

博士論文 (要約)

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

岩渕 望

目次

第1章 緒論	6
1.1 ファイトプラズマ属細菌	6
1.1.1 植物病原細菌ファイトプラズマ	6
1.1.2 ファイトプラズマの分類	9
1.1.3 ファイトプラズマのゲノム解析	11
1.1.4 Potential mobile unit (PMU)	13
1.2 花の形態異常を伴うファイトプラズマ病	17
1.2.1 様々な植物における花の形態異常	17
1.2.2 ファイトプラズマによる花器官の様々な形態変化	21
1.3 ファイロジェンによる葉化誘導機構	23
1.3.1 葉化誘導因子ファイロジェンの同定	23
1.3.2 花の ABCE モデルと MADS ドメイン転写因子 (MTF)	25
1.3.3 ファイロジェンによる標的 MTF の分解誘導	27
1.3.4 MTF の分解誘導におけるプロテアソーム系との関わり	28
1.3.5 ファイロジェンによる葉化誘導モデル	31
第2章 ファイロジェンの葉化誘導能に重要な α ヘリックス構造	36
2.1 序文	36
2.1.1 タンパク質の構造生物学的解析	36
2.1.2 タンパク質の基本構造	39
2.1.3 ファイロジェンの標的となる MTF と RAD23 タンパク質の立体構造	41
2.2 材料および方法	44
2.2.1 材料	44
2.2.2 遺伝子のクローニング・変異導入	46
2.2.3 タンパク質精製および結晶化	51
2.2.4 ヨウ素化誘導体作製および構造決定	53
2.2.5 配列解析および構造予測	55
2.2.6 Yeast two hybrid assay (Y2H)	55
2.2.7 MTF の分解誘導活性試験	57
2.2.8 TRV ベクターの改変およびファイロジェンのクローニング	61
2.2.9 TRV ベクターの植物への接種	65
2.2.10 TRV 感染植物からのウイルス検出	65
2.3 結果	66
2.3.1 PHYL1 _{oy} の立体構造	66
2.3.2 PHYL1 _{oy} と他のファイロジェンの構造比較	70

2.3.3	PHYL10Y 変異体の MTF、RAD23C との結合能.....	74
2.3.4	PHYL10Y 変異体の SEP3 に対する分解誘導活性試験.....	76
2.3.5	TRV ベクターを用いたファイロジェンの効率的な発現.....	77
2.3.6	PHYL10Y 変異体接種シロイヌナズナの花器官の形態.....	79
2.4	考察.....	81
2.4.1	2 つの α ヘリックス構造は葉化誘導能に重要である.....	81
2.4.2	α ヘリックスを介した MTF および RAD23 との結合様式.....	82

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

謝辞..... 154

引用文献..... 155

略号

-LW: synthetic defined medium lacking leucine and tryptophan

-LWH: synthetic defined medium lacking leucine, tryptophan and histidine

-LWH + 3AT: synthetic defined medium lacking leucine, tryptophan and histidine with 3-amino-1,2,4-triazole

-LWAH: synthetic defined medium lacking leucine, tryptophan, histidine and adenine

API: APETALA 1

CBB: coomassie brilliant blue

DTT: dithiothreitol

DW: distilled water

EtBr: ethidium bromide

GFP: green fluorescent protein

GST: glutathione S-transferase

GUS: β -glucuronidase

MTF: MADS-box transcription factor

OD: optimal density

ORF: open reading frame

OY onion yellows

PCR: polymerase chain reaction

PDB: protein data Bank

PHYLL1: phytoplasmal effector causing phyllody symptoms 1

PMU: potential mobile unit

RAD23: radiation sensitive 23

RMSD: root mean square deviation

SAP54: secreted AYWB protein 54

SD: synthetic defined medium

SDS: sodium dodecyl sulfate

SEP: SEPALLATA

TRV: tobacco rattle virus

Y2H: yeast two hybrid assay

YFP: yellow fluorescent protein

第1章 緒論

1.1 ファイトプラズマ属細菌

1.1.1 植物病原細菌ファイトプラズマ

ファイトプラズマ属細菌 (*Candidatus Phytoplasma spp.*) は、1,000 種以上の様々な植物の節部に感染し病気を引き起こす、絶対寄生性の植物病原細菌である。ファイトプラズマに感染した植物は、正常な生育が阻害され、農作物に収量の減少および品質の低下を引き起こすため、しばしば農業上問題となる。ファイトプラズマに対する抵抗性品種や農業現場で有効な治療手段は確立していないため、一度発生すると節部吸汁性昆虫に媒介されて急速に蔓延し、発生地域に壊滅的な経済的被害を与える (Strauss, 2009; Gurr *et al.*, 2016; Macrone, 2017; Kumari *et al.*, 2019)。そのため、ファイトプラズマの昆虫媒介や病原性を中心とした生物学的性状を理解し、ファイトプラズマ病の防除戦略の基盤を構築していくことが農業上重要である。

ファイトプラズマは、1967 年に萎縮黄化症状を示す植物の超薄切片観察によりその存在が初めて確認され (土居ら, 1967)、その後、世界各国で様々な植物の病原不明の類似病害の原因であることが追認された。ファイトプラズマは細胞壁を持たず、電子顕微鏡下において細胞膜に包まれた不定形粒子 (直径 0.2–0.8 μm) として観察される (図 1.1)。このような形態はヒトや家畜を含む動物に感染し病気を引き起こすマイコプラズマ (mycoplasma) と類似しているため、発見当初は mycoplasma-like organism (MLO) と呼ばれた。その後、分子系統解析により MLO はマイコプラズマ属と同じ Mollicutes 綱において独立した単系統群を形成することが判明した (Namba *et al.*, 1993)。その後、2004 年に MLO は新設の暫定属 (ファイトプラズマ属) に分類された。

ファイトプラズマを媒介する昆虫は、ヨコバイ、ウンカ、キジラミといったカメムシ目昆虫である (図 1.2)。植物においてファイトプラズマは節部のみに局在し、昆虫が感染植物の節管液を吸汁するこ

とで、口針を介して昆虫の中腸に到達する。その後、昆虫の体内で増殖しながら腸壁を通過して血体腔内に侵入し、やがて唾腺を含む昆虫の全身に感染する。ファイトプラズマを保毒した昆虫が新たに健全植物を吸汁することで、ファイトプラズマは唾液とともに植物の篩管内に放出され、新たな植物へと感染する (図 1.2; Namba, 2019)。なお、昆虫を介さない伝染様式として、接ぎ木等の栄養繁殖による伝染や、ファイトプラズマに感染した寄生植物ネナシカズラ (*Cuscuta* spp.; ヒルガオ科ネナシカズラ属) による伝染が知られている (Kaminska and Korbin, 1999)。

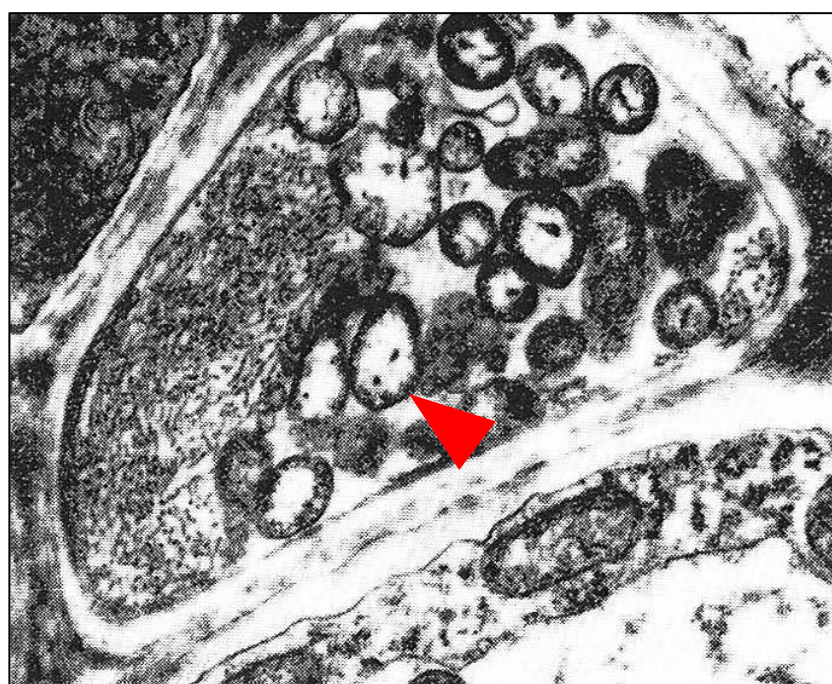


図 1.1 ファイトプラズマの電子顕微鏡写真

植物の篩管で観察されたマイコプラズマ様微生物 (赤矢頭) の電子顕微鏡写真。(土居ら, 1967)。

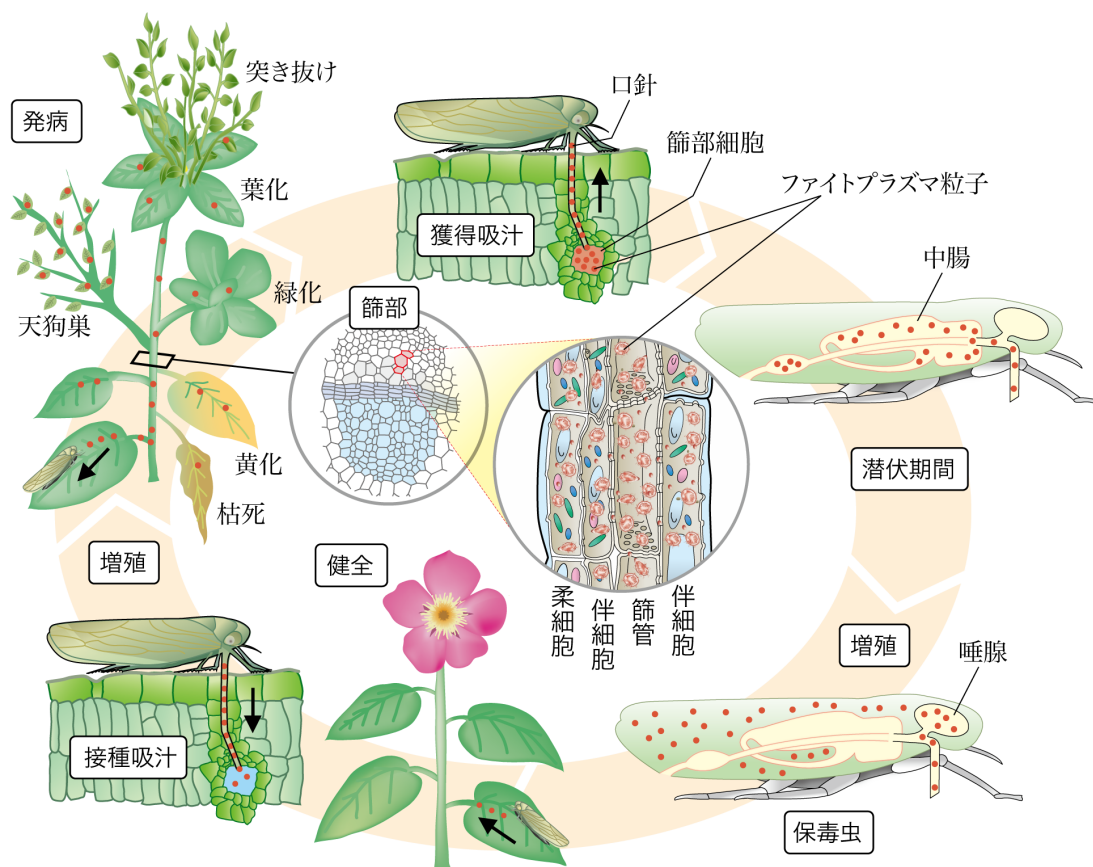


図1.2 ファイトプラズマの感染環

ファイトプラズマは植物の篩部から口針を介して篩部吸汁性昆虫に獲得され、昆虫の腸に入る（獲得吸汁）。吸汁されたファイトプラズマは昆虫体内の3つの障壁（腸、血体腔、唾腺）を越えて新たに植物に媒介される（接種吸汁）。新たな植物に侵入したファイトプラズマは増殖して植物体全身の篩部に感染し、様々な特徴的な症状を引き起こす（難波, 2017）。

1.1.2 ファイトプラズマの分類

分子系統学的にファイトプラズマ属はマイコプラズマ属やスピロプラズマ属など、細胞壁を欠きゲノムサイズが極めて小さい細菌からなる Firmicutes 門 Mollicutes 綱に分類される (図 1.3)。これまでにファイトプラズマ属には 40 以上の暫定種が報告されている (Namba, 2019)。各暫定種は International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) への掲載により認められ、その際には基準となる参考株 (reference strain) が定められる。新たな暫定種として認められる基準は、16S rRNA 遺伝子の 1,200 塩基以上の配列が、既存のいずれの参考株の配列とも配列同一性が 97.5%未満である場合、あるいは 97.5%以上であっても宿主範囲、媒介昆虫、病原性などが既存の暫定種と大きく異なる場合である (IRPCM, 2004)。

他の Mollicutes 綱の細菌 (マイコプラズマやスピロプラズマなど) の多くは人工培地上で単離および純粋培養が可能であるが、ファイトプラズマの純粋培養は困難である (Namba, 2019)。そのため、ファイトプラズマに対しては一般的な細菌の解析で行われているような生物学的性状の解析や、形質転換体の作出は困難であり、ゲノム情報に基づいた分子生物学的研究によりその性状や病原性の解析が行われている。

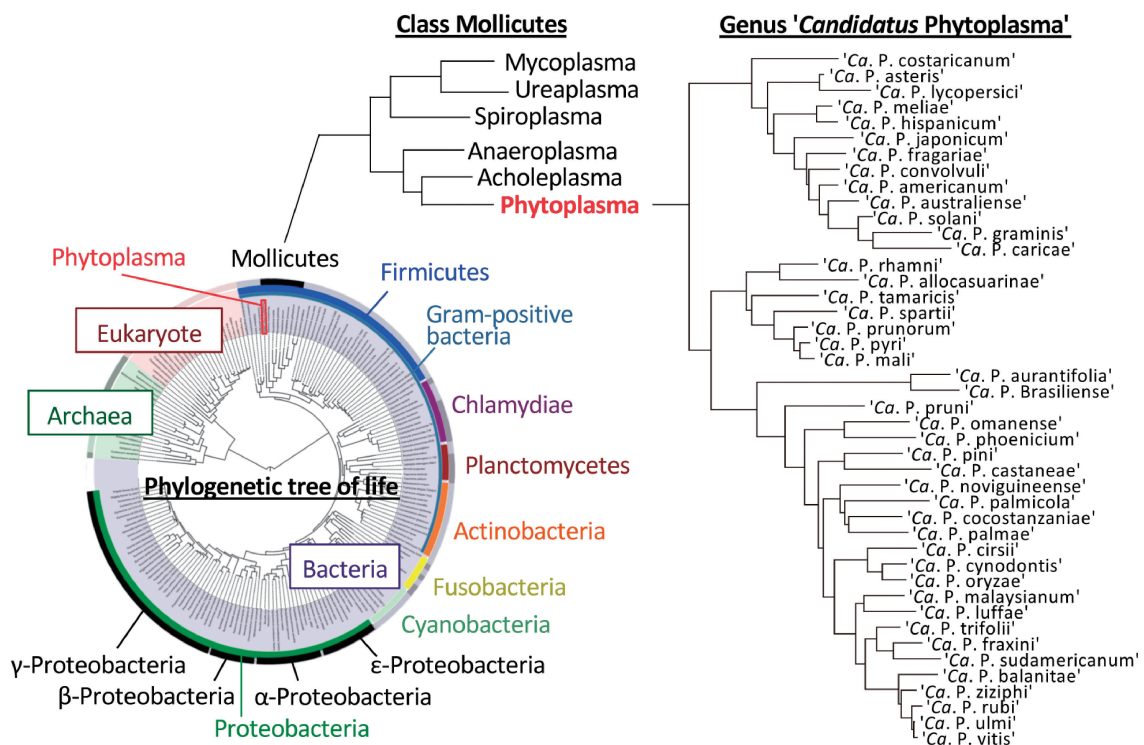


図 1.3 ファイトプラズマ属の系統学的位置と分類体系

ファイトプラズマ属はマイコプラズマと同じ Mollicutes 綱に属する。現在では 40 以上の暫定種に分類される (Namba, 2019)。

1.1.3 ファイトプラズマのゲノム解析

ファイトプラズマのゲノムは、2004 年にタマネギ萎黄病ファイトプラズマ弱毒株 ('*Ca. P. asteris*' OY-M strain) で初めて解読された (Oshima *et al.*, 2004)。OY-M は全長約 860 kbp の環状染色体に加え、2 つのプラスミドを有する (Nishigawa *et al.*, 2001, 2002a, 2002b)。他の Mollicutes 綱細菌と同様に染色体の GC 含量は 28% と低く、754 個の ORF の存在が予測された (Oshima *et al.*, 2004)。うち、257 個は既知の遺伝子と相同性が認められず、機能未知であった (Oshima *et al.*, 2004)。その後、次世代シーケンサーの登場によりファイトプラズマのゲノム解読は様々な種・系統で進み、2019 年 10 月現在では、7 系統の全ゲノム (Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013; Orlovskis *et al.*, 2017; J. Wang *et al.*, 2018) および、20 系統以上のドラフトゲノム配列 (Carle *et al.*, 2011; Saccardo *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013; Mitrović *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Kakizawa *et al.*, 2014; Pacifico *et al.*, 2015; Quaglino *et al.*, 2015; Lee, *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2016; Zamorano and Fiore, 2016; Cho *et al.*, 2019; Coetzee *et al.*, 2019; Music *et al.*, 2019) が報告されている。

これらのゲノム情報から、ファイトプラズマゲノムの特徴の 1 つとして、核酸再利用系、転写・翻訳、細胞膜合成、タンパク質輸送に関わる遺伝子を維持している一方で、多くの代謝系関連遺伝子を欠損していることが挙げられる (Oshima *et al.*, 2013)。これは、ファイトプラズマが植物体の中でも特に環境の安定した篩部組織に生息することにより、遺伝子の多くを失う退行的進化を遂げたためと考えられる。ファイトプラズマの人工培養系がこれまでに確立されていないことも、他の Mollicutes 綱細菌と比較して多くの代謝系関連遺伝子を失ったことに起因すると推察されている。

