゼを発現させて窒素固定を行う。ニトロゲナーゼ活性に必要な ATP は好気呼吸によって賄われるため、副産物として活性酸素種の産生が避けられない。また、根粒菌が感染した根や根毛において O₂ と H₂O₂ が検出されることから、宿主は防御または相互認証のために活性酸素種を産生すると考えられている。即ち、根粒菌は共生の維持と成立過程のいずれの段階でも活性酸素種に対抗する必要性が示唆されている。アルファルファの根粒菌で抗酸化酵素であるスーパーオキシディスムターゼ (SOD) (O₂ を H₂O₂ に変換) とカタラーゼ (H₂O₂ を分解) が共生に重要であるとの報告が為されているが、一般性は不明である。本研究では、モデルマメ科植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根粒菌 (*Mesorhizoibum loti*) を材料に、抗酸化酵素が共生成立と維持に果たす役割を解析することを目的とし、SOD 遺伝子および 2 つのカタラーゼ遺伝子について機能解析を行った。

1：ミヤコグサ根粒菌の 2 つのカタラーゼの機能解析 分子生物学的・生化学的解析により、ミ

ヤコグサ根粒菌は 2 つの生化学的性質の異なるカタラーゼを持つ事を確認し、KatE および KatG と名付けた。発現解析と遺伝子破壊株の形質評価の結果、KatG は単生における主要な H₂O₂ 除去酵素であり、比較的高濃度の H₂O₂ 処理を行うが共生には影響しないと判断された。また、KatG 破壊株が野生株と同様に共生を成立させることから、共生時に特異発現する特殊なカタラーゼ酵素が存在しない限り、宿主から産生される H₂O₂ は少量か低濃度であると考えられた。一方、*katE* は発現量が低いものの、単生定常期での長期生存に影響し、共生時には窒素固定活性の最適化に関わることが明らかになった。おそらく KatE は根粒内部の低濃度の H₂O₂ をより効率的に処理すると考えられた。

2：ミヤコグサ根粒菌の唯一の SOD の機能解析 ミヤコグサ根粒菌が持つ唯一の SOD 遺伝子である *sodA* について、欠失挿入変異株を作製して形質評価を行った。単生状態において、*sodA* の欠失は致死にならないものの、好気条件下での増殖速度の低下、O₂ の発生剤に対する耐性の低下、DNA 障害による変異発生頻度の上昇など、SOD 欠失によって期待される形質を示した。しかしながら、*sodA* 欠失株は同様に共生を成立させた。従って、H₂O₂ の場合と同様、共生時に特異発現する特殊な SOD 活性を持つ酵素が存在しない限り、ミヤコグサ根粒内部で発生する O₂ は少量であると考えられた。

本研究の結果は、宿主によって共生過程で放出する活性酸素種の量が異なる事を示した。宿主による違いは認証様式の違いを反映していると考えられた。また、窒素固定能の最適化には根粒内で生じる少量の H₂O₂ を効率的に除去することが重要である可能性を示した。

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の成立に際しては根粒菌が植物の内部に侵入し細胞質内でオルガネラ様構造体として機能する。根粒菌の侵入と細胞内での生存形態は一部の植物病原菌との類似しているため、宿主植物からの活性酸素種による防御作用に曝される可能性がある。また、窒素固定の中心酵素であるニトロゲナーゼは極めて活性酸素種に弱い酵素であるため、共生の維持段階での呼吸によって発生する活性酸素種も共生に有害であると考えられる。羽生君の学位論文の内容は、根粒菌側の活性酸素除去酵素に着目し、モデルマメ科植物ミヤコグサの根粒を材料にして、生理機能解析を行ったものである

学位申請論文の序章では、これらの背景についての説明が為されている。

第 1 章において、羽生君はミヤコグサ根粒菌が持つ 2 つのカタラーゼの機能解析を行い、ミヤコグサ根粒菌は 2 つの生化学的性質の異なるカタラーゼ (KatE および KatG) を持つ事を確認している。そして、発現解析と遺伝子破壊株の形質評価の結果、KatG は単生において比較的高濃度の H₂O₂ 処理を行うが、共生には影響しないことを示した。この一方、*katE* は発現量が低いものの、単生定常期での長期生存に影響し、共生時には窒素固定活性の最適化に関わることを明らかとしている。

第 2 章においては、ミヤコグサ根粒菌が持つ唯一の SOD の機能解析を行っている。まず、ミヤコグサ根粒菌が持つ唯一の SOD 遺伝子である *sodA* について、欠失変異株を作製して形質評価を行っている。得られた欠失株は、単生状態においては、好気条件下での増殖速度の低下や DNA 障害による変異発生頻度の上昇など、期待される形質を示した。一方、共生においては、野生株とほぼ同等の共生能力を維持しているという、アルファルファ根粒菌に関する既報などとは異なる形質を示した。

第 3 章においては、第 2 章で得たミヤコグサ根粒菌 SOD 欠失株から偽復帰株が得られることに注目した研究を行っている。まず、*sodA* 欠失株を好気条件下で長期間培養することによって、好気増殖能力が野生株に近づくが活性酸素発生剤に対する感受性は僅かにしか示さない偽復帰株を多数獲得している。代償的に発現している遺伝子が存在している可能性を確かめる為にマイクロアレイ解析を行い、偽復帰株では複数の遺伝子群が野生株や *sodA* 欠失株よりも発現上昇していることを示した。発現上昇している遺伝子群の中にはホスホン酸代謝に関わる遺伝子群と高い相同性を示す遺伝子クラスターが含まれていたという結果を得ている。

終章において羽生君は、宿主植物と根粒菌の組み合わせによって共生過程で生じる活性酸素種の量が異なる事、

量の違いは認証様式の違いを反映している可能性を提言している。また、窒素固定能の最適化には根粒内で生じる少量の H_2O_2 を効率的に除去することが重要であると論じている。モデルマメ科植物のうちで、ミヤコグサはダイズなどの商品作物により近い性質を持つ。従って、本研究の成果は基礎学問としての新知見を与えただけでなく、応用への基礎を築くものである。

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。