

学 位 論 文 の 要 旨

氏 名	笹倉 芙裕子
学位論文題目	非マメ科木本植物とフランキアの共生に関与する植物ヘモグロビン

本論文は、フランキア（放線菌の一種）と共生することができるアクチノリザル植物ヤシャブシ (*Alnus firma*) からヘモグロビン遺伝子を単離し、発現様式やタンパク質の解析結果からその機能を推測し、アクチノリザル共生におけるヘモグロビンの存在意義について考察しまとめたものである。

第1章は、アクチノリザル植物とフランキアの共生、および近年さまざまな植物から単離されているヘモグロビンについて説明する。窒素固定能をもつフランキアと共生することができる植物を総称して、アクチノリザル植物と呼ぶ。アクチノリザル植物はフランキアによる窒素固定産物を利用できるため、貧栄養の土地でも生育することができ、そのため日本でも昔から緑地回復や砂防などに利用されてきた重要な共生系である。しかし、マメ科植物と根粒菌の共生系に比べ、いまだ不明な点が多く残されている。マメ科植物の根粒中には、レグヘモグロビンが根粒特異的に多量に生成・蓄積されており、窒素固定酵素の活性発現と密接に関わっていることが知られている。近年では、さまざまな植物からヘモグロビン遺伝子が単離され、3つのタイプに分類されている（共生型、非共生型、truncated）。アクチノリザル植物では、*Casuarina glauca*でヘモグロビタンパク質と遺伝子が単離され (Jacobsen-Lyon et al., 1995), *Myrica gale*と*Alnus glutinosa*でも、ヘモグロビタンパク質の存在が報告されている (Pathirana et al., 1995, Usman et al., 1995)。

第2章では、アクチノリザル植物であるヤシャブシの根粒cDNAライブラリーを作成し、そのスクリーニングの結果一つのヘモグロビン遺伝子*AfHb1*を単離することに成功した。その遺伝子構造、推測されるアミノ酸配列から、*AfHb1*は非共生型 (class1) に分類されることがわかった。また、共生型ヘモグロビン遺伝子の存在は確認できておらず、ヤシャブシとモクマオウの根粒内部でのフランキアの形態の違いからその存在の有無について考察した。

第3章は、発現様式を解析し*AfHb1*の特徴づけを行った。ヤシャブシの組織別（根粒、根、茎、葉）での発現解析を行った結果、*AfHb1*は非共生型に分類されるにもかかわらず、根粒で最も発現が高かった。このことから、*AfHb1*はフランキアとの共生に関係があることが推測される。さまざまなストレス条件下では、これまで報告されているclass1の非共生型ヘモグロビン遺伝子とは違い、低酸素ではなく低温ストレスによって発現の誘導をうけた。近年、class1非共生型ヘモグロビンと一酸化窒素 (NO) の関係を示唆する報告が多数なされている。また、マメ科モデル植物であるミヤコグサでは、*LjHb1* (class1 非共生型ヘモグロビン遺伝子) の発現が誘導される低酸素、低温条件下でNOが発生しているということが報告されている (Shimoda et al. 2005)。そこで、NO、またNOの発生その質と考えられている硝酸 (NO_3^-)、亜硝酸 (NO_2^-) に対する応答も解析した。その結果、すべての化合物に対して著しく発現が上昇し、*AfHb1*のNOとの密接な関係が示唆された。