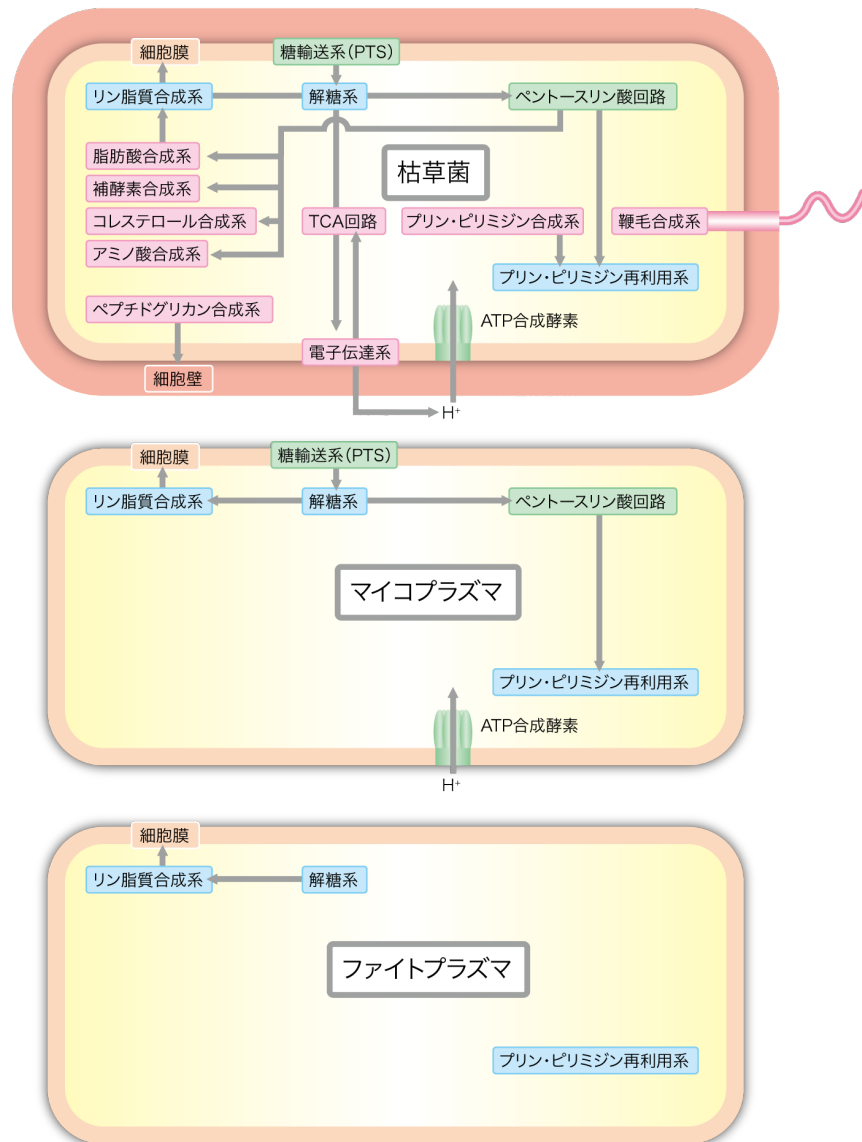


図 1.4 退行的進化を遂げたファイトプラズマの代謝経路

ファイトプラズマゲノムでは他の細菌がもつ代謝経路の遺伝子の多くが欠失している (難波, 2017)。青色: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、マイコプラズマ、ファイトプラズマで保存されている代謝経路。赤色: マイコプラズマ、ファイトプラズマで失われている代謝経路。緑色: ファイトプラズマで失われている代謝経路。

1.1.4 Potential mobile unit (PMU)

代謝経路に関わる遺伝子の欠失に加え、遺伝子の重複が多いこともファイトプラズマのゲノムの特徴として挙げられる。一般的な細菌のゲノム上に1コピーしか存在しない遺伝子群でも、ファイトプラズマのゲノム上には多コピー存在する場合がある (表 1.1)。OY-M 系統では、このような重複遺伝子群が主に4カ所の領域に集中し、全遺伝子の18%、全ゲノム領域の23%を占める (Jomantiene and Davis, 2006)。また、重複遺伝子群は5'-fliA-ssb-himA-hflB...tmk-dnaB-dnaG-tra5-3' のような規則性をもつ遺伝子クラスター (約10-20 kbp) を形成することが多い (図 1.5)。このクラスターは多くのファイトプラズマゲノム上に存在し、DNA 複製関連遺伝子ならびに転移酵素をコードする遺伝子を含むことから、複製しながらゲノム上を転移するトランスポゾン様の領域と推測され、potential mobile unit (PMU) と呼ばれている (Bai *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2013; Ku *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2019; Music *et al.*, 2019)。

PMU には、ゲノム構造の多様性を増加させる意義があると考えられている (Arashida *et al.*, 2008a)。PMU には繰り返し配列が多く、相同組換えや大規模な欠失が生じやすいためである。また、PMU の重複遺伝子が新しい機能を獲得する可能性や、PMU の転移に伴って遺伝子が破壊される可能性が指摘されている。Arashida らは、OY ファイトプラズマを由来とする OY-M 分離株 (弱毒株) と OY-W 分離株 (強毒株) のゲノムの差異は、上記に挙げたような PMU の転移による遺伝子の獲得や破壊によって生じたのではないかと考察している (Arashida *et al.*, 2008a)。

さらに、PMU には多数のエフェクターが保持されているという特徴がある (Sugio and Hogenhout, 2012)。エフェクターとは、宿主細胞内で直接作用する病原体のタンパク質のことであり、病原体が感染を成立させるために宿主環境を制御する役割をもつ (Wirthmueller *et al.*, 2013; 1.3.1 項)。「*Ca. P. asteris*」 Aster yellows witches' broom (AY-WB) 系統の場合、ゲノム上に予測される56個のエフェ

クターのうち、34 個が PMU に座乗している (Toruño *et al.*, 2010)。例えば、昆虫体内で機能すると考えられている SAP36 や、植物に形態異常を引き起こす SAP11 や SAP54 が PMU に座乗している (Sugio and Hogenhout, 2012; 3.1.2 項)。PMU は宿主体内で機能するエフェクターを多数保持することを通じて、ファイトプラズマの宿主生物への適応にも寄与していると考えられている。

遺伝子 ^a	COG ^b	コピー数	機能
<i>dam</i>	L	7	DNA アデニンメチラーゼ
<i>dnaB</i>	L	15	DNA ヘリカーゼ
<i>dnaG</i>	L	14	DNA プライマーゼ
<i>fliA</i>	K	13	RNA ポリメラーゼシグマサブユニット
<i>hflB</i>	O	24	ATP 依存型 Zn プロテアーゼ
<i>himA</i>	L	15	DNA 結合タンパク質 (ファージ組み込み宿主因子)
<i>sbcC</i>	L	5	DNA 修復に関するタンパク質
<i>smc</i>	D	6	細胞分裂関連タンパク質
<i>ssb</i>	L	17	一本鎖DNA 結合タンパク質
<i>tmk</i>	F	11	チミジル酸キナーゼ
<i>tra5</i>	L	12	トランスポザーゼ ^c
<i>uvrD</i>	L	8	UV による DNA 損傷の際に働く DNA ヘリカーゼ

表 1.1 OY-M ゲノムに複数コピー存在する遺伝子 (Arashida *et al.*, 2008a)

^a 遺伝子名は COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/index.html>) データベースから採用した。

^b COG による分類 D, 細胞分裂と染色体の分割; F, 核酸の輸送と代謝; K, 転写; L, DNA 複製, 修復, 組換え; O, 翻訳後修飾, タンパク質代謝, シャペロン

^c 挿入配列 (insertion sequence: IS) 様配列の構成要素

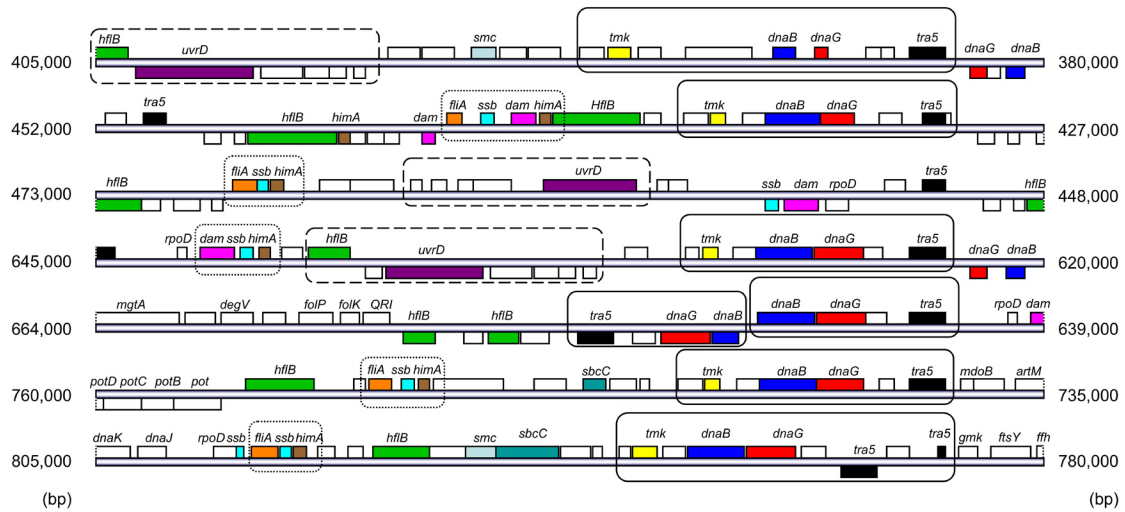


図 1.5 OY ファイトプラズマゲノム上に存在する potential mobile unit (PMU)

‘*Ca. P. asteris*’ OY-M のゲノム上に存在する PMU を示した。 *tmk-dnaB-dnaG-tra5* を含む PMU を実線で、 *hflB-uvrD* を破線で、 *fliA-ssb-himA* を点線で示している (Arashida *et al.*, 2008a)。

1.2 花の形態異常を伴うファイトプラズマ病

1.2.1 様々な植物における花の形態異常

ファイトプラズマ病の最大の特徴は、宿主植物に独特の形態異常を引き起こす点である。代表的な例として、ファイトプラズマは双子葉・単子葉植物含めた様々な被子植物に花の形態異常を引き起こすことが報告されている (図 1.6; Chaturvedi *et al.*, 2010; Musetti and Pagliari, 2019)。花の形態異常を呈する植物はその特徴的な外観から古来より珍重されてきたが、放置しておけば病気の感染源となるため商業利用には適さない。以下では、花のユニークな形態異常を引き起こす一方で、近年農業生産における被害が国内外で注目されているファイトプラズマ病 3 例 (アジサイ、ゴマ、イチゴ) について要約する。

アジサイ (*Hydrangea* spp.)

アジサイはアジサイ科アジサイ属の低木落葉樹である。アジサイは日本原産であるが、1789 年にイギリスに導入されて以後、フランス、ドイツ、ロシア、アメリカなど世界各国で栽培されている。花の形態異常がファイトプラズマ感染によるものと解明される以前は、花色や形態の希少さから、感染アジサイが希少品種として登録されていた事例もある。しかし、当該アジサイからファイトプラズマが検出されたため、現在では品種登録から除外されている。

葉化症状を呈するアジサイにファイトプラズマが感染していることは、ベルギー (Schneider and Seemüller, 1994a, b)、イタリア (Welvaert *et al.*, 1975; Bertaccini *et al.*, 1992)、カナダ (Hiruki *et al.*, 1994)、フランス (Cousin and Sharma, 1986)、アメリカ (Hearon *et al.*, 1976) で報告された。ベルギーで報告された HYDP 系統、およびイタリアで報告された HYPh 系統について 16s rRNA の

遺伝子配列が解読されたところ、いずれも '*Candidatus Phytoplasma asteris*' に属していた

(Schneider and Seemüller, 1994a, b; Bertaccini *et al.*, 1992)。

日本では 1994 年から 1995 年にかけて、栃木県、静岡県、大分県で採取された緑化または葉化症状を示すアジサイ、ガクアジサイ、ヤマアジサイにおいて、電子顕微鏡観察、PCR などにより、ファイトプラズマの感染が初確認された (Kanehira *et al.*, 1996)。これら 3 株のアジサイに感染したファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は互いに一致した一方で、海外でアジサイ葉化病の病原として報告されていた '*Ca. P. asteris*' を含む既知の種と相同性が低く、新暫定種 '*Ca. P. japonicum*' に属する Japanese hydrangea phyllody (JHP) 系統であると報告された (Sawayanagi *et al.*, 1999)。さらに、2011 年に群馬県で発生した葉化アジサイのファイトプラズマ種を同定したところ、'*Ca. P. asteris*' に属することが明らかとなり、本系統は Hydrangea phyllody (HP) 系統と命名されている (図 1.6A; Takinami *et al.*, 2013)。

ファイトプラズマが感染したアジサイは数年以内に枯死するため、重要病害として認識されている。アジサイは品種改良の際に有性繁殖を行なう以外は、挿し木による栄養繁殖による繁殖を行なうことが一般的である (川原田ら, 2010)。そのため、病気の母樹が用いられた場合は伝染源の拡散につながる。

ゴマ (*Sesamum indicum*)

ゴマはゴマ科の一年草であり、主にミャンマー、中国、インドなどで盛んに生産されている。ゴマは主に種子が食材や食用油などの油製品の材料とされるなど、広く利用される。特に、ゴマの生育の早さは、中間作物として有用である (Salehi *et al.*, 2017)。一方で、他の主要作物と比べて栽培体系が確立しておらず、生物学的あるいは非生物学的ストレス耐性をもつゴマの品種の開発が遅れている。生物学的ストレスの中でも、ファイトプラズマによる Sesame phyllody disease (SP) は熱帯、亜熱帯におけ

る重要病害であり、発病したゴマでは主に花の緑化、葉化、および突き抜け症状が生じるために種子が出来ず (図 1.6B)、大きな経済的損失につながる (Rao *et al.*, 2015)。SP は熱帯・亜熱帯地域を中心に様々な国 (韓国、インド、ミャンマー、イラン、オマーン、台湾、タイ、トルコ、ブルキナファソ、エチオピア、イラク、イスラエル、メキシコ、ナイジェリア、スーダン、タンザニア、ウガンダ、ベネズエラ) で報告されている (Salehi *et al.*, 2017)。これまでに、接ぎ木、ネナシカズラ、および4種のヨコバイ (*Hishimonus phycitis*, *Orosius albicinctus*, *O. cellulosus* Lindberg, *Circulifer haematocephus*) によって伝染することが報告されている (Salehi *et al.*, 2017)。葉化症状を呈するゴマからは互いに遠縁な関係にある4種のファイトプラズマ (*'Ca. P. asteris'*, *'Ca. P. aurantifolia'*, *'Ca. P. phoenicum'*, *'Ca. P. trifolii'*) が同定され (Nabi *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2017)、SP は様々なファイトプラズマによって引き起こされることが明らかになっている。

イチゴ (*Fragaria × ananassa*)

イチゴはバラ科の多年草であり、世界各地で栽培されている。中でもアメリカ大陸で広く栽培されて、米国とメキシコのイチゴ生産量は中国に次いでそれぞれ2位、3位である他、アルゼンチン、チリなど他の中南米諸国も重要なイチゴ生産国である。ファイトプラズマによるイチゴの花の形態異常は、中央ヨーロッパで1959年に初めて発見されて以降 (Blatný jun C and Blatný sen C, 1959)、カナダ (Gundersen *et al.*, 1996)、チェコ (Honetšlegrová *et al.*, 1996)、イタリア (Contaldo *et al.*, 2012)、アメリカ (Jomantiene *et al.*, 1998)、アルゼンチン (Fernández *et al.*, 2015)、メキシコ (Pérez-López and Dumonceaux, 2016)、ブラジル (Melo *et al.*, 2018)、チリ (Cui *et al.*, 2019) などラテンアメリカを中心に報告されている。花器官の形態異常を引き起こしたイチゴ果実は加工すらできなくなり、商業価値を失うため (図 1.6C; Pérez-López *et al.*, 2017)、これらのファイトプラズマ病はイチゴ生産における脅威となっている。これまでに、ヨーロッパとカナダでは *'Ca. P. asteris'* に

属するファイトプラズマが検出されている一方で、アメリカと南米で検出されたファイトプラズマは全て‘*Ca. P. asteris*’とは系統的に遠縁であり、一部は‘*Ca. P. hispanicum*’に属することが示された (Davis *et al.*, 2016; Pérez-López *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2019)。これらのファイトプラズマの媒介昆虫や伝染経路などは不明である。

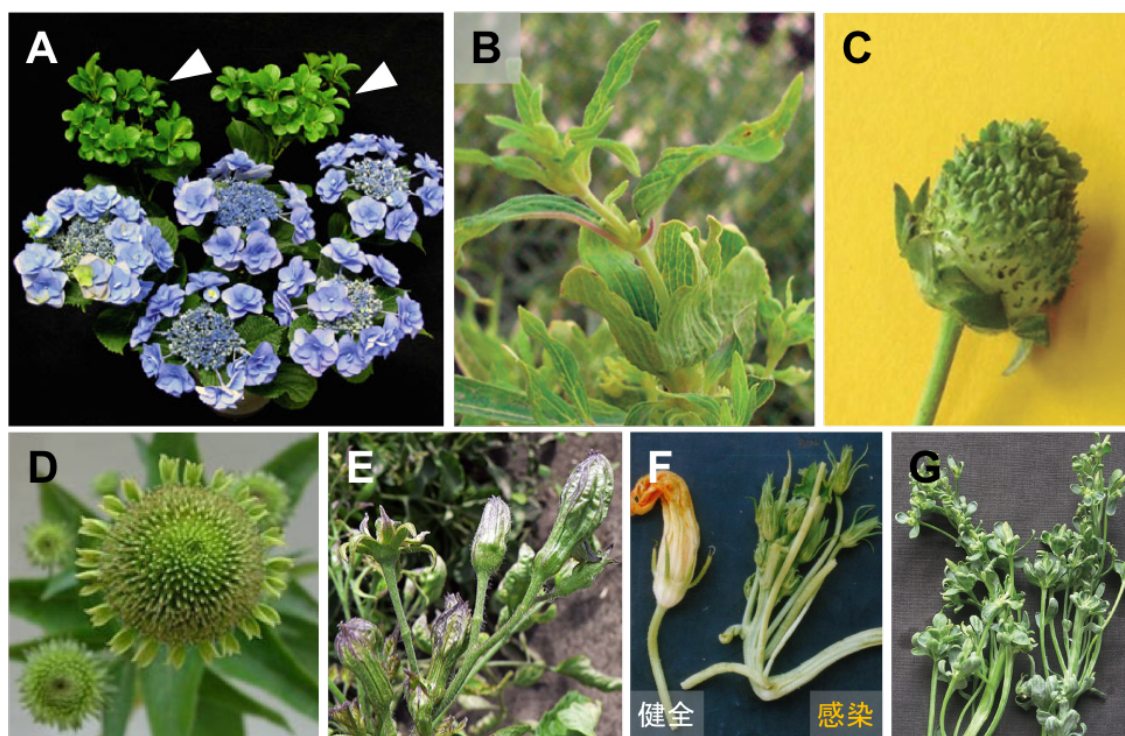


図 1.6 ファイトプラズマによる花の形態異常

(A-G) ファイトプラズマ感染により葉化症状を呈する植物。(A) アジサイ (白矢頭で示した株が葉化症状を呈する) (Takinami *et al.*, 2013)。(B) ゴマ (Akhtar *et al.*, 2008)。花弁が葉のような構造になり、雌しべから新たに茎を生じる。(C) イチゴ (Melo *et al.*, 2017)。(D) Purple coneflower (Fránová *et al.*, 2013)。(E) トマト (Navratil *et al.*, 2009)。(F) カボチャ (Salehi *et al.*, 2015)。(G) カリフラワー (Cai *et al.*, 2016)。

1.2.2 ファイトプラズマによる花器官の様々な形態変化

嵐田らは JHP ファイトプラズマに感染したアジサイの症状についてさらに詳細な観察を行った。緑化症状のアジサイは、がく片が緑化 (花器官が緑色を呈する) するだけで、他の花器官は正常である。葉化症状のアジサイは、がく片が葉化 (花器官が葉のような構造になる)、花弁・雄しべは緑化、柱頭は葉化し、子房は消失する。突き抜け症状を呈するアジサイは、葉化症状が見られたアジサイで見られた症状に加え、雌しべが茎頂に変化し、そこからまた葉化した花が伸長する (図 1.7)。以上より、ファイトプラズマ感染植物で見られる緑化、葉化、突き抜け症状は同じメカニズムで誘導され、程度の強弱により現れる病徴が、緑化<葉化<突き抜けへと変わる可能性が考えられた (Arashida *et al.*, 2008b)。また、各花器官別に見ると、がく片>雌しべ>花弁>雄しべ、の順に葉化が起きやすいことも示唆された。

