

氏名	ルマン エムディ ハフイヅ ユル RUMAN MD HAFIJUR
本籍（国籍）	バングラデシュ人民共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 841 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	Characterization of lysin motif receptor-like kinases in plant (植物のリジンモチーフ受容体様キナーゼの機能評価)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 立澤 文見 副査 岩手大学准教授 川原田 泰之 副査 山形大学教授 俵谷 圭太郎 副査 弘前大学准教授 山岸 洋貴 副査 岩手大学特任研究員 齋藤 雅典

論文の内容の要旨

Plant survival in the rhizosphere depends upon the recognition and interaction with soil microorganisms, especially bacteria and fungi, which are abundant in the soil. The interaction between plants and microbes is not always detrimental but sometimes benefits both partners. The ancient and widespread beneficial symbiosis is the arbuscular mycorrhiza symbiosis which is based upon the mineral nutrients and fixed carbon exchange between mycorrhizal fungi and more than 80% of plants on the land. Another agronomically crucial root nodule symbiosis occurs between legumes with Rhizobia supplying nitrogen to plants in exchange for carbohydrates. The rest of the soil microbes are pathogenic and infect the host for survival. However, plants evolved their defense mechanism to tackle the invaders and, at the same time, recruit beneficial symbionts into the root. In the case of pathogenic interaction, plants recognize molecular compositions of invading microbial constituents called microbe-associated molecular patterns (MAMPs). MAMPs perception by plants through pattern recognition receptors (PRRs) activate the immune system. On the other hand, plants can recognize molecular cues synthesized by beneficial microorganisms through specific receptors and establish symbiotic relationships. Pathogenic and beneficial, both types of microbes secrete molecular compounds such as short and long chitooligomers, lipochitooligomers, peptidoglycans with N-acetyl glucosamine as the major component, and β -glucans, exopolysaccharides, and lipopolysaccharides are recognized by lysin motif (LysM) receptor-like kinases (LysM-

RLKs), plant-specific receptors mainly localized at the plasma membrane and activating either innate immunity or beneficial symbiosis.

LysM-RLK comprises two functional regions across the transmembrane domain: an extracellular region carries one to three LysM domains, and an intracellular kinase region contains a kinase domain. LysM-RLKs can be categorized as active and pseudokinases based on kinase domain catalytic activity. From ancient to modern plant species have LysM-RLKs and many are characterized as Nod factors, Myc factors, chitin, peptidoglycan, and exopolysaccharide perceived and signalling to down stream. Despite crucial roles in symbiosis and immunity, the majority LysM-RLKs in seed plants and their functions are unrecognized and uncharacterized.

Therefore, in chapter 1, I updated information of LysM-RLKs in *Lotus japonicus* and characterized these 20 LysM-RLKs. To identify LysM-RLKs from diverse plant species and constructed a phylogenetic classification by using full-length amino acid to address the evolutionary and functional characteristics, the phylogeny analysis supported by protein homology and kinase functionality categorized 193 LysM-RLKs from 16 angiosperm species into 14 distinct clades and one out-clade receptor. Classification revealed that selected species possessed clade I receptors, mostly recognized as Nod factors/chitin receptors, and clade III receptors which are uncharacterized but conserved from ancient Bryophytes expect for *Physcomitrella patens*. This study also identified dicots and monocots-specific clades and predicted the evolutionary drift of LysM-RLKs. Also, a correlation was found between the species that lost arbuscular mycorrhiza symbiosis and the lack of clade II receptors.

In chapter 2, I focused on *L. japonicus* clade II receptors, EPR3, and its homolog receptor LYS8 role in root nodule and arbuscular mycorrhiza symbiosis. Expression of the *Epr3* promoter region was highly induced in root nodules and nodule primordia whereas, *Lys8* gene showed expression in the arbuscule-containing cortical cells and vascular regions. Mutant analysis of *epr3* and *lys8* showed that mutation of *Epr3* and *Lys8* genes have an inadequate effect on root nodule and arbuscule formation, suggesting two receptors have any redundant roles in the *Lotus*-Rhizobia and *Lotus*-AM fungi symbiosis. The analysis suggests that both EPR3 and LYS8 are not essential and have no role during pre-symbiotic signalling however, EPR3 acts during root nodules symbiosis and LYS8 positively regulates arbuscular mycorrhiza symbiosis.

Altogether, the phylogenetic classification illustrates the evolutionary pattern of LysM-RLKs and predicts novel receptor functions and interactions with microorganisms.