第4章は、*AfHb1*のリコンビナントタンパク質、および、*Agrobacterium rhizogenes*系を用いてミヤコグサの*AfHb1*過剰発現毛状根を作成し、植物体内での*AfHb1*の機能について検討した。*AfHb1*のリコンビナント蛋白質 (r*AfHb1*) を作成し、ミヤコグサの共生型ヘモグロビン遺伝子 (*LjLb3*) のリコンビナント蛋白質 (r*LjLb3*) とともに、NOとの相互作用をみるため吸光度を測定した。その結果、両蛋白質ともに500~600 nmの範囲で、ヘモグロビンに特徴的な2箇所のピークを示した。さらにNO を処理したところ、そのピークは両蛋白質ともに時間の経過に伴い消失していったが、r*LjLb3*に比べてr*AfHb1*の方がその消失が著しかった。この結果から、r*LjLb3*に比べてr*AfHb1*の方がNOとの相互作用が強いということが示された。さらに、*AfHb1*を過剰発現させたミヤコグサ形質転換毛状根では、コントロール毛状根に比べて、窒素固定活性が2~3倍も上昇した。しかし、根粒内の*nifH*の発現に違いはみられなかった。またヤシヤブシ根粒において、NOの窒素固定活性に対する影響を調べたところ、NO処理では窒素固定活性がコントロールよりも明らかに低下し、同時にNO scavengerを処理した場合にはその低下はわずかに回避された。

第5章は、これまでの結果から、*AfHb1*の特徴、推測される機能について総括した。*AfHb1*はアミノ酸配列からclass1の非共生型ヘモグロビンに分類されるが、根粒でもっとも発現が高いことから、フランキアとの共生に何らかの関係があることが推測された。さらに、ストレス条件やNOへの発現応答の結果から、誘導を受けるストレス条件はこれまで報告されているclass1の非共生型ヘモグロビン遺伝子とは異なるが、誘導を受ける原因は一酸化窒素であることが確認された。このことから、草本、木本植物においてclass1非共生型ヘモグロビンは共通した機能を保持していることが考えられる。また、r*AfHb1*のNOとの親和性の強さ、NOが共生窒素固定に対して悪影響を与えるという結果から、*AfHb1*はNOを除去あるいは代謝することによって、NOによる共生窒素固定の阻害を回避させる役割をしていると推測される。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第233号	氏名	笹倉 芙裕子
審査委員	主査	阿部 美紀子	
	副査	内海 俊樹	清原 貞夫
		塚原 潤三	

学位論文題目 **The role of plant hemoglobin on the actinorhizal symbiosis between non-leguminous tree and *Frankia***
(非マメ科木本植物とフランキアの共生に関する植物ヘモグロビン)

審査要旨 提出された学位論文、及び、論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、放線菌の仲間であるフランキアと共生する非マメ科木本植物ヤシャブシで、共生時にヘモグロビン遺伝子が発現することを見だし、発現特性や遺伝子産物の解析結果から植物ヘモグロビンの機能を推測し、フランキアとアクチノリザル植物の共生系におけるヘモグロビンの存在意義について述べたもので、全文5章より構成されている。

第1章は序章である。共生窒素固定について、マメ科植物の場合と、アクチノリザル植物の場合についての研究の現状を概説した。

第2章では、ヤシャブシ根粒のcDNAライブラリー、及び、ゲノムDNAより、ヘモグロビン遺伝子をクローニングし、ヤシャブシヘモグロビンの遺伝子の構造とその系統的な位置づけを明確にした。

第3章では、ヤシャブシのヘモグロビン遺伝子の発現特性を解析した。この章では、ヤシャブシのヘモグロビン発現に至るストレスシグナルが、マメ科植物のミヤコグサとは異なること、また、ストレス応答の産物である一酸化窒素(NO)により発現が誘導されることなど、これまで木本植物ではほとんど報告のなかった新知見について詳しく解説している。

第4章では、大腸菌で生産したヤシャブシの組換えヘモグロビンの生化学的特性、及び、ヤシャブシヘモグロビン遺伝子を導入したミヤコグサ毛状根の生理的特性の解析に基づいて、植物における分子シグナルとしてのNOとヘモグロビンの機能を関連づけた。

