

学位論文の要旨

氏名

永田 真紀

学位論文題目

植物ヘモグロビン遺伝子の発現と一酸化窒素発生を指標とした
ミヤコグサと微生物の相互作用に関する研究

マメ科植物は、根粒菌との共生により根粒を形成し、生育に必要な窒素栄養を大気中から得ることができる。本論文は、マメ科モデル植物であるミヤコグサを材料とし、植物組織内で発生する一酸化窒素(NO)、及び、NOと相互作用することが知られている植物ヘモグロビン(Hb)の遺伝子発現を指標として、共生根粒菌と植物病原菌に対する宿主植物の応答の違いを検討したものである。さらに、根粒菌のリポ多糖(LPS)について、共生根粒菌接種による一過的なNO生成の誘導活性と比較、検討し、共生における菌体多糖類とNO発生、Hbの遺伝子発現の意義について論じた。

第1章は、マメ科植物と根粒菌の共生系の分子的背景、HbとNOの植物での生理機能、さらに、根粒菌の多糖類の共生における役割に関する知見を整理し、緒論としてまとめた。

第2章では、様々な根粒菌や根粒菌変異株、植物病原菌をミヤコグサに接種し、植物体の成長に及ぼす影響を調査した。共生根粒菌、非共生根粒菌、植物病原菌をそれぞれミヤコグサの根に接種し、28日後植物の成長を観察した。植物病原菌のなかには、ミヤコグサの成長を著しく阻害するものを見いだした。また、葉肉組織への接種では、植物病原菌種により病徴の現れ方が異なった。これらの結果を、共生根粒菌、非共生根粒菌、植物病原菌、それぞれに対するミヤコグサの応答の特徴としてまとめた。

第3章では、病原応答のシグナル分子として機能するNO、そのNOと相互作用するHbの遺伝子発現を指標として、共生根粒菌、非共生根粒菌、植物病原菌それぞれに対するミヤコグサの応答を解析した。その結果、共生根粒菌を接種したときに限り、一過的な*LjHb1*(ミヤコグサの class 1 Hb)の発現とNOの生成が観察された。一過的なHb遺伝子の発現とNOの発生は、他のマメ科植物でも、その共生根粒菌の接種時に観察された。NOが病原応答のシグナル分子として機能することを考慮すると、宿主植物は、共生根粒菌を病原菌と同様に認識していることを示唆している。しかし、植物HbがNO除去効果を発揮することにより、根粒菌接種によるNO発生は、一過的なものとなっている可能性がある。ミヤコグサに植物病原菌を接種した場合、NOは持続的に生成されるものの、*LjHb1*の発現は誘導されなかった。

第4章では、ミヤコグサにおけるNO生成と*LjHb1*の発現を一過的に誘導する菌体成分の同定を試みた。NO誘導活性成分の候補として、LPSに注目した。根粒菌のLPSは、宿主植物への感染時に重要であるとされているが、その分子機構は不明である。一般にLPSは、親水性の多糖部分と疎水性のリピドAからなり、多糖部分はO-側鎖とコアオリゴ糖に分けられ、さらにコアオリゴ糖はリピドA領域と結合している。本論文では、根粒菌および植物病原菌の細胞外多糖であるLPSやEPSにはNO誘導活性があることを示した。また、根粒菌のLPSの各構成部分のNO誘導活性について検討したところ、コアオリゴ糖を含む画分にNO誘導活性があることが示唆された。

