

学 位 論 文 の 要 旨	
氏 名	橋 本 駿
学位論文題目	広宿主域根粒菌の遺伝子破壊が多様な宿主植物との共生に及ぼす影響
<p>本論文は、タイの水田地帯にエダウチクサネムを植え、着生した根粒から分離した根粒菌2株を材料として遺伝子破壊株を作出し、共生特性についてまとめたものである。</p> <p>第1章は序論である。まず、マメ科植物の分類群について概説し、次に、マメ科植物と根粒菌の共生成立における宿主特異性や宿主による根粒菌の制御機構について概説した。最後に、本論文の材料である広宿主域根粒菌<i>Bradyrhizobium</i> sp. SUTN9-2とDOA9が広宿主域根粒菌であることを述べ、本論文の主な内容を紹介した。</p> <p>第2章では、広宿主域根粒菌SUTN9-2とDOA9の<i>nifV</i>遺伝子の破壊が、多様な宿主植物との共生に及ぼす影響について検討した。部位特異的な遺伝子組換えによってSUTN9-2とDOA9の<i>nifV</i>破壊株を作出し、それらの自由生活下における窒素固定酵素の活性と、エダウチクサネム、カリビアンスタイロ、タイワンコマツナギ、ヌスビトハギの4種の宿主植物との共生表現型について検討した。両菌株の<i>nifV</i>破壊株の窒素固定酵素の活性は、それぞれの野生株と比較して、自由生活条件下で有意に低かった。SUTN9-2の<i>nifV</i>破壊株は、SUTN9-2野生株と比較して、3種の宿主植物（エダウチクサネム、タイワンコマツナギ、ヌスビトハギ）に対する成長促進効果が低下した。DOA9の<i>nifV</i>破壊株は、4種のすべての宿主植物に対して、DOA9野生株と同程度の成長促進効果を示した。これらのことから、根粒菌の<i>nifV</i>は、宿主植物と根粒菌株のペア依存的に共生窒素固定に必要であると結論付けた。本研究により、先行研究で報告されていた特定のクサネム種に加え、エダウチクサネムや他の属のマメ科宿主についても、共生窒素固定に根粒菌の<i>nifV</i>を必要とする場合があることが明らかになった。</p> <p>第3章では、広宿主域根粒菌SUTN9-2のⅢ型分泌系の遺伝子破壊が、<i>Lotus</i>属のマメ科宿主との共生に及ぼす影響について検討した。Ⅲ型分泌系破壊株の共生表現型の検討には、<i>Lotus burtii</i>、及び、<i>L. japonicus</i> Gifu B-129とMiyakojima MG-20を宿主植物として使用した。SUTN9-2野生株は、<i>L. burtii</i>とGifu B-129の根に窒素固定能のある根粒を低頻度で誘導したものの、Miyakojima MG-20の根には、窒素固定能のある根粒は誘導できなかった。一方、Ⅲ型分泌系破壊株は、<i>L. burtii</i>とGifu B-129の根に窒素固定活性のある根粒を誘導する確率が野生株よりも高かった。また、Ⅲ型分泌系破壊株は野生株と異なり、Miyakojima MG-20の根に窒素固定能のある根粒を誘導した。これらのことは、Ⅲ型分泌系の破壊が、3つの<i>Lotus</i>属のマメ科種との共生能を向上させることを示している。Ⅲ型分泌系の遺伝子破壊の実験結果に基づいて、SUTN9-2野生株は「根粒形成因子を分泌し</p>	

て宿主植物と根粒共生をしようとするが、宿主細胞内へ送り込まれたⅢ型分泌系エフェクターが宿主植物側の防御応答を誘導してしまい、共生が成立しにくい、または破綻する。」と考察した。一方、SUTN9-2のⅢ型分泌系破壊株は「エフェクターを宿主細胞内へ送り込めないため、宿主植物側の防御応答を誘導せず、根粒形成因子により共生を成立させることができる。」と考察し、「SUTN9-2のⅢ型分泌系エフェクターの中には、*Lotus*属の宿主植物との共生を阻害するものがある。」と結論付けた。