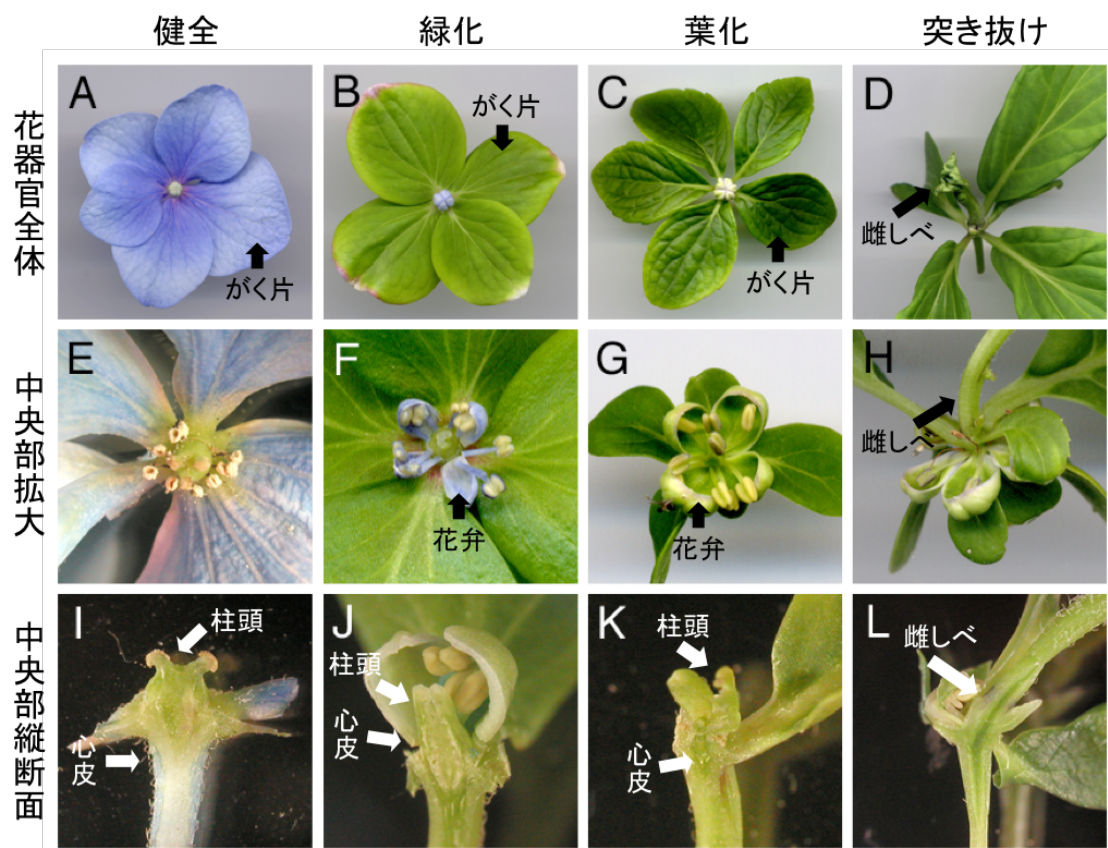


図 1.7 JHP ファイトプラズマ感染アジサイの花器官における形態観察

(A, E, I) 健全。(B-D, F-H, J-L) JHP ファイトプラズマ感染アジサイ。(B, F, J) 緑化症状を呈したアジサイ。がく片が緑化している。(C, G, K) 葉化症状を呈したアジサイ。がく片は葉化し、中央部は緑化している。(D, H, L) 突き抜け症状を呈したアジサイ。葉化症状に加えて、雌しべが茎頂へと変化している。(Arashida *et al.*, 2008b)。

1.3 ファイロジェンによる葉化誘導機構

1.3.1 葉化誘導因子ファイロジェンの同定

花器官への形態異常の原因を探るため、まず初めに宿主植物の生殖組織におけるファイトプラズマの局在が調べられてきた。その結果、ファイトプラズマは葉化した花器官の篩部組織に局在するものの、茎頂分裂組織にはいなかったことから、ファイトプラズマは篩部組織から間接的に茎頂分裂組織に影響を与えることで葉化を誘導していることが示唆された (Arashida *et al.*, 2008b)。そこで、ファイトプラズマから菌体外に放出され、宿主の細胞機能に直接作用するエフェクターを対象とした病原性因子の探索が行われてきた。

MacLean らはゲノム情報に基づき‘*Ca. P. asteris*’ aster yellows witches’ broom (AY-WB) 系統のエフェクターを一つずつシロイヌナズナに形質転換した。その結果、ファイトプラズマ感染植物と類似した葉化や緑化等の花器官の形態異常を呈するラインを見出し、原因タンパク質として secreted AYWB protein 54 (SAP54) を同定した。Maejima らは‘*Ca. P. asteris*’ onion yellows (OY) 系統にも当該タンパク質のホモログが保存され、葉化、緑化、突き抜け等の激しい花器官の形態異常を植物に誘導することを見出し、それをコードする遺伝子を *phytoplasmal effector causing phyllody symptoms 1 (PHYLI)* と命名した (Maejima *et al.*, 2014; 図1.8)。Yang らもまた‘*Ca. P. aurantifolia*’ peanut witches’ broom (PnWB) 系統のもつ PHYLI_{OY} ホモログ (PHYLI_{PnWB}) をシロイヌナズナに形質転換し、同様の花器官の形態異常を引き起こすことを明らかにした (Yang *et al.*, 2015)。以上のように、機能的に類似したホモログが複数種のファイトプラズマに見出されることから、これらはファイトプラズマに保存された遺伝子群であると考えられており、phyllody-inducing gene family (phyllgen: ファイロジェン) と総称されている (Maejima *et al.*, 2014)。

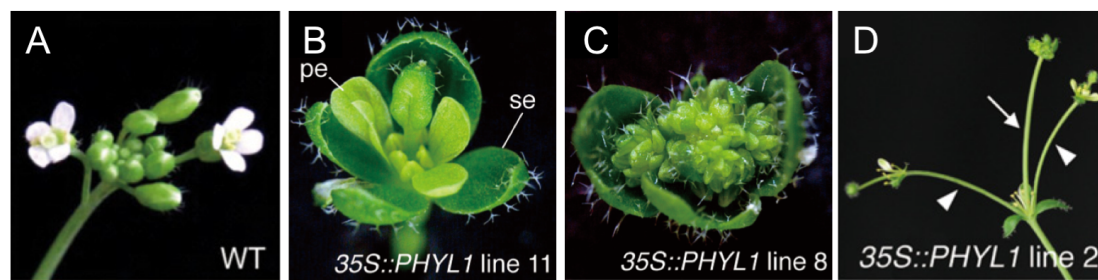


図 1.8 ファイロジェン発現植物の花の表現型

(A) 正常なシロイヌナズナの花。(B-D) $PHYL1_{ov}$ を形質転換したシロイヌナズナの花 (Maejima *et al.*, 2014)。形質転換体では、がく片 (se) と花弁 (pe) が葉のような構造に変化し (B)、分裂組織が増え (C)、雌しべや、各花器官の基部から先端に花をつけた茎が生じる (D)。(Maejima *et al.*, 2014)。

1.3.2 花の ABCE モデルと MADS ドメイン転写因子 (MTF)

一般的な被子植物の花は、がく片、花弁、雄しべ、雌しべの4つの花器官から構成されている。各花器官の形態形成には、A、B、C、E クラスに分類される MADS ドメイン転写因子群 (MADS-box transcription factors: MTFs) が関与している。MTFs には四量体を形成することで DNA と結合する性質があり、定められた組合せの MTFs の四量体が下流の遺伝子の発現を制御することで各花器官の形成を誘導する (カルテットモデル; Theissen and Saedler, 2001; Kaufmann *et al.*, 2005)。

葉化誘導因子ファイロジェンが同定される以前から、ファイトプラズマが感染した植物において、一部の MTF の発現量が変動することが報告されていた (Pracros *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011; Himeno *et al.*, 2011)。加えて、ファイトプラズマ感染植物が呈する花器官の形態異常は、A および E クラスに属する MTF の欠損変異体の表現型に類似していた。A クラスに属する *APETALA 1 (API)* を欠失したシロイヌナズナは二次花を形成する (図 1.9A)。また、近縁な MTF である *CAULIFLOWER (CAL)* をコードする遺伝子と *API* の二重変異体シロイヌナズナでは、花器官の分化が生じずに花芽が無数に生じる (図 1.9B)。E クラスに属する MTF はシロイヌナズナには4つ存在し (*SEPALLATA1-4: SEPI-4*)、*SEPI,2,3* の三重変異体シロイヌナズナは花弁、雄しべががく片に類似した形態を示すとともに、雌しべが茎に変化する (図 1.9C)。さらに、*SEPI,2,3,4* の四重変異体シロイヌナズナはがく片、花弁、雄しべが葉に類似した形態を示す (Ditta *et al.*, 2004)。シロイヌナズナだけでなく、E クラスに属する MTF の機能が喪失したペチュニアやガーベラでも同様の花の形態異常が観察される (図 1.9D-F)。以上の表現型は *PHYLL*₀₁ や *SAP54* の形質転換体で見られる花の形態異常と類似していることから (図 1.8)、ファイロジェンは A クラスや E クラスに属する MTFs の機能を阻害することで葉化を誘導する可能性が考えられていた。

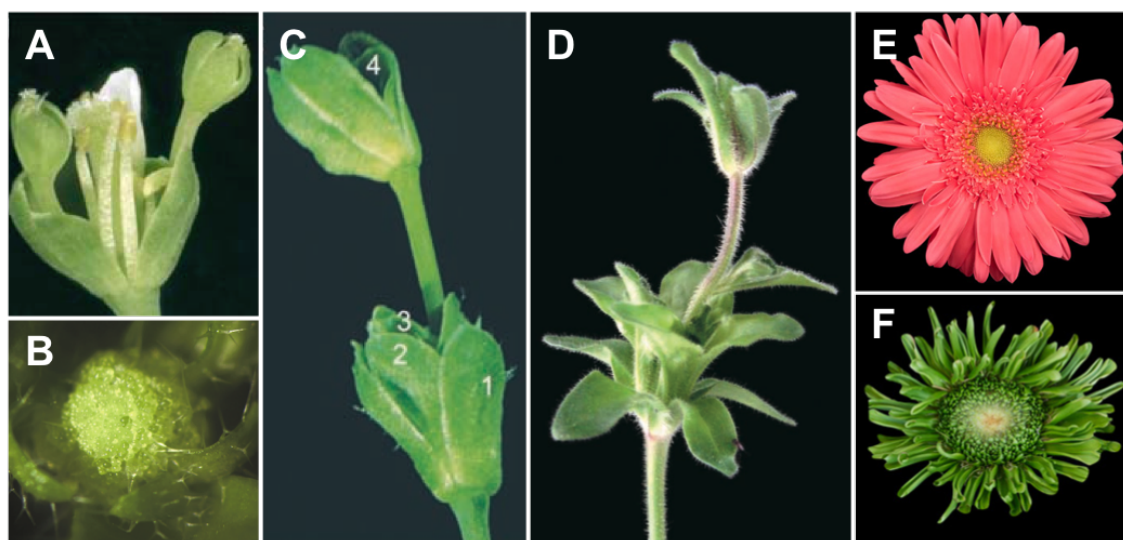


図 1.9 MTF の機能欠失による花の形態異常

(A) *ap1* 変異体シロイヌナズナ。二次花の形成されている (Gregis *et al.*, 2006)。 (B) *ap1/cal* 二重変異体シロイヌナズナ。花芽が増生している (Ditta *et al.*, 2004)。 (C) *sep1/sep2/sep3* 三重変異体シロイヌナズナ。花弁、雄しべの代わりにがく片 (2, 3) が形成され、雌しべの代わりに先端に新たな花をもつ茎の構造 (4) が生じる (Ferrario *et al.*, 2003)。 (D) E クラスに属する *FBP2* 遺伝子を欠失したペチュニア。 (C) と同様の形態異常が生じる (Eckardt *et al.*, 2003)。 (E) 正常なガーベラの花 (T. Zhang *et al.*, 2017)。 (F) ガーベラのもつ複数の SEP-like 遺伝子の機能が喪失したガーベラの花。葉のような構造が生じる (T. Zhang *et al.*, 2017)。

1.3.3 ファイロジェンによる標的MTFの分解誘導

そこで、PHYL1_{oy}とSEP3、AP1、CALの結合能について、yeast two hybrid (Y2H)法を用いて検証したところ、PHYL1_{oy}がこれらのMTFsに結合することが明らかになった (Maejima *et al.*, 2014)。続いて、PHYL1_{oy}がSEP3、AP1、CALの蓄積量に与える影響について、*in planta*でのタンパク質の一過的発現によって検証したところ、PHYL1_{oy}にはこれらのMTFsの蓄積量を減少させる活性があることが明らかになった (図1.10A)。一方で、PHYL1_{oy}はSEP3、AP1、CALの発現量には影響を与えないことが明らかになった (Maejima *et al.*, 2014)。さらに、形質転換体では、AP1とSEP3の下流で正に制御されるBクラス (Ng and Yanofsky, 2001; Wu *et al.*, 2012) に属するMTF (*APETALA 3: AP3*および*PISTILLATA: Pi*)の発現量が低下していることが明らかになった (図1.10B)。これらの結果から、PHYL1_{oy}はAおよびEクラスのMTFの分解を誘導し、その下流のBクラスMTFの発現を抑制することで花の形態形成に関わるMTFの機能を阻害することが示唆された。

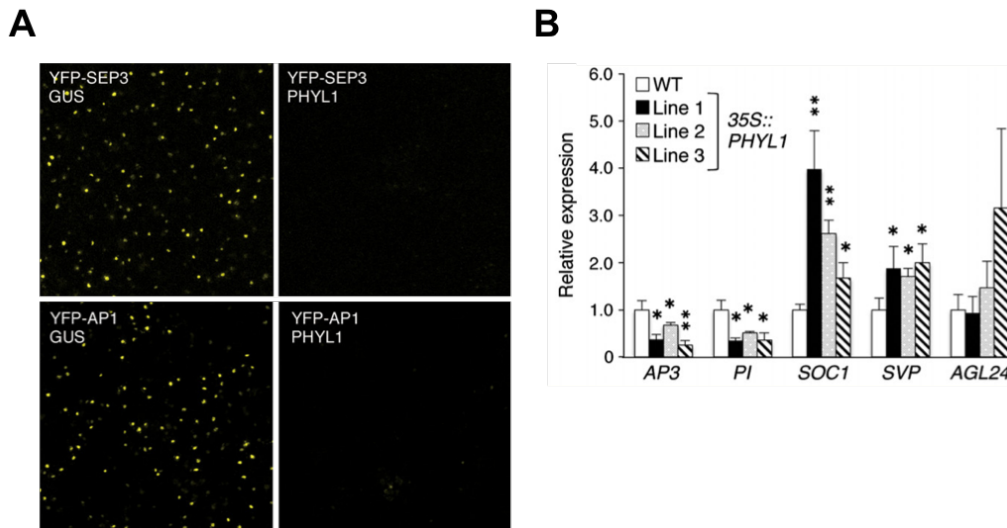


図 1.10 *In planta*での PHYL1 の MTFs の蓄積量に与える影響の検証

(A) SEP3、AP1 の N 末端側に YFP を付加し、*Nicotiana benthamiana* 葉にて GUS または PHYL1_{oy} と共発現させたところ、GUS 区で観察される YFP 蛍光が PHYL1_{oy} 区では観察されなかった (Maejima *et al.*, 2014)。(B) PHYL1_{oy} 形質転換シロイヌナズナにおける B クラスの MTF (AP3、PI) の発現変動。PHYL1_{oy} 形質転換シロイヌナズナでは AP3 と PI の発現量が低下しているが、それ以外の MTF (SOC1、SVP、AGL24) は低下しない (Maejima *et al.*, 2014)。

1.3.4 MTF の分解誘導におけるプロテアソーム系との関わり

プロテアソームは真核生物に広く保存された巨大なタンパク質複合体であり、細胞内で異常な構造をとるタンパク質や不要なタンパク質を選択的に分解する機能を担う (Saeki, 2017)。一般的に、プロテアソームの分解の標的となるタンパク質は複数のユビキチンからなるポリユビキチン鎖による修飾 (ポリユビキチン化) を受ける (Dantuna *et al.*, 2009)。ポリユビキチン化されたタンパク質は、直接的に、あるいは RADIATION SENSITIVE23 (RAD23) などのシャトルタンパク質を介してプロテアソームへと運ばれる (Saeki, 2017)。このようなシャトルタンパク質は、プロテアソームおよびユビキチンと相互作用するドメインを持つため、ユビキチン化タンパク質をプロテアソームに輸送すると考えられる (図 1.11A; Dantuna *et al.*, 2009)。酵母を用いた実験では、ユビキチン化タンパク質とプロテアソーム間の相互作用は、2つのシャトルタンパク質、RAD23 と DOMINANT SUPPRESSOR OF KAR2 (DSK2) に大きく依存していることが示されている (Tsuchiya *et al.*, 2017)。シロイヌナズナのゲノム上には4つの RAD23 アイソフォーム (RAD23A-D) が存在する (Farmer *et al.*, 2010)。

これまでにプロテアソーム阻害剤を用いた実験によって、ファイロジェンによる MTF の分解誘導はプロテアソーム系を介して行われていることが明らかとなっている (図 1.11B; Maejima *et al.*, 2014; MacLean *et al.*, 2014)。さらに、ファイロジェンは MTF だけでなく、シロイヌナズナのもつ4つの RAD23 アイソフォーム (RAD23A-D; Farmer *et al.*, 2010) のうち RAD23C/D に結合する性質があること、*rad23C/D* 二重変異体ではファイロジェンの葉化誘導能が著しく阻害されることも示された (図 1.11C-D; MacLean *et al.*, 2014)。

以上より、ファイロジェンによる標的 MTF の分解誘導はプロテアソーム系を介して行われ、RAD23 は分解誘導において重要な役割を果たす可能性が高い。ただし、MTF の分解誘導において

RAD23 タンパク質がどのように関わるか、またユビキチンなどその他の因子の関わりについての詳細は不明である。

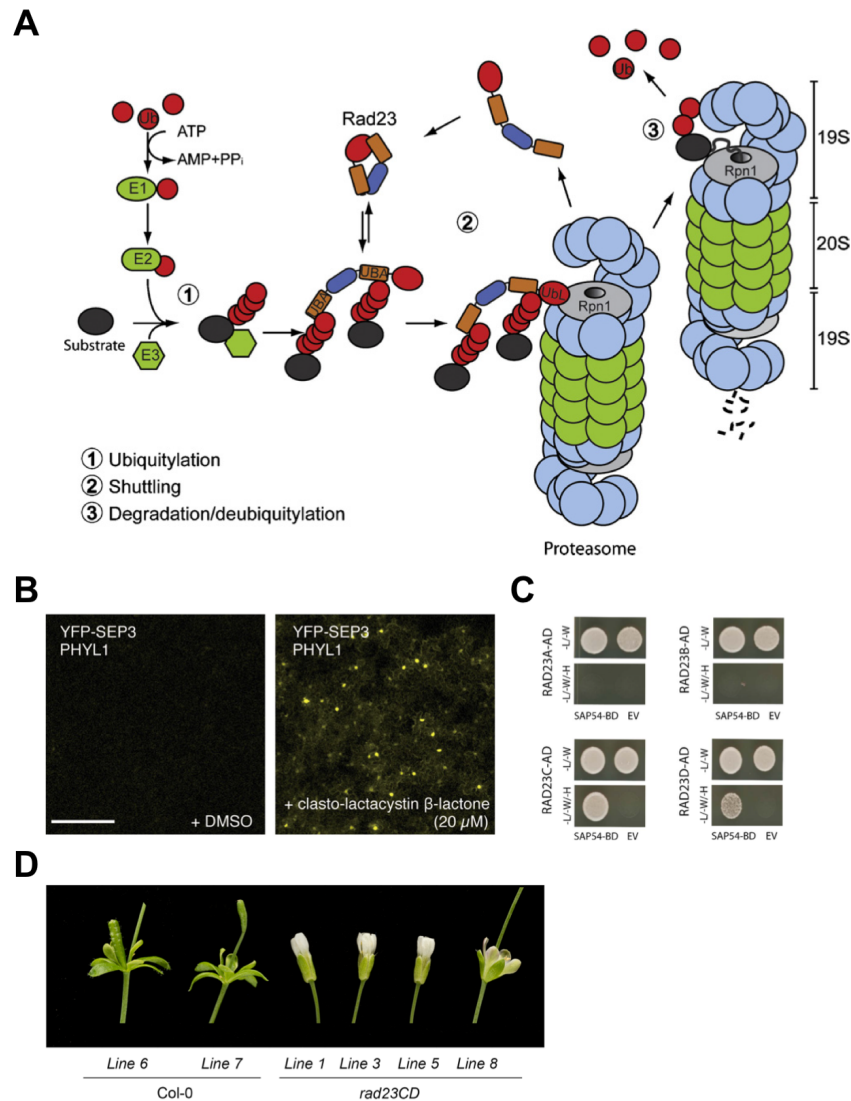


図 1.11 ファイロジェンの機能とプロテアソームとの関連

(A) プロテアソーム分解における RAD23 の機能。プロテアソーム分解の標的タンパク質は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、およびユビキチンリガーゼ (E3) によってユビキチン化を受ける。RAD23 はポリユビキチン化タンパク質と 19S プロテアソームサブユニットの regulatory-particle non-ATPase subunit 1 (Rpn1) に結合することでポリユビキチン化タンパク質をプロテアソームへと輸送する (Dantuna *et al.*, 2009)。(B) プロテアソーム阻害剤処理時におけるファイロジェン (PHYL1_{ov}) の SEP3 分解能 (Maejima *et al.*, 2014)。プロテアソーム阻害剤の 1 つである clasto-Lactacystin β -Lactone 処理時に YFP-SEP3 の蛍光が回復する。(C) 酵母内におけるファイロジェン (SAP54) とシロイヌナズナのもつ 4 つの RAD23 アイソフォーム (RAD23A-D) との結合能。SAP54 と RAD23C/D を発現する酵母は選択培地 (-L/W/H) 上で生育することから、両者は結合すると考えられる。(D) ファイロジェン (SAP54) を形質転換したシロイヌナズナの花。ファイロジェンを過剰発現しても *rad23C/D* 変異体では花の形態異常が軽微になる (MacLean *et al.*, 2014)。

