

学位論文要旨

松原 智子

題目： Analysis and utilization of proteins related to mycorrhizal symbiosis
(菌根共生に関与するタンパク質の分析および応用)

本研究では、アーバスキュラー菌根菌をはじめとした菌根菌が植物と共生関係を結ぶメカニズムについてタンパク質の方面から分析を行うとともに、その利用について調査した。

General introduction

菌根菌は、宿主植物の根に感染し、宿主から光合成産物を受ける見返りに、宿主の養水分吸収を促進させたり、病虫害抵抗性や環境ストレス耐性の付与などに貢献することが知られている。特に、ほとんど全ての植物と共生関係を結ぶことができるアーバスキュラー菌根菌 (AMF) は、化学合成農薬や化学肥料を削減、あるいは不要にできる、安心・安全で持続可能な食料増産に貢献するとともに、土壤中の AMF の生息状況が土壤の健全性の指標にもなり得るという極めて重要な有益微生物である。そのため、この菌の働きや利用をさらに進展させるためには、菌根共生の解明が非常に重要である。しかしながら、AMF は多核で、かつ核型が多型であるため、ゲノム解析によって菌根共生を解明するのは極めて困難である。

そこで、本研究では遺伝子の産物であるタンパク質の方面から菌根共生の解析および応用を試みた。

Chapter 1: Development of preparative chromatography for proteomic approach of mycorrhizal symbiosis

(プロテオミクスの視点から菌根共生のメカニズムを探るための分取クロマトグラフィーの開発)

菌根共生のメカニズムを探るためには、菌根共生に関与している特定のタンパク質を分析することが有用であると考えられた。また、石井ら (1999) は AMF 共生に関与する物質が分子量 24 および 53 kDa のタンパク質であることを報告している。

そこで、本章では目的のタンパク質を大量に分取できるクロマト技術を開発して、AMF の他、外生菌根菌、ラン型菌根菌およびエリコイド菌根菌における菌根共生に関与する 24 および 53 kDa のタンパク質を多量に分取した。そして、これらのタンパク質の特性を調査したところ、24 kDa のタンパク質は菌根における膜構造に関与する非特異性脂質輸送タンパク質であることを明らかにした。一方、53 kDa のタンパク質はストレスの緩和に関与するグロマリン様のタンパク質である可能性を示唆した。

Chapter 2: A new reagent for detecting mycorrhizal fungi

(菌根菌を検出する新規の試薬)

従来から、土壤の健全性の指標として根の菌根感染率が測定されてきたが、根の染色などの前処理が煩雑であるとともに、菌根の観察には経験が必要である。そこで、本章では全ての菌根菌に含まれている 24 kDa のタンパク質を用い、抗原抗体反応で検出するという技術開発に取り組んだ。その結果、菌根菌の有無を簡便に検出できる試薬を世界で初めて開発した。すなわち、この試薬の極少量を根に滴下し、蛍光顕微鏡下で観察するだけで、菌根菌の存在を容易に調査することが可能となった。

また、植物根から抽出したタンパク質に本試薬を加えて蛍光分光光度分析を行ったところ、蛍光

強度から菌根感染率を求めることもできた。

Chapter 3: Fungal isolate 'KMI' is a new type of orchid mycorrhizal fungus

(分離菌株「KMI」は新型のラン型菌根菌である)

ラン科植物 *Paphiopedilum thailandense* の根から分離した新型のラン型菌根菌 KMI について調査した。前述の菌根共生に関与するタンパク質の分析結果から、この菌株は分子量 24 および 53 kDa のタンパク質を有していることが明らかとなった。また、KMI をラン科植物へ接種したところ、菌根形成が観察された。さらに、ITS rDNA および 18S rDNA 配列を既知の菌株と比較すると相同性が著しく低かった。これらの結果から、KMI は新型のラン型菌根菌であるとした。

Chapter 4: Changes of proteins in genetically modified plants

(遺伝子組み換え作物におけるタンパク質の変化)

本章では、遺伝子組み換え作物の根におけるタンパク質の変化について調査した。前述の分取クロマト技術を活用して、遺伝子組み換え作物と非組み換え作物の根内のタンパク質を調査したところ、遺伝子組み換え作物のタンパク質含量は、非組み換え作物と比べて増加する傾向にあり、それらのタンパク質、特に 24 kDa 周辺のものの中には毒性を持つと示唆されているタンパク質が存在していた。なお、本実験はカナダ農務・農産食品省(Agriculture and Agri-Food Canada)の許可のもと、カナダ農務・農産食品省 Semiarid Prairie Agricultural Research Centre の施設内で遺伝子組み換え作物を栽培し、タンパク質の抽出・精製を行った。

General conclusions

本研究において、菌根共生に関与している 24 および 53 kDa のタンパク質は、AMF のみならず、外生菌根菌、ラン型菌根菌およびエリコイド菌根菌においても検出された。このことは、これらのタンパク質、特に 24 kDa のタンパク質がいずれの菌根共生においても重要な働きを示していることが明らかとなった。また、これらのタンパク質の特性から、宿主植物における収量増加、ストレス耐性などへ関与していることが推察された。また、本研究に用いた新開発の分取クロマト技術はプロテオミクス研究において広く活用されると考えられた。

また、24 kDa のタンパク質はいずれの菌根菌においても存在していることから、このタンパク質を抗原抗体反応で検出することによって、菌根菌の有無を簡便に検出できる試薬の開発を世界に先駆けて成功した。この手法を、農業の現場に普及させるためには、より安価で、かつ取り扱いが容易な蛍光分析機器を今後開発していく必要がある。

さらに、24 および 53 kDa のタンパク質は菌根菌中に存在し、菌根共生に関与していることから、これらのタンパク質の分析技術は、新しい菌根菌の探索に役立つことが明らかとなった。この技術を活用して、本研究では新しいラン型菌根菌 KMI を発見した。

一方、AMF は宿主植物から核を奪うので、その核型は多型であるとともに、奪った核に由来する遺伝情報を共生関係の構築に利用していると考えられている。そのため、遺伝子組み換え作物が宿主の場合、組み換え遺伝子の収奪による AMF の汚染が問題となるとともに、本研究では遺伝子組み換え作物根内で毒性を有すると示唆されているタンパク質が増大することを明らかにした。その中には菌根共生に関与する 24kDa タンパク質と分子量が非常に近いものであり、大量分取が非常に難しかった。しかし、本研究における新開発の分取クロマト技術によって、これらのタンパク質を大量に分取できたので、今後、これらの毒性タンパク質の特性などを詳細に分析できると考えられる。