

(学位第 9 号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
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
実施年月日	平成30年8月8日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） 口答 ・筆答	
<p>主査及び副査は、平成30年8月8日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

飯笹 さやか

[質問1]

AtLBRは大腸菌のLPSとシュードモナス属のLPSとの間で結合特異性に差異があるか?

[回答1]

差異があると考えられる。AtLBR-1とAtLBR-2の各々は、大腸菌のLPSとは強く結合し、シュードモナス属のLPSとは弱く結合すると推定している。私の実験系ではAtLBRと大腸菌のLPSの結合をみることしかできない。そこで、シュードモナス属のLPSがAtLBRと大腸菌のLPSの結合を競合できるかどうかを調べた。過剰のシュードモナス属LPSを加えることで、競合ははっきりと見られるものの、その競合度合いは弱かった。つまり、植物病原菌として代表的なシュードモナス属と強く結合する訳ではないと思われる。おそらく、LPSの構造の違いによって特異性の違いが生まれるのであろう。AtLBRは幅広いLPSに結合できるものであると考えられる点も興味深い。

[質問2]

AtLBRの発現はLPS刺激でどうようになるか?

[回答2]

リアルタイムPCRを用いて、定量を行った。AtLBR-2に関しては、LPS刺激で有意な発現量の増加が検出された。AtLBR-1に関しては、わずかに発現が増加する傾向があった。一方、RNA-Seq解析において私が用いた基準 ($\log_2 FC = 1.35$) ではAtLBR-1とAtLBR-2共に発現に差が見られなかった。これは基準が厳しいからかもしれない。いずれにせよ、AtLBRの量のLPS刺激による変化は大きいものではなく、AtLBRのタンパク質量の変化は生理的にそれほど重要でないと考えている。

[質問3]

LPSをイムノブロットで検出しているが、LPSは滲んだように検出される。何故か?

[回答3]

AtLBRとLPSをSDS-PAGEの前処理によって、分離した後に、LPSをイムノブロットで検出している。つまり、タンパク質に結合した状態でLPSを検出しているわけではない。これが、タンパク質は一本のバンドで検出されるのに対し、LPSは滲んだように検出される理由だ。LPSが滲んだように検出されるのは、多様な分子が含まれているからだ。スムーズ型のLPSがブロードに検出され、ラフ型のLPSが狭く検出されることを、単品のLPSを用いて確認しているが、これは予測通りだった。

[質問4]

AtLBR遺伝子を破壊した植物では野生型植物と比べて、LPS刺激1日後のPRIの遺伝子発現に差が見られるが、2日後には差が見られない、これは何故か?

[回答4]

AtLBRはLPSを細胞膜上のLPS受容体に受け渡すに関わっていると考えている。AtLBRがないせいで、LPS刺激1日後では十分な量のLPSを細胞膜上のLPS受容体が認識していないが、2日後では、AtLBRなしでも、十分な量のLPSを細胞膜上のLPS受容体が認識できるので、このような結果になったと考えている。

[質問5]

AtLBR遺伝子を破壊した植物で病原菌自体への応答はどうなるか? また、大腸菌のような非病原菌への応答はどうなるか?

[回答5]

モデル植物シロイヌナズナを用いる病原菌感染実験で最も良く用いられる *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000を用いて病原菌自体への応答を見た。しかし、AtLBRの破壊の有無で、感染後の菌体量に差がなかった。このことについては、次の二つの理由を考えている。一つ目は、先程も述べたように、AtLBR無しでもLPS応答がおこることが理由だ。AtLBRはLPSを細胞膜上のLPS受容体に受け渡すに関わっており、LPS受容体そのものではないと考えている。二つ目は、植物は、フラジェリンやEF-Tuなどの他の細菌産物に応答する経路も持っていることだ。これら経路が

残っているために、病原菌は植物を攻撃できたのだと考えている。

また、大腸菌のような非病原菌への応答を見れば、差が検出されるのではないかという指摘は尤もだと思う。残念ながら、その実験は行っていない。

[質問6]

AtLBRと他のタンパク質との相互作用、特にLPS受容体との相互作用はどうなっているか？

[回答6]

LOREという名称のLPS受容体が既にシロイヌナズナで同定されている。これとのAtLBRとの相互作用は興味深い研究課題だが、その相互作用はまだ見ていない。なお、LOREはシュードモナス属およびザントモナス属のLPSのみに応答する。幅広いLPSに結合するAtLBRとは特異性が異なる。また、RNA-Seq実験から、AtLBR-2依存的にLPS刺激で発現量が上昇する遺伝子としてAtlg67250を見つけている。これがコードするタンパク質は、LOREと同様に細胞外ドメインにBulb-type lectin S-domain-1を持つ。このタンパク質もLPS受容体の候補であると考えており、これとAtLBRとの相互作用を調べることも興味深い研究課題だ。

[質問7]

AtLBRに抗菌活性はあるのか？

[回答7]

AtLBR-1についても、AtLBR-2についても、N末端ドメインには抗菌活性はなかった。AtLBR-2全長については抗菌活性があるという予備的な結果は得られている。しかし、AtLBR-2全長のcDNAを大腸菌にクローニングして、保持させることが難しい。そのため、AtLBR-2全長タンパク質の機能解析を行うこと自体が難しい状況である。

[質問8]

AtLBRは構造的によく似たドメインが二回繰り返していると考えられるが、その理由は何か？

[回答8]

より強くLPSと結合するためだと考えている。しかし、そのことの生化学的および生理的な重要性についてははっきりとわかっていない。ヒト等にホモログがあり、これらもよく似たドメインが二回繰り返しているが、その理由についても、報告を知らない。

[質問9]

GFP融合タンパク質を用いて、AtLBRの局在場所を見た実験がよく分からなかったもので、もう一度説明してほしい。また、シグナルペプチドとGFPの融合タンパク質が発現するプラスミドを構築して実験を行ったのか？

[回答9]

AtLBR-2は細胞質ゾルでも蛍光が見られるが、アポプラストにおける細胞膜と細胞壁の間の空間、特に細胞壁近辺に強い蛍光が見られた。このことから細胞外に分泌されるタンパク質であると結論づけた。一方、AtLBR-1については、細胞外に分泌される証拠は得られなかった。一方、液胞に蛍光が見られるという興味深い性質があった。液胞に取り込まれたグラム陰性菌を検出するという可能性も考えられる。

実験は、シグナルペプチドとタンパク質全長とGFPの融合タンパク質が発現するプラスミドを構築しておこなったものである。この方法の方がより正確にタンパク質の局在がわかると考えている。

[質問10]

今回、PRIの遺伝子発現変動に注目していたが、PRIタンパク質の機能は何か？

[回答10]

糸状菌に対して抗菌活性があるという報告はあるが、LPSをもつグラム陰性菌に対する作用は分かっていない。しかし、病原菌に対する応答という点では、最も代表的なマーカーである。

[質問11]

AtLBR遺伝子を破壊した植物で形態の異常は見られたか？

[回答11]

私が見た限りでは形態異常は見られなかった。