1.3.5 ファイロジェンによる葉化誘導モデル

以上の知見から、ファイトプラズマによる葉化誘導モデルは次のように提唱されている。葉化誘導因子ファイロジェンは篩部細胞に局在するファイトプラズマによって分泌され、AクラスとEクラスのMTFに結合してプロテアソーム系を介した分解を誘導する。それに伴ってBクラスの遺伝子の発現量も低下する。結果、各花器官を形成するために必要なMTFsの機能を阻害し、葉化をはじめとした花器官の形態異常が誘導されると考えられる (図1.12)。

さらに、Kitazawaらはファイロジェンがアブラナ科のシロイヌナズナだけでなくナス科 (ペチュニア)、ゴマ科 (ゴマ)、キク科 (ヒマワリ) 植物にも花の形態異常を引き起こすことを明らかにしている (図1.13; Kitazawa *et al.*, 2017)。また、ファイロジェンが双子葉植物、単子葉植物を問わず複数の植物の花器官形成関連MTFの分解を誘導したことから、ファイロジェンは広く被子植物の葉化に関与することが示唆されている (Kitazawa *et al.*, 2017)。以上より、ファイロジェンは花器官形成に関わるMTFと結合・分解することで、広範な植物で観察される花器官の形態異常の誘導において重要な役割を担うと考えられる。

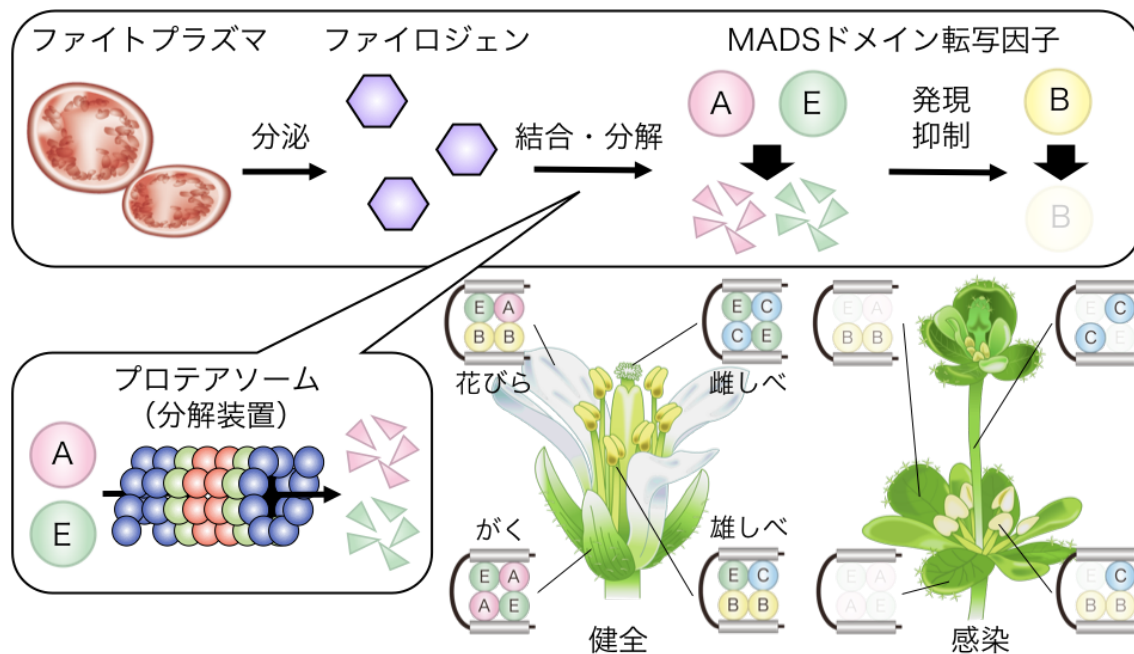


図 1.12 ファイロジェンによる葉化誘導モデル

ファイロジェンはファイトプラズマから分泌されたのち、A および E クラスの MTF と結合してプロテアソーム系を介した分解を誘導する。さらに、それぞれの MTF の下流で制御される B クラスの MTF の発現を抑制する。カルテットモデルでは、各 ABCE クラスの転写因子が図のように四量体を形成し、各花器官形成に関わる遺伝子の発現を制御すると考えられている (Theissen and Saedler, 2001)。図の黒い曲線は、ターゲット遺伝子のプロモーター領域を表す。四量体のうち各二量体がプロモーター領域中の CArG ボックスと呼ばれる DNA モチーフ (灰色) にそれぞれ結合すると考えられている (Kaufmann *et al.*, 2005)。ファイロジェンが A、B および E クラスの MTF の機能を阻害することで葉化が引き起こされると考えられる (難波, 2017)。

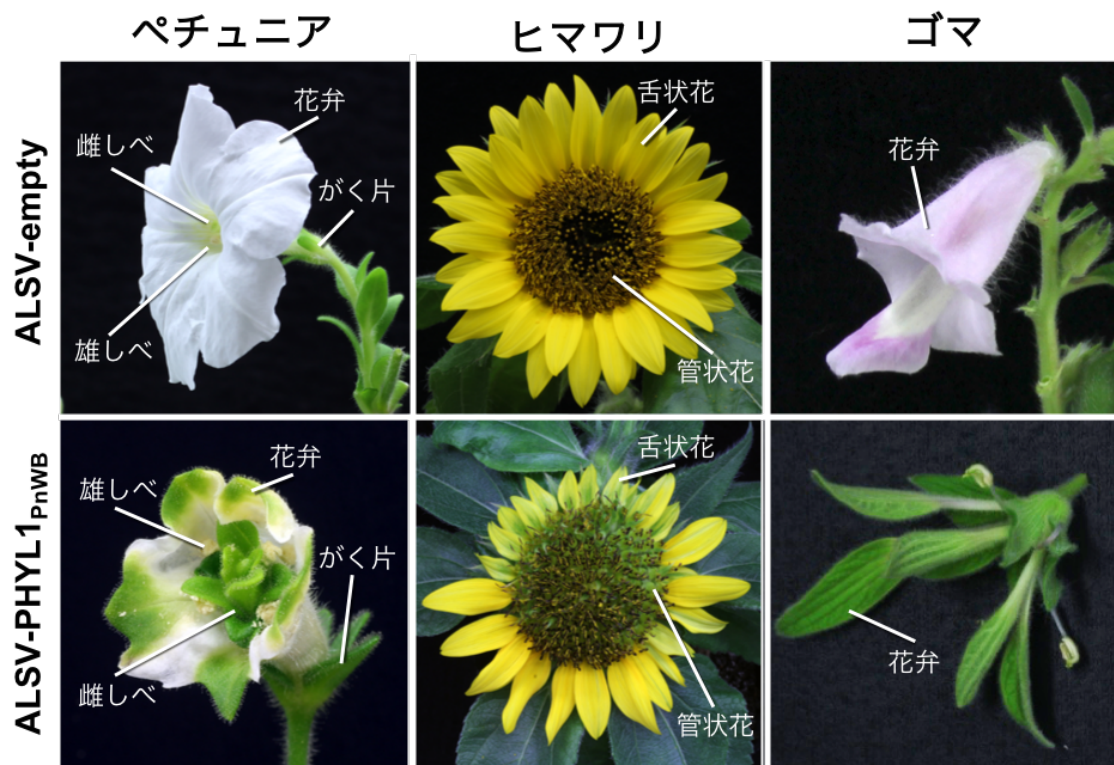


図 1.13 ファイロジェンは様々な植物の花の形態異常を引き起こす

ウイルス (apple latent spherical virus: ALSV) ベクターを用いた PHYL1_{PnWB} 発現植物の表現型 (Kitazawa *et al.*, 2017)。ALSV-empty 接種植物では花の形態異常は観察されない。ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種植物では葉化症状が観察される。

以上のように、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。発病した植物は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。ファイトプラズマのゲノム解読が進んだことをきっかけに、病原因子としてファイロジェンが同定され、その標的因子が明らかになるなど葉化病の発症機構が解明されつつある。そのため、ファイロジェン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。

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。そこで本研究ではまず、ファイロジェンの結晶構造解析を行い、ファイトプラズマのエフェクターで初めてその立体構造を決定し、 α ヘリックス構造が機能に重要であることを明らかにした(第2章)。次に、ファイロジェン間で保存された α ヘリックス上のアミノ酸モチーフに着目したファイロジェン遺伝子の新しい探索法を用いて多様なファイトプラズマからファイロジェンを同定した。同定したファイロジェンの配列・系統解析を行ったところ、ファイロジェンファミリーは4つの異なるグループ(Phyl-A, -B, -C, -D)に分かれ、ファイトプラズマ属内で種を越えて水平伝搬している可能性が示唆された(第3章)。最後に各グループのファイロジェンの機能を比較解析することで、葉化誘導能を持たないグループ(Phyl-B)を発見した。さらに phyl-B グループに特徴的なアミノ酸多型に注目することで、phyl-B グループに特徴的な1アミノ酸がファイロジェンの葉化誘導能を決定することを明らかにした(第4章)。

なお、本研究の第 2 章は以下の国際学術誌にて発表された。本研究の第 3 章および第 4 章の内容は国際学術誌に投稿中で、5 年以内に雑誌等で刊行予定である。

Iwabuchi N, Maejima K, Kitazawa Y, Miyatake H, Nishikawa M, Tokuda R, Koinuma H, Miyazaki A, Nijo T, Oshima K, Yamaji Y, Namba S. (2019) Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513: 952–957.

第2章 ファイロジェンの葉化誘導能に重要な α ヘリックス構造

2.1 序文

2.1.1 タンパク質の構造生物学的解析

構造生物学の基本概念は「理解するためには見る必要がある」という古典的な考え方に立脚している (Liljas *et al.*, 2012)。たとえ非常に小さい生体高分子であっても、その立体構造や運動性に基づいて生命現象を理解・推定する学問であり、現代の生命科学において柱となる分野の1つである。

ワトソンとクリックによって解明されたように、DNA 分子は通常、その配列情報に関わらず単純な二重螺旋構造をとる。その一方で、タンパク質はその不規則で多様な構造により、様々な機能を獲得する。タンパク質の構造の多様性については、1958 年に初めてミオグロビンの立体構造を明らかにした John Kendrew も次のような言葉で表現している (Branden and Tooze, 2000)。“おそらくこのタンパク質分子の最も顕著な特徴は、複雑なことと対称性を欠如していることである。その構造には、直感的に予測できる規則性がまったくなく、また、タンパク質構造に関するどんな理論が予測したものよりも複雑である”。以上のように、タンパク質の構造生物学的解析は配列情報では得られない三次元情報をもとに生化学的機能およびその作用機序を理解・推定する上で重要である。今日では、データベースの充実や構造解析技術の進歩により、タンパク質の構造生物学的な考え方や実験に容易にアクセス可能になった。

植物病原菌のエフェクターの多くは宿主の防御応答を抑制することで病原体の感染に重要な役割を果たすものの、既知のタンパク質とは配列類似性が低いため、その生化学的機能を推定することは難しい (Franceschetti *et al.*, 2017)。近年では、植物病原菌のゲノム情報が集積したこともあり、様々なエフェクターの立体構造情報をもとに、植物の防御応答関連因子との結合や、酵素活性など分子的な作用機序について研究が進められてきた (図 2.1: Wirthmueller *et al.*, 2013; Franceschetti *et al.*,

2017)。難培養性細菌であるファイトプラズマにおいても近年では様々な種あるいは系統のゲノム情報が集積し、病徴に関わるいくつかのエフェクターの機能が明らかになった。しかし、多くのファイトプラズマのエフェクターは既報の植物病原菌のもつエフェクターと配列の類似性をもたず、立体構造も不明だったため、配列情報のみでその生化学的機能とその作用機序を予測することは困難であった。

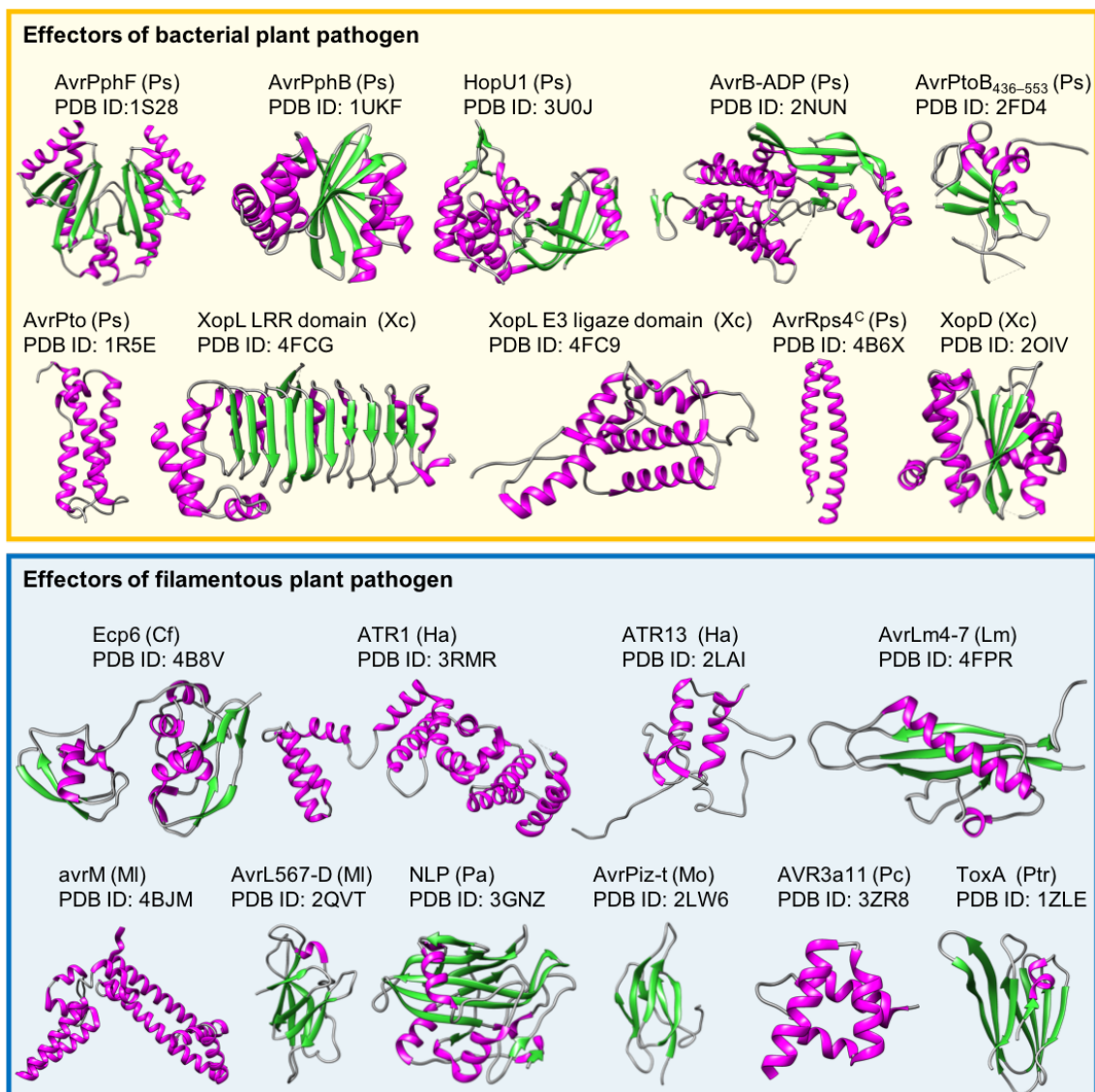


図2.1 植物病原菌のエフェクターの多様な立体構造

マゼンタ色は α ヘリックス、緑色は β ストランドを示す。Cf: *Cladosporium fulvum*, Ha: *Hyaloperonospora arabidopsidis*, Lm: *Leptosphaeria maculans*, Mi: *Melampsora lini*, Mo: *Magnaporthe oryzae*, Pa: *Pythium aphanidermatum*, Pc: *Phytophthora capsica*, PDB ID: Protein Data Bank ID, Ps: *Pseudomonas syringae*, Ptr: *Pyrenophora tritici-repentis*, Xc: *Xanthomonas campestris*, Xo: *Xanthomonas oryzae*. (Wirthmueller *et al.*, 2013; Franceschetti *et al.*, 2017)。

2.1.2 タンパク質の基本構造

タンパク質を構成するアミノ酸

タンパク質を構成するアミノ酸は20種類あり、炭素にアミノ基、カルボキシ基、側鎖、水素が結合し、側鎖の性質によって各アミノ酸の性質が決定する(河合ら, 2018)。疎水性アミノ酸 [アラニン (A), バリン (V), ロイシン (L), イソロイシン (I), プロリン (P), メチオニン (M), フェニルアラニン (F), トリプトファン (W)] は球状タンパク質の内側や膜タンパク質の膜中に多く見られ、側鎖の形成する疎水性相互作用に寄与している。親水性アミノ酸は球状タンパク質の表面に存在して水分子と接し、溶解性を付与したり、酵素の活性部位に位置して基質と水素結合を形成するなどの役割をもつ。中性の親水性アミノ酸にはセリン (S), トレオニン (T), チロシン (Y), アスパラギン (N), グルタミン (Q), システイン (C) が含まれる。酸性の親水性アミノ酸にはアスパラギン酸 (D), グルタミン酸 (E) が含まれる。塩基性の親水性アミノ酸にはリシン (K), アルギニン (R), ヒスチジン (H) が含まれる。グリシン (G) は側鎖をもたず、立体障害が少ないため、後述する二次構造間の折れ曲がり部位に局在することが多い。

基本的な二次構造

タンパク質の主鎖の特徴的な部分構造のことを二次構造という。規則的な二次構造として α ヘリックスと複数の β ストランドからなる β シートがあり、アミノ酸の種類によってどちらの構造を形成しやすいかが決まる。

α ヘリックスはアミノ酸の主鎖が右巻きの螺旋構造を形成し、側鎖が螺旋の外側に出ているような構造であり、最も一般的な二次構造である。 α ヘリックスの螺旋は1巻あたり3.6残基で構成されているため、1残基あたり 100° 回転する。そのため、ヘリックス軸を上から見下ろすとアミノ酸の側鎖