植物は、土壌微生物の細菌や菌類を認識し、常に相互作用を行いながら生活している。この植物と微生物の相互作用は、有害だけではなく、双方の利益をもたらす有益な関係も含まれ、アーバスキュラー菌根菌との共生が古代の植物から行われてきたことが知られている。また、マメ科植物は、土壌細菌の根粒菌との間で特徴的な根粒共生を成立させることも知られている。植物は病原菌に対抗する防御機構を進化させる一方で、同時に有益な共生細菌を自身に取り込むように進化した。病原性微生物と相互作用で植物は微生物関連分子パターン (MAMPs) と呼ばれる侵入微生物の分子組成を認識し免疫系を活性化する。一方、植物は有益な微生物が合成する分子シグナルを認識し、共生関係を構築することができる。これらの認識には、様々な受容体が関与していることが知られており、N-アセチルグルコサミンを主成分とするキチン鎖やペプチドグリカン、そして、細胞外多糖といった MAMPs や分子シグナルは、植物特異的受容体であるリジンモチーフ (LysM) 受容体様キナーゼ (LysM-RLK) に認識され、自然免疫や有益な共生を活性化させる。

LysM-RLK は、膜貫通領域を挟んで、1~3 個の LysM ドメインを持つ細胞外領域と、キナーゼドメインを含む細胞内キナーゼ領域という 2 つの機能領域から構成されている。LysM-RLK は、キナーゼドメインの活性により、活性型キナーゼと擬似キナーゼに分類される。古代から現代の植物種に至るまで LysM-RLK は存在し、多くは Nod 因子、Myc 因子、キチン、ペプチドグリカン、多糖の認識と下流へのシグナル伝達という特徴を持っているが、種子植物における大多数の LysM-RLK とその機能は未認識で未解明となっている。

そこで第 1 章では、ミヤコグサに存在する LysM-RLK の情報を更新し、これら 20 の LysM-RLK の特徴を明らかにした。また、多様な植物種から LysM-RLK を同定し、全長アミノ酸を用いた系統分類を構築し、被子植物 16 種から 193 種の LysM-RLK を 14 の異なるクレードと一つのアウトクレードの受容体に分類した。その結果、全ての植物は、Nod ファクター/キチンを認識する clade I 受容体と、機能未同定の clade III 受容体を有していることが明らかとなった。また、双子葉植物と単子葉植物に特異的なクレードを同定した他、アーバスキュラー菌根菌との共生を失った植物種では、クレード II 受容体の欠如が明らかとなった。

第 2 章では、根粒菌やアーバスキュラー菌根の共生におけるミヤコグサ clade II 受容体である EPR3 と LYS8 の機能解析に注目した。Epr3 プロモーター領域の発現は根粒と根粒原基で強く誘導され、Lys8 はアーバスキュールを含む皮質細胞と維管束で発現が確認された。また、epr3 および lys8 を解析した結果、EPR3 や LYS8 は根粒およびアーバスキュール形成に十分な影響を及ぼさないことが明らかとなり、2 つの受容体がロータス-根粒菌共生およびロータス-AM 菌共生において冗長な役割を担っていることが示唆された。

このような系統分類は、LysM-RLK の進化パターンを示すとともに、新規の受容体機能や微生物との相互作用を予測するものである。

論文審査の結果の要旨

植物は、土壌微生物の細胞構成成分や分泌する化学物質を受容・認識することで免疫システムや共生システムを誘導する。これらの受容・認識には、植物の様々な受容体を用いられており、本研究では、植物が特異的に保有するリジンモチーフ受容体様キナーゼに着目し、これらの受容体の新たな分類法の確立と、受容体の機能解析を進めた。

リジンモチーフ受容体様キナーゼの分類では、20 種の植物ゲノム中から 215 のリジンモチ

ーフ受容体様キナーゼを抽出・同定し、これらの受容体の全長、および部分長を用いた近隣結合系統解析、相同性比較解析、モチーフ比較解析、そしてキナーゼ活性の機能予測比較解析を統合することで、16のクレードと2種の特異的な受容体に分類した。分類した16のクレードは、全ての植物種で保存されているクレード I や III、双子葉植物が特異的に保存しているクレード VI から XI、そして単子葉植物が特異的に保存しているクレード XII から XIV に分けられた。さらに、各植物種において各クレード保有の有無と様々な土壌微生物との相互作用の可否の関係性を調べると、アーバスキュラー菌根菌との共生能力を失った植物種では、クレード II と IV が保存されていないことを明らかにした。また、植物の進化系統樹に各クレードの分布を照らし合わせることで、リジンモチーフ受容体様キナーゼの進化と多様性を推定した。

新たなリジンモチーフ受容体様キナーゼの機能解析では、上記で明らかとなったアーバスキュラー菌根菌との共生相互作用の関連が予測されたクレード II に属する受容体に着目して研究を進めた。その結果、マメ科のモデル植物であるミヤコグサのリジンモチーフ受容体様キナーゼのである EPR3 と LYS8 受容体をコードする遺伝子は、根粒菌やアーバスキュラー菌根菌との共生過程でそれぞれ特異的に発現誘導されることを明らかにし、その発現部位の詳細を同定した。さらに、これらの遺伝子の *lore1* 変異体を取得し、根粒菌、およびアーバスキュラー菌根菌との共生過程における各々の受容体の機能解析を進めた。

以上の研究より、新たなリジンモチーフ受容体様キナーゼの分類を提唱し、各々のクレードの特徴の詳細を明らかにした。さらに、個別のリジンモチーフ受容体様キナーゼの機能解析を進め新たな機能を証明した。これらの成果は、植物-微生物相互作用の分子基盤の理解へ貢献するものである。

以上より、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Ruman H., Kawaharada Y.

A New Classification of Lysin Motif Receptor-like Kinases in *Lotus japonicus* (2022)

Plant and Cell Physiology <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac156>