

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 29 年度博士課程進学

氏 名 岩 渕 望

指導教員名 山次 康幸

論文題目 ファイトプラズマの葉化誘導因子「ファイロジェン」の構造と機能に関する研究

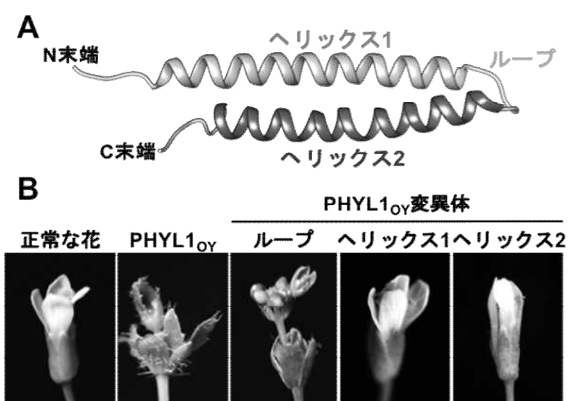
植物病原細菌ファイトプラズマは篩部吸汁性の昆虫によって媒介される Mollicutes 綱細菌であり、様々な植物の篩部に感染して特徴的な症状を引き起こす。近年、ファイトプラズマのゲノム解読の進展に伴い、ファイトプラズマから分泌されるエフェクタータンパク質がこれらの症状を誘導する病原性因子として同定され、ファイトプラズマ病の発症機構が解明されつつある。これらのエフェクターの構造や配列の保存性および多様性を解析することは、ファイトプラズマの病原性に関する分子機構の理解を深める上で重要である。

葉化病はファイトプラズマが感染した様々な植物で報告され、花が葉のような構造に変化する病害である。最終的に不稔を引き起こすとともに病気の感染源ともなるため、農家にとっての懸念事項である。これまでにファイトプラズマのエフェクターの一つであるファイロジェンが、様々な植物に対する葉化誘導因子として同定されている。ファイロジェンは花の形態形成に重要な MADS ドメイン転写因子群 (MADS-box transcription factors: MTFs) とプロテアソームのシャトルタンパク質である radiation sensitive 23 (RAD23) に結合し、プロテアソーム系を介して A および E クラスの MTF を分解する。一方で、ファイロジェンの立体構造や配列情報に基づいて機能を解析した研究は少なく、葉化誘導に重要な構造やアミノ酸についての知見は乏しかった。

### 1. ファイロジェンの葉化誘導能に重要な $\alpha$ ヘリックス構造

これまでにファイロジェンの標的となる MTF や RAD23 の立体構造データは集積しているが、ファイロジェンの構造は不明であった。そこで当研究室で維持しているタマネギ萎黄病 (onion

yellow: OY) ファイトプラズマのファイロジェン (PHYL1<sub>OY</sub>) の立体構造を、X 線結晶構造解析により決定した。その結果、PHYL1<sub>OY</sub> は 2 つの  $\alpha$  ヘリックス (ヘリックス 1, 2) がループで繋がれたコイルドコイル構造を形成した (図 1A)。PHYL1<sub>OY</sub> の立体構造に基づくホモロジーモデリングにより、本構造は他のファイロジェン (SAP54、PHYL1<sub>PhWB</sub>) でも同様に予測された。既報のファイロジェンのアミノ酸配列をアラインメントしたところ、いずれの  $\alpha$  ヘリックスにも疎水性残基が一定間隔で繰り返し保存され、両親媒性の  $\alpha$  ヘリックスであることが示唆された。以上より、ファイロジェンファミリーには 2 つの両親媒性の  $\alpha$  ヘリックス構造が保存されていることが示唆された。本構造は、ファイロジェンの標的である MTF の K ドメインと類似した構造である。次に、ファイロジェンの構造と機能の関係を明らかにするため、PHYL1<sub>OY</sub> の 4 箇所の異なる部位に 2 つのアラニン残基を挿入した変異体 (ヘリックス 1: PHYL1<sub>OY</sub><sup>K28KAA</sup>, ループ: PHYL1<sub>OY</sub><sup>P53PAA</sup>, ヘリックス 2: PHYL1<sub>OY</sub><sup>L68LAA</sup> および PHYL1<sub>OY</sub><sup>Q75QAA</sup>) を作製し、MTF および RAD23 との結合能、MTF の分解能、植物体への葉化誘導能を検証した。葉化誘導能の検証には任意の外來遺伝子を発現可能な tobacco rattle virus 由来のウイルスベクターを用いた。その結果、いずれかのヘリックスにアラニンを挿入した変異体 (PHYL1<sub>OY</sub><sup>K28KAA</sup>, PHYL1<sub>OY</sub><sup>L68LAA</sup>, PHYL1<sub>OY</sub><sup>Q75QAA</sup>) では、葉化誘導能を初めとする全ての機能が失われた (図 1B)。一方で、ループ領域に挿入した変異体はいずれの機能も PHYL1<sub>OY</sub> と同様に維持していた。以上より、ファイロジェンの機能には疎水性残基を繰り返しもつ 2 つの  $\alpha$  ヘリックスが必要であることが示唆された。



