

学位論文の要旨

氏名	村上英一
学位論文題目	根粒菌との共生におけるミヤコグサの共生菌由来リポ多糖の認識
<p>マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定は、大きく異なる生物間の相互認識と受容の上に成立しており、そこに関与する分子、あるいは、遺伝子とシグナル伝達機構についての研究が、急速に進展している。根粒菌が宿主植物細胞内部に侵入してからは、根粒菌のリポ多糖(LPS)が共生成立で重要な分子のひとつとされているものの、植物のLPS認識機構についての知見はほとんどない。本論文では、ミヤコグサとその根粒菌を主な材料として、共生相手であるミヤコグサ根粒菌のLPSに対する応答を、根における一酸化窒素(NO)の発生を指標として詳細に解析し、LPSの構成成分に対してNO発生のプロファイルが異なることを見いだした。また、LPSと結合する植物のLPS結合性タンパク質(LBP, LPS Binding Protein)遺伝子のクローニングに成功し、その機能が、根粒菌との共生成立に必須であることを見いだした。本論文は、これらの新知見に基づいて、共生菌由来のリポ多糖を認識する植物側の機構とその共生系における役割について、植物と微生物の相互認識の立場からまとめたものである。</p> <p>第1章は、本研究の背景と意義についてまとめた。マメ科植物は、根粒菌との共生窒素固定によって、大気中の窒素を栄養源として活用できる。共生成立に必要な分子の一つとして、菌の表層多糖であるLPSが知られている。病原菌のLPSは、動・植物の病原応答を誘導することが知られている。しかし、マメ科植物と根粒菌の共生系では、LPSに対する植物の応答や認識機構は明らかにされていない。この共生系を材料として、LPSに対する植物の応答や認識機構を解析することは、共生だけではなく、病原応答も含めた植物の微生物に対する認識・応答機構を解明する上で重要である。</p> <p>第2章では、ミヤコグサ根粒菌のLPSが、宿主であるミヤコグサの根にNOの発生を誘導することを明らかにした。病原菌体や病原菌のLPSが、NO産生を誘導することが動植物で報告されている。また、ミヤコグサ根粒菌の接種によって、ミヤコグサの根では一過的なNO産生が誘導されることを既に見いだしていた。しかし、NO産生を誘導する物質の同定には至っていなかった。根粒菌もLPSを保持しており、根粒菌接種によって誘導されるNO産生が、LPS認識の結果によることは十分に考えられる。そこで、ミヤコグサ根粒菌の精製LPSまたはLPSを、多糖(PS)、リポオリゴ糖(LOS)、オリゴ糖(OS)、リピド</p>	

Aの各フラクションに分け、それぞれを根に接種してNO産生を観察した。その結果、LPSとlipid Aでは、接種後少なくとも24時間までNO産生が確認できた。しかし、PSでは4時間以降は観察されなかった。LPSは根粒菌接種後にNO産生を誘導する分子の一つであること、また、植物は、LPSの構成成分ごとに異なる認識応答をすることが示唆された。

第3章では、ミヤコグサのLPS結合性タンパク質遺伝子(*LjLBP*)をクローニングし、その特徴と組換えタンパク質のLPS結合活性を検討した。ヒトのLBPと相同性が高いタンパク質を暗号化している4遺伝子をミヤコグサゲノム上に見だし、ミヤコグサのLBP遺伝子として、*LjLBP1*, *LjLBP2*, *LjLBP3*, *LjLBP4*とした。それぞれの遺伝子発現は、根粒の着生などにより、異なる特徴を示した。このうち*LjLBP1*, 2, 3についてはN-terminal barrel部分の組換えタンパク質を作製し、大腸菌LPSとの結合活性があることを確認した。

第4章では、*LjLBP*発現抑制、及び、過剰発現形質転換毛状根を作製し、根粒菌との共生における機能について検討した。*LjLBP1*と*LjLBP2*の発現抑制毛状根に着生した根粒内部の感染細胞では、バクテロイドの細胞膜が溶解している様子が観察され、特に*LjLBP1*の抑制根では、感染細胞の内部構造も崩壊していた。*LjLBP 3/4*の抑制根では、シンビオソームの肥大が観察された。過剰発現体では、シンビオソーム当たりのバクテロイド数の増加が確認された。これらの結果は、*LjLBP*がバクテロイドの分裂やシンビオソームの維持などに関与することを示唆している。窒素固定活性と根粒数を測定すると、*LjLBP1*の発現抑制体では窒素固定活性の低下と根粒数の増加が確認できた。これらのことから、正常な*LjLBP*の機能が、共生成立に必須であることが実証された。

第5章では、研究を総括し、共生窒素固定系における根粒菌のLPS、及び、宿主植物のLBPによる根粒菌認識について議論した。共生相手となる根粒菌のLPSが宿主植物の根にNO産生を誘導すること、*LjLBP*遺伝子の発現を抑制すると正常な共生が成立しないことから、根粒菌の感染前、感染後ともに、宿主植物は、LBPを介して根粒菌を監視していると考えられる。このLBPによる監視機構の全体像は今のところ不明であるものの、病原菌に対しても機能している可能性について言及し、その重要性を示した。

このように、本論文は、植物による細菌LPSの認識に関わる遺伝子を初めて同定し、根粒菌との共生成立に必須であることを明らかにした。植物の細菌LPS認識機構の全容解明の端緒となる重要な成果であると考えられる。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第355号	氏名	村上英一
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	伊東 祐二	橋本 雅仁

