

## 学位論文の要旨

氏名	石原 寛信
学位論文題目	マメ科植物の根粒特異的ペプチド群と根粒菌のバクテロイド分化

マメ科植物と根粒菌の共生は、農業生産上極めて有用な特性である窒素固定活性を有する。また、根粒細胞内部に侵入した根粒菌は、増殖能を喪失したバクテロイドへと分化し、あたかも植物細胞の細胞小器官のひとつのように窒素固定に専念している。この共生窒素固定系の確立・維持に関与する分子機構は、根粒菌と宿主マメ科植物双方のゲノム情報を活用した研究が急速に進展したことにより、明らかになりつつある。特に、根粒菌と宿主植物の相互認識と根粒形成の初期過程、及び、根粒着生数の調節機構に関わる遺伝子が同定され、その機能が解明されたことは重要な成果である。しかしながら、宿主植物細胞内で根粒菌を共生状態であるバクテロイドへと分化を誘導し、窒素固定能を発揮させて共生を安定に維持する機構については、全く不明であると言っても過言ではない。本論文では、マメ科植物の根粒特異的ペプチド群に着目し、根粒細胞内における根粒菌のバクテロイドへの分化と根粒特異的ペプチド群の機能についてまとめたものである。

第1章では、本研究の背景について記述した。その内容は、1) マメ科植物と根粒菌の共生、2) マメ科植物の系統進化学、3) 無限型根粒と有限形根粒の組織形態学、4) Inverted Repeat-Lacking Clade (IRLC) に属するマメ科植物の根粒内部のバクテロイド(共生状態の根粒菌)の最終分化、5) IRLCマメ科植物の根粒内部に存在する根粒特異的ペプチド群、以上の5項目である。

第2章では、根粒特異的ペプチド群によりバクテロイドの最終分化が誘導されることを示した。具体的には、1) IRLCマメ科植物であるタルウマゴヤシの根粒特異的ペプチド群がバクテロイドに局在すること、2) バクテロイドの最終分化が誘導されない変異株であるタルウマゴヤシ *dnf-1* 株では、根粒特異的ペプチド群が小胞体に局在し、バクテロイドには局在しないこと、3) バクテロイドの最終分化を誘導しないマメ科植物であるミヤコグサの根粒内部でタルウマゴヤシの根粒特異的ペプチド遺伝子を発現させると、ミヤコグサのバクテロイドに、タルウマゴヤシのバクテロイドの特徴である最終分化と酷似した形態変化が観察されること、4) 根粒特異的ペプチドの合成ペプチドを根粒菌の培養菌体に作用させると、最終分化と酷似した形態的及び生理的変化が観察されることを示した。これらの結果から、IRLCマメ科植物では、根粒特異的ペプチド群がバクテロイドの最終分化を誘導することを示した。

第3章では、マメ科植物の系統進化上、早い時期に分岐したと考えられるギンネムを材料として、その根粒と内部のバクテロイドの特徴を明確にした。さらに、バクテロイドの分化と根粒特異的ペプチド群の進化的背景について考察した。1)ギンネムの根粒の形状はIRLCマメ科植物と同様の無限型根粒であること、2)ギンネム根粒内部のバクテロイドは、培養菌体と比較すると形態的に変化していること、しかし、3)ギンネム根粒内部のバクテロイドの形態的・生理的特徴は、IRLCマメ科植物の根粒内部のバクテロイドの特徴とは異なること、4)ギンネム根粒内部に根粒特異的ペプチド群は検出されなかったことを示した。これらの結果から、根粒の形状と根粒特異的ペプチド群の存在の有無とは相関が無く、根粒特異的ペプチド群によるバクテロイドの最終分化はIRLCマメ科植物のみが獲得した形質であると考察した。

第4章では、本論文を総括し、IRLCマメ科植物の無限型根粒における根粒菌との共生戦略について議論した。IRLCマメ科植物の根粒特異的ペプチド群は、抗菌活性のあるディフェンシンと同じ構造上の特徴を有している。ディフェンシンは、動物、植物を問わず、広く生物界に分布しており、自然免疫を構成する分子種の一つとされている。従って、マメ科植物は、共生を成立させるために、病原抵抗性に関与する分子を活用して(あるいは、使い回して)、自身の細胞内部に受け入れた根粒菌をコントロールしていると捉えることができる。ディフェンシンのあるものは、標的微生物の遺伝子に直接作用して、その発現を変化させることも知られている。根粒特異的ペプチド群にも、バクテロイド内部に侵入しているものがある。そのようなペプチドの中には、根粒菌の遺伝子発現に関与して代謝系をも変化させ、最終的には、バクテロイドさえも植物の養分として利用できるようにしている可能性についても言及した。

このように、本論文は、マメ科植物が根粒菌を共生状態へと分化させ共生を成立させるために必要な分子種を同定し、その機能を検討することにより、根粒菌との共生窒素固定系における分子戦略の一端を明らかにした。同時に、宿主植物は、根粒菌を強力に制御することにより、窒素固定の恩恵にあずかっているという共生の姿を浮き彫りにした。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第353号	氏名	石原寛信
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	笠井 聖仙	橋本 雅仁
		濱田 季之	