(図 1) PHYL1<sub>OY</sub> の構造とシロイヌナズナへの葉化能の関係。(A) PHYL1<sub>OY</sub> は 2 つのヘリックスからなる立体構造をとる。(B) ヘリックスをつなぐループへの変異は葉化能に影響しないが、どちらのヘリックスに変異を入れても葉化能が失われる。

## 2. $\alpha$ ヘリックスを標的にした様々なファイロジェン遺伝子の探索と配列解析

葉化は幅広いファイトプラズマが引き起こすが、ファイロジェン遺伝子はその中で限られた種・系統でしか同定されていなかった。そこで、機能に重要な  $\alpha$  ヘリックスの保存領域を標的にした PCR 法により、様々なファイトプラズマからファイロジェン遺伝子を同定し、配列を解析した。

まず、PHYL1<sub>OY</sub>、SAP54、PHYL1<sub>PhWB</sub> の  $\alpha$  ヘリックス上の保存領域にプライマーを設計し、幅広いファイトプラズマ DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、これまでにファイロジェン遺伝子が同定されていない 4 種 (‘*Ca. P. fragariae*’, ‘*Ca. P. fraxini*’, ‘*Ca. P. japonicum*’ および ‘*Ca. P. oryzae*’) を含む、9 種 25 系統のファイトプラズマから想定サイズの DNA 断片が得られた。得られた DNA 断片は既報のファイロジェンと 70%以上の同一性を示したため、ファイロジェン遺伝子の一部であることが示唆された。そのうち、8 系統について genome walking により上流および下流配列を決定することでファイロジェン遺伝子の全長配列を決定した。決

定したファイロジェン遺伝子上流にはリボソーム結合予測サイト (5'-AAGGAG-3')、および開始コドンが、下流には終止コドンが既報のファイロジェンと同じ位置に存在した。いくつかの系統ではファイロジェン遺伝子の途中に生じた終止コドンにより、 $\alpha$ ヘリックスが欠失していた。 $\alpha$ ヘリックスを欠失した場合を除き、同定したファイロジェンにはN末端のシグナル配列切断サイトと、それに続く疎水性残基の保存された2つの $\alpha$ ヘリックスが予測された。既報のものも含めて、ファイロジェンの全長配列を用いて配列同一性を算出したところ、塩基では66.7-100%、アミノ酸では44.1-100%であり、ファミリー内での配列同一性は低かった。以上より、これまでの知見と合わせて、11種59系統の幅広いファイトプラズマが多様なファイロジェン遺伝子をもつことが明らかとなった。

