

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	新屋 良治
論文題目	Molecular insights into the parasitism and the virulence determinants of the pine wood nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (マツノザイセンチュウの寄生戦略及び病原因子に関する分子的洞察)		
(論文内容の要旨)			
<p>マツ材線虫病 (マツ枯れ) は病原体マツノザイセンチュウを媒介昆虫、マツノマダラカミキリが枯死木から健全木に伝播することによって被害が拡大する森林流行病で、長年に亘り日本や中国、韓国など、東アジア諸国のマツ林に甚大な被害を及ぼしてきた。近年、ヨーロッパにもこの病気が侵入し、急速に世界規模の深刻な問題になってきている。病原体の発見以降マツ枯損メカニズムに関しては様々な研究が行われ、多くの生理・生態的な知見が蓄積されてきた。しかし、依然として発病・枯死に直結する病原因子や、病原体マツノザイセンチュウの詳細な寄生メカニズムについては未解明なままであった。</p> <p>本論文ではこれらの問題を解明するため、病原線虫側因子として宿主マツ組織と直接接触するマツノザイセンチュウ体表面タンパク質と、線虫口針から分泌されるタンパク質に焦点を絞り、それらの構成分子種と生物学的性質をプロテオーム解析法によって精査することにより、病原因子の探索を試みている。また、これらの結果を踏まえて、今後の当該分野研究の飛躍的な進展のために不可欠と考えられる遺伝的に均一なマツノザイセンチュウ近交系の作出を試みている。</p> <p>第1章では、線虫体表面の主要分子である糖タンパク質の基本的性質を調べるために、糖タンパク質の糖鎖部分と特異的に結合する複数の植物レクチンを用いて線虫の生育ステージ間、系統間における体表面タンパク質の性質の違いを調べている。その結果、小麦胚芽レクチン (WGA) を用いた場合には、生育ステージによる顕著な染色結果の違いが観察されること、また同様の染色性の違いはマツノザイセンチュウの系統間にも見られることを明らかにしている。さらにSDS-PAGE及びレクチンブロット解析を行うことによって、その変化が糖鎖とタンパク質の両方で生じていることを明らかにした。</p> <p>第2章では、引き続きマツノザイセンチュウ体表面タンパク質に焦点を絞り、比較プロテオーム解析手法を用いて生育環境により体表面タンパク質がどのように変化するかを研究した。その結果、マツノザイセンチュウでは、宿主マツに感染後、体表面タンパク質はその総量が急激に大きくなること、なかでも増加の著しいタンパク質種は抗酸化・解毒酵素群であることが明らかになった。これらの結果から、マツノザイセンチュウの体表面タンパク質は宿主抵抗性反応に対する防御手段としての役割を担っているであろうことを述べている。</p>			

第3章では、プロテオーム解析手法を用いてマツノザイセンチュウの分泌タンパク質の網羅的同定を行っている。本研究はまずマツノザイセンチュウのゲノムシーケンス情報にアノテーションを付与することから始められており、このことにより精度の高いプロテオーム解析を行うためのデータベースが作成された。解析の結果、合計で1,551種の分泌タンパク質が同定され、同定タンパク質の中では特に、ペプチダーゼ、細胞壁分解酵素、抗酸化・解毒酵素の割合が高いことが明らかになった。また、それらのタンパク質の一部は遺伝子水平伝播により糸状菌及び細菌から新たに獲得されたタンパク質であることも明らかにされた。これらの結果から、マツノザイセンチュウの分泌タンパク質の特徴は宿主を積極的に加害する分子ではなく、宿主抵抗性に対する防御的役割を果たす分子が多いことであると考察している。

第4章では、前章で網羅的に同定を行った分泌タンパク質を、宿主に対する病原力が異なるマツノザイセンチュウ4系統間で比較することにより、病原因子を探索することを試みている。まず、弱病原力系統に比べ、強病原力系統に共通して顕著に発現量が高い4種類の分泌タンパク質種（病原候補因子）を特定し、LC-MS/MS解析により同定した。さらに、これら4種の病原候補因子の機能を確認するため、RNA干渉による機能抑制を試みた。その結果4種の病原候補因子の内2種のタンパク質が増殖に深く関与する遺伝子発現産物であることが明らかになった。

