

氏名 柿澤 茂行

本論文は5章からなり、第1章は序論、第2章は Sec system の構成タンパク質遺伝子のクローニングと発現解析、第3章は Immunodominant membrane protein (IDP) 遺伝子のクローニングと Sec system による輸送、第4章は IDP に認められた適応進化、第5章は総合考察について述べられている。本論文は、重要な植物病原細菌でありかつ培養が困難なファイトプラズマを材料として研究を行っている。ファイトプラズマは細胞壁を持たず、宿主の細胞内に寄生するという特徴から、その菌体表面に存在する物質輸送系は宿主との相互作用に重要な役割を果たすと予想し、本論文では *Candidatus Phytoplasma asteris*, OY strain (OY) のタンパク質膜輸送系の解析と、その基質タンパク質についての解析を行っている。第1章において、ファイトプラズマの歴史や特徴について詳細に述べられている。

第2章においては、ファイトプラズマのタンパク質膜輸送系の構成因子のクローニングとその発現解析について述べられている。細菌におけるタンパク質膜輸送系については他の細菌で複数の系が報告されているが、その中で Sec system のみが生存に必須であるため、本論文ではこの Sec system に着目して研究を行っている。OY より抽出したゲノム DNA よりゲノミックライブラリを作製し、すでに知られている遺伝子構成上の特徴を利用して目的のクローンを選抜し、それらをシークエンスすることにより、*secA*、*secY*、*secE* 遺伝子のクローニングに成功している。またその発現を調べるため、SecA タンパク質の一部を大腸菌で大量発現させ、抗 SecA ポリクローナル抗体を作出した。抗体を用いたウェスタンブロット解析および免疫組織化学的解析により、感染植物組織内における OY の SecA タンパク質の発現を証明した。これらの結果は、ファイトプラズマに Sec system が存在することを強く示唆するものである。

第3章においては、ファイトプラズマの Sec system によって輸送される候補である IDP 遺伝子のクローニングと、その輸送形態の解析について述べられている。まず、既報のファイトプラズマのタンパク質から、他の細菌の Sec system のシグナル配列を持つものを検索し、候補として得られた AY ファイトプラズマの IDP を元に、OY より IDP 遺伝子をクローニングしている。次に IDP を大腸菌で大量発現し、抗 IDP ポリクローナル抗体を作出

した。抗体を用いたウェスタンブロット解析により、IDP が大腸菌とファイトプラズマ双方の Sec system によって輸送されている可能性を示唆する結果を得ている。これらの結果より、両 Sec system によって認識されるシグナル配列の共通性について論じている。

第4章においては、ファイトプラズマの IDP における適応進化の解析について述べられている。まず6種類のファイトプラズマより IDP 周辺の遺伝子をクローニングし、それらのサイレントな変異頻度 ( $d_s$ ) とアミノ酸置換を伴う変異頻度 ( $d_N$ ) とを比較している。比較には、遺伝子全長の平均で  $d_N/d_s$  を計算する手法と、コドン毎に  $d_N/d_s$  を計算する最尤法による手法を用いている。その結果、どちらの手法によっても IDP 遺伝子に特異的に明確な適応進化が認められたと論じている。また、最尤法による解析の結果、正の選択を受けていると推定されたアミノ酸サイトは IDP の中央領域、つまり宿主の細胞質側へと露出している領域に多く認められたことから、IDP 遺伝子にかかる正の選択圧は宿主との相互作用によって引き起こされている可能性を示唆している。これらの結果は、昆虫-ファイトプラズマ間における相互作用において、IDP が非常に重要な役割を担っている可能性を強く示唆するものである。

第5章においては、本論文の全般にわたる広範な考察が述べられている。本研究により、これまで全く未知であったファイトプラズマの膜タンパク質における新知見を得ることができ、宿主-ファイトプラズマ間の相互作用やその病原性の解明への道を開く基盤的知見を得ることができたと考えられる。

なお、本論文第2-5章は、難波成任氏・宇垣正志氏・大島研郎氏・宮田伸一氏・久保山勉氏・西川尚志氏・鄭熙英氏・澤柳利実氏・土崎常男氏・田中穰氏・岸野洋久氏・魏薇氏・鈴木志穂氏・嵐田亮氏・中田大介氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および執筆を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。