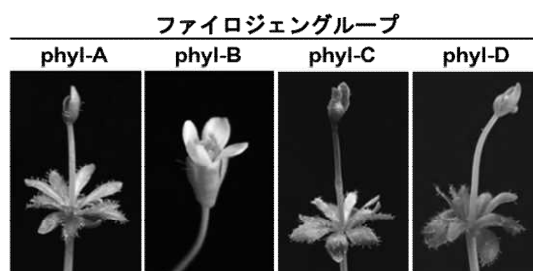
興味深いことに、ファイロジェン遺伝子の塩基配列に基づいて系統樹を作製したところ、4グループ (Phyl-A, -B, -C, -D) に分かれ、16S rRNA 遺伝子に基づく系統関係と一致しなかった。さらに、同種ファイトプラズマどうしても異なるグループに属するファイロジェンを持つことがあった。以上より、ファイロジェン遺伝子はファイトプラズマ属の進化とは独立に進化を遂げていることが示唆された。

### 3. $\alpha$ ヘリックス上のアミノ酸多型による葉化誘導能の多様性

いくつかのファイトプラズマのエフェクターは、ホモログ間で機能に差異があることが報告されている。そこで、葉化誘導能がファイロジェンファミリー内で保存されているか検証した結果、phyl-A、-C、-Dグループのファイロジェンは、

$\alpha$ ヘリックスを欠失したものを除いて葉化誘導能を維持していた (図2)。一方で、phyl-Bグループと $\alpha$ ヘリックスを欠失した PHYL1<sub>PYR</sub> はいずれも葉化誘導能を失っていた。また、葉化誘導能をもつファイロジェンはいずれも MTF の分解を誘導したが、phyl-Bグループに属する PHYL1<sub>SY</sub> はほとんど分解を誘導しなかった。MTF および RAD23 との結合能を比較したところ、葉化誘導能をもつファイロジェンはいずれも MTF および RAD23 との結合能を維持していた。葉化誘導能を失ったファイロジェンのうち、PHYL1<sub>PYR</sub> は MTF とともに RAD23 とともに結合できなかった。一方で、phyl-Bグループのファイロジェンは RAD23 との結合能を維持していたものの、いくつかの MTF との結合能が低下していた。以上より、phyl-Bグループは RAD23 との結合能を維持しながらも、MTF と結合し分解を誘導する活性が低下したために、葉化誘導能を喪失したことが示唆された。

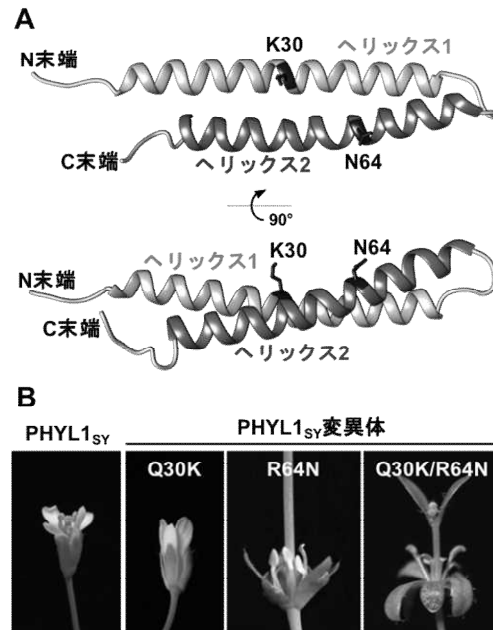
併次に、phyl-Bグループの葉化誘導能の喪失の原因となるアミノ酸を特定するため配列を比較したところ、 $\alpha$ ヘリックス表面に露出している2つの親水性残基 [30番目のリジン (K30) と64番目のアスパラギン (N64)] が、phyl-Bグループではそれぞれグルタミン (Q30) およびアルギニン (R64) に置換していた (図3A)。そこで、PHYL1<sub>OY</sub> (phyl-Aグループ) のK30、N64残基をphyl-Bグループと同じアミノ酸に置換した変異体 (PHYL1<sub>OY</sub><sup>K30Q</sup>, PHYL1<sub>OY</sub><sup>N64R</sup>, PHYL1<sub>OY</sub><sup>K30Q/N64R</sup>) を作製したところ、PHYL1<sub>OY</sub><sup>K30Q</sup> はシロイヌナズナの花に激しい形態異常を引き起こしたが、