学位論文題目 **Bacteroid differentiation and nodule-specific peptides in legumes**

(マメ科植物の根粒特異的ペプチド群と根粒菌のバクテロイド分化)

## 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。本論文ではタルウマゴヤシ及びミヤコグサとその根粒菌を主な材料として、根粒特異的な植物のペプチド群が、共生を成立させるために必須であることを解明し、その生理機能を明らかにした。加えて、熱帯性のマメ科植物であるギンネムを材料として、根粒と共生状態の根粒菌を形態的及び生理学的に解析し、タルウマゴヤシやミヤコグサと比較した。本論文は、4章から構成されている。

第1章では、序論として、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定、根粒と共生状態の根粒菌の形態的特徴、根粒特異的ペプチド群の存在について概説した。

第2章では、根粒特異的ペプチド群の組織・細胞内局在部位を検討し、共生状態の根粒菌(=バクテロイド)及びその内部に存在することを明らかにした。また、バクテロイドへの分化が観察されないタルウマゴヤシ変異体では、根粒特異的ペプチド群が、根粒細胞内部の根粒菌に届いていないことを示した。加えて、形質転換ミヤコグサや合成ペプチドを用いた実験から、タルウマゴヤシでは、根粒特異的ペプチド群がバクテロイドへの分化を誘導することを明確に示し、共生窒素固定に必須であるとした。

第3章では、タルウマゴヤシやミヤコグサとは、進化的に早い時期に分岐したとされるギンネムを材料として、その根粒と内部のバクテロイドの特徴を明確にした。その結果に基づいて、根粒の形状と根粒特異的ペプチド群の存在の有無とは相関が無く、根粒特異的ペプチドによるバクテロイドの分化は、タルウマゴヤシ等が属するマメ科植物グループのみが獲得した形質であると考察した。

第4章では、研究を総括し、マメ科植物の根粒菌との共生における分子戦略について議論した。根粒特異的ペプチド群は、抗菌活性のあるディフェンシンと同じ構造的特徴を有している。マメ科植物は、共生を成立させるために抗菌活性ペプチドを活用して、自身の細胞内部に受け入れた根粒菌を強くコントロールしていると考察した。さらには、根粒特異的ペプチド群は、根粒菌の遺伝子発現に関与して代謝系をも変化させ、最終的には、バクテロイドさえも植物の養分として利用できるようにしている可能性についても言及した。

このように、本論文は、マメ科植物が根粒菌を共生状態へと分化させ共生を成立させるために必要な植物分子を同定し、その機能を検討することにより、根粒菌との共生窒素固定系における宿主植物の分子戦略の一端を明らかにした。植物ペプチドの新規な機能を解明すると同時に、宿主植物は、根粒菌を強力に制御することにより、窒素固定の恩恵にあずかっているという共生の新しい姿を浮き彫りにしたものであり、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。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353号	氏名	石原寛信
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	笠井 聖仙	橋本 雅仁
		濱田 季之	

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 石原寛信 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的確な回答を得ることができた。

Q1. 根粒特異的ペプチド群 (NCR) は、根粒菌の細胞膜に作用するのか？

回答：NCRは、システインの数と位置が保存されている以外は、アミノ酸配列は非常にバリエーションに富んだペプチド群である。従って、細胞膜に作用するものもあれば、そうでないものもあると予想される。本論文では、NCR035は、細菌の細胞分裂時に現れる収縮環を構成するタンパク質と相互作用することを明らかにした。一方、NCR001は、バクテロイド（共生状態の根粒菌）の細胞内部に存在していた。NCRとよく似た構造的特徴を示す抗菌性ペプチドであるディフェンシンの一種は、菌体内部へ侵入してDNAと直接相互作用し、遺伝子発現の調節に関与していることが示唆されている。NCR001もバクテロイドの遺伝子発現を直接調節している可能性があり、興味深い。

Q2. NCRはどのようにしてバクテロイドに届けられるのか？

回答：NCRにはシグナルペプチドがついており、これが膜系に取り込まれる際に切断されて成熟NCRとなり機能する。従って、NCRは膜輸送系で根粒細胞内部の根粒菌へ届けられると予想される。ディフェンシンでは、細胞膜を通過して微生物細胞内部へと取り込まれる際のモデルが提案されている。根粒菌へと届けられたNCRも、ディフェンシンと同じような機構で根粒細胞内部へと取り込まれることが考えられる。

Q3. シグナルペプチダーゼの遺伝子が欠損しているタルウマゴヤシの *dnf1* 変異体の表現型は？

回答：タルウマゴヤシ *dnf1* 変異体は、根粒着生するものの共生窒素固定はできない。 *dnf1* 変異体に着生した根粒では、NCR遺伝子群は発現しており、NCRペプチドも生産されている。しかし、シグナルペプチダーゼが機能していないために、NCRは未成熟のままである。根粒菌もバクテロイドへと分化していない。しかし、窒素源を与えれば正常に生育し、植物体の形態や生殖に異常は認められない。従って、このシグナルペプチダーゼは、根粒特異的なものであると考えられる。

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りる資格を有するものと判定した。