

学位論文の要旨	
氏名	福留 光挙
学位論文題目	ミヤコグサの根粒共生系におけるクラス1植物ヘモグロビンの機能に関する研究
<p>本論文は、ミヤコグサとその共生根粒菌を材料として、根粒共生系におけるミヤコグサのクラス1植物ヘモグロビンであるLjGlb1-1の機能を明らかにし、さらに、LjGlb1-1の一酸化窒素（NO）除去機能を活用して、根粒共生系を強化することが可能であることを示した。</p> <p>第1章は序章である。植物ヘモグロビンのクラス分類と特性、植物の様々な生理応答や病原応答における植物ヘモグロビンの機能とNO、および、植物ホルモンとの関係について概説した。さらに、根粒菌との共生におけるマメ科植物ヘモグロビンの知見について整理し、取り組むべき課題とその意義を明確にした。</p> <p>第2章では、ミヤコグサの<i>LjGlb1-1</i>遺伝子の変異系統を確立して、根粒菌との共生に関する特性を解析することにより、LjGlb1-1の根粒共生系における機能を議論した。ミヤコグサの変異種子集団の中から、LjGlb1-1に1アミノ酸置換が生じた変異系統を2系統（A102VとE127K）、レトロトランスポゾン<i>LORE1</i>挿入変異集団の中から、<i>LjGlb1-1</i>遺伝子がほとんど発現しない系統（96642）をそれぞれ選抜・確立した。いずれの系統も根粒の着生数が少なく、窒素固定活性は低かった。根および根粒のNO量を測定したところ、野生型系統より高い値を示した。野生型系統にNO供与剤を与えると、根粒着生数、窒素固定活性ともに低下した。これらのことから、根粒菌との共生における変異系統の特性は、LjGlb1-1によるNO除去活性の低下によるものと結論した。1アミノ酸置換が生じたLjGlb1-1組換えタンパク質を大腸菌で産生し、NO除去活性を測定したところ、予想に反して野生型と大差なかった。このような試験管内と植物体でのNO除去活性の違いについては、MOEによる立体構造の予測やヘム特異的吸収スペクトルなどから、その原因について考察した。</p> <p>第3章では、<i>LjGlb1-1</i>遺伝子を高発現するミヤコグサの形質転換植物系統（Ox1とOx2）を確立し、根粒菌との共生特性を解析した。いずれの高発現系統とも、根粒着生数は野生型と有意差はなかったが、窒素固定活性は2倍程度の高い値を示した。根および根粒中のNO量は、野生型より低かった。これらのことから、高発現系統では、窒素固定酵素の活性を阻害するNOの量が低く保たれるために、窒素固定活性が高いと結論づけた。</p> <p>第4章では、高発現系統の根粒の老化について検討した。野生型および低発現系統では、根粒菌接種後6週以降は根粒が緑色を呈するようになり、窒素固定活性も低下した。根粒菌接種8週後は、野生型および低発現系統の根粒の窒素固定活性は、活性が最も高い</p>	

根粒菌接種4週後の活性の10%以下に低下した。組織内のNO量も高く、菌接種8週後の根粒内部を顕微鏡で観察したところ、細胞が崩壊し、空洞化した細胞が多数観察された。一方、*LjGlb1-1*遺伝子の高発現系統は、根粒菌接種8週後も細胞の崩壊は観察されず、菌接種4週後の活性の50%程度に相当する残存活性があった。これらのことから、高発現系統では根粒の老化が抑制されていると考え、システインプロテアーゼなど、根粒老化の指標とされる3種の遺伝子の発現を解析したところ、老化の抑制が示唆された。組織内のNO量も低く抑えられていたことから、NOの低濃度維持が根粒老化の遅延に起因したと考察した。さらに、根粒老化と*LjGlb1-1*のNO制御の関係を、植物の老化に関与しているとされるアブシシン酸、エチレン等の植物ホルモンと関連付けて検討した。NO供与剤、2つの植物ホルモンの添加及びNO除去剤の共添加による実験から、どちらの植物ホルモンも窒素固定活性の低下、感染細胞の崩壊、老化関連遺伝子の発現を誘導し、根粒老化に寄与した。また、いずれの表現型もNO除去剤の共添加により緩和し、アブシシン酸はNO産生を誘導したことから、アブシシン酸、エチレンによる根粒老化はNOを介していることが示唆された。さらに、根粒では、アブシシン酸、エチレン、NOが*LjGlb1-1*の発現を誘導し、また、それらによる誘導はNO除去剤により阻害されたことから、アブシシン酸とエチレンのNOを介した根粒老化が、同調的にNOに誘導された*LjGlb1-1*によってコントロールされる制御系を提案した。