学位論文題目 **Host-plant recognition of lipopolysaccharide from microsymbiont during symbiosis between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus***

(根粒菌との共生におけるミヤコグサの共生菌由来リポ多糖の認識)

審査要旨

提出された学位論文および論文目録等をもとに、学位論文審査を実施した。本論文では、ミヤコグサとその根粒菌を主な材料として、宿主植物が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一酸化窒素(NO)を発生することを確認した。続いて、ミヤコグサのリポ多糖結合性タンパク質遺伝子のクローニングに成功し、その機能が、根粒菌との共生に必須であることを見いだした。本論文は、これらの新知見に基づいて、共生菌由来のリポ多糖を認識する植物側の機構とその共生系における役割について、植物と微生物の相互認識の立場からまとめたものであり、5章から構成されている。

第1章では、マメ科植物と根粒菌の相互認識機構と共生における根粒菌リポ多糖の役割に関する知見を概説し、本研究の背景と意義についてまとめた。

第2章では、ミヤコグサ根粒菌より精製したリポ多糖及びその構成成分でミヤコグサの根を処理し、NOの発生を指標として応答を検討した。その結果、ミヤコグサは共生相手の根粒菌のリポ多糖に応答し、病原応答のシグナル分子であるNOを発生することを確認した。さらに、リポ多糖を構成単位ごとに精製してミヤコグサに与え、いずれの画分にも応答することを見いだした。

第3章では、ミヤコグサのリポ多糖結合性タンパク質の遺伝子を4種同定し、クローニングに成功した。そのうち3種については組換えタンパク質を生産し、リポ多糖との結合活性を示した。

第4章では、それぞれのリポ多糖結合性タンパク質の遺伝子発現を特徴付けた。さらに、発現抑制毛状根及び過剰発現毛状根を作出し、リポ多糖結合性タンパク質が、根粒菌との共生成立には必須であることを示した。

第5章では、研究を総括し、共生窒素固定系における根粒菌のリポ多糖及び宿主植物のリポ多糖結合性タンパク質による根粒菌認識について議論した。宿主植物は、根粒菌の感染前・後ともに、リポ多糖結合性タンパク質を介して根粒菌を監視していると考えられる。この監視機構の全体像は今のところ不明であるが、病原菌に対しても機能している可能性を示し、その重要性に言及した。

このように、本論文は、植物による細菌のリポ多糖の認識に関わる遺伝子を初めて同定し、根粒菌との共生成立に必須であることを明らかにした。これは、植物の細菌リポ多糖認識機構の全容解明の端緒となる重要な成果であり、植物と微生物の相互作用に関する研究に大きく貢献することが期待される。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355号	氏名	村上英一
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	伊東 祐二	橋本 雅仁

2011年2月10日に行われた博士論文発表会において、審査委員を含む約30名の教員及び学生の前で、学位申請者 村上英一 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以下に示すような質疑応答が行われた。いずれの質問に対しても的確な回答を得ることができた。

Q1. 動物の病原菌と植物の病原菌では、リポ多糖の構造に違いがあるか？

回答：リポ多糖の構造は、感染する生物の種類によって異なるのではなく、細菌の分類群によって異なる。例えば、リポDは、属が異なればアシル基の鎖長や数が異なる。また、同属同種でも、O-抗原を構成する糖の種類や糖鎖の長さの違いによって、菌株が分類されている。

Q2. ミヤコグサのリポ多糖結合性タンパク質(LjLBP)の遺伝子の発現量はどの程度か？

回答：LjLBP遺伝子の発現量の絶対値を見積もることはできていないが、発現量は非常に低い。しかし、植物体のあらゆる組織で発現している。本研究では、4種のLjLBP 遺伝子の発現について解析したが、そのうちのLjLBP3/4の発現が、細菌の存在に反応して変化しており、大きな特徴であると考えている。

Q3. LjLBPは、植物のどこに存在して機能しているのか？

回答：現在のところ不明である。LjLBPにはシグナルペプチドがあるので、細胞外に分泌されている可能性もある。また、膜輸送系の働きによって、根粒細胞内部に放出された根粒菌へと届けられている可能性もある。蛍光タンパク質遺伝子との融合遺伝子を構築するなどして、組織・細胞レベルでLjLBPの局在部位を検討する必要がある。

Q4. LjLBPの遺伝子発現を抑制すると、なぜ共生が成立しないのだろうか？Nodファクターが関与するシグナル伝達系と関係があるのだろうか？

回答：共生を成立させるためには、リポ多糖を認識する植物のシグナル伝達系が機能している必要があると予想される。植物は、細菌由来の様々な分子を認識して応答する。根粒菌とマメ科植物の共生系では、植物はNodファクター（根粒菌が生産するリポキトオリゴ糖）を認識することにより共生成立へ向けた遺伝的プログラムが進行する。その過程で、リポ多糖が関与するシグナル伝達系とのクロストークが存在するのかもしれない。あるいは、LiLBPは根粒細胞内部に放出された根粒菌に結合し、根粒菌を保護する役割があるのかもしれない。様々な可能性を考えながら実験を組み立てる必要がある。

以上のことから審査委員会は、申請者が大学院博士後期課程修了者としての学力並びに見識を有するものと認め、博士（理学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。