第5章では、研究の結果を総括し、根粒菌とその宿主となるマメ科植物の初期認識過程におけるNOの一過的な発生と、それと同調して起きるHb遺伝子の発現の意義について議論した。根粒菌とマメ科植物の共生成立に向けた初期過程では、宿主植物の共生根粒菌に対する応答は、病原菌に対する応答と似ている。しかし、結局は、病原応答の発動が何らかの機構で回避されると考えられている。本論文では、Hbが植物組織内のNOレベルを低く保つことにより、植物病原応答の誘導を回避している可能性を示した。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第312号	氏名	永田真紀
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	阿部 美紀子	橋本 雅仁
<p>学位論文題目 Expression of a class 1 hemoglobin gene and nitric oxide generation in the interaction between plant-associate bacteria and <i>Lotus japonicus</i> (植物ヘモグロビン遺伝子の発現と一酸化窒素発生を指標とした ミヤコグサと微生物の相互作用に関する研究)</p>			
<p>審査要旨</p> <p>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。本論文では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサを材料とし、植物組織内で発生する一酸化窒素(NO)、及び、NOと相互作用する植物ヘモグロビン (Hb)の遺伝子発現を指標として、共生根粒菌と植物病原菌に対する宿主植物の応答の違いを検討した。さらに、根粒菌のリポ多糖について、共生根粒菌接種に対する宿主植物の応答と比較・検討し、共生におけるリポ多糖類 (LPS) とNO発生・Hb遺伝子発現の意義について論じており、全文5章より構成されている。</p> <p>第1章は序章である。マメ科植物と根粒菌の共生系の分子的背景、HbとNOの植物での生理機能、さらに、根粒菌の多糖類の共生における役割に関する知見を整理してまとめた。</p> <p>第2章では、植物病原菌の中から選抜した菌株をミヤコグサに接種し、その病徴を特徴づけた。</p> <p>第3章では、Hb遺伝子の発現と病原応答のシグナルであるNOの発生とを指標として、根粒菌及び病原菌接種に対するミヤコグサの応答を解析した。共生根粒菌に対しては一過的なHb遺伝子の発現とNO発生、病原菌に対してはHb遺伝子の発現を伴わない持続的なNO発生という明確な応答の違いを発見した。</p> <p>第4章では、根粒菌のLPSにNO発生を引き起こす活性があることを見だし、共生成立に向けた根粒菌と宿主植物の初期応答におけるLPS、NO、Hbの役割を関連づけた。</p> <p>第5章は、本論文の総括である。</p> <p>以上、本論文は、植物の微生物に対する応答について、NO発生とHb遺伝子発現を指標として解析することにより、共生応答と病原応答の共通点と相違点を明確に特徴づけた。宿主植物は、共生菌である根粒菌のリポ多糖を認識して、病原応答のシグナル分子であるNOを発生することを明らかにした。このことは、共生応答の初期過程では、宿主植物が共生根粒菌を病原菌と同様に認識・応答していることを示唆している。さらに、植物ヘモグロビンが組織内のNOレベルを低く保つことにより、根粒菌に対する病原応答の発動を回避している可能性を示した。本論文は、このように、病原応答の視点から共生の分子機構に関する新しいモデルを提案した点で高く評価できる。また、根粒菌が宿主植物に特異的に応答して生産する根粒形成誘導因子が、Hb遺伝子の発現を誘導する可能性も示している。これは、共生成立のプロセスで機能すると予想される病原応答の回避機構を解明するための有力な手がかりとなる、非常に重要な新知見である。</p> <p>よって、審査委員会は学位 (博士) の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第312号	氏名	永田真紀
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	阿部 美紀子	橋本 雅仁

2009年2月9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30名の教員及び学生の前で、学位申請者 永田真紀 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。

Q1. 根粒菌のリポ多糖(LPS)が宿主植物にNO発生を誘導する活性があることを見だし、LPSの各構成成分についてNO誘導活性を検討した。それぞれの構成成分の画分の純度はどの程度か？

回答：カラムで分離・精製しているものの、純度は80%程度である。

Q2. LPSの各構成成分についてNO誘導活性があるのは、どの部分と考えられるか？

回答：それぞれの構成成分の純度の問題を考慮しても、コアオリゴ糖を含むO-側鎖、及び、リピドAに活性があると判断してよいと考える。しかし、リピドAは、根粒菌外膜に埋まった状態で存在していることから、菌体の外側に存在するコアオリゴ糖を含むO-側鎖の部分が、最初に宿主植物に認識され、NO発生を誘導するものと考えられる。

Q3. Hb遺伝子自身はNOに応答して発現が誘導される。植物病原菌はNOの持続的発生を誘導するもの、ヘモグロビン(Hb)遺伝子の発現は伴わない。この機構をどのように考えているか？

回答：植物病原菌を接種した場合のNO発生は、大量であり持続的である。その結果、NOが細胞毒性を発揮し、植物の細胞は大きなダメージを受けてしまい、Hb遺伝子が発現できなくなるものと考えられる。病原応答が誘導される前に植物細胞は大きなダメージを受けるため、植物病原菌にとっては好都合な環境となるものと考えられる。根粒菌の場合は、NOが発生するものの、その量はHb遺伝子の発現を誘導し、Hbによって速やかに硝酸へと酸化されてしまう程度の量であろうと考えられる。しかし、本実験系に適したNOの定量法がないために、実験的に証明するのは、現在のところ困難である。

Q4. 非共生菌のLPSに対する応答性はどうか？

回答：病原菌のLPSには、NO発生の誘導活性がある。しかし、非共生菌のLPSに対しては未検討である。LPSの構造、及び、LPSと結合する植物のリポ多糖結合性タンパク質の機能などを解明するためにも、非共生菌のLPSに対する応答は重要な基礎的知見となる。

Q5. NOの存在は、NO特異的蛍光試薬DAF-FM とc-PTIOの組み合わせで検討しているが、L-NAMEなどを使う必要はないか？

回答：DAF-FMの蛍光が、必ずしもNOの存在を示すものではないことは認識している。しかし、NOの除去活性が知られているc-PTIOの添加により、Hb遺伝子の発現誘導がなくなることからも、NOが存在するものと判断している。L-NAMEは、動物の一酸化窒素合成酵素(NOS)の阻害剤であるが、植物では未だNOSの存在は証明されておらず、L-NAMEで判断することも同じ危険性をはらんでいる。植物でのNOSの存在の証明と、信頼性の高いNOの検出法、及び、定量法の開発が待たれるところである。

以上、いずれの質問にも、的確に回答し、3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、博士の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。