第5章は、本論文の総括である。

以上、本論文はヤシャブシのヘモグロビンに関する研究で、遺伝子の探索から発現特性の解析、タンパク質レベルでの機能解析など、一連の必要事項について詳細に検討し、非マメ科木本性植物におけるヘモグロビンの機能を明らかにした。モデルマメ科植物であるミヤコグサの形質転換系を有効に活用してヘモグロビンとNOの生理機能を結びつけ、さらに、ヘモグロビン遺伝子の過剰発現により根粒の窒素固定活性が向上するという結果は、特筆に値する。また、別のアクチノリザル植物であるモクマオウとの対比により、共生状態にあるフランキアの形態と、そこで主に発現するヘモグロビン遺伝子に違いがあることも明らかにした。このことは、植物と微生物の共生窒素固定系の進化を探る手がかりとなる非常に重要な知見である。

よって、審査委員会は博士(理学)の学位論文として合格と判定する。

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第233号	氏名	笹倉 芙裕子
審査委員	主査	阿部 美紀子	
	副査	内海 俊樹	清原 貞夫
		塚原 潤三	
<p>2006年1月25日に行われた博士論文発表会において、主査・副査を含む約40名の教官及び学生の前で、学位申請者笹倉芙裕子氏による学位論文発表会が開催され、その内容及び関連事項について質疑応答が行われた。その一部を以下に示す。</p> <p>Q1. 植物のヘモグロビン遺伝子は、class1とclass2に類別されているということであるが、今回解析したヤシャブシには、class2は存在していないのか、またはゲノムとしては確認できるのか？ 回答：ミヤコグサのclass2ヘモグロビン遺伝子をプローブにして、サザンハイブリダイゼーションをすると、ポジティブなバンドが得られるので、類似の塩基配列は存在していると考えている。しかし、それが遺伝子としての機能を有しているかどうかは、現時点では分からない。</p> <p>Q2. 同じアクチノリザル植物のモクマオウには、class2ヘモグロビン遺伝子も確認されているということであったが、それをプローブにすることは試さなかったのか？ 回答：ヤシャブシ根粒のcDNAライブラリーからヘモグロビン遺伝子を釣取する際に、モクマオウのclass2ヘモグロビン遺伝子をプローブにしたが、本研究で使用したcDNAライブラリー中には、ポジティブクローンは存在しなかった。</p> <p>Q3. ヤシャブシのclass1ヘモグロビンを強制発現させたミヤコグサ毛状根において、窒素固定酵素以外の活性の上昇が考えられるということであるが、具体的には何を想定しているのか？ 回答：実験では、ヘモグロビンを形質転換した根粒内の共生菌のnif geneの発現量をReal-time PCRで測定した結果、発現量は非形質転換毛状根との間に差異は認められなかった。このことは、強制発現させたヘモグロビンが、窒素固定酵素の活性を直接調節するのではなく、窒素固定活性の阻害作用があるNOが速やかに除去されることにより、結果的に窒素固定活性の上昇として現れたものと考えている。</p> <p>Q4. ヤシャブシのclass1ヘモグロビンを強制発現させたミヤコグサ毛状根において、着生根粒数が増える理由はどのように考えるか？ 回答：今回の実験の形質転換系では、同一個体で形質転換した根と、していない根が混在している。その根に根粒菌を感染させると、個体全体としての着生根粒数にはあまり違いはなかったが、形質転換根/非形質転換根で着生根粒数比が形質転換根が増えるという結果を得た。このことは、根粒菌感染時に発生したNOをヘモグロビンが速やかに酸化することによりNOの濃度を低く抑え、その結果、植物の防御応答が抑制されたものと考えている。</p> <p>Q5. 植物ヘモグロビンが、防御応答に対して抑制的に作用するというが、ストレスシグナルとヘモグロビン発現との間に時間的な差異はあるのか？ 回答：個々の反応系を調べたわけではないが、NO発生とヘモグロビン発現上昇のタイミングは、ほぼ一致していることから、かなり早い時点で発現上昇が起きて、防御応答産物の除去に機能していると考えている。</p> <p>以上、いずれの質問にも、的確に回答し、4名の審査委員は申請者が大学院博士後期課程修了者としての学力と見識を備えており、博士(理学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>			