(図2) グループ間の葉化誘導能の比較。Phyl-A、-C、-Dグループではシロイヌナズナに葉化を誘導するが、phyl-Bでは見られない。

PHYL1<sub>0Y</sub><sup>N64R</sup>は軽微な形態異常を引き起こすのみで、PHYL1<sub>0Y</sub><sup>K30Q/N64R</sup>は形態異常を全く引き起こさなかった。また、phy1-C と phy1-D グループの当該アミノ酸を置換した変異体でも、同様の結果が得られた。さらに、PHYL1<sub>0Y</sub><sup>K30Q/N64R</sup>は PHYL1<sub>0Y</sub> と比べて MTF の分解能が低下していた。以上より、N64 はファイロジェンの葉化誘導能を決定し、K30 はその補助的な役割を担うことが示唆された。

さらに、PHYL1<sub>SY</sub> の Q30、R64 残基をそれぞれ K30 および N64 に置換した変異体 (PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K</sup>, PHYL1<sub>SY</sub><sup>R64N</sup>, PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K/R64N</sup>) を作製したところ、上述の結果と一致して、PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K</sup> は花の形態異常を全く引き起こさなかったが、PHYL1<sub>SY</sub><sup>R64N</sup> では葉化誘導能が回復し、PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K/R64N</sup> では PHYL1<sub>SY</sub><sup>R64N</sup> より激しい葉化を引き起こした (図 3B)。また、MTF の分解も PHYL1<sub>SY</sub><sup>R64N</sup> で回復し、PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K/R64N</sup> でより顕著になった。一方で、PHYL1<sub>SY</sub> の R64 残基をアスパラギン以外の親水性残基 (アスパラギン酸、リジン、グルタミン) に置換しても葉化誘導能は回復しなかった。最後に、MTF および RAD23 との結合能を検証したところ、PHYL1<sub>SY</sub><sup>R64N</sup> は PHYL1<sub>SY</sub> と比べて各 MTF との結合能が回復し、PHYL1<sub>SY</sub><sup>Q30K/R64N</sup> ではより顕著になった。以上より、phy1-B グループは、N64 の変異によって MTF の結合能が低下したことで葉化誘導能を失ったことが示唆された。



(図 3) 葉化誘導に重要なアミノ酸の特定。(A) Phyl-B グループで生じたアミノ酸多型の位置。Phyl-B グループではそれぞれ Q あるいは R に置換している。(B) Q30K の変異では変異導入前と同様に葉化を誘導しないが、R64N の変異で葉化誘導能が回復し、Q30K/R64N の変異で葉化症状が激しくなる。

以上より、ファイロジェンによる葉化誘導能に必須な構造 ( $\alpha$ ヘリックス) と MTF との結合特異性に重要なアミノ酸 (K30 および N64) が明らかとなり、葉化病の発症機構に関する分子構造学的な知見が得られた。すなわち、ファイロジェンファミリーには葉化誘導を初めとする全ての機能に重要な  $\alpha$ ヘリックス構造が保存されていた。また、 $\alpha$ ヘリックスを標的にした PCR 法により多様なファイロジェンを同定し、その中からタンパク質構造を維持しながらも 1 アミノ酸 (N64) の変異により葉化誘導能を失ったファイロジェン (phy1-B グループ) を同定した。Phyl-B グループをもつファイトプラズマの感染植物には葉化症状が観察されないことから、一つのエフェクターのわずかなアミノ酸の違いがファイトプラズマの病原性の強弱を決定している可能性が示唆された。本研究で得られた立体構造および配列情報と機能の関係性がファイトプラズマのエフェクターの機能と進化の全貌をつかむための礎となることを期待する。