第4章では、広宿主域根粒菌SUTN9-2の*bclA*遺伝子の破壊が、多様な宿主植物との共生に及ぼす影響について検討した。部位特異的な遺伝子組換えによってSUTN9-2の*bclA*破壊株を作出し、宿主植物との共生表現型について検討した。SUTN9-2の*bclA*破壊株は、ほとんどの宿主植物との共生において、SUTN9-2野生株と同様の表現型を示した。しかし、タイワンコマツナギとの共生においては、SUTN9-2の*bclA*破壊株は、SUTN9-2野生型と比較して、植物の成長促進効果が低かった。根粒内でのバクテロイド分化と窒素固定活性の発現に関与する根粒菌のトランスポーター遺伝子である*bclA*は、マメ科宿主と根粒菌のペアによって、共生窒素固定に必須な場合とそうでない場合が報告されている。SUTN9-2の*bclA*は、先行研究で報告されている*Bradyrhizobium japonicum* USDA110の*bclA*や*Mesorhizobium loti*の*bacA*と同様に、マメ科宿主との共生窒素固定に必須ではないものの、根粒着生や窒素固定活性には負の影響を及ぼすと考察した。

第5章は総括である。本研究では、広宿主域根粒菌の遺伝子破壊株を作出し、多様な宿主植物との共生表現型を検討した。本研究により、根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定のシステムとその進化・多様性を解明するための基礎的な知見が得られた。これらの知見をもとに、今後の研究の展望を述べて総括とした。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Effect of gene disruption of wide-host-range *Bradyrhizobium* strains on their symbiotic phenotypes
with various host plants

Name: Shun HASHIMOTO

This thesis comprised symbiotic phenotypes of two *Bradyrhizobium* strains isolated from *Aeschynomene americana* nodule. Gene disruption mutants of two wide-host range *Bradyrhizobium* strains were constructed and tested the symbiotic phenotypes with various legumes.

Chapter 1 is general introduction. It contains following topics; 1) Classification of legumes. 2) Rhizobia-legume symbiosis. 3) Diversity in the root nodule symbiosis. 4) Brief introduction of two wide-host range *Bradyrhizobium* sp. strains SUTN9-2 and DOA9.

In chapter 2, characteristics of SUTN9-2 and DOA9 and their *nifV*-disruption ($\Delta nifV$) mutants were examined. Acetylene reduction activity (ARA) of both $\Delta nifV$ mutants in a free-living state were significantly reduced than those of respective wild-type strains. Symbiotic phenotypes of SUTN9-2 and DOA9 and their $\Delta nifV$ mutants were examined with four legumes, *A. americana*, *Stylosanthes hamata*, *Indigofera tinctoria*, and *Desmodium tortuosum*. *NifV* of SUTN9-2 were required for the efficient symbiosis with *A. americana*, *I. tinctoria*, and *D. tortuosum*. On the other hand, *nifV* of DOA9 did not required for the symbiosis with four legumes. In conclusion, rhizobial *nifV* are required for the symbiosis depending on symbiont-host combination. This study reveals that, in addition to some *Aeschynomene* plants reported in previous study, *A. americana* and other several legumes require the rhizobial *nifV* for symbiosis.

In chapter 3, symbiotic phenotypes of SUTN9-2 and its type III secretion system (T3SS) disruption ($\Delta T3SS$) mutant were examined with *Lotus burtii*, *L. japonicus* Gifu B-129 and *L. japonicus* Miyakojima MG-20. SUTN9-2 wild-type strain induced effective nodule with low frequency on *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu B-129 but could not induce effective nodule on *L. japonicus* Miyakojima MG-20. SUTN9-2 $\Delta T3SS$ mutant induced effective nodule on *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu B-129 with high frequency than the wild-type strain. SUTN9-2 $\Delta T3SS$ mutant could induce effective nodule on *L. japonicus* Miyakojima MG-20 in contrast to wild-type. These results suggest that the T3SS of SUTN9-2 interference the symbiosis with *Lotus* plants.

In chapter 4, symbiotic phenotypes of SUTN9-2 and its *bclA*- disruption ($\Delta bclA$) mutant were examined. Symbiotic phenotypes of SUTN9-2 $\Delta bclA$ mutant with various legumes was the same as those of wild-type strain except for symbiosis with *I. tinctoria*. In the case of *I. tinctoria*, inoculated with SUTN9-2 $\Delta bclA$ mutant showed lower plant growth when compared with the plant inoculated with wild-type strain. *BclA* is a transporter gene for bacteroid differentiation and nitrogen fixation in nodule. Requirement of the *bclA* for symbiosis depends on symbiont-host combination. In conclusion, *bclA* of SUTN9-2 is not essential for symbiosis as same as the *bclA* of *B. japonicum* USDA110 (which close strain with SUTN9-2).

Chapter 5 is a summary. In this thesis, symbiotic phenotypes of wide-host-range rhizobia and their mutants were investigated with various legumes. The findings provide basic and new insight for further understanding the rhizobia-legume symbiosis.