

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 石井 佳子

ファイトプラズマはヨコバイ等の昆虫によって植物から植物へと伝搬され、感染を拡大させる。そのため昆虫伝搬に関与する因子の探索は、ファイトプラズマ病の防除法を確立する上で重要である。*Candidatus Phytoplasma asteris*、OY strain の弱毒株 (OY-M) および昆虫伝搬能喪失株 (OY-NIM) はそれぞれ 2 種類のプラスミドを保持しており (OY-M: EcOYM と pOYM, OY-NIM: EcOYNIM と pOYNIM)、pOYM にコードされている *orf3* 遺伝子が pOYNIM では欠失していたことから、ORF3 が昆虫伝搬に関与する可能性が考えられている。本研究では、ORF3 の昆虫伝搬能への関与を解析するために、植物および昆虫内における ORF3 タンパク質の発現解析、*orf3* 遺伝子の転写開始点の特定および OY-M や OY-NIM の EcOY-DNA におけるプロモーター領域の比較解析を行った。また、OY ファイトプラズマのプラスミドに宿主環境の変化が与える影響について解析するため、約 10 年間に渡って維持した OY-NIM のプラスミド配列を OY-M のプラスミドと比較解析した。

1. 植物および昆虫宿主内における ORF3 のタンパク質の発現解析

植物宿主内における ORF3 のタンパク質の発現を確認するため、ORF3 タンパク質を大腸菌において大量発現させ、抗 ORF3 抗体を作出した。この抗体を用いて OY-M および OY-NIM 感染植物の免疫組織化学的染色を行った。その結果、OY-M 感染植物ではファイトプラズマが局在する篩部組織特異的にシグナルが観察されたが、OY-NIM 感染植物では全くシグナルが観察されなかった。従って OY-NIM は、そのプラスミドである EcOYNIM に *orf3* をコードしているにも関わらず、植物宿主内で ORF3 タンパク質を発現していないことが示唆された。

また、植物および昆虫宿主内における ORF3 のタンパク質の発現を比較するため、抗 ORF3 抗体を用いて OY-M 感染植物および感染昆虫の免疫組織化学的染色を行った。その結果、昆虫宿主においては 1 µg/ml の ORF3 抗体を反応させた場合でも強いシグナルが認められたが、植物宿主においては 100 µg/ml の ORF3 抗体を反応させないとシグナルは確認できなかった。この結果は、昆虫宿主内では ORF3 タンパク質の発現量が増加している可能性を示唆しており、ORF3 は昆虫宿主内で重要な役割を担っていると考えられた。

2. *orf3* 遺伝子の転写開始点の特定

OY-NIM は植物宿主内において ORF3 タンパク質を発現していないことから、*orf3* は転写発現していない可能性が考えられた。そこで *orf3* 遺伝子の転写開始点を決定し、その上流を OY-M と OY-NIM で比較した。*orf3* 遺伝子の転写開始点を特定するため、OY-M 感染昆虫から抽出した RNA を用いて

5'-RACE を行った。5'-RACE では、逆転写した反応産物の 5'末端にアダプター配列を付加させ、アダプターのプライマーと遺伝子特異的プライマーを用いて initial PCR および nested PCR を行った。得られた増幅産物は、TA クローニングとシーケンスを行い配列の決定を試みた。

orf3 は、*orf1-orf2* の下流にコードされている。5'-RACE の結果、*orf1* の内部から始まる増幅産物に加え、*orf1* と *orf2* の遺伝子間領域から始まる増幅産物が得られた。この結果から OY-M では *orf3* 遺伝子の転写が、*orf1* の内部および *orf1* と *orf2* の遺伝子間領域の 2 ヶ所から開始していることが示唆された。

3. *orf3* 遺伝子のプロモーターの推定と比較解析

EcOYM における *orf3* 遺伝子の転写開始点上流のプロモーター配列を、プロモーター予測ソフトウェアによって探索したところ、それぞれプロモーター配列が予測された。これら 2 つのプロモーターを、それぞれ ORF3-pro1 および ORF3-pro2 と命名した。EcOYM の ORF3-pro1 と ORF3-pro2 に該当する EcOYNIM 上の配列を調べたところ、ORF3-pro1 では配列が 2 塩基変異しており、ORF3-pro2 においてはプロモーター領域全長を含む 157 bp の領域が欠落していた。これらの結果から、OY-NIM では *orf3* のプロモーターが変異および欠落し、そのために OY-NIM は *orf3* を発現できなくなった可能性が考えられた。

4. 1998-2006 年における OY-M と OY-NIM プラスミドの比較解析

OY-M は植物と昆虫を用いて維持している一方で、OY-NIM は植物内でのみ維持しているため、両者は宿主環境が大きく異なる。加えて、OY-NIM は短期間で OY-M から単離されたことから、OY-NIM のプラスミド配列は単離後から現在までの間に、更に配列が変化していると推測された。そこで、昆虫伝搬能喪失後のプラスミドの変化を追うため、OY-NIM を植物の組織培養によって約 10 年間維持し、その過程で経時的にサンプリングした DNA を用いて、プラスミドの遺伝子構造を解析した。その結果、EcOYNIM は *orf3* プロモーターが欠失した後、*orf3* を含む周辺の領域が段階的に欠失し、最終的にはプラスミド自体が OY-NIM から消失したことが明らかとなった。以上の結果より、EcOYNIM は植物による継代・維持で配列が段階的に失われ、遂にはプラスミド自体が OY-NIM から消失したことが明らかとなった。

以上を要するに、OY-NIM のプラスミドは植物内という一定の宿主環境における維持により、段階的に配列が欠失していることが明らかとなった。この結果は、*orf3* を含む OY プラスミドにコードされる遺伝子が、植物内での生存に必須ではないことを示しており、ファイトプラズマのプラスミドと昆虫伝搬能との関連性が強く示唆された。この意義は大きく、この成果を応用すれば、昆虫伝搬によるファイトプラズマ病の拡大を抑えるような有効な防除法の確立も実現可能であると想定される。以上のように本研究の成果は、学術上また応用上きわめて価値が高い。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。