

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 魏 薇

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・黄化・叢生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。植物と昆虫の細胞内という全く異なる環境下で生息し、両宿主におけるファイトプラズマの局在・増殖・移行パターンなどその動態は非常に興味深い。そこで本研究では、ファイトプラズマのタンパク質に対する特異抗体を作出し、それをを用いてファイトプラズマの有効な検出法および免疫組織化学的解析法と real-time PCR による定量法を確立し、同時に nested-PCR による高感度な検出法を駆使して、ファイトプラズマの植物・昆虫両宿主における感染・増殖・移行の過程を解析した。

1. 抗ファイトプラズマタンパク質抗体の作出およびその比較解析

(1) 抗IDP抗体

タマネギ萎黄病(OY)ファイトプラズマ強毒株(OY-W)の immunodominant membrane protein (IDP) に対する抗体 (Kakizawa *et al.*, in press) を用いて、本抗体の有効性をウェスタンブロット解析及び免疫組織化学的解析により検討した結果、抗 IDP 抗体は「AY 16S-group」ファイトプラズマの検出に有効であることが明らかになった。

(2) 抗 SecA 抗体

OY-WのSecAタンパク質に対する抗体 (Kakizawa *et al.*, 2001) を用いて、ウェスタンブロット解析及び免疫組織化学的解析を行った結果、AY, WX, EY, RYDの各16S-groupに属する8種のファイトプラズマに反応することが明らかになり、ファイトプラズマに共通した抗体である可能性が示唆された。

(3) 抗P17抗体

OY-W、弱毒株(OY-M)及び昆虫伝搬能喪失株(OY-NIM)のプラスミド構造解析より、OY-NIMにはP17タンパク質が欠失することが分かった (Nishigawa *et al.*, 2003)。P17タンパク質に対し、抗P17抗体を作出した。この抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったが、OY-W、-M、-NIM感染植物よりバンドは検出されなかった。そこで、免疫組織化学的解析を行った結果、OY-W、-M感染植物でシグナルが観察されたが、OY-NIM感染植物では認められなかった。また、OY-W保毒昆虫(ヒメフタテンヨコバイ)について免疫組織化学的解析を行ったところ、植物体内よりも昆虫体内においてより強いシグナルが得られ、P17タンパク質は昆虫伝搬能に関与している可能性が示唆された。

2. 宿主植物における動態解析

nested-PCRにより、接種1日後には接種葉に加えて茎頂と主茎全体に、2日後には根と最上位葉に検出された。1週間後新たな最上位葉が展開を始めたが、これらの葉では常にOY-Wが検出された。そして2週間後上位葉から下位葉に向けて順にOY-Wが移行し、3週間後にはすべての葉より検出された。また、real-time PCRにより、OY-Wは接種葉と根において、接種後2~4週間では1週間あたり約6倍増殖することが明らかになった。さらに、感染植物の茎と根の横断切片に対する免疫組織化学的解析を行った結果、2週間後に一部の篩部にシグナルが観察され、3週間後以降には篩部全体に観察された。OY-Wはシュンギクにおいては

「接種葉⇨主茎⇨最上位葉・根⇨下位葉」というパターンで移行・増殖することが明らかになった。

### 3. 媒介昆虫における三次元動態解析

ヒメフタテンヨコバイにおける OY の経時的局在変化を解析した。nested-PCR により、OY-W、-M の獲得吸汁 1 日後では腹部、4~6 日後では胸部、10~14 日後では頭部でファイトプラズマが検出され、OY-NIM は、獲得吸汁直後 nested-PCR を用いても検出されなかった。real-time PCR により、昆虫体内におけるファイトプラズマは 1 週間あたり約 9~11 倍の割合で増殖することが明らかとなった。また、免疫組織化学的手法により得られた画像から 3 次元画像を構築し、虫体内におけるファイトプラズマの動態を解析した。OY-W, OY-M は媒介昆虫においては「口針⇨腹部（腸管）⇨体腔⇨胸部（唾腺）⇨頭部（脳）」というパターンで移行・増殖することが明らかになった。

これらの成果は学術上・応用上の価値もきわめて高く、特に免疫組織化学的手法によるファイトプラズマの可視化は病原性や昆虫伝搬能などの解明及び、その防除の面においても今後非常に役立つ知見であり、高く評価される。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。