第5章では、マツノザイセンチュウ近交系の作出を試みている。既存系統の線虫において兄妹交配を繰り返し、遺伝的純度の高い複数の近交系を作出した。続いて、AFLP法によりこれらの近交系の純度の確認を行った上で、増殖力や病原力を精査し、起源が同一の系統内から病原力や増殖力が異なる新規の近交系が作出できることを示した。今後の研究において、これらの遺伝的純度の高い近交系を使用することにより、既存系統では困難であった病原力に関する遺伝学的解析の可能性を強く示唆している。

総合考察では本研究によって数多く同定された分子情報を基に、マツノザイセンチュウの寄生戦略とそれらの進化的起源に関して考察し、現時点で考え得るマツ枯れのメカニズムに関して検討を加えている。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

森林流行病であるマツ枯れは西南日本に端を発し、今や北海道を除く日本全土のマツ林に被害が及んでいる。さらに、本病は中国や韓国、台湾にも被害が及び、1999年にはヨーロッパにも本病が侵入した事が報告されており、まさに世界的な規模の病害として注意が喚起されている。一方、マツ枯れのメカニズムに関しては病原体であるマツノザイセンチュウの発見から40年以上が経過したにもかかわらず、依然としてその病原因子の解明には至っていないのが現状である。

以上のような状況の中、本論文ではマツ枯れの発病メカニズムやマツノザイセンチュウの寄生メカニズムを解明するために、主に分子生物学的、特にプロテオーム解析手法という新たな切り口で研究を行っており、長年未解明であった本病の発病メカニズムの本質に肉薄する非常に優れた研究である。評価すべき点は以下の通りである。

1. マツノザイセンチュウの体表面タンパク質の性質が成育ステージにより変化するか否かを調べるためには、均一な成育ステージの線虫を大量に得る必要がある。このため、まず線虫成長の同調化法を開発し、その後この方法を駆使して特定の成育ステージの線虫を大量に得ることに成功した。この独自の手法を用いることによって初めて、マツノザイセンチュウの体表面タンパク質が成育ステージごとに顕著に変化することを明らかにした。

2. プロテオーム解析手法を用いて大規模にタンパク質同定を行うためには、マツノザイセンチュウのゲノム情報が必要である。本論文では、ゲノムアノテーション解析を行い、遺伝子データベースを整備することでマツノザイセンチュウへのプロテオーム解析の適用を可能にした。

3. マツノザイセンチュウの体表面タンパク質と分泌タンパク質は長年に亘りマツ枯れにおける重要な関与があると考えられてきた分子群である。しかし、その扱いの難しさからこれまでその構成分子種すらほとんど明らかになっていない状況であった。本論文ではプロテオーム解析手法を用いることによって両タンパク質を併せて1,500種を超えるタンパク質の同定に成功し、さらに、マツノザイセンチュウを特徴づける複数の分子群の特定に成功した。

4. 病原力の異なる4系統の線虫間でその分泌タンパク質の発現量を網羅的に比較・スクリーニングすることで、強病原力系統のマツノザイセンチュウのみが共通して多量に分泌する4種類のタンパク質(病原候補因子)を明らかにした。

5. マツ枯れの病原因子の研究において、従来までは現象の観察及び相関関係を基にした推測に頼らざるを得なかった。本論文では、スクリーニングにより選抜した病原候補因子をRNA干渉法により発現抑制させそれらの機能を特定し、2種のタンパク質にまで絞り込んだ。

6. マツノザイセンチュウ既存系統は各集団内での遺伝的多様度が高く、このことがマツノザイセンチュウにおいて遺伝学的研究及び遺伝子破壊株取得における大きな障害となっていた。本論文では兄妹交配を繰り返すことで病原力の異なる近交系を作出し、今後の病原力解明に向けた研究において利用価値の高い生物材料を作出した。

以上のように、本論文はマツ枯れの病原体マツノザイセンチュウの表皮タンパク質と分泌タンパク質の網羅的同定、病原候補因子の選抜、分子機能解析、などを通じて数多くの知見を提供し、マツ枯れのメカニズム及びマツノザイセンチュウによる寄生戦略の分子レベルでの理解を大いに前進させた。さらに、本線虫に関する分子基盤情報の整備、数々の新規手法の確立、新規マツノザイセンチュウ近交系の作出などを達成した。このように本研究は微生物環境制御学、線虫学、分子生態学などに寄与するところがきわめて大きい。

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 24年 2月 10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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降