はヘリックス軸から 100° おきに突出する。その結果、アミノ酸配列が3-4 残基離れたアミノ酸残基の側鎖はヘリックスの同一側面から突き出ることになる。多くの α ヘリックスでは、 $[abcdefg]_n$ の形式の7 残基反復 (heptad repeat) の中で、a と d 残基を疎水性アミノ酸が占めている。このような性質はとりわけ、コイルドコイル構造を形成する α ヘリックスによく見られる (Lupas and Blassler, 2017)。また、親水性残基と疎水性残基が配列上で3-4 残基離れて繰り返し分布すると、 α ヘリックスの一側面が疎水性、その反対側の側面が親水性となる。このようなヘリックスは両親媒性ヘリックスと呼ばれ、ヘリックスどうしの相互作用を安定化させる性質がある。

β ストランドは主鎖が伸び切った構造をとり、 β ストランドが平行に2 本以上並び、隣接したアミノ酸どうしが水素結合により結合することで β シートが形成される。

2.1.3 ファイロジェンの標的となる MTF と RAD23 タンパク質の立体構造

MTF はタンパク質の構造から 2 つの系統 (タイプ I および II) に分類され、ファイロジェンは主にタイプ II の MTF に結合する (MacLean *et al.*, 2014)。タイプ II の MTF は MIKC と呼ばれる 4 つのドメイン [MADS DNA binding (M), intervening (I), keratin-like coiled-coil (K), C-terminal (C)] によって構成される (Kaufmann *et al.*, 2005)。M ドメインは核移行シグナルを持ち、DNA との結合特異性に、I ドメインは MTF どうしの特異的な二量体化形成に、K ドメインは MTF どうしの二量体および四量体化を形成するためのタンパク質間相互作用に、C ドメインは多量体化形成と転写調節を担う (Kaufmann *et al.*, 2005; Smaczniak *et al.*, 2012; Puranik *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2019)。特に、K ドメインを介した MTF の多量体化は花の形態形成に重要である (Hugouvieux *et al.*, 2018) が、ファイロジェンもまた K ドメインに結合することが知られる (MacLean *et al.*, 2014)。X 線結晶構造解析により、シロイヌナズナの E クラス MTF の 1 つである SEP3 の K ドメインは 2 つの α ヘリックス構造を有することが明らかとなっている (図 2.2A, B; Puranik *et al.*, 2014; Rümpler *et al.*, 2018)。K ドメインのアミノ酸配列では、疎水性および親水性残基が規則的に配置されており (図 2.2C, D; Rümpler *et al.*, 2018)、両親媒性の性質を有している。同構造解析によって明らかになった K ドメイン多量体の構造により、ヘリックス内部の疎水性残基が MTF の多量体化に関与していることが示唆されている (Puranik *et al.*, 2014)。

RAD23 は 4 つのドメイン、ubiquitin-like domain (UbL)、ubiquitin-associated domain (UBA) 1、XPC/Rad4 結合ドメインおよび UBA2 ドメインによって構成される (図 2.2E; Dantuma *et al.*, 2009)。RAD23 は UbL ドメインを介してプロテアソームと結合する一方で、UBA ドメインを介してポリユビキチン鎖と結合することで基質をプロテアソームへと運搬すると考えられている (Dantuma *et al.*, 2009)。これまでにファイロジェンが RAD23 のいずれのドメインに結合するかは不明である。

ファイロジェンの標的となる MTF (K ドメイン) および RAD23 については、図 2.2 の通り立体構造データが集積されている。その一方で、ファイロジェンの立体構造については報告がない。そこで、本章では X 線結晶構造解析によってファイロジェンの立体構造を決定することで、ファイロジェンによる MTF および RAD23 の認識機構について立体構造を通して分子レベルで理解することを目指した。

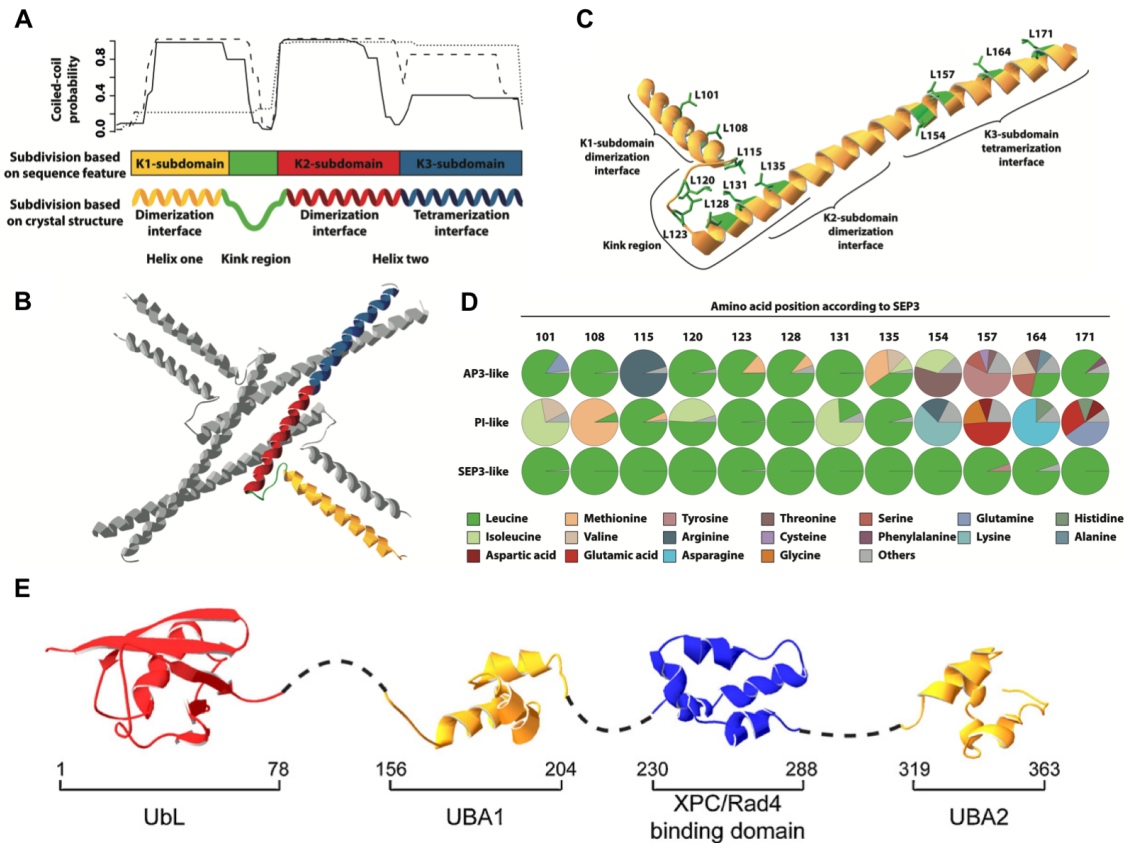


図 2.2 ファイロジェンが認識する MTF と RAD23 の立体構造

(A) SEP3 の K ドメインのコイルドコイル構造。K ドメインは 3 つのコイルドコイル構造 (K1、K2、K3 サブドメイン) に分けられる。K1 サブドメイン (黄色) は SEP3 の二量体化に関与する。K2 サブドメイン (赤) は SEP3 二量体の安定性に関与し、K3 サブドメイン (青) は SEP3 二量体同士の相互作用 (四量体化) に関与する (Rümpler *et al.*, 2018)。(B) SEP3 の K ドメインの四量体の立体構造 (PDB ID: 4ox0)。黄: ヘリックス 1 の二量体化相互作用面、緑: kink 領域、赤: ヘリックス 2 の二量体化相互作用面、青: ヘリックス 2 の四量体化相互作用面 (Rümpler *et al.*, 2018)。(C) SEP3 の K ドメイン単体の立体構造。分子間および分子内相互作用に関与しているロイシン残基を緑色で示した (Rümpler *et al.*, 2018)。(D) SEP3、AP3、および PI サブファミリーにおける、SEP3 の K ドメインの四量体の分子間および分子内相互作用に関与するロイシン残基に相同な部位のアミノ酸頻度 (Rümpler *et al.*, 2018)。(E) ヒトの RAD23 ホモログ (hHR23A) の各ドメインの立体構造。Ubiquitin-like domain (UbL) ドメイン (PDB ID: 1P98)、ubiquitin-associated domain (UBA) 1 ドメイン (PDB ID: 1IFY)、XPC/Rad4 結合ドメイン (PDB ID: 1TP4) および UBA2 ドメイン (PDB ID: 1DV0) (Dantuna *et al.*, 2009)。

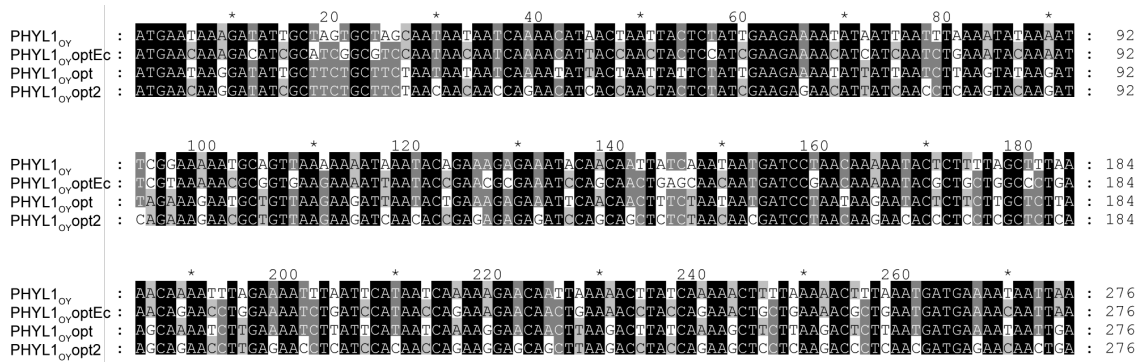
2.2 材料および方法

2.2.1 材料

遺伝子配列の合成

RAD23C (Genbank アクセッション番号 NM_001202864) の遺伝子配列は、GeneArt® Strings™ DNA Fragments (Thermo Fisher Scientific) に受託して合成した。

本研究では異なるコドン使用頻度を持つ4種類の PHYLI_{oy} (Genbank アクセッション番号 AB812838) 遺伝子配列を使用した。オリジナルのコドン使用頻度を持つ PHYLI_{oy} は pGBKT7 ベクターへのクローニングに用いた (2.2.6 項参照)。大腸菌のコドンに最適化して合成された PHYLI_{oy} (PHYLI_{oy}optEc) は遺伝子合成サービス (GenScript) により合成され、結晶構造解析に用いた (2.2.3 項参照)。シロイヌナズナのコドンに最適化して合成された PHYLI_{oy} (PHYLI_{oy}opt) は遺伝子合成サービス (Eurofin Genomics) により合成され、pGADT7 ベクターへのクローニングに用いた (2.2.6 項参照)。PHYLI_{oy}opt とは別にシロイヌナズナのコドンに最適化して合成された PHYLI_{oy} (PHYLI_{oy}opt2) は GeneArt® Strings™ DNA Fragments により合成され、その他の実験に用いた。最適化後の塩基配列は図 2.3 の通りである。依頼配列は塩基配列断片として合成され、PHYLI_{oy}opt2 には、pENTA ベクター (後述) にクローニングするため 5'端に 5'-AAGGAACCAATTTCAGTCATG-3' を、3'端に 5'-AAGCTGGGTCTAGAT-3' を付加した。

図2.3 最適化PHYL1_αの塩基配列 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

淡灰色、濃灰色、黒色の背景はそれぞれ50%、75%、100%以上の同一性を示す。

植物

本章で用いた植物はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* エコタイプ Col-0)、*N. benthamiana* である。シロイヌナズナの栽培は明条件 16 時間、暗条件 8 時間、23 度恒温に保たれた人工気象室で行った。種子をバーミキュライト上に直播し、ハイポネックスを添加した水を週に一回与えて育成した。*N. benthamiana* は実験期間を通じて 25°C・明条件 15 時間、20°C・暗条件 9 時間に設定した人工気象室において育成した。

2.2.2 遺伝子のクローニング・変異導入

pENTA ベクターへのクローニング

pENTA ベクターは、pENTR ベクター (Invitrogen) 由来の組み換え配列 (*attL* 配列カセット) を有し (Himeno *et al.*, 2010)、対となる組み換え配列 (*attR* 配列カセット) を有するベクターと配列カセットの相同組み換えが可能である (LR 反応)。本研究では目的の遺伝子を pENTA ベクターへクローニングしたのち、様々なベクターへの組み換えを行った。SEP1、SEP3 は既報のコンストラクトを用いた (Maejima *et al.*, 2014, 2015)。遺伝子合成した PHYLL_{OV} および RAD23C の pENTA へのクローニングについて、詳細な手順を以下に記載した。以降、特別な断りが無い限り、ライゲーション後の大腸菌への形質転換、プラスミド回収は本項に準じて行った。

1. pENTA ベクターを制限酵素 SalI-HF、EcoRV-HF を用いて切断した。組成は以下の通りであり、37°C で 16 時間反応させた。

10×CutSmart buffer (NEB)	5 µl
Sall-HF (NEB)	1 µl
EcoRV-HF (NEB)	1 µl
DNA + DW	43 µl
Total	50 µl

2. 0.7% (w/v) アガロースゲルを用いて反応液を泳動し、EtBr で染色後、UV 照射下で目的のバンドを切り出した。ゲルから illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE ヘルスケア) を用いて DNA 断片を精製した。精製は付属のマニュアルに従い行った。
3. ゲル精製後のベクターと合成遺伝子を混合し、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用いてライゲーションした。操作は付属のマニュアルに準じた。
4. ライゲーション後のサンプルに 10 倍量の大腸菌 DH5 α 株のコンピテントセル (ニッポンジーン) を加え、氷上で 15 分間静置した。
5. サンプルを 42°C で 45 秒間加熱した。
6. 氷上で 5 分間静置したのち、SOC 培地 [2% (w/v) Bacto-tryptone (Difco), 0.5% (w/v) Yeast Extract (Difco), 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose] を 300 µl 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。

7. 大腸菌を LB/Ampicillin 平板培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) に塗抹して 37°C で一晩静置した。
8. 形成されたコロニーを爪楊枝でつつき、YT/Ampicillin (1.6% Bacto tryptone, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) 液体培地中で 37°C、16 時間振盪培養し、アルカリ SDS 法でプラスミドを精製した。

PHYL1_{oy} 遺伝子の変異導入

pENTA ベクターにクローニングした PHYL1_{oy} 遺伝子の変異導入は GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用いて、キットに付属のマニュアルに従って行った。使用したプライマーは表 2.1 に示した。

塩基配列決定

得られたプラスミドの塩基配列は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて行った。詳細な手順は以下の通りである。プラスミドを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) およびベクター上に設計されたプライマー M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')、M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') を用いてシーケンス反応を行った。96°C 3 分、(96°C 15 秒, 48°C 30 秒, 60°C 4 分) を 1 サイクルとして 25 サイクルの反応を行い、4°C で保存した。次いで、Sephadex G-50 Superfin (GE ヘルスケア) 適量と蒸留水 330 μL をウェルに加え、2 時間静置した後に 910 $\times\text{g}$ で 5 分間遠心し、水分を除去することに

より作成した96穴カラムを用いてシーケンス反応産物を純化した。カラム精製後のシーケンス反応産物は減圧乾燥し完全に乾燥させた。乾燥させたサンプルにHi-Di Formamide (ABI) 15 μ Lを加えた後95°Cで5分間反応させ、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列はシーケンスアセンブリ用のソフトウェア ATGC ver. 4.3.5 (GENETYX) を用いて解析した。

表2.1 第2章で使したプライマー (Iwabuchi *et al.*, 2019)

プライマー名	配列 (5'→3')	標的遺伝子	目的	
AD_SEP1_F	CCAGTACCAGATTACGCTCATATGGGAAGAGGAAGAGTA	SEP1	Y2H (pGADT7 vector)	
AD_SEP1_R	ATGCCACCCGGGTGGAATTCTCAGAGCATCCATCCTGG	SEP1		
pENTA_to_pGADT7_R	TGCCACCCCGGGTGGAAGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAT	genes cloned in pENTA		
Rad23C_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGAAGATATTTGTGAAAACCTCTC	Rad23C		
Phyl1_to_pGADT7	ACCAGATTACGCTCATATGAATAAGGATATTGCTTCTGC	PHYL1 _{ov} opt1	Y2H (pGBKT7 vector)	
SEP3-BDF	AGAGGAGGACCTGCAAATGGGAAGAGGGAGAGTAGA	SEP3		
SEP3-BDR	CGACGGATCCCCGGGCCCAATAGAGTTGGTGTCAT	SEP3		
PHYL1opt2_GBK_F	AGAGGAGGACCTGCATATGAACAAGGATATCGCTTC	PHYL1 _{ov} opt2		
PHYL1opt2_GBK_F	ACGGATCCCCGGGAATTCTCAGTTGTTCTCATCGTTG	PHYL1 _{ov} opt2	pEarleyGate202 発現ベクターの改変	
pEG202-3Flag-F	ATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGACGACGATGA CAAGATCACAGTTTGTACAAAAAAGC	pEarleyGate202		
pEG202-3Flag-R	GATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGT CCATGGTAATTGTAATGTAATTGTAATG			
OYW_K28KAA_F	GAGAACATTATCAACCTCAAGGCTGCTTACAAGATCAGAA AGAACGC	PHYL1 _{ov} のアラニン挿入変異体作製		
OYW_K28KAA_R	GCGTTCTTTCTGATCTTGTAAAGCAGCCTTGAGGTTGATAAT GTTCTC			
OYW_L68LAA_F	CAGAACCTTGAGAACCTCGCTGCTATCCACAACCAGAAG GAG			
OYW_L68LAA_R	CTCCTTCTGTTGTGGATAGCAGCGAGGTTCTCAAGGTTCT G			PHYL1 _{ov} opt2
OYW_P53PAA_F	GCTCTCTAACACGATCCTGCTGCTAACAAGAACCCTC CTC			
OYW_P53PAA_R	GAGGAGGGTGTCTTGTTAGCAGCAGGATCGTTGTTAGAG AGC			
OYW_Q75QAA_F	CAACCAGAAGGAGCAGGCTGCTCTTAAGACCTACCAGAA GC			
OYW_Q75QAA_R	GCTTCTGGTAGGTCTTAAGAGCAGCCTGCTCCTTCTGGTTG			
2A-PHYL1 _{ov} opt2F	TCCAACCCTGGGCCCATGAACAAGGATATCGCTTC	PHYL1 _{ov} opt2	植物体でのタンパク質発現	
PHYL1 _{ov} opt2R	GTCCTTAAATCCCTAGTTGTTCTCATCGTTGAGGG	PHYL1 _{ov} opt2		
pTRV2-OY-F	CGATACGTCCTAATCCCATGAACAAGGATATCGTTCTG	PHYL1 _{ov} opt2		
pTRV2-1173-1193F	TAGGGATTAAAGGACGTGAAC	TRV		
pTRV2-2A-F	CGATACGTCCTAATCCCAATTTGACCTTCTTAAGCT	2A		
2A-R	GGGCCAGGGTTGGAATCGA	2A		
2A-sGFP-F	AGTCCAACCCTGGGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	sGFP		
pTRV2-sGFP-R	ACGTCTTAAATCCCTACTTGTACAGCTCGTCCA	sGFP		
trv-F	GCTGCTAGTTTCATCTGCAC	TRV	ウイルス感染および挿入配列の保持の確認	
trv-R	GCACGGATCTACTTAAAGAAC			

