

氏名	ばんばま 馬場真里
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第10号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	共生窒素固定根粒の老化に関する研究 —インゲン根粒菌により形成されたミヤコグサ早期老化根粒をモデルとして—
論文調査委員	(主査) 教授 泉井 桂 教授 佐藤 文彦 教授 山本 憲二

論文内容の要旨

マメ科植物は、根粒と呼ばれる特殊な器官に根粒菌を棲まわせ、共生的に窒素固定を行わせる能力を有する。通常、お互いに厳密に定まった相手とのみ共生が成立するが、その初期相互認識は、植物が分泌するフラボノイド化合物と根粒菌が分泌するノッドファクターを介して行われる。しかし、形成された根粒はやがて老化して機能を失う。本研究は、ミヤコグサ根粒菌と同じ化学構造のノッドファクターを分泌するインゲン根粒菌をマメ科のモデル植物ミヤコグサに接種して人為的な根粒を形成させ、ミヤコグサ根粒菌による本来の根粒との性状比較を通じて根粒の老化機構の解析を試みたものである。主な内容は次の通りである。

1. ミヤコグサに本来の共生相手ではないインゲン根粒菌を感染させて無窒素培地で育てると、一見正常な根粒が形成された。しかし、形成された根粒の窒素固定活性は非常に低く一過的であった。また、ミヤコグサ根粒菌による本来の根粒はレグヘモグロビンによる濃いピンク色を長期間呈したが、インゲン根粒菌感染根粒では短期間のうちに薄いピンク色が緑色に変化した。顕微鏡観察の結果、若いインゲン根粒菌感染根粒の構造は健全であり、根粒菌の感染やバクテロイドへの分化なども正常に行われていることが判明した。一方緑色に変化した根粒においては、バクテロイドやペリバクテロイド膜の崩壊が観察された。以上の結果から、インゲン根粒菌によって人為的に形成されたミヤコグサの根粒は、いわゆる早期老化型根粒であると結論した。
2. ミヤコグサ根粒菌による本来の根粒の老化に伴う細胞内変化や老化を引き起こす要因を遺伝子レベルで調べるために、ミヤコグサ cDNA マクロアレイを用いて、若い根粒から老化根粒までの経時的なトランスクリプトーム解析を行った。その結果、若い根粒において高発現する遺伝子群、成熟した壮年期の根粒において高発現する遺伝子群、根粒の自然老化に伴って誘導される遺伝子群などを初めて見いだした。
3. インゲン根粒菌感染根粒において同様に cDNA マクロアレイ解析を行い、根粒の早期老化に特徴的な遺伝子発現パターンを調べた。その結果、インゲン根粒菌感染根粒で有意な防御応答は検出されず、過敏細胞死の形跡もなかった。また、インゲン根粒菌による若い根粒において、加齢したミヤコグサ根粒菌感染根粒で発現している遺伝子群がすでに数多く発現していたが、全体的な変動パターンは類似している事が判明した。すなわち、インゲン根粒菌による根粒は時間的に早期に老化に向かうが、そのプロセスはミヤコグサ根粒菌感染根粒の自然老化と大部分共通していた。ただし、さらに詳しく解析したところ、インゲン根粒菌感染根粒において老化や細胞崩壊に関与する幾つかのシステインプロテアーゼ遺伝子が、自然老化根粒より有意に高く発現することも見いだした。
4. 地上部を遮光処理して栄養不足にした根粒は従来老化のモデルになり得ると考えられてきたが、若いインゲン根粒菌感染根粒や加齢したミヤコグサ根粒菌感染根粒で高発現する5つの遺伝子は遮光処理根粒では殆ど発現していなかった。この事から、インゲン根粒菌感染根粒のほうが遮光処理根粒よりも自然老化に近い遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

マメ科植物は、根粒という特殊な器官を形成して各々の種に固有な根粒菌を棲まわせ、光合成産物を供給する見返りに大気中の窒素をアンモニアに固定させるため、窒素肥料の乏しい土地でも生育できるという特異な能力を有する。この系は、微生物の植物細胞内共生の珍しい例として、基礎生物学的に興味深い研究対象である。また、我々人類が膨大な化石エネルギーを使って化学合成した窒素肥料を農地に多投しているのに対して、マメ科植物と根粒菌との共生窒素固定はクリーンな太陽エネルギーに基づいており、省資源型・環境保全型農業を将来確立するためにも、その応用研究は非常に重要であると思われる。

本論文は、根粒菌が分泌して共生相手の認識に大きな役割を果たすノッドファクターの構造がインゲン根粒菌 *Rhizobium etli* とミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* とで同一であることから、インゲン根粒菌によってミヤコグサが根粒を形成するか否かという初歩的な実験を手始めに、根粒老化に関する独自の研究展開を記述したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. インゲン根粒菌の感染によってミヤコグサが根粒を着生して共生関係を成立させることを初めて発見し、その人為的な根粒の性状解析を綿密に行った。インゲン根粒菌が正常にミヤコグサ細胞に侵入してバクテロイドに分化した結果として、低いながらも有意な窒素固定活性を検出した。ところがこの共生は一過的なものであり、バクテロイドやペリバクテロイド膜が急速に崩壊するとともに窒素固定も停止し、根粒の外観が緑色に変化することを認めた。すなわち、インゲン根粒菌感染根粒は、早期老化型であることを見いだした。
2. 根粒老化に伴って引き起こされる変化を分子的に解明することを目的として、大規模なミヤコグサ cDNA マクロアレイを老化に伴うトランスクリプトーム解析に初めて適用した。ミヤコグサ根粒菌による本来の根粒の自然老化過程を調べたところ、根粒が成熟して老化に至る過程で多数の遺伝子の発現変化が見られることを初めて明らかにした。マメ科植物の根粒老化に関する分子的な解析例は極めて乏しいため、この結果は根粒の自然老化機構を追究するための基礎になる重要な知見である。
3. インゲン根粒菌による早期老化型根粒に特徴的な遺伝子発現パターンを探索した。その結果、予想に反して、インゲン根粒菌感染根粒においては防御応答や過敏感細胞死が有意に引き起こされた形跡はなく、自然老化プロセスが全体的に早まっていることを明らかにした。すなわち、インゲン根粒菌感染根粒はシステインプロテアーゼ遺伝子の発現程度に自然老化根粒との多少の差異は見られるものの、従来しばしば実験に用いられてきた遮光処理根粒よりも自然老化に近いモデル系であることを見いだした。

以上のように、本論文は共生窒素固定根粒の老化機構を探るために極めて有用な知見や実験系を記述するとともに、根粒の寿命制御の道を切り拓く可能性を示唆しており、植物生理学、植物分子生物学、植物-微生物共生学、応用植物学などの発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成16年1月26日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。