



Title	ミヤコグサ根粒菌 <i>Mesorhizobium loti</i> における <i>BacA</i> タンパク質の <i>in planta</i> および <i>ex planta</i> での機能に関する遺伝学的研究
Author(s)	丸屋, 淳平
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58593
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	まる や じゅん へい
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学 位 記 番 号	第 24349 号
学位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 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	ミヤコグサ根粒菌 <i>Mesorhizobium loti</i> における BacA タンパク質の <i>in planta</i> および <i>ex planta</i> での機能に関する遺伝学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 福山 恵一 (副査) 教授 金澤 浩 教授 長谷 俊治 奈良女子大学教授 佐伯 和彦

論文内容の要旨

マメ科植物と根粒菌の窒素固定共生は、植物が炭酸固定によって生産する有機酸をエネルギー源として、根粒菌が大気中の窒素ガスをアンモニアへと還元し植物に提供する栄養共生である。この共生を行う際、根粒菌は宿主の細胞質内へ侵入しバクテリオイドと呼ばれる異形状態となる。宿主細胞へ侵入の段階は、宿主側が根粒菌に対して防御・攻撃応答を行う主要な段階でもある。アルファルファの根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* では、細胞内に侵入した後バクテリオイド化に失敗する株から、原因遺伝子が見出され *bacA* と名付けられた。*bacA* は複数回膜貫通タンパク質をコードし、そのホモローグは多くの細菌に保存されている。その中でも動物病原菌 *Brucella abortus* の *bacA* ホモローグは宿主マクロファージ内での生存に貢献する事が報告されており、*bacA* は動物／植物を問わず真核宿主の細胞質内で原核生物が生存することに貢献している可能性がある。マメ科植物は根粒の器官形成様式によって大きく 2 つのグループに分類される。アルファルファが無限伸育型根粒と呼ばれる円柱型の根粒を形成するグループに属するのに対し、もう一つの有限伸育型根粒と呼ばれる球形の根粒を形成するグループには作物として重要なダイズやインゲンが属している。私は有限伸育型根粒を形成するモデル植物であるミヤコグサの根粒菌 *Mesorhizobium loti* の BacA ホモローグに注目して共生と単生での生存に対する貢献と、その機能について研究を行った。

まず、ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* MAFF303099 株における *bacA* オルソローグである ORF (mlr7400) について、ミニトランスポゾン挿入変異株を作製した。得られた挿入変異株は共生能を保っていたが、挿入部位が C 末端に近く不完全な破壊である可能性があった。このため、ミヤコグサ根粒菌を対象とするタンパク質コード領域欠失株作製法の確立を行い、*bacA* オルソローグである mlr7400 を欠失させた。得られた欠失株 ML7400DK 株はミヤコグサの成長補助能力は若干低いものの依然共生能力を保っていた。ただしアルファルファ根粒菌を含む既知の *bacA* 変異株と同様に、ML7400DK 株でも、膜を不安定化する界面活性剤や有機溶剤に対する感受性の上昇、アミノグリコシド系抗生物質等に対する感受性の低下が認められた。

ミヤコグサ根粒菌 *M. loti* MAFF303099 の BacA オルソローグである mlr7400 が、アルファルファ根粒菌の BacA の機能を保持しているかどうかを確かめるために、アルファルファ根粒菌の *bacA*

変異株にミヤコグサ根粒菌の *mlr7400* を保持させて、アルファルファとの共生能を検討した。その結果、各種の単生形質をほぼ完全に相補すると同時に、共生能も僅かだが有意に相補することを明らかにした。

これらの結果は、*mlr7400* の産物は *BacA* とほぼ同等の機能を保つもののミヤコグサとの共生に必須では無いことを示し、近年の根粒菌の菌体表層の多糖類、活性酸素種除去酵素群等に関する研究報告などと総合すれば、無限伸育型と有限伸育型のマメ科宿主の間には細胞内に侵入してくる根粒菌に対する防衛・攻撃反応の強さに大きな差のあることを支持するものである。

論文審査の結果の要旨

マメ科植物と根粒菌の窒素固定共生は、栄養交換を通じた代表的な相利共生である。共生が成立するのは貧窒素条件下であり、窒素源が十分な条件下では宿主植物と根粒菌のどちらもが単独に生活可能（単生）で根粒も形成されない。単生から共生へと移行する際、根粒菌は宿主の細胞質内に侵入し長期に生存を樹立する必要がある。根粒菌が真核宿主の細胞内へ侵入する過程は、真核細胞内に慢性感染を行う病原菌や寄生菌が侵入する過程と類似しており、宿主側からの攻撃・防衛反応にさらされる段階である。申請者は、根粒菌がマメ科宿主に感染して細胞内共生を樹立する際に、宿主からの攻撃を回避・抑制するために機能する根粒菌因子について、主に分子遺伝学的な研究を行った。すなわち、マメ科植物の根粒形成様式として知られる2つのタイプ、有限伸育型と無限伸育型、のうち、無限伸育型の宿主アルファルファ (*Medicago sativa*) との共生に必須なアルファルファ根粒菌 (*Sinorhizobium meliloti*) の遺伝子 *bacA* について、有限伸育型のモデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) と共生する根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) を用いて、遺伝子破壊と各種の相補実験を行った。その結果、7回膜貫通タンパク質をコードする *bacA* は、アルファルファ根粒菌のみならず、動物病原菌 *Brucella abortus* でも宿主の細胞内での長期生存に必須であるにも関わらず、ミヤコグサ根粒菌では宿主のミヤコグサの細胞内での生存に必須ではないことを示した。また、単生条件での形質である *bacA* の欠損に伴う薬剤等への感受性変動はミヤコグサ根粒菌でもアルファルファ根粒菌でも区別が付かないことを示すとともに、ミヤコグサ根粒菌の *bacA* がアルファルファ根粒菌の *bacA* の共生機能を部分的に相補することを実験的に示し、単純な機能喪失ではないことを示した。さらに、*bacA* 産物ならびにマメ科植物と根粒菌の系統学的な解析を行い、細胞内に侵入する根粒菌に対するマメ科植物の応答強度について考察を加えた。

申請者の研究は、アルファルファやクローバーに代表される円筒形根粒を形成するマメ科植物と、ミヤコグサやダイズに代表される球形根粒を形成するマメ科植物とでは、根粒菌遺伝子 *bacA* に対する要求性が異なることを初めて明らかにした。研究成果は、マメ科植物の進化系統、特に根粒組織の発達様式の違いにより、細胞質内に侵入する根粒菌に対する排除反応の強度が異なり、その強度に応じて根粒菌側が備えるべき要素の異なることを示すものとして評価できる。また、最近の関連した研究報告が申請者の示した特徴を補強しつつあることも評価できる。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。