2.2.3 タンパク質精製および結晶化

PHYLI_{oy}の結晶の調製は(株)プロテインウェーブに依頼した。以下に詳細を述べる。5'および3'末端に制限酵素 BamHI および SalI 部位を有する PHYLI_{oy}遺伝子 (図 2.1; PHYLI_{oy}optEc) を、これらの制限酵素を用いて pGEX-4T-1 (GE ヘルスケア) にクローニングした。クローニングしたプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) (NEB) に形質転換し、PHYLI_{oy}を大腸菌中で大量発現させた。大量培養後に集菌・凍結保存された菌体を氷上で融解し、溶菌バッファー (50 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT) を加えて懸濁した。さらに 1/1000 量の protease inhibitor を溶菌バッファーに添加して超音波破碎を行った。超音波破碎後の Lysate を遠心分離 (40,000 rpm, 60min, 4°C) して上清を回収した。次に平衡化バッファー [50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol] を加え、GSTrap FF column (GE ヘルスケア) に上清をアプライした。その後、平衡化バッファーでカラムを洗浄し、5 mM の還元型 glutathione を含む溶出バッファー [50 mM Tris-HCl pH8.2, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol] で目的タンパク質を溶出した。溶出液をスピナラム VIVASPIN 20 (Sartorius) を用いて濃縮したのち、Thrombin protease (GE ヘルスケア) を加えて GST 融合タンパク質の Thrombin 認識配列を切断することで N 末端側の GST を除去した。その後、GST 除去後の画分の透析を行い、濃縮された溶出画分に含まれる還元型 glutathione 濃度を下げた。透析後の溶出液を再度 GSTrap FF column にアプライし、GST が除外された目的蛋白質を回収した。次に、希釈バッファー [20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol] を加えて NaCl 濃度を 2 倍希釈したのち、さらに Resource Q column (GE ヘルスケア) にアプライした。その後、目的蛋白質を回収した後、結晶化バッファー (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 5 mM DTT) による透析でバッファー置換後、タンパク質濃度が 10 mg/mL になるまで濃縮した。1 ml のタンパク質溶液を同容量の沈殿剤緩衝液 [100 mM sodium citrate pH5.0, 2.1 M (NH₄)₂SO₄, 250

mM MgCl₂, 2.5% (v/v) glycerol] と混合し、沈殿剤緩衝液に対して蒸気拡散させ、3 日後に 293K で棒状結晶を得た (図 2.4A)。

2.2.4 ヨウ素化誘導体作製および構造決定

PHYLI_{oy}の結晶構造解析を行う上では、構造既知の分子構造を利用する分子置換法 (Molecular Replacement Method) が適用できなかったため、SAD 法 (Single Anomalous Dispersion Method) を適用して構造解析を行った。SAD 法で構造解析を行うためには、原子の異常分散効果の大きな重原子を結晶内に導入する必要があるが、ここではヨウ素分子 (I₂) を成長後の結晶にドーピングする蒸気拡散ヨウ素ラベル法 (Vaporizing Iodine Labeling: VIL) および過酸化水素-蒸気拡散ヨウ素ラベル法 (Hydrogen Peroxide VIL: HYPER-VIL) 法を適用した (Miyatake *et al.*, 2006)。1 mL のヨウ素溶液 (0.67 M KI, 0.47 M I₂) を 15 時間結晶化ウェルに封入した (図 2.4B)。結晶の色が暗黄色に変わった後、ヨウ素粒子はピペッティングにより除去した。さらにヨウ素化を促進するため、1 mL の 30% 過酸化水素液滴も結晶化ウェルに封入した。結晶を凍結保護緩衝液 [100 mM sodium citrate pH5.0, 2.1 M (NH₄)₂SO₄, 400 mM MgCl₂, 15% (v/v) glycerol] に移した。ヨウ素標識結晶は、ビームライン PX-III (Swiss Light Source) で最大解像度 2.4 Å まで X 線を回折した。回折データは XDS パッケージを使用して処理した (Kabsch *et al.*, 2010)。この結晶は空間群 P2₁2₁2₁ (斜方晶系) に属し、セルパラメータは $a = 42.843 \text{ \AA}$ 、 $b = 60.664 \text{ \AA}$ 、 $c = 124.874 \text{ \AA}$ だった。データは PHENIX パッケージによって分析した (Adams *et al.*, 2010)。ヨウ素部位の初期検索とそれに続く I-SAD フェージングは AutoSol ウィザードを使用して行った (Terwilliger *et al.*, 2009)。初期モデルは自動構築ウィザードによって構築した (Terwilliger *et al.*, 2008)。プログラム Coot (Emsley *et al.*, 2004) を用いて、モデルの再構築と修正を行った。すべての立体構造の図はプログラム ICM (Abagyan *et al.*, 1994) または UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) を使って描いた。DALI サーバを使用して構造が類似しているタンパク質を検索した (Holm *et al.*, 2010)。

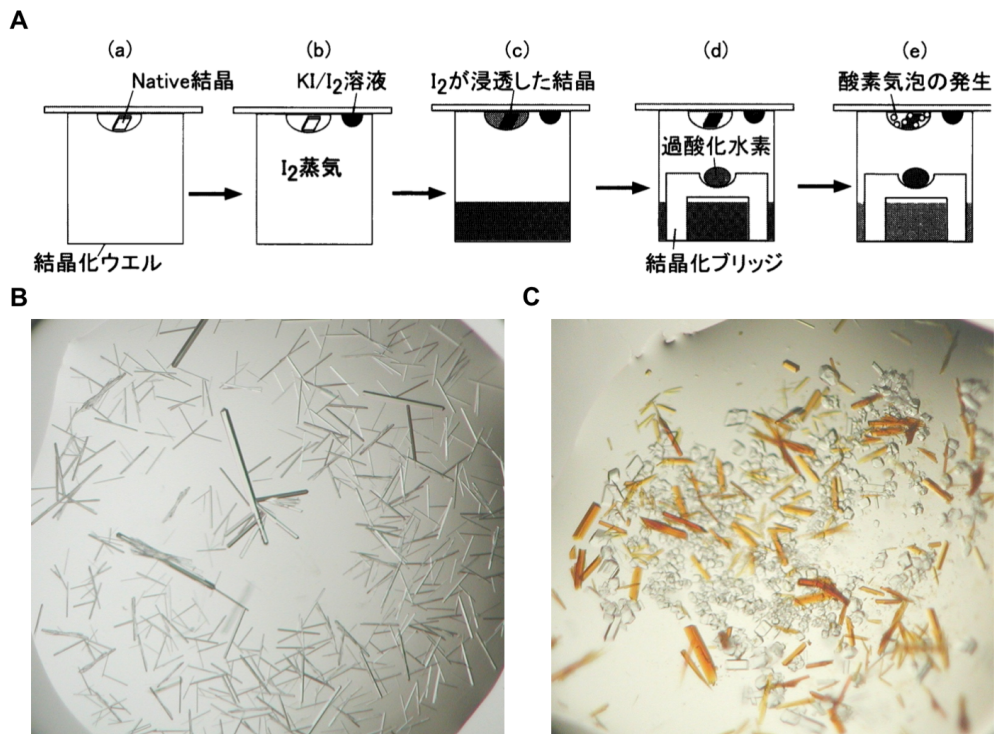


図2.4 本研究で得られたPHYL1_{OY}の結晶と作製方法

(A) VIL法 [(a)-(c)] およびHYPER-VIL法 [(d)-(e)] の概略図 (宮武 2007)。(a) ハンギングドロップ蒸気拡散法により調製された目的結晶。(b) 少量のKI/I₂溶液ドロップをカバーガラス上に乗せ、結晶化ウエル内に封入する。ただちに、ヨウ素 (I₂) 蒸気が結晶化ウエル内に蒸気拡散する。(c) I₂が目的結晶内に徐々に浸透する。通常この際、結晶に褐色の着色が見られる。その後、I₂がチロシンと共有結合を形成、あるいはヨウ素陰イオンI⁻がイオン結合をするために必要な時間、温度などの条件は結晶によって異なる。(d) さらにヨウ素化反応を進行させたい場合には、触媒として30%過酸化水素を図のように結晶化ウエル中に封入する。過酸化水素が蒸気拡散し、結晶化ドロップに浸透する。(e) 結晶化ドロップ中に酸素気泡が発生し、結晶が酸化的環境におかれ、チロシンのヨウ素化反応が促進される。。(B) I₂ドーピングする前の斜方晶系の結晶写真。(C) I₂ドーピングした結晶の写真。ドーピング時間は15時間。ドーピングされない透明な結晶は硫安の析出結晶である。結晶化ドロップ中には酸素気泡が発生している。

2.2.5 配列解析および構造予測

ファイロジェンファミリーのアミノ酸配列のマルチプルアライメントはMUSCLE アルゴリズムを用いてMEGA7で作成した (Kumar *et al.*, 2016)。ファイロジェンファミリーに共通した二次構造の予測にはソフトウェアPROMALS3Dを使用した (Pei *et al.*, 2008)。PHYLI_{0Y}の立体構造に基づく他のファイロジェンの構造予測にはI-TASSER サーバーを使用し、予測されたモデルの中で最も信頼度 (confidence score: C score) が高いものを選抜した (Y. Zhang *et al.*, 2008)。 α ヘリックスの螺旋軸に垂直な断面に各アミノ酸残基の位置を投影したモデル (Helical wheel モデル) は各タンパク質のアミノ酸配列をもとにAdobe Illustrator CS4を用いて作製した。

2.2.6 Yeast two hybrid assay (Y2H)

Y2H法はタンパク質間相互作用を解析するために広く用いられる手法であり、細胞内で2つのタンパク質を発現させた酵母の選択培地上での生育程度を観察することで、相互作用の有無を検証する。本項では酵母の転写因子GAL4が2つのドメイン [DNA-binding domain (BD), activation domain (AD)] に分割可能なことを利用し、両ドメインをファイロジェン、または宿主因子に付加したコンストラクトを酵母細胞内で発現させ、GAL4の機能が回復するかを試験し、タンパク質間相互作用を検証した。

タンパク質発現用コンストラクトの作出

AD-SEP3、BD-PHYLI_{0Y}融合タンパク質は既報のコンストラクトを使用した (Maejima *et al.*, 2014)。AD-SEP2⁸⁷⁻²²⁰ (87-220 アミノ酸)、SEP4⁵⁷⁻²⁵⁷ (57-257 アミノ酸) 融合タンパク質はMate &

Plate cDNA library of *A. thaliana* (Takara) より得た。PHYL1_{oy}、PHYL1_{oy} 変異体、SEP3 を pGBKT7 ベクター (Clontech) にクローニングし、BD ドメインを付加した。同様に PHYL1_{oy}、SEP1、RAD23C を pGADT7 ベクター (Clontech) にクローニングし、AD ドメインを付加した。詳細な手順は以下の通りである。

1. 各遺伝子配列を PCR により増幅した。鋳型には各遺伝子配列がクローニングされた pENTA ベクター (2.2.2 項に記載) を用いた。使用したプライマーは表 2.1 に記す。
2. 2.2.2 項での pENTA へのクローニング操作に準じ、ベクター、インサートの制限酵素処理、ライゲーション、大腸菌への形質転換、プラスミド回収を行った。使用した制限酵素は NdeI-HF (NEB)、EcoRI-HF (NEB) であり、メーカー推奨のバッファーを用いて、2.2.2 項と同様に行った。また、pGBKT7、pGADT7 の形質転換された大腸菌の選抜にはそれぞれ Kanamycin、Ampicillin を用いた。
3. 精製したプラスミドにインサートが挿入されているかどうかを、2.2.2 項での pENTA へのクローニング操作に準じ、確認した。シーケンス時に用いたプライマーは、ベクター上に設計されたプライマーである T7F (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、AD3'R (pGADT7 ベクター用; 5'-CTGTGCATCGTGCACCATCT-3')、BD3'R (pGBKT7 ベクター用; 5'-TTTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC-3') である。

酵母への形質転換・選抜

各 pGADT7 コンストラクトと pGBKT7 コンストラクトが 1 種類ずつ形質転換された酵母を、酢酸リチウム法によって作出した。酵母は *Saccharomyces cerevisiae* AH109 株あるいは Y2H Gold 株 (Clontech) を用いた。操作は Clontech 社によってオンラインで公開されている Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 kit (<https://www.med.upenn.edu/robertsonlab/assets/user-content/documents/Matchmaker%20Two-Hybrid%20System.pdf>) に従い、酢酸リチウム法により pGADT7 と pGBKT7 ベクターを同時に形質転換したのち、BD、AD の相互作用を検証した。形質転換体の選抜にはロイシン (L) とトリプトファン (W) を欠く合成培地 [SD/-LW] を用いた。タンパク質の相互作用を評価するための選択培地には以下の 3 種類を用いた: ロイシン/トリプトファン/ヒスチジン (H) を欠く合成培地 (SD/-LWH)、5 mM の 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール (Sigma-Aldrich) を含む SD/-LWH (SD/-LWH + 3AT)、およびロイシン/トリプトファン/アデニン (A)/ヒスチジンを欠く合成培地 (SD/-LWAH)。

2.2.7 MTF の分解誘導活性試験

クローニング

pEarleyGate vector series (Earley *et al.*, 2006) は LR 反応を介して様々なタンパク質にタグを付加し、植物内で発現可能である。本実験では pENTA ベクターにクローニングした SEP3 を、LR 反応を介して pEarleyGate 203 ベクターに挿入することで、N 末端に myc タグを付加した。また、pENTA ベクターにクローニングした PHYLI_{0Y} および PHYLI_{0Y} 変異体を、改変 pEarleyGate 202 ベクター (pEarleyGateN3×flag) に挿入することで、N 末端に 3×flag タグを付加した。pEarleyGate 202 ベク

ターの改変は2.2.2項と同様に GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用いて、キットに付属のマニュアルに従って行った。LR 反応の詳細な実験手順は以下の通りである。

1. 1 µl の LR clonase II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific)、1 µl の各 pENTA ベクター、1 µl の pEarleyGate ベクター、2 µl の DW をエッペンチューブ内で混合し、室温で一晩静置した。
2. エッペンチューブに 0.5 µl の Protein K (Thermo Fisher Scientific) を加え、37°C で 10 分間静置した。
3. 2.2.2 項での pENTA へのクローニング操作に準じ、大腸菌への形質転換、プラスミド回収を行った。大腸菌の選抜にはそれぞれ Kanamycin を用いた。
4. pEarleyGate ベクター上の配列を認識するプライマー attB1F (5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3')、attB2R (5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') を用いて PCR を行い、各遺伝子配列が正しく挿入されていることを確かめた。

アグロバクテリウムへの形質転換

クローニングしたプラスミドのアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 菌株) への形質転換は freeze-thaw 法により行った。以下に具体的な方法を述べる。各プラスミド (約 1 µg) を 1.5 ml エッペンチューブに分注し、30 µl のアグロバクテリウムのコンピテントセルと混合した。分注したエッペンチューブを液体窒素内で 1 分間凍結させた。室温でエッペンチューブの温度を上昇

させ、SOC 培地を 300 μ l 加え、28°C で3時間震盪培養した。形質転換されたアグロバクテリウムを、選抜用の抗生物質 (kanamycin 50 μ g/ml) を含む LB 固形培地に塗布して 28°C で2日間培養した。単コロニーを抗生物質入りの YT (1.6% Bacto tryptone, 1% Yeast extract, 0.5% NaCl) 液体培地で一晚培養し、等量の 50%グリセロール溶液と混合して液体窒素で急冷した (グリセロールストック)。作製したストックは-80°Cで保存し、実験ごとに取り出して用いた。

N. benthamiana 葉で一過的発現

各タンパク質はアグロインフィルトレーション法 (Johansen and Carrington, 2001) を用いて植物細胞内で一過的に発現させた。本法では、Ti プラスミドに由来するバイナリーベクターの T-DNA 領域に外来遺伝子をクローニングし、これを導入したアグロバクテリウムの培養液を植物組織の細胞間隙に注入する。これによりバイナリーベクター上の外来遺伝子は植物細胞核へと移行し、一過的に発現する。各タンパク質の発現用アグロバクテリウムを YT/Kan 液体培地で一晚培養し、OD₆₀₀ 値が 1.0 になるようにアグロインフィルトレーション用バッファー[10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH5.7), 150 μ M 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenone]で調整した。サイレンシングサプレッサーP19、myc-SEP3、および各 3×flag-PHYL1_{ov} 変異体を形質転換したアグロバクテリウムを 1: 10: 1 の比で混合した。注射針で穴をあけた *N. benthamiana* 上位葉に、各菌液を 1 ml テルモシリンジを用いて葉の裏面から注入接種した。接種した植物を 36 時間、25°Cで静置した。

ウェスタンブロット

植物内で発現させた各タンパク質の蓄積量はウェスタンブロット法により確認した。詳細な手順は以下の通りである。

1. 接種葉を液体窒素中で磨碎し、タンパク質抽出用サンプルバッファー[62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% 3-Mercapto-1,2-propanediol, 2% sodium dodecyl sulfate, (SDS), 5% sucrose, 0.5% Bromophenol blue]を加えて混合した。
2. 抽出液を 15,000 rpm、4°Cで 30 分間遠心し、上清を回収した夾雑物を取り除いた。
3. サンプルを 95°Cで 5 分間加熱し、熱変性させた。
4. 各サンプルを 5 μ l ずつ用いて、タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、iBlot 2 Dry Blotting System (Invitrogen) によりゲル内のタンパク質をポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜状に転写した。転写後の PVDF メンブレンは 5% スキムミルク-PBST [5% (w/v) スキムミルク, 1 \times PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4), 0.05 % (v/v) Tween20] 中で 1 時間以上振盪し、ブロッキングした。
5. iBind™ Western Systems (Invitrogen) を用いて一次抗体、二次抗体反応を行った。myc 融合タンパク質の標識には抗 myc 抗体 (clone 4A6; Millipore) 、flag 融合タンパク質の標識には抗 flag 抗体 (clone M2; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体反応には horseradish peroxidase (HRP) 標識された抗マウス抗体 (GE ヘルスケア) を用いた。
6. Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて、標識されたタンパク質の検出を行った。反応は付属のマニュアルに準じた。

7. タンパク質抽出効率を検証するため、反応後のPVDFメンブレンをCBB染色液 (Bio-Rad) で染色した。

2.2.8 TRV ベクターの改変およびファイロジェンのクローニング

ウイルスベクターとは、ウイルスゲノムに外来遺伝子配列を組み込み、ウイルスの感染・増殖能を利用して宿主内で目的遺伝子を過剰発現あるいは発現抑制するように改変したウイルスのことである。例えば、ウイルスゲノム内に目的の外来遺伝子を導入した感染性クローンを植物に接種すると、ウイルスが増殖した部位ではウイルスのタンパク質発現機構を介して目的タンパク質が発現される。形質転換とは異なり、ウイルスベクターを利用する場合、目的遺伝子の発現または抑制にあたって、組織培養など煩雑な作業を必要としないため非常に簡便である。

Tobacco rattle virus (TRV)

本実験では、タバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus: TRV) をウイルスベクターとしてシロイヌナズナ、*N. benthamiana* での PHYLL1_{ov} の発現を試みた。TRV はビルガウイルス科トブラウイルス属に属する植物ウイルスであり (図 2.5)、2 分節のプラス一本鎖 RNA (RNA1, RNA2) をゲノムとする。RNA1 および RNA2 はそれぞれ約 6.8kb、4.5kb であり、5'末端は基本的なキャップ構造 (m7G^{5'}ppp^{5'}Ap) をもち、3'末端にポリ A 構造はなく tRNA 様構造を持つ。RNA1 は 4 つの非構造タンパク質 (134K, 194K, P1a, P1b) をコードする。194K は 134K の終止コドンのリードスルーによって翻訳され、いずれもウイルスの複製に関与する。P1a は移行タンパク質でウイルスの細胞間移行に関与する。P1b は RNA サイレンシングサプレッサーとしての機能を有し、種子伝染にも関与する。

RNA2はウイルスの外被タンパク質 (CP)、および2つの非構造タンパク質 (P2b, P2c) をコードする。

P2b および P2c は線虫によるウイルス伝搬に関与するが、いくつかの系統では欠落している (King *et al.*, 2011)。

TRV はシロイヌナズナ、*N. benthamiana*、トマトなどでウイルス誘導ジーンサイレンシング (virus-induced gene silencing: VIGS) ベクターとして各種遺伝子の機能解析に広く利用されている (Macfarlane, 2010)。また、近年では外来遺伝子の発現にも利用されている (Tian *et al.*, 2014)。

