

(論文内容の要旨)

植物の生理，形態反応はそのほとんどが植物単独によって行われていると考えられてきたが，内生微生物が栄養繁殖性植物の生理・形態の多様化に関与している可能性は十分に考えられる．本研究では，内生微生物であるファイトプラズマによる植物の遺伝子発現制御機構を解明することを目的として，ファイトプラズマに感染したアジサイ植物体における遺伝子発現の変化を形態学および分子生物学的側面から調査した．

1. 形態学的側面からファイトプラズマの感染によって発現量が変化する遺伝子群を推定するために，ファイトプラズマ感染個体での花器官の形態変化を調査したところ，以下のような形態変化が明らかとなった．がく片および雌蕊となるべき組織が葉を形成する．花卉および雄蕊は形態変化を起こさなかった．また，本来退化する花序分枝を抱く葉が発達し，小花柄に苞葉を形成する小花が見られる．額咲き品種では側花として着生する非装飾花の形成が阻害されることで頂花として着生する非装飾花が装飾花化し，花房あたりの総小花数に占める装飾花数の割合が増大した．以上の調査結果を花器官の形態形成を制御する遺伝子の発現モデルである ABC モデルの観点から考察すると，A，B および C クラス遺伝子，花序と小花の形成や生長相の転換に関与する *LEAFY* 遺伝子などがファイトプラズマの感染によって発現量が変化する候補遺伝子として考えられた．

2. 形態学的調査から発現量が変化する と推定された候補遺伝子群の発現量を調査した．アジサイにおける花器官形態形成遺伝子ホモログ(A クラス遺伝子ホモログ，*HmFUL-1*，*-2*，*-3*，B クラス遺伝子ホモログ，*HmTM6*，*HmAP3*，*HmPI*，C クラス遺伝子ホモログ，*HmAG*)の発現量を JHP(*Japanese hydrangea phyllody*)ファイトプラズマ感染品種である‘ミドリバナアジサイ’と JHP ファイトプラズマを茎頂培養で除去した個体との間で比較した．‘ミドリバナアジサイ’茎頂部の未発達花序では *HmFUL-1*，*-3* を除く全解析遺伝子の発現量が低下していた．特に B および C 遺伝子ホモログである *HmAP3*，*HmPI* および *HmAG* の発現量が低下していたことから，*HmAP3*，*HmPI* および *HmAG* の発現量の低下が JHP ファイトプラズマの感染による花器官の形態変化に関与すると考えられた．次に，遺伝子発現量の低下が起こる機構を明らかにすることを目的とし，未発達花序組織中の small interfering RNA (siRNA)蓄積量を調査した．JHP ファイトプラズマ非感染個体と比較して，‘ミドリバナアジサイ’の未発達花序において *HmAG* に由来する siRNA が多く検出され，JHP ファイトプラズマの感染による花器官の形態形成を制御する遺伝子群の発

現量の低下には転写後ジーンサイレンシングを引き起こす mRNA の分解が関与すると考えられた。

3. ファイトプラズマによる植物遺伝子の発現制御には未知の遺伝子群が関与する可能性も高い。本調査ではファイトプラズマの感染によって発現量が変化する遺伝子群を網羅的に選抜した。サブトラクション(SSH)法によって‘ミドリバナアジサイ’未発達花序特異的に発現する遺伝子群 (以下 SSH Green)および JHP ファイトプラズマ非感染個体の未発達花序特異的に発現する遺伝子群 (以下 SSH Blue)を選抜した。SSH Green では *Hydrangea ring spot virus (HdRV)* 複製酵素, 葉緑体関連遺伝子, およびストレス防御関連遺伝子群が多く単離された。HdRV は‘ミドリバナアジサイ’および非感染個体の双方が感染しており, JHP ファイトプラズマと HdRV の複合感染によって HdRV の増殖が促進されると考えられた。SSH Blue では転写因子関連遺伝子およびリボソームタンパク質が多く単離された。転写因子関連遺伝子の多くは *HmAP3* の発現制御に関与し, 次に *HmAG* の制御遺伝子, MYB 関連遺伝子, Transcription initiation factor TF II D subunit がつづいた。SSH Green と共通する転写因子遺伝子は MYB 関連遺伝子のみであった。SSHBlue では *HmAP3* および *HmAG* が多く単離されたが, これは JHP ファイトプラズマ非感染個体における発現量が‘ミドリバナアジサイ’における発現量よりも多いために単離されたと考えられ, 花器官形態形成遺伝子ホモログの発現解析の結果を支持した。

以上より, ‘ミドリバナアジサイ’の花器官の形態変化には, JHP ファイトプラズマの感染によって発現低下するいくつかの候補遺伝子が関与する可能性が考えられた。特に, 花器官形態形成遺伝子の転写後分解などによる制御機構が働いている可能性が高いと思われた。

氏 名

北村 嘉邦

(論文審査の結果の要旨)

園芸作物には長年の栄養繁殖の間に植物に感染した微生物が様々な形質を付与していることがある。アジサイの緑花化には絶対寄生性微生物の一つであるファイトプラズマが関与する。本研究はファイトプラズマによるアジサイの花器官の形態制御機構を分子生物学的手法によって明らかにしようとしたものである。本論文は以下の点で評価される。

1. アジサイには多種の細菌が感染していると報告されている。本論文ではアジサイ茎頂培養時に発生する微生物を網羅的に分離・同定・比較することで、培養時に感染している細菌がアジサイの緑花化には関与しないことを明らかにした。また、これらの知見をもとに新しい殺菌方法を開発し、これまで困難であるとされてきたアジサイの茎頂培養に成功した。培養個体は全て青花化し、緑花で感染が見られたファイトプラズマは検出されなかった。以上の結果より、ミドリバナアジサイの緑花化を引き起こすのはファイトプラズマであり、他の細菌の共存は影響しないことが明らかとなった。また以降の遺伝子解析のための対照植物体を作出できた。

2. ファイトプラズマが感染すると花器官に形態変化が見られるが、形態変化の詳細についての報告はない。ファイトプラズマの感染による花器官の変化として、萼片の葉状化のみならず、雌蕊を形成する心皮の葉状化が多発することを明らかにした。一方で花弁と雄蕊にはほとんど変化は見られなかった。また、花芽分化時期や開花時期にも感染個体と非感染個体で違いは見られなかったことから、花器官の形態変化はABCクラス遺伝子の発現パターンの差異による可能性を示唆した。本形態調査により、以降の実験における解析対照遺伝子を絞ることが可能となった。

3. ABCクラス遺伝子の解析に先立って、アジサイではじめてCクラス遺伝子である *Agamous* 相同遺伝子の全長を決定し、*HmAG* と名付けた。

4. ABCクラス遺伝子はすべて‘ミドリバナアジサイ’の特定の花序発達ステージにおいて発現が低下しており、なかでもCクラス遺伝子の *Agamous* は対照植物体の花序に比べて1/20倍の発現量であった。このステージは対照植物と緑花アジサイとの形態的差異が顕在化するステージであった。さらに *HmAG* については、RNAサイレンシングがRNA発現量の低下に関わっている可能性を実験的に示唆した。また、‘ミドリバナアジサイ’で発現量が変化する遺伝子を網羅的に解析し、‘ミドリバナアジサイ’のABCクラス遺伝子の発現低下を別の実験からも確認した。感染微生物が宿主において発現するRNAのRNAサイレンシングを通して形態制御にかかわる可能性も明らかにしている。

以上のように本論文は微生物とくにファイトプラズマが関与する植物の形態反応の分子生物学的研究を行ったものであり、園芸学並びに植物生理・形態学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成21年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。