

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三浦 千裕

植物病原細菌ファイトプラズマは、主要作物を含むあらゆる植物に病気を引き起こし、農業生産に被害を及ぼしている。本細菌は昆虫により媒介され、植物と昆虫間を交互に宿主転換しながら急速に感染を拡大させるため、その被害をより深刻化させている。しかしその宿主転換メカニズムはほとんど明らかにされていない。これを解明することは、ファイトプラズマ-植物間の相互作用の理解につながるだけでなく、ファイトプラズマの防除法の確立にも重要な知見となることが期待される。

1. ファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現の網羅的解析

ファイトプラズマが宿主転換に伴いどれだけの遺伝子の発現を変化させているのかを調査するため、マイクロアレイ解析を行った。これにより植物感染時と昆虫感染時におけるファイトプラズマ遺伝子の発現量を比較した。その結果、ファイトプラズマ遺伝子の約 33%に相当する遺伝子の発現が 2 倍以上の変動を示すことを明らかにした。中でも宿主-ファイトプラズマ間の相互作用に強く関わりと考えられる遺伝子の発現量が顕著に変化している傾向が見られた。一方で、解糖系遺伝子や活性酸素種分解酵素遺伝子は両宿主間において発現量がほとんど変化しなかった。したがってこれらの遺伝子は両方の宿主におけるファイトプラズマの生存に重要な因子であることが示唆された。以上のマイクロアレイ解析の結果をランダムに選択した遺伝子を対象とした定量 RT-PCR の結果と比較し、その信頼性を確認した。

2. 機械刺激受容チャネルの機能解析

マイクロアレイ解析の結果、機械刺激受容チャネル遺伝子 (Large-conductance mechanosensitive channel gene; *mscL*) の発現は植物感染時において高発現している傾向が見られた。*MscL* は他の細菌において浸透圧の調節に関与する因子として知られており、ファイトプラズマ種内においてもよく保存されている。そのため *MscL* はファイトプラズマの宿主転換に重要な役割を果たす因子の一つなのではないかと考えた。

そこで、塩化ガドリニウムにより *MscL* の機能を阻害した場合におけるファイトプラズマの増殖量を経時的に測定し、*MscL* がファイトプラズマの増殖に与える影響について解析した。阻害剤を処理した植物体にファイトプラズマを接種し、接種 4 週間までの

植物体内における菌体量を定量 RT-PCR 解析により測定したところ、菌体量は接種 3 週後まで抑制されることが明らかとなった。一方で接種 4 週間になると水を処理したコントロール植物における菌体量と同程度となることが明らかとなった。以上により塩化ガドリニウムがファイトプラズマの増殖を一時的に抑制することを明らかにした。

3. 活性酸素種分解酵素の活性解析

生体内において産生される活性酸素種は DNA や脂質、タンパク質などの生体分子を損傷することから、生物は活性酸素種を適切に除去する必要がある。その役割を担う因子の一つが活性酸素種分解酵素 (superoxide dismutase; SOD) である。本研究にて行ったマイクロアレイ解析の結果、ファイトプラズマの *sod* は両宿主感染時において同程度発現していることが明らかとなった。このことから SOD は両宿主への感染に重要な役割を果たす因子と考えられたため、SOD の発現と活性について解析を行った。

まず、ファイトプラズマの SOD が両宿主感染時にタンパク質レベルで発現しているかについてウェスタンブロット解析により検証した。その結果、両宿主においてファイトプラズマ感染時特異的にバンドが検出された。次に、この SOD が活性酸素種を分解する機能の有無を検証するため、nitroblue tetrazolium (NBT) 法による活性酸素種分解活性試験を行った。その結果、ファイトプラズマの SOD は活性酸素種分解酵素活性を有することが明らかとなった。さらに配列の保存性および SOD 阻害剤への感受性を調査した結果、ファイトプラズマの SOD が活性中心金属として Mn を保持する Mn-SOD と非常に類似する特徴を有していることが明らかとなった。

以上を要するに、宿主転換に伴うファイトプラズマの遺伝子発現パターンをマイクロアレイにより解析し、その遺伝子発現パターンが植物感染時と昆虫感染時とで大きく変化し、それぞれの宿主に適応した遺伝子が発現していることを明らかにした。その中で、浸透圧調節を担うと考えられる MscL および活性酸素の除去に関与する SOD についてそれぞれ機能解析を行い、これらが宿主転換に重要な役割を果たす因子であることが示唆された。これらの成果は、学術上の新規性、応用性が高い。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。