

## 学位論文の要旨

氏名	中務 弘基
学位論文題目	<i>Agrobacterium</i> と <i>Rhizobium</i> 間を移動する巨大プラスミドと共生能発現

本研究は、クローバを宿主とする根粒菌と *Agrobacterium* の間で根粒菌の共生遺伝子群を含む巨大プラスミド（共生プラスミド）を接合伝達させ、得られた菌株のクローバとの共生能、及び共生プラスミドの存在様式を詳細に解析したものである。その結果、共生プラスミドが、根粒菌、及び *Agrobacterium* の主染色体に組込まれ共生アイランド化する現象を見いだした。さらに、*Agrobacterium* 主染色体上の組込み部位の詳細な解析により、共生プラスミド上のトランスポゾンが組込みに関与していることを示した。自然界では、多数の遺伝子を含む広範な領域の移行により、細菌類が種々の機能を相互に交換していることを示す事例が知られているが、本研究の結果は、その機構のひとつを提示するものである。

第1章は、根粒菌とマメ科植物の共生機構、窒素固定能発現の機構について、最新の知見を交えて整理し、総合的な緒論としてまとめた。

第2章は、細菌類における、遺伝子（群）の水平伝達の事例と、水平伝達の仕組みについて紹介した。

第3章では、クローバ根粒菌の共生プラスミドを *Agrobacterium* に接合伝達し、得られた *Agrobacterium* 接合伝達株のクローバとの共生能、及び、共生プラスミドの存在様式について検討した。クローバ根粒菌の共生プラスミドを、トランスポゾン Tn5-*mob* の挿入により可動化し、*Agrobacterium* へと接合伝達した。得られた *Agrobacterium* 接合伝達株は、クローバに根粒を着生したが、窒素固定活性は示さなかった。根粒より分離した

*Agrobacterium* 接合伝達株は、共生プラスミドを保持していたが、共生プラスミドが主染色体に組込まれて、共生アイランド化していると判断できる株 (Afcs1株) も見いだした。

第4章では、共生アイランド化していると判断した Afcs1株について、共生プラスミドの組込み部位を特定し、詳細に解析した結果をまとめた。すなわち、共生プラスミドは、*Agrobacterium* の linear chromosome に位置する putative P4-family integrase gene に組込まれていること、さらに、組込みには共生プラスミドに挿入し Tn5-*mob* が関与することを明らかにした。

第5章では、Afcsl株と、共生プラスミドを除去したクローバ根粒菌（H1株）を接合させ、共生遺伝子群を根粒菌に戻すことを試みた。接合で得られた根粒菌接合伝達株は、クローバに窒素固定能のある根粒を形成した。根粒から分離した菌株は、共生プラスミドを保持していたが、共生プラスミドが根粒菌の主染色体に組み込まれた株（H1tr1株）も見いだすことができた。クローバ根粒菌で、共生窒素固定遺伝子群が共生アイランド化して存在する株の報告は初めてである。

第6章は、本研究全体を総括した。細菌間を相互に移行する遺伝子の存在から、自然界における、共生遺伝子群の移動が、共生窒素固定菌の多様性を生み出す一因となっていることを示し、遺伝子の水平伝播の仕組みについて考察した。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第285号	氏名	中務 弘基
審査委員	主査	阿部美紀子	
	副査	内海 俊樹	坂井 雅夫

学位論文題目 *Agrobacterium*と*Rhizobium*間を移動する巨大プラスミドと共生能発現  
(Inter-generic transfer of a symbiotic plasmid between *Agrobacterium* and *Rhizobium*  
and expression of its symbiotic ability with leguminous plants)

## 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。本論文は植物と共生する細菌類の共生に関与する遺伝子が、丸ごと他の細菌に移行し、主染色体に組み込まれる仕組みについて述べたもので、全文6章より構成されている。

第1章は序章として植物と微生物の共生の概要を述べた。

第2章では細菌類の遺伝子移行について解説している。

第3章では根粒細菌のプラスミドをアグロバクテリウムに接合伝達の後、共生遺伝子群の移行した部位について検討し、主染色体上に共生アイランド化した菌株の存在を明らかにした。

第4章ではアイランド化した共生遺伝子群の、主染色体上での組み込み部位を詳細に解析した結果、アグロバクテリウムの主染色体に位置するP4-family integrase を暗号化していると予想される遺伝子に組み込まれていること、さらに組み込みには共生プラスミドに挿入したTn5-mobが関与することを明らかにした。

第5章では、移行させた共生遺伝子群を、再度アグロバクテリウムから根粒菌に接合伝達によって戻すことを試みた。その結果、共生遺伝子群をアイランド化させたアグロバクテリウムでは、窒素固定能が認められなかったが、根粒菌に移行させると窒素固定能が復活することを見いだし、遺伝子の移行と表現型の発現には、遺伝子セットの存在だけではなく、菌体の他の要因も重要な機能を果たしていることを提示した。

第6章では、本研究全体を統括し考察した。

以上、本論文は、多数の遺伝子を含む広範な領域の移行により、細菌類が種々の機能を自然界で相互に交換していることを示す機構の具体例を提示し、微生物界における多様性を創出する一因となっていることを提案した。

よって、審査委員会は博士（理学）の学位論文として必要十分な内容を含んでおり、合格と判定する。

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第285号	氏名	中務 弘基
審査委員	主査	阿部美紀子	
	副査	内海 俊樹	坂井 雅夫

2008年 2月 4日に開催された学位論文発表会において、主査・副査を含む約30名の教員及び学生の前で、学位申請者 中務弘基 氏による学位論文が発表され、その内容および関連事項について質疑が行われた。その一部を以下に示す。いずれの質問に対しても適切に対応し、満足すべき回答を得ることが出来た。

Q1. トランスポゾンの挿入部位には特異性はあるのか？

A. 文献を見る限り、ターゲット部位に相当するものはあるようであるが、特異的ということはない。

Q2. 共生遺伝子群を導入したアグロバクテリウムでは、窒素固定能の発現が阻害されているということであるが、何が阻害に関わっていると考えられるか？

A. 窒素固定に関わるFix遺伝子の転写に必要な $\sigma^{54}$ はアグロバクテリウムにも存在することが分かっている。共生プラスミドを移行させたアグロバクテリウムで窒素固定能が発現せず、アグロバクテリウムから根粒菌に共生プラスミドを移行させた時には、正常に窒素固定能を発現することから、根粒菌の他のプラスミドや、主染色体上に窒素固定能発現の鍵が隠されているかも知れない。

Q3. 発表の中に、遺伝的に異なる菌種に共生窒素固定を行っているものがあるという話であったが、それが水平移行によるという根拠は何か。人為的な水平移行で窒素固定能を発現する例はあるのか？

A. 報告された菌種は、どれも通常は土壌細菌として植物根圏に成育していること、また、共生能に関しては例のないことが分かっている種類である。これらの菌種の中には、共生組織内で窒素固定を行う種類も確認されている。

Q4. 自然界で共生遺伝子の移行が可能になるのはどういうことによるか？

A. 細菌が自己伝達性のプラスミドを保持していれば起こりうる。自然界ではわりと頻繁に形質転換が行われており、その結果、細菌類の多様性が出現したものと考えている。

以上のことから審査委員会は、申請者が課程博士修了者としての学力ならびに見識を有すると認め、博士（理学）の学位を与えるに足る資格を有すると判定した。