

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 岩 渕 望

本論文は植物病原細菌ファイトプラズマのもつ葉化誘導因子「ファイロジェン」がその機能を発揮するために必要な立体構造やアミノ酸を特定し、ファイトプラズマによる葉化病の発症の分子機構を解明することを目的としている。

ファイトプラズマは様々な植物に感染して特徴的な症状を引き起こすため、農業上問題となる。葉化病は花が葉のような構造に変化する病害であり、ファイトプラズマが感染した様々な植物で報告されている。ファイトプラズマから分泌されるエフェクターの一つであるファイロジェンは、葉化を引き起こす原因因子である。ファイロジェンは花の形態形成に重要な A および E クラスの MADS ドメイン転写因子群 (MADS-box transcription factors: MTFs) と結合し、プロテアソーム系を介して分解する。ファイロジェンの機能が明らかになってきた一方で、これまでにファイロジェンの立体構造やファイトプラズマにおける保存性についての知見は乏しかった。本論文において、申請者はまずファイロジェンの立体構造を決定し、機能に重要な構造を明らかにした。次に、様々なファイトプラズマからこれまで未同定だったファイロジェン遺伝子の配列を決定し、さらにアミノ酸配列と葉化誘導能の比較解析により機能に重要なアミノ酸を特定した。

本論文は3部より構成される。

第 1 部は「結晶構造解析によるファイロジェンの立体構造の決定」である。申請者はまず、タマネギ萎黄病ファイトプラズマのファイロジェン (PHYL1_{OY}) の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。その結果、PHYL1_{OY} は 2 つの α ヘリックス (ヘリックス 1, 2) がループで繋がれたコイルドコイル構造を形成することを明らかにした。本構造は他の系統のファイトプラズマが持つファイロジェン (SAP54, PHYL1_{PnWB}) でも同様に予測され、ファイロジェンに共通の構造であることを示した。そこで、PHYL1_{OY} の 4 箇所異なる部位に 2 つのアラニン残基を挿入した変異体を作製し、機能解析を行った。その結果、ヘリックス 1 あるいはヘリックス 2 にアラニンを挿入した変異体では、葉化誘導能を初めとする全ての機能が失われた。一方で、ループ領域に挿入した変異体はいずれの機能も PHYL1_{OY} と同様に維持していた。以上より、ファイロジェンの機能

に2つの α ヘリックスが深く関わることを明らかにした。

第2部は「新たなファイロジェン遺伝子の探索と配列解析」である。これまでに、葉化を誘導するファイトプラズマ暫定種・系統の多くではファイロジェン遺伝子が同定されていなかった。そこで申請者は、ファイロジェンの保存領域に設計したプライマーを用いたPCRにより、9暫定種25系統のファイトプラズマからファイロジェン遺伝子の部分配列を決定した。そのうち9系統について、部分配列の周辺の塩基配列も決定することでファイロジェン遺伝子の全長配列を決定した。決定したファイロジェン遺伝子は既報のファイロジェンと同様の構造を有していた。以上より、データベース上に登録されている既報のファイロジェンの配列情報と合わせて、11種59系統の幅広いファイトプラズマが多様なファイロジェン遺伝子をもつことを明らかにした。さらに、系統解析によってファイロジェンは4グループ (Phyl-A, -B, -C, -D) に分かれ、16S rRNA 遺伝子に基づく系統関係と一致しなかった。これにより、ファイロジェンはファイトプラズマとは独立の進化を遂げたことを示した。

第3部は「ファイロジェンのアミノ酸配列と葉化誘導能の比較解析」である。申請者は、第2部で得られた配列情報を元に、葉化誘導能がファイロジェン間で保存されているか検証した。その結果、phyl-A、-C、-D グループのファイロジェンは葉化誘導能を有した一方で、phyl-B グループに属するファイロジェンはいずれも葉化を誘導しなかった。phyl-B グループに属するファイロジェンは他のグループのファイロジェンと比べてMTF分解能、MTFとの結合能が低下していた。以上より、phyl-B グループはMTFと結合性が低下したために、葉化誘導能を失ったことを明らかにした。次に、phyl-B グループの葉化誘導能の喪失の原因となるアミノ酸を特定するためグループ間で配列を比較したところ、 α ヘリックス表面に露出している2つの親水性残基 [30番目のリジン (K30) と64番目のアスパラギン (N64)] が、phyl-B グループではそれぞれグルタミン (Q30) およびアルギニン (R64) に置換していた。そこで、各グループで代表的なファイロジェンを用いて変異導入解析を行った。その結果、N64がファイロジェンの葉化誘導能を決定し、K30はその補助的な役割を担うこと、phyl-B グループはN64の変異によってMTFとの結合能が低下することを示した。

以上を要するに、申請者はファイトプラズマの葉化誘導因子ファイロジェンの立体構造を解明した。また、ファイロジェンがファイトプラズマで幅広く保存されることを明らかにし、葉化誘導能に重要なアミノ酸を解明した。これらの研究成果はファイトプラズマの病原性誘導機構の全容解明に資するものであり、学術的および応用的観点から極めて価値が高い。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。