

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 石井 孝昭

副査 久保 康之

副査 寺林 敏



1 氏名： 松原 智子

2 学位の種類： 博士（農学）

3 学位授与の要件： 学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目

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)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文は、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い、菌根共生に関与するタンパク質の大量分取法を確立するとともに、その利用について調査したものである。

General introduction では、菌根菌の働きを述べるとともに、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）が安心・安全で持続可能な食料増産に貢献することを紹介している。また、土壌中の AMF の生息状況は土

壤の健全性の指標にもなり得ることから、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と述べている。しかし、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ので、氏は、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では、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が知られているので、氏は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、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、また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ことを明らかにしている。

Chapter 2では、従来の菌根観察技術は根の染色などの前処理が煩雑であり、かつ菌根の観察には経験が必要なことから、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できる試薬の開発とその分析方法を世界に先駆けて確立した。この手法は、新開発の試薬を根に極少量滴下し、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でき、また植物根から抽出したタンパク質を用いて、蛍光強度から菌根感染率を求めることができることを報告している。

Chapter 3では、ラン科植物 *Paphiopedilum thailandense* の根から分離したラン型菌根菌 KMI を、従来の手法で同定を試みるとともに、ラン型菌根菌にも存在する分子量24および53 kDaのタンパク質の有無を調査した。その結果、分離した KMI は新型のラン型菌根菌であることを明らかにしている。

Chapter 4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ている。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することを明らかにしている。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が栽培され、タンパク質が抽出・精製されたものであることを確認した。

General conclusions では、氏は上記の研究成果を以下のように取りまとめている。すなわち、氏は、1) 菌根共生に関与している24および53 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おり、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。2) 本研究で新たに開発された分取クロマト技術はプロテオミクス研究に大いに役立つこと。また、24 kDaのタンパク質を用いた、新開発の菌根菌観察試薬は、菌根菌の有無を簡便に検出できる試薬として広く活用できること、3) 24および53 kDaのタンパク質の有無を調査することによって、新しい菌根菌の探索に役立つこと、並びに4) 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、この研究で開発した新たな分取クロマト技術はこれらのタンパク質を大量に分取でき、構造解析、毒性試験などの分析に大いに役立つことを示している。

以上、本論文では菌根共生に関与するタンパク質を大量に分取できるクロマト技術を開発し、いずれの菌根菌にも常在する 24 kDa のタンパク質を分取して、世界初の菌根菌観察試薬を開発している。また、菌根共生に関与するタンパク質の分析と従来の手法によって、新たなラン型菌根菌 KMI を見出している。さらには、この分取クロマト技術を活用して、遺伝子組み換え作物ではタンパク質、特に毒性を持つと示唆されているタンパク質が増加することを明らかにしている。これらの新知見や新技術は菌根研究だけでなく、様々の研究分野で活用されることが期待される。

以上により、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価できる。

6 最終試験の結果の要旨

本論文の内容は、平成 27 年 2 月 23 日午前 10 時半より、図書館視聴覚室において公開の博士学位論文発表会で発表された。口頭発表後、質疑応答が行われ、菌根菌の働き、菌根共生に関与するタンパク質の特性とその分取技術、クロマトグラフィーに関する情報、新型のラン型菌根菌の特性、AMF に及ぼす遺伝子組み換え作物の影響、AMF 感染の遺伝子組み換え作物内で増加する毒性タンパク質の特性など、多岐にわたる内容であったが、それぞれ適切に回答した。最終試験の結果としては、審査委員全員一致で合格とした。

以上