

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西川 尚志

ファイトプラズマは主にヨコバイにより伝搬され、数百種の植物に萎縮・叢生・黄化・緑化・葉化などの病気を引き起こす農業上重要な植物病原細菌である。しかし人工培養が出来ないことから、その研究は遅れていたが、近年ファイトプラズマ DNA の分離とその解析が可能となり、分子生物学的手法を用いた研究はここ数年で著しい進展を見せている。

一般に、植物病原細菌には染色体外 DNA にその病原性に関与する遺伝子がコードされている例の多いことが知られている。本研究では、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (OY) の野生株 (OY-W) の継代過程で分離された病徴の極めて穏やかな変異株 (OY-M) より昆虫伝搬能喪失変異株 (OY-NIM) を作出した。そして、各分離株よりこれまでにないタイプのユニークな染色体外 DNA をそれぞれ見出し、その構造および病原性や昆虫伝搬能との関係を解析した。

1. 昆虫伝搬能喪失変異株の作出および染色体外 DNA の抽出法の確立

昆虫による伝搬能を失った変異株を作出する目的で、OY-M の接木のみによる継代を繰り返した結果、約 2 年後に昆虫伝搬能を喪失した変異株 (OY-NIM) の作出に成功した。また、ファイトプラズマが植物の篩部細胞内に局在することを利用し、効率的な染色体外 DNA の抽出法を確立した。

2. ウイルス型複製酵素を持った染色体外 DNA

OY-W には染色体外 DNA (EcOYW1, 7005 bp, 7 open reading frames (ORFs)) が存在し、ジェミニウイルスの複製酵素と相溶性の高いウイルス型複製酵素(Rep)と、*Clostridium perfringens* のプラスミド等にコードされるコピー数制御タンパク質と相溶性の高いタンパク質の両方をコードしていた。また、EcOYW1 に相当する染色体外 DNA は OY-M および OY-NIM には存在しなかったことから、EcOYW1 の有無と病原性との関係が示唆された。

3. ユニークな複製酵素を持つプラスミド DNA

OY-W、OY-M、OY-NIM には pLS1 family プラスミドの複製酵素に似た Rep をもつ染色体外 DNA (pOY プラスミド)、pOYW (3933 bp, 5 ORFs)、pOYM (3932 bp, 5 ORFs)、pOYNIM (3062 bp, 3 ORFs) がそれぞれ認められた。しかし、pOY プラスミドの Rep の C 末端側の領域には、1 本鎖 DNA ウイルスの Rep のヘリカーゼドメインと高い相溶性が認められたため、(1) pOY プラスミドの祖先がウイルスのヘリカーゼドメインを組換えにより獲得した可能性、あるいは、(2) 真核生物の 1 本鎖 DNA ウイルスは原核生物のプラスミドから進化したと考えられているが、pOY プラスミドがその進化の中間体を起源として

いる可能性が示唆された。

また、pOYNIMには膜タンパク質をコードしていると推定される ORF3 が欠失していた。ファイトプラズマは細胞壁を持たないために、膜タンパク質が直接宿主と相互作用すると考えられるため、このタンパク質が昆虫伝搬能と何らかの関連性を持つことが示唆された。

#### 4. 染色体外 DNA のダイナミックな組換え

OY-W、OY-M、OY-NIMには以上の染色体外 DNA に加え、それぞれ 5 kbp の染色体外 DNA、EcOYW2 (5560 bp, 7 ORFs)、EcOYM (5025 bp, 6 ORFs)、EcOYNIM (5045 bp, 6 ORFs) が認められた。これらを他の染色体外 DNA と比較した結果、5 kbp の EcOY-DNA は EcOYW1 および pOY プラスミドとの間で組換えを起こして生じた可能性が強く示唆された。細菌において染色体外 DNA 間の組換えは進化的に重要な役割を果たしていることから、このような組換えが、ファイトプラズマの広い宿主と多様な病原性と関連していることが示唆された。

#### 5. PCR によるファイトプラズマの検出と識別

EcOYW2、EcOYM、EcOYNIM に共通する塩基配列を用いて、それぞれ異なるサイズが増幅されるような PCR プライマーセット (EC-d1/EC-d2) をデザインし、高感度な検出と識別する手法を確立した。これにより、ファイトプラズマの混合感染や干渉現象のメカニズムを解析することが可能となった。

以上の結果は染色体外 DNA が生物学的に重要な意味を持つことを示すものであり、学術上・応用上の価値もきわめて高く、特にファイトプラズマのリバースジェネティクスによる病原性や昆虫伝搬能の解明および、その防除においても今後非常に役立つ知見となることが期待される。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。