

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 星 朱 香

植物は菌類、細菌、ウイルスなどの病原微生物に感染すると、葉や花器などに様々な症状（病徴）を示し、農作物では収量や品質が著しく低下する。これらの病原微生物が植物に引き起こす病徴の発現機構を解明することは、農学における最重要課題の一つである。しかしながら、病原体の感染により誘導される植物に形態異常を伴った病徴については、その誘導メカニズムの大部分が不明である。

ファイトプラズマは、世界中で約700種以上の植物に感染する病原細菌である。また、ファイトプラズマに感染した植物は、萎縮、叢生、黄化、花器官の緑化・葉化・突き抜け症状等の形態異常を伴った特徴的な病徴を示すことから、その病徴発現に至る分子メカニズムには興味を持たれてきた。しかしながら、人工培養系および、形質転換系が確立していないことから、その分子生物学的研究は遅れ、病徴誘導メカニズムも不明であった。

そこで、本研究では、花器官に緑化、葉化、突き抜け症状を引き起こすアジサイ葉化病ファイトプラズマ (*Japanese Hydrangea phyllody (JHP) phytoplasma*) と、萎縮・叢生症状を引き起こすタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (*onion yellows (OY) phytoplasma*) を用いて、感染植物内におけるファイトプラズマの局在、および感染から形態異常を誘導するまでの分子メカニズムの全容解明を目的として以下の解析を行った。

1. 葉化アジサイの花器官におけるファイトプラズマの局在解析

葉化症状を示すアジサイの花器官におけるJHPファイトプラズマの分布を解析し、形態異常とファイトプラズマの局在についての関連性を調べた。まず、JHPファイトプラズマの局在を解析するために、ファイトプラズマの菌体表面の大半を覆う主要抗原膜タンパク質 (*Antigenic membrane protein : Amp*) に対する抗体を作出した。次に、健全アジサイおよび葉化アジサイの花器官の切片について、抗JHP-Amp抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、葉化アジサイ花器官の維管束の篩部組織および、葉化した萼片の葉脈や、葉化した柱頭に形成された篩部組織においてJHP-Amp特異的なシグナルが検出された。一方、器官分化に重要な役割を果たす頂芽分裂組織など、篩部以外の組織からはシグナルは認められなかった。これらの結果から、ファイトプラズマ自身は篩部組織に局在した状態で、遠隔的に植物の遺伝子発現や形態形成に影響を与え、葉化症状などの形態異常を引き起こすことが示唆された。

このファイトプラズマによる形態形成の遠隔的な制御メカニズムの一つの仮説として、移行性の病原性因子の関与が考えられた。ファイトプラズマは、宿主細胞内に局在し、ペプチドグリカン等からなる細胞壁を欠くことから、ファイトプラズマの菌体の外に放出される分泌タンパク質は、植物宿主に直接的に働きかけ、病原性を発現する機能を持つ可能性が高く、病原性因子の最有力候補と考えられる。そこで、上記の結果を踏まえ、次項ではファイトプラズマの分泌タンパク質に焦点を当て、病原性因子の同定および病徴誘導メカニズムの解明を試みた。

2. 植物に形態異常を誘導する病原性因子の探索

分泌タンパク質より病原性因子を単離するため、OY ファイトプラズマの全ゲノム情報よりシグナル配列推定プログラムである SignalP 3.0 を用いて分泌タンパク質遺伝子を予測し、それら分泌タンパク質を、ウイルスベクターを用いて *Nicotiana benthamiana* に一つずつ一過的に発現させ、植物の応答を調べた。その結果、分泌タンパク質のうち、PAM765 を発現させた植物において、頂芽から複数のシュートが分化する叢生症状と萎縮症状が認められた。さらに、PAM765 を恒常的に発現するシロイヌナズナの形質転換体を作成したところ、同様の叢生および萎縮症状を示した。日本において、叢生および萎縮症状を示す植物は、てんぐが巣を作ったように見えたことから、これらの症状はてんぐ巣症状と呼ばれてきた。そこで、植物にてんぐ巣症状を誘導する病原性因子として、PAM765 を「tengu-su inducer (TENGU)」と命名した。

3. 病原性因子「TENGU」によるてんぐ巣症状誘導メカニズムの解析

TENGU の分泌領域は、わずか 38 アミノ酸（分子量：4.5 kDa）の極めて小さなタンパク質である。そこで、TENGU の植物組織内における挙動を調べるため、抗 TENGU 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った結果、TENGU は篩部組織にとどまらず、茎の内部組織（髄）全体で検出された。特に、TENGU は分枝領域や茎の先端周辺に多く局在し、加えて茎頂においても局在が認められた。以上の結果は、TENGU が篩部組織から隣接組織、そして茎頂に向かって移行する性質を持つ可能性を示唆している。

さらに、TENGU によるてんぐ巣症状誘導メカニズムを調べるため、TENGU 発現形質転換体において特異的に発現変動する植物遺伝子群を、マイクロアレイ解析によって調べた。その結果、TENGU 発現形質転換体では、植物ホルモンのオーキシンに関連した遺伝子群の発現低下が認められた。このことから TENGU は、オーキシンのシグナル経路や生合成経路を抑制する機能をもつ可能性が示唆された。この TENGU によるオーキシン作用の抑制により、頂芽優勢が解除され、頂芽の伸長が抑制される一方で、側芽の伸長が促進され、結果として、萎縮や叢生症状を伴ったてんぐ巣病が引き起こされるものと考えられた。

ファイトプラズマは植物だけでなく、ヨコバイ等の昆虫にも細胞内寄生する細菌である。リアルタイム PCR により、植物と昆虫におけるファイトプラズマの TENGU 遺伝子の発現量を比較したところ、植物宿主内では昆虫宿主内に比べ、約 5 倍も多く発現していた。これは、TENGU が植物において重要な機能を担っていることを示唆している。以上の結果より、ファイトプラズマは、篩部組織から隣接組織や茎頂分裂組織へと拡散する TENGU を分泌することにより、自身では侵入できない組織における植物宿主の形態形成を遠隔的に制御し、てんぐ巣症状を誘導していると考えられた。

以上を要するに、本研究では、ファイトプラズマの分泌タンパク質を標的として機能スクリーニングを行い、植物にてんぐ巣症状を誘導する病原性因子「TENGU」を同定した。さらに、TENGU 形質転換体を用いたマイクロアレイ解析および、抗 TENGU 抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、TENGU はファイトプラズマから分泌された後、頂芽分裂組織を含む植物体全体へと拡散し、オーキシン作用を抑制することで、萎縮および叢生症状を引き起こすという新規な病徴誘導メカニズムを提唱した。本研究の成果は、学術上の新規性、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。