

(学位第8号様式)

No. 1

| 学位論文審査結果の要旨 | |
|---|---|
| 学位申請者 氏 名 | 飯笹 さやか |
| 審査委員 | 主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一 |
| | 副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳 |
| | 副査 琉球大学 教授 平良 東紀 |
| | 副査 琉球大学 准教授 関根 健太郎 |
| 審査協力者 | 印 |
| 題 目 | Functional analysis of <i>Arabidopsis</i> LBP/BPI related-1 and -2 in lipopolysaccharide-induced plant defense responses (LPS に対する防御応答におけるシロイヌナズナ LBP/BPI 関連タンパク質-1 と-2 の機能解析) |
| <p>本研究ではモデル植物シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) からリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) に結合するタンパク質を初めて同定した。また、同定したタンパク質の機能を生化学的および生理的に詳細に解析し、これらタンパク質が LPS に対する防御応答において重要な役割を果たすことを示した。</p> <p>グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 LPS は動植物の自然免疫を誘導するエリシターである。しかし、植物の LPS 認識機構の詳細はほとんど分かっていない。そこで学位申請者は、哺乳類の LPS 認識機構において、LPS と直接結合し重要な役割を果たす LPS 結合タンパク質 (LPS-binding protein; LBP) と殺菌性/透過性増強タンパク質 (bactericidal/permeability-increasing protein; BPI) に注目した。シロイヌナズナのゲノムには2つの LBP/BPI 関連タンパク質 (LBP/BPI-related protein; AtLBR) をコードする配列が存在する。学位申請者は2つを AtLBR-1、AtLBR-2 と名付け、LPS に対する防御応答における機能解析を試みた。</p> | |

まず、AtLBR の N 末端を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、精製した。その結果、組換え AtLBR は大腸菌由来 LPS と共精製されることが分かった。そこで、LPS を取り除いた AtLBR と精製 LPS をインキュベートし、両者が直接結合するかどうかを調べた。その結果、AtLBR は LPS と直接結合することが分かった。LPS は構造の違いにより、ラフ型とスムーズ型に分類される。AtLBR はどちらの型の LPS にも直接結合した。更に、LPS に対する防御応答の違いを野生株 (wild type; WT) と *atlbr* 変異株間で比較した。まず、LPS 処理に伴う病害抵抗性遺伝子 1 (*pathogenesis-related 1*; *PR1*) の発現を調べた。その結果、変異株では *PR1* 発現上昇に時間がかかることが分かった。他の *PR* 遺伝子の発現上昇に、有意な差はなかった。また、LPS 処理に伴う活性酸素種の発生を調べた結果、変異株では有意に低下していた。これらの結果から、哺乳類の LBP や BPI と同様に、シロイヌナズナの AtLBR も LPS に対する防御応答において重要な役割を果たすことが明らかになった。

AtLBR-2 は防御応答に重要な植物細胞のアポプラスト領域に局在し、高い LPS 結合活性を示した。そこで学位申請者は、特に AtLBR-2 に注目し、より詳細な機能解明を行うため、RNA-Seq を用いたトランスクリプトーム解析を試みた。RNA-Seq データ解析の結果、WT では、LPS 処理に伴い 605 遺伝子の発現が上昇し、1,534 遺伝子の発現が低下することが分かった。更に、発現上昇する 605 遺伝子の内、65 遺伝子が AtLBR-2 依存的であることが分かった。遺伝子オントロジー (Gene ontology; GO) 解析の結果、AtLBR-2 依存的に発現上昇する 65 遺伝子において、特に防御応答に関する GO term がエンリッチされていた。65 遺伝子でエンリッチされた GO term の一つに Responses to salicylic acid stimulus が含まれていた。実際、65 遺伝子には *PR1* を初めとする、多くのサリチル酸 (salicylic acid; SA) 誘導性の遺伝子が含まれていた。そこで学位申請者は、WT と *atlbr-2* 変異株に LPS を処理し、蓄積する SA と SA グルコシド (SA glucoside; SAG) の量を比較した。その結果、*atlbr-2* 変異株は SAG 蓄積量が WT に比べて有意に低かった。更に、SA を処理した *atlbr-2* 変異株では *PR1* の発現が上昇した。これらの結果から、AtLBR-2 は LPS が誘導する SA(SAG) を介したシグナル伝達と防御応答関連遺伝子の発現に必要不可欠であることが明らかになった。本研究により、LPS に対する防御応答における AtLBR の重要性が証明された。

以上のように、本研究は、グラム陰性菌の構成成分であるリポ多糖に対する植物の防御応答機構に新たな知見を提供するものである。したがって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値があるものと判断した。