第5章ではクラス1植物ヘモグロビンの高発現によるNO制御の強化が、根粒共生系の冠水（低酸素ストレス）耐性に寄与するか検討した。野生型と低発現系統は、根粒着生根圏を1週間冠水処理することで窒素固定活性が低下し、組織内NO量も上昇した。一方、高発現系統は窒素固定活性が低下せず、組織内NO量も低く維持され、冠水耐性を示した。低酸素ストレスは植物内にNO産生を誘導することが知られている。そのため、高発現系統では根粒の老齢時と同様に、根粒内で産生されたNOを除去することで活性維持に貢献したと考えられた。しかしながら、野生型の冠水処理後の根粒内部を顕微鏡で観察したところ、老化根粒とは異なる形態を示し、根粒老化の指標遺伝子も発現増加を示さなかった。以上の結果から、根圏の冠水による根粒共生系の崩壊はNOを介しているものの、根粒老化とは異なるメカニズムであると考察した。同時に、NOを介した様々な根粒機能の低下経路が、NO除去能の強化によって緩和できる可能性が示唆された。

第6章は総括である。ミヤコグサと共生根粒菌の根粒共生系において、*LjGlb1-1*は根粒菌の感染から共生窒素固定の段階にかけてNO量を低く保つことで正常な共生に貢献していると結論した。また、NO及び植物ホルモンとのクロストークを介し、根粒老化にも関与している可能性も示唆された。さらに、この*LjGlb1-1*高発現によるNO制御能の強化は、窒素固定活性を強化するだけでなく、根粒老化の遅延及び冠水耐性付与に貢献することを明らかにした。根粒寿命の長期化は窒素肥料の施肥量削減に寄与し、冠水耐性は収量増加・品質向上への寄与が期待できる。NOは老齢及び冠水ストレスの他にも多様な環境ストレスによって誘導されることから、本研究では検討していないストレスに対しての耐性も期待できる。以上を、根粒共生系での*LjGlb1-1*のNO制御機構と農業応用への展望として総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Function of a class 1 plant hemoglobin of *Lotus japonicus* in the root nodule symbiosis

Name: Mitsutaka FUKUDOME

This thesis comprises 6 Chapters. In this thesis, the function of LjGlb1-1, which is a class 1 plant hemoglobin of *Lotus japonicus*, was clarified in the root nodule symbiosis. It was also demonstrated that overexpression of *LjGlb1-1* gene improved the symbiotic ability by modulating nitric oxide (NO) in the nodule tissue.

Chapter 1 is an introduction. Classification and characteristics of plant hemoglobins were reviewed in relation with NO and plant hormones in various physiological and pathogenic responses of plants.

In Chapter 2, the role of LjGlb1-1 in the root nodule symbiosis was discussed based on the symbiotic phenotype of three mutant lines of *LjGlb1-1* gene of *L. japonicus*. Plants of all three mutant lines showed decreased nodule numbers and lowered nitrogenase activity of their nodules. The roots and nodules of the mutant plants exhibited a greater accumulation of NO than did the wild-type (WT). In conclusion, the mutants of *LjGlb1-1* gene revealed that this protein contributed to establish proper symbiosis by modulating NO level.

In Chapter 3, the stable overexpression lines (Ox1 and Ox2) of *LjGlb1-1* gene were generated and phenotyped. Although the number of nodules did not change in the both Ox lines, they showed reduced NO level in their roots and enhanced nitrogenase activity of the mature nodules relative to the WT. The higher nitrogenase activity of the nodules on the Ox lines could be attributed to the lowered NO level caused by the overexpression of *LjGlb1-1* gene.

In Chapter 4, nodule senescence of the Ox lines was investigated. Both Ox lines showed reduced NO level in their roots and enhanced nitrogenase activity even in the senescent nodules relative to the WT. Physiological and cytological observations and expression analysis of three senescence-related genes indicated that overexpression of *LjGlb1-1* gene delayed nodule senescence. The application of a NO donor to WT nodules or a phytohormone, abscisic acid, and an ethylene precursor repressed nitrogenase activity concomitant with the expression of three senescence associated genes, and caused cytological changes evidencing nodule senescence. These effects were almost completely suppressed by a NO scavenger. This beneficial effect, delayed senescence, was probably mediated by the participation of LjGlb1-1 in modulating the level of NO that may be produced downstream in the phytohormone signaling pathway in the nodules.

In Chapter 5, it was investigated whether enhancing of NO modulation by overexpression of *LjGlb1-1* gene contributes to tolerance against flooding of the root nodule. In the WT, nitrogenase activity of the nodules was decreased by one-week flooding, and NO level in the tissue was also increased. On the other hand, Ox line was tolerant against flooding; nitrogenase activity did not decrease and the NO level was lower in the tissue. Based on these results, it was concluded that overexpression of *LjGlb1-1* gene contributed to flooding tolerance with enhanced NO modulation.

Chapter 6 summarizes the presented results and gives the discussion on the function of LjGlb1-1 in the root nodule symbiosis considering with the crosstalk among LjGlb1-1, NO and plant hormones. This chapter concluded that LjGlb1-1 contributed to efficient symbiosis by modulating NO from early- to senescent-stage of the symbiosis. The plant hemoglobin gene could be a useful genetic tool to provide beneficial properties to plants.