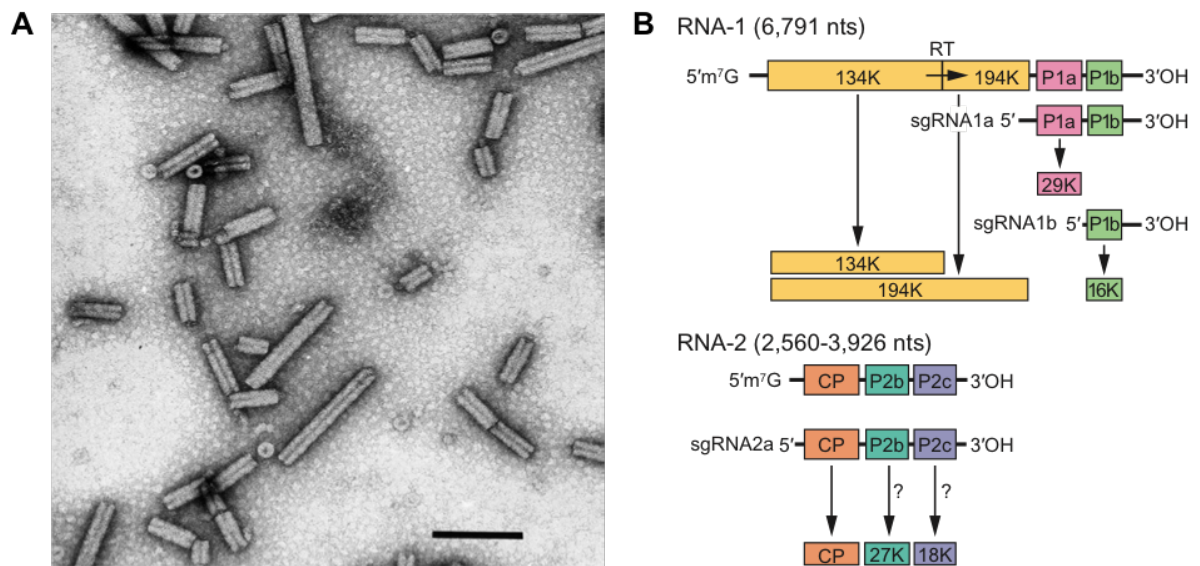


図 2.5 tobacco rattle virus (TRV)

(A) ダイレクトネガティブ染色法による TRV のウイルス粒子の電子顕微鏡写真。スケールバーは 100 nm。(B) TRV のゲノム構造と各 ORF の発現様式。P2b および P2c の発現様式は不明である。(King *et al.*, 2011)。

TRV ベクターの作成

本研究で用いたウイルスベクターは Dr. Savithramma Dinesh-Kumar (University of California) より分譲頂いた TRV ベクター (pTRV1; YL192, pTRV2-MCS; YL156) をもとに作製した (図 2.6)。

両プラスミドには2つの35Sプロモーター直下にそれぞれRNA1、またはRNA2が組み込まれている。加えて、RNA2のCPコード領域の下流にはマルチクローニングサイト(MCS)が挿入され、任意の遺伝子配列を挿入することでVIGSベクターとして利用可能である。なお、P2bおよびP2cコード領域は欠失している。CPの直下にGFP遺伝子配列を挿入することで、TRV感染時にCP-GFP融合タンパク質を発現するベクターとしても利用可能である(Tian *et al.*, 2014)。

いくつかの植物ウイルスベクターは、自己切断配列である foot-and-mouth-disease virus (FMDV) の2Aペプチドを介してウイルスタンパク質と外来遺伝子を融合させることで単独の外来遺伝子を発現させる(Minato *et al.*, 2014a)。2Aペプチドは真核細胞内で翻訳過程においてポリペプチドの「切断」を促進する18-22アミノ酸のオリゴペプチドである(Gao *et al.*, 2016)。そこで本研究ではTRVベクターによる効率的なタンパク質発現系の構築のため、2A配列を介してCPの直下にsGFPを融合させることにより、CP-sGFP融合タンパク質に加えて、本来の大きさのsGFP導入タンパク質が発現できるようにした。

ベクター構築のため、まずPCRにより2A-sGFP融合DNA断片を増幅した。増幅したDNA断片をinverse PCRにより増幅したpTRV2-MCSのCPコード領域の直下に導入し、CP-2A-sGFP融合タンパク質を発現するpTRV2-sGFPを得た。ライゲーションにはGibson Assembly Master Mix(New England BioLabs)を付属のマニュアルに従って用いた。プラスミド回収後、pTRV2ベクター上の配列を認識するプライマーtrv-F、trv-R(表2.1)を用いてPCRを行い、各遺伝子配列が正しく挿入されていることを確かめた。

PHYL1_{oy}の TRV ベクターへの挿入

改変した TRV ベクターを用いて CP-2A-PHYL1 融合タンパク質を発現させるため、pTRV2-sGFP の sGFP 遺伝子配列を PHYL1_{oy} または PHYL1_{oy} 変異体に置き換えた (図 2.6; pTRV2-PHYL1_{oy})。具体的には、各遺伝子配列をクローニングした pENTA ベクター (2.2.2 項参照) を鋳型に PCR を行い、インサート配列を増幅した。また、pTRV2-sGFP を鋳型に inverse PCR を行い、ベクター配列を増幅した。ゲル精製後のインサートとベクターを混合し、GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用いてライゲーションした。操作は付属のマニュアルに準じた。また、GENEART® Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用いて pTRV2-PHYL1_{oy} の 2A ペプチド配列を除外することで、従来の TRV ベクター同様に 2A ペプチドを介さずに CP 全長に融合させた CP-PHYL1_{oy} タンパク質を発現する pTRV2 (図 2.6; pTRV2-CP-PHYL1_{oy}) を構築した。各プラスミド回収後、前述の通りインサートチェック PCR を行い、各遺伝子配列が正しく挿入されていることを確かめた。

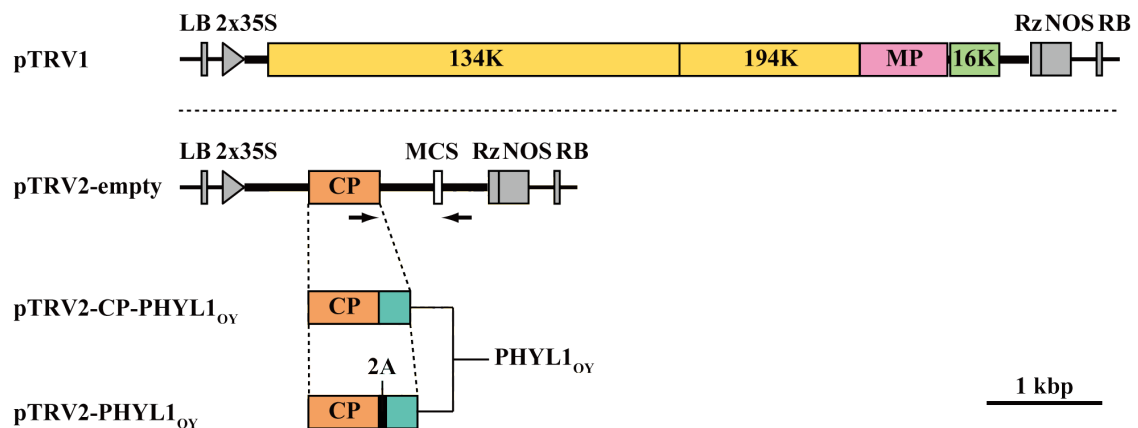


図 2.6 本研究で使⽤した TRV 発現ベクター

TRV の各ゲノムは 2 つのカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (2×35S) の直下に挿入した。濃灰色の四角は、left border (LB)、right border (RB)、self-cleaving ribozyme (Rz)、および nopaline synthase (NOS) ターミネーターを表す。白色、黒色の四角はマルチクローニングサイト (MCS) および FMDV 2A ペプチドを表す。実線の矢印は、クローニングおよび TRV の感染を確認するための RT-PCR に使⽤した trv-F および trv-R の位置を示す。

2.2.9 TRV ベクターの植物への接種

TRV ゲノムの第一分節および第二分節を発現させるためのアグロバクテリウムを 2.2.7 項と同様の手法で 1:1 の比率で混合し、シロイヌナズナ、*N. benthamiana* にアグロインフィルトレーション法によって接種した。接種には、播種後 3-4 週後のシロイヌナズナ、4-5 週後の *N. benthamiana* を用いた。接種後の植物は 2.2.1 項に記載した条件下でそれぞれ生育させて、花の形態を観察した。

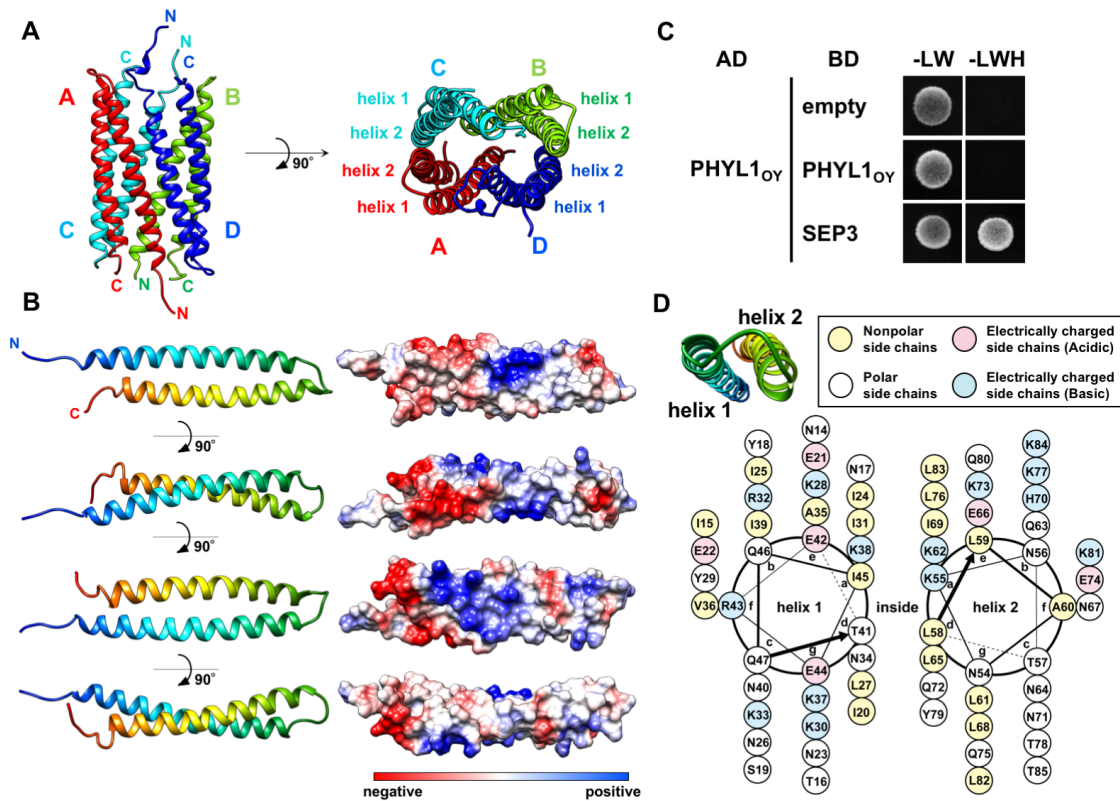
2.2.10 TRV 感染植物からのウイルス検出

シロイヌナズナにおける TRV 感染の有無を確認するため、ウイルス接種後約 4 週間の植物の RNA を抽出し、RT-PCR を行った。RNA 抽出は ISOSPIN Plant RNA Kit (ニッポンジーン) を用いて、付属のマニュアルに従って行った。得られた RNA 10 ng を鋳型として、TRV の第二分節ゲノムを特異的に増幅するプライマー trv-F、trv-R を用いた RT-PCR を行い、ウイルスの検出および PHYLL_{ov} 遺伝子の有無を確認した。なお、本プライマーセットはゲノム上で PHYLL_{ov} 遺伝子を含む領域を増幅するように設計されているため、増幅産物のサイズから PHYLL_{ov} 遺伝子が保持されているか判別可能である。RT-PCR は SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を用いて行った。増幅産物は 2% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動し、EtBr で染色したのち UV を照射してサイズを確認した。

2.3 結果

2.3.1 PHYLI_{oy}の立体構造

PHYLI_{oy}の結晶構造を分解能 2.4 Å、R-work/R-free = 0.2741/0.3066 (PDB ID: 6JQA) まで精密化して決定した (表 2.2)。R-work は最終的に得られたタンパク質の座標が、実験で測定された X 線回折強度とどれくらい一致しているかを示す定量的な指標であり、実験で得られた全ての回折振幅とモデルから計算できる回折振幅の差の絶対値の平均に相当する。R-work に対して R-free はランダムに選抜した回折データに対して計算した値である。R 因子はいずれもより低い値が得られたとき、正しい立体構造を構築できていることを示す。分解能が 2.0 Å のデータでは、R-work の値が 0.20、R-free の値が R-work プラス 0.05 くらいになるまで精密化を行うことが一般的であり (河合ら, 2018)、得られた PHYLI_{oy}の結晶構造は十分に精確なものと考えられた。決定した結晶構造は 4 つのサブユニット (chain A-D) からなる四量体を形成し (図 2.7A)、各サブユニットはランダムループによって連結された 2 つの α ヘリックスからなるコイルドコイル構造を形成した (図 2.7B)。この PHYLI_{oy}四量体の重要性を調べるため、PHYLI_{oy}同士の相互作用を Y2H 法により検証したところ、BD-PHYLI_{oy}および AD-PHYLI_{oy} を共発現する酵母は選択培地 (SD/-LWH) で生育せず、両者の相互作用は認められなかった (図 2.7C)。タンパク質の立体構造の比較サーバーである DALI を用いて、PHYLI_{oy}と類似の立体構造をもつタンパク質を検索したところ、*Pseudomonas syringae*のエフェクターAvrRps4^c (PDB ID: 4B6X) と構造的に類似していた (z スコア 7.7, 平均RMSD = 1.92Å) (図 2.8A)。AvrRps4^cは 221 アミノ酸からなる AvrRps4 の C 端側 88 アミノ酸からなるタンパク質であり、AvrRps4 が植物への分泌後に切断されることで生じる (Sohn *et al.*, 2009)。両タンパク質は共通して 2 つの両親媒性 α ヘリックスの疎水性面がヘリックス内部に向いているコイルドコイル構造を形成していたが、両タンパク質の形成する表面電荷分布は異なっていた (図 2.7B, 2.8C)。

図 2.7 PHYL1_{OY}の結晶構造 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) 結晶構造解析により観察されたPHYL1_{OY}四量体。タンパク質のN末端とC末端をそれぞれ図示した。(B) PHYL1_{OY}単量体のリボンモデル (左) と表面電荷モデル (右) (ヨウ素原子を含まないサブユニットAの7-91番目の残基からなる)。表面電荷モデルでは青が正電荷、赤が負電荷に帯電していることを示す。(C) Y2H法によるPHYL1_{OY}どうしの相互作用解析。BD-SEP3およびBD-emptyをそれぞれポジティブおよびネガティブコントロールとして用いた。(D) PHYL1_{OY}のもつそれぞれの α ヘリックスのhelical wheelモデル。左上の図に示すように、ヘリックス1あるいは2のC末端、N末端からアミノ酸の投影を行った。各円の数字および色は、PHYL1_{OY}の各アミノ酸残基の位置および化学的性質を示す。7残基反復 (heptad repeat) 内のアミノ酸残基はa-gの記号を付けて表す。

表 2.2 PHYL1_{ox}の立体構造解析データと構造精密化の統計値 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

Protein	PHYL1 _{ox}
Wavelength (Å)	1.7
Resolution range (Å)	40.52–2.402 (2.488–2.402)
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell (Å)	42.843 60.664 124.874 90 90 90
Total reflections	194152 (20164)
Unique reflections	24467 (1296)
Multiplicity	7.9 (8.2)
Completeness (%)	85.56 (52.53)
Mean I/sigma (I)	8.21 (1.91)
Wilson B-factor (Å ²)	44.03
R-merge	0.1374 (0.9488)
R-meas	0.147 (1.013)
R-pim	0.05178 (0.3528)
CC1/2	0.996 (0.713)
CC*	0.999 (0.912)
Reflections used in refinement	20963 (1296)
Reflections used for R-free	2093 (141)
R-work	0.2741 (0.3063)
R-free	0.3066 (0.3186)
CC(work)	0.895 (0.645)
CC(free)	0.794 (0.709)
Number of non-hydrogen atoms	2829
Macromolecules	2794
Iodine atoms	19
Solvent	16
Protein residues	335
RMS(bonds) (Å)	0.017
RMS(angles)	1.87
Ramachandran favored (%)	84.69
Ramachandran allowed (%)	8.16
Ramachandran outliers (%)	7.14
Rotamer outliers (%)	0
Clashscore	45.1
Average B-factor	89.32
Macromolecules	89.27
Iodine atoms	128.32
Solvent	51.32
Number of TLS groups	12

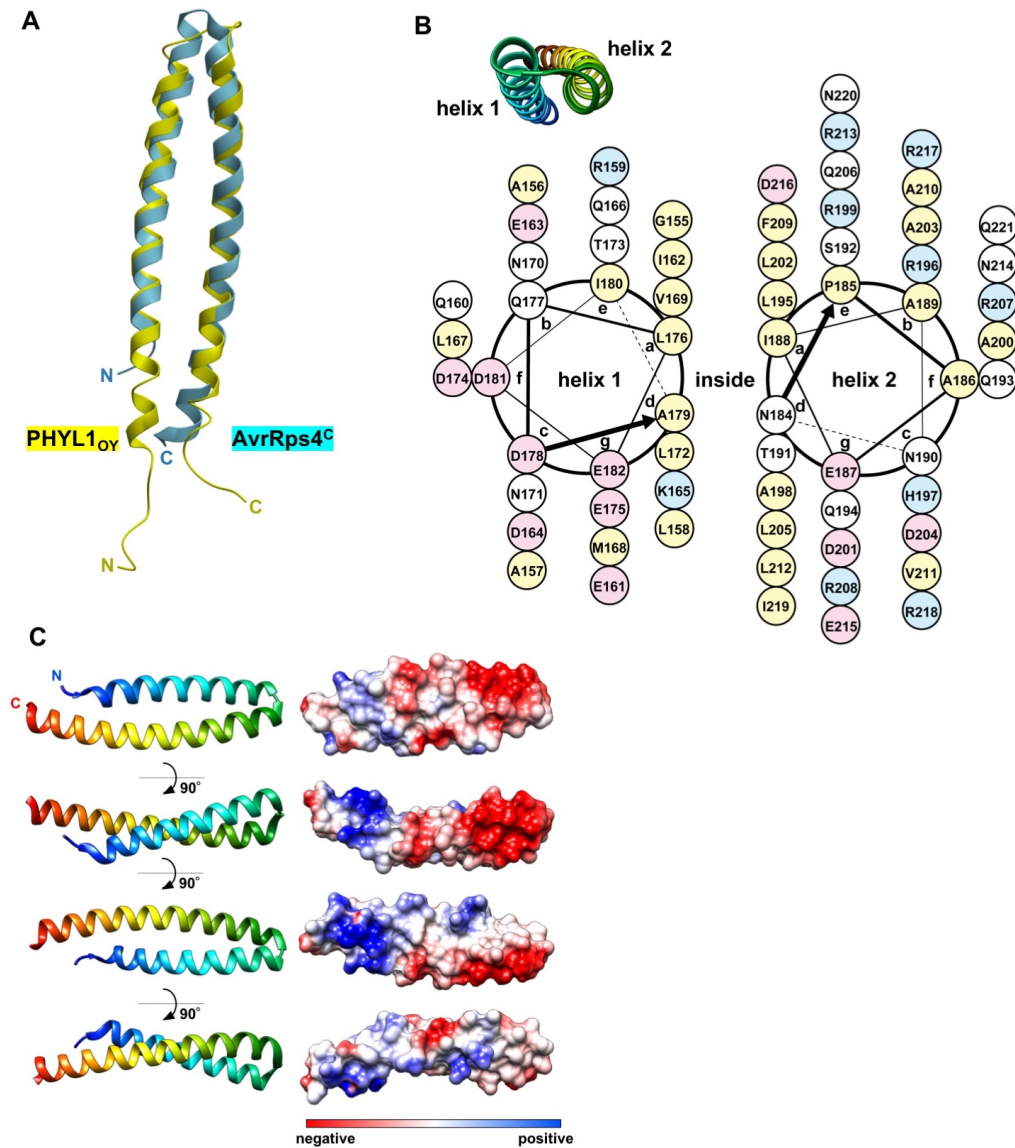
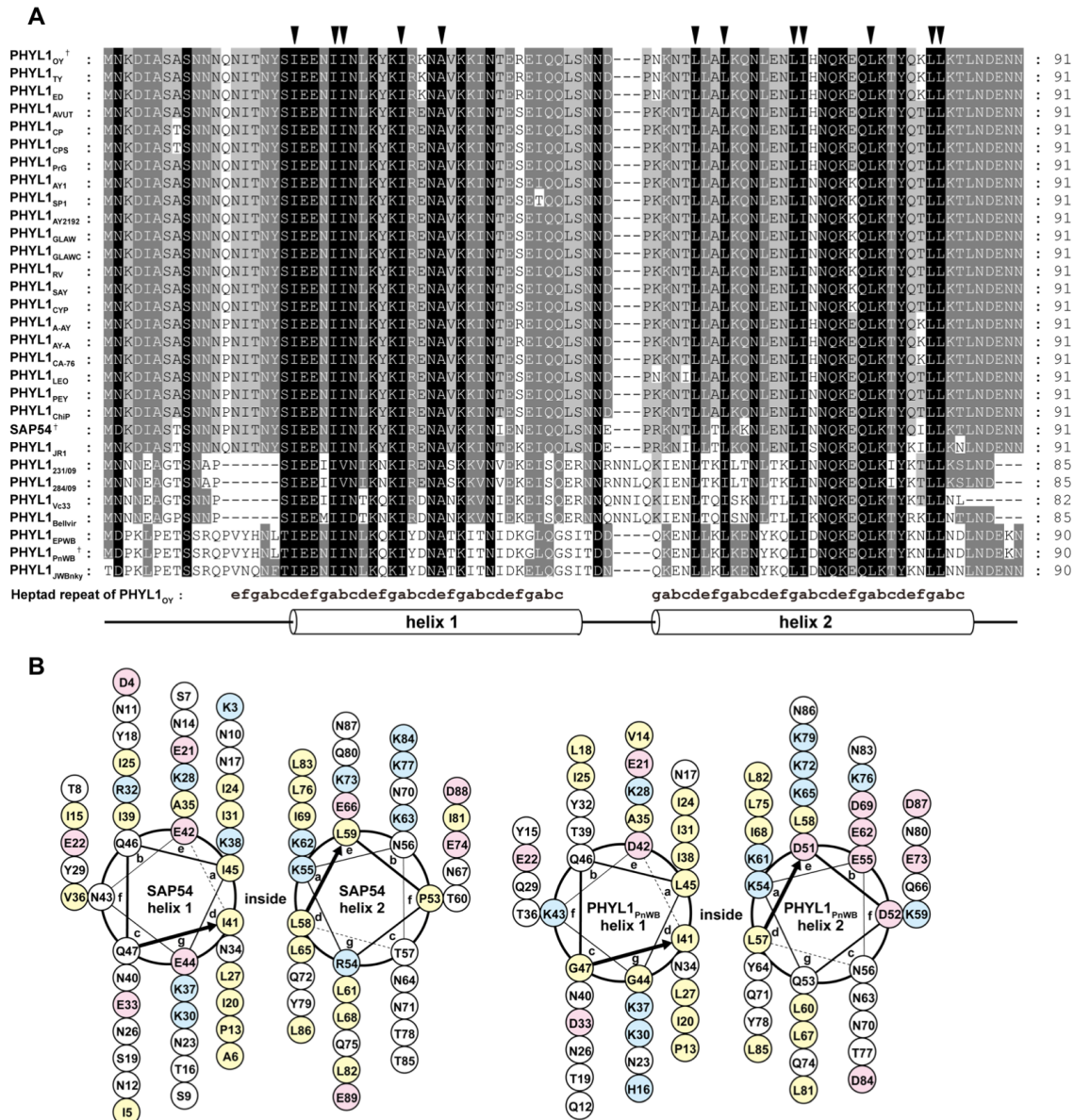


図2.8 AvrRps4^CとPHYLL1_{OY}の立体構造比較 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) AvrRps4^CとPHYLL1_{OY}の立体構造の重ね合わせ。(B) AvrRps4^Cの helical wheel モデル。ヘリックス1あるいは2のC末端、N末端から helical wheel におけるアミノ酸の投影を行った (左上図)。各円の数字および色は、AvrRps4^Cの各アミノ酸残基の位置および化学的性質を示す (図2.7D 参照)。7 残基反復 (heptad repeat) 内のアミノ酸残基は a-g の記号を付けて表す。(C) AvrRps4^C単量体のリボンモデル (左) および表面電荷モデル (右)。青: 正電荷、赤: 負電荷に帯電。

2.3.2 PHYLI_{oy}と他のファイロジェンの構造比較

二次構造予測サーバーである PROMALS 3D を用いて、PHYLI_{oy} 以外の既知ファイロジェンの二次構造を予測したところ、2つの α ヘリックス構造が保存されていることが示唆された (図2.9A, 表2.3)。興味深いことに、両 α ヘリックス内に繰り返し存在する疎水性残基の保存性は高かった (図2.9A)。これらの中で葉化誘導能が示されている2つのファイロジェン、SAP54 および PHYLI_{phWB} (それぞれ、PHYLI_{oy}の分泌領域に対して 86.8%および 50.0%のアミノ酸同一性) のホモロジーモデリングを、PHYLI_{oy}の立体構造に基づき I-TASSER を用いて行った。得られた立体構造モデルは PHYLI_{oy}と同様に各両親媒性 α ヘリックスの疎水性面がヘリックス内部に向いているコイルドコイル様構造を形成していた。I-TASSER で予測されたモデルの信頼度を示す confidence score (C score) は -5 から 2 の値で算出され、SAP54 および PHYLI_{phWB} の C score はそれぞれ -0.45 および -1.10 であった。ヘリックス内部および表面電荷の分布もまた PHYLI_{oy}と類似していた (図2.9B, 2.10)。

図 2.9 ファイロジェン間の配列および構造の類似性 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) 既報のファイロジェンの分泌領域のマルチプルアライメント。淡灰色、濃灰色、黒色の背景はそれぞれ60%、80%、100%以上の同一性を示す。黒矢印は、それぞれの α ヘリックス内に保存された疎水性残基を示す。PHYL1_{OY}の7残基反復 (a-g) およびPROMALS3Dソフトウェアによって予測されたファイロジェンの共通の二次構造をアラインメントの下に示した。全ての系統名とアクセッション番号は表 2.3 に記載した。ダガー (†) は薬化誘導能力報告されているファイロジェンを示す。(B) I-TASSER によって予測された立体構造モデルに基づく SAP54 および PHYL1_{PHWB} の各ヘリックスの helical wheel モデル。ヘリックス 1 あるいは 2 の C 末端、N 末端から helical wheel におけるアミノ酸の投影を行い、各円の数字および色はそれぞれのファイロジェンの各アミノ酸残基の位置および化学的性質を示す (図 2.7D 参照)。

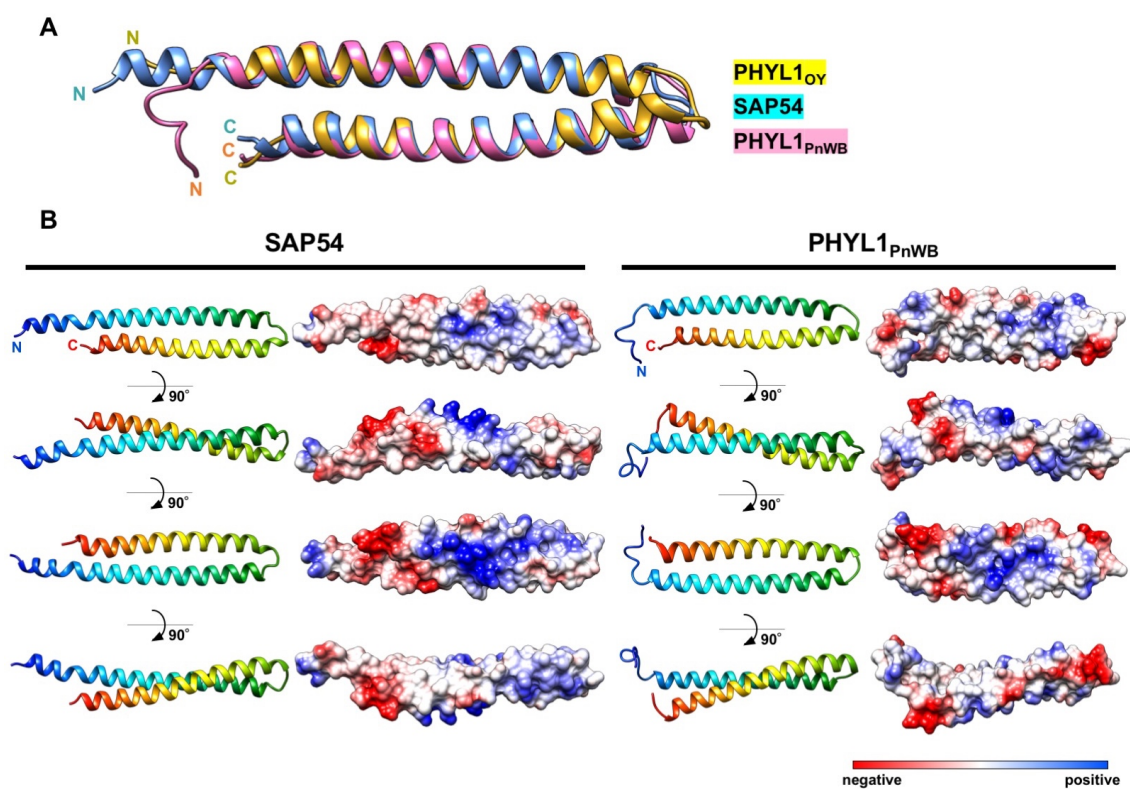


図2.10 I-TASSER を用いた SAP54 と PHYL1_{PnWB} のホモロジーモデリング

(Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) SAP54、PHYL1_{PnWB} およびPHYL1_{OY} の立体構造の重ね合わせ。(B) SAP54 と PHYL1_{PnWB} のリボンモデル (左) および表面電荷モデル (右)。青: 正電荷、赤: 負電荷に帯電。

表 2.3 第2章で用いたファイロジェン遺伝子の由来となるファイトプラズマ系統

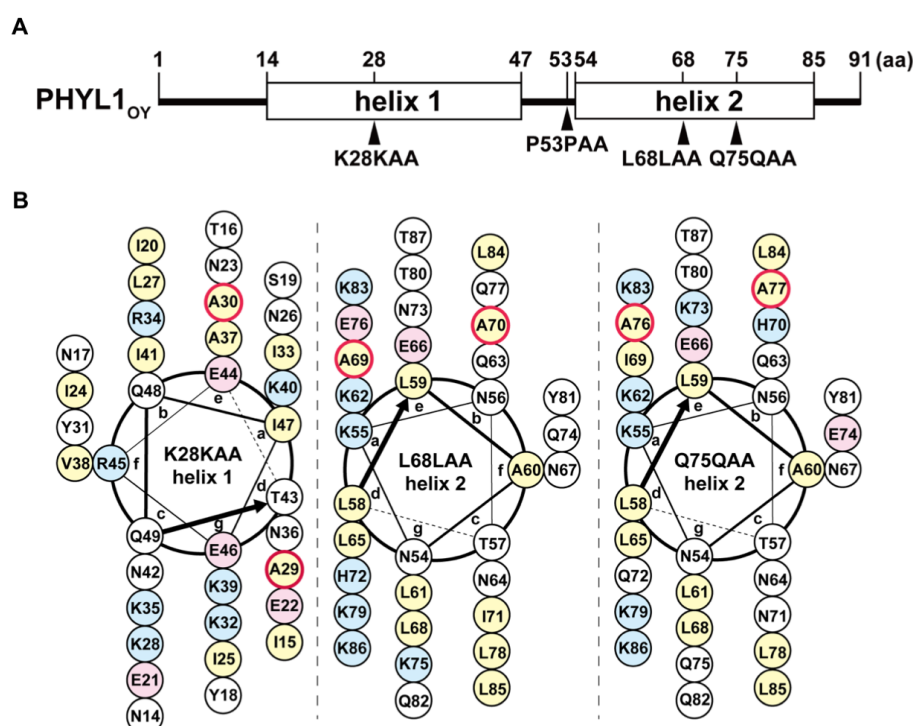
暫定種	系統名	略称	ファイロジェン遺伝子のアクセッション番号
'Ca. P. asteris'	apricot chlorotic leafroll	AY-A	AB862479
	aster yellows	AY2192	AB862480
	aster yellows from apricot	A-AY	AB862477
	aster yellows witches' broom	AY-WB	CP000061
	atypic aster yellows	AVUT	AB862478
	carrot yellows	CA-76	AB862481
	chrysanthemum yellows	CYP	JSWH01000189
	eggplant dwarf	ED	AB862482
	gladiolus witches' broom	GLAW	AB897828
	gladiolus witches' broom	GLAWC	AB862483
	leontodon yellows	LEO	AB862484
	maryland aster yellows	AY1	DQ837760
	oilseed rape virescence	RV	AB862487
	onion yellows	OY	AB812838
	primula green	PrG	AB862485
	severe western aster yellows	SAY	AB862488
	tomato yellows	TY	EF200537
'Ca. P. aurantifolia'	<i>'Echinacea purpurea'</i> witches'-broom	EPWB	LKAC01000004
	peanut witches' broom	PnWB	AMWZ01000001
'Ca. P. phoenicium'	picris echioides yellows	PEY	AB862490
	ChiP	ChiP	PUUG01000078
'Ca. P. pruni'	bellis virescence	BellVir	MH756633
	clover proliferation	CP	AB862489
	poinsettia branch-inducing	JR1	AKIK01000122
	spiraea stunt	SP1	EF200539
	Vc33	Vc33	LLKK01000018
'Ca. P. solani'	231/09	231/09	FO393428
	284/09	284/09	FO393427
'Ca. P. trifolii'	catharanthus phyllody	CPS	AB897827
'Ca. P. ziziphi'	jujube witches' broom	JWB-nky	CP025121

第2章で用いたファイトプラズマ系統とそのファイロジェン遺伝子配列のGenBank アクセッション番号を示す (Iwabuchi *et al.*, 2019)。

2.3.3 PHYLI_{OY}変異体のMTF、RAD23Cとの結合能

結晶構造解析により、ファイロジェンは2つの α ヘリックス構造を持つことが明らかになった (図2.7)。そこで、ファイロジェンの構造と機能の関連を検証するため変異導入試験を行った。2つのアラニン残基をPHYLI_{OY}のヘリックス1領域 (PHYLI_{OY}^{K28KAA})、ループ領域 (PHYLI_{OY}^{P53PAA})、またはヘリックス2領域 (PHYLI_{OY}^{L68LAA} および PHYLI_{OY}^{Q75QAA}) に挿入した4つの変異体を構築した (図2.11A)。2.1.2項で述べたとおり、 α ヘリックスの螺旋は1巻あたり3.6残基で構成されているため、1残基あたり100°回転すると考えられる。つまり、PHYLI_{OY}^{K28KAA}、PHYLI_{OY}^{L68LAA} および PHYLI_{OY}^{Q75QAA} 変異体はアラニンを2残基挿入することでアラニンの挿入位置を起点として元のアミノ酸配列を2アミノ酸ずつずらし、 α ヘリックスの螺旋が200°回転していると考えられる (図2.11B)。

Y2H法を用いて宿主因子との結合性を検証したところ、BD-PHYLI_{OY}^{P53PAA} および各AD-SEP1-4を発現する酵母は、BD-PHYLI_{OY}の発現時と同様に選択培地で生育した (表2.4)。また、BD-PHYLI_{OY}^{P53PAA} およびAD-RAD23Cを発現した酵母も選択培地上での生育が観察された。一方で、BD-PHYLI_{OY}^{K28KAA}、-PHYLI_{OY}^{L68LAA} または-PHYLI_{OY}^{Q75QAA} を各AD-SEP1-4またはAD-RAD23Cと共発現する酵母は選択培地上での生育は観察されない、あるいは-LWHでの生育が観察されるのみだった (表2.4)。以上より、2つの α ヘリックス構造はいずれも、PHYLI_{OY}のMTFおよびRAD23Cとの相互作用に重要であることが示された。

図 2.11 PHYL1_{OY}変異体の作製 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) PHYL1_{OY}の二次構造の模式図。矢印は、2つのアラニンが挿入された位置を示す。(B) PHYL1_{OY}変異体 (PHYL1_{OY}^{K28KAA}、PHYL1_{OY}^{L68LAA}およびPHYL1_{OY}^{Q75QAA})のhelical wheelモデル。ヘリックス1あるいは2のC末端、N末端からhelical wheelにおけるアミノ酸の投影を行った (図2.7D参照)。挿入された2つのアラニン残基は赤枠で示す。

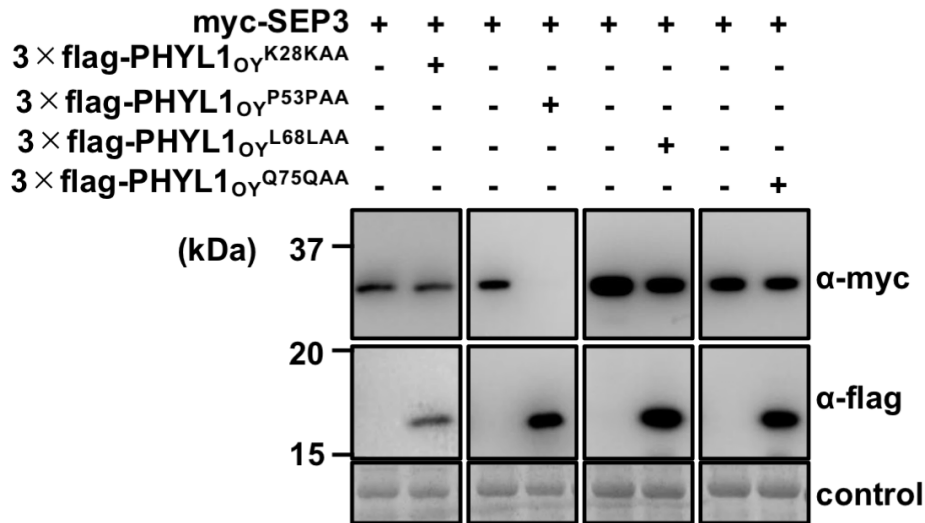
表 2.4 PHYL1_{OY}変異体の SEP1-4 および RAD23C との結合性 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

BD\AD	empty	SEP1	SEP2	SEP3	SEP4	RAD23C
empty	-	-	-	-	-	-
PHYL1 _{OY}	-	+++	+++	+++	+++	++
PHYL1 _{OY} ^{K28KAA}	-	+	+	-	-	-
PHYL1 _{OY} ^{P53PAA}	-	++	++	++	++	++
PHYL1 _{OY} ^{L68LAA}	-	+	-	-	-	-
PHYL1 _{OY} ^{Q75QAA}	-	+	-	+	-	-

表内の記号は各コンストラクトを形質転換した酵母の生育程度を示す。+++：すべての選択培地で生育。++：-LWH +3AT、-LWH および -LW で生育。+：-LWH および -LW で生育。-：-LW のみで生育。

2.3.4 PHYL1_{oy}変異体の SEP3 に対する分解誘導活性試験

アグロインフィルトレーション法によって *N. benthamiana* 葉に myc-SEP3、および各 3×flag-PHYL1_{oy} 変異体を共発現させ、myc-SEP3 の蓄積量を比較した。その結果、PHYL1_{oy} (Maejima *et al.*, 2014) と同様に、3×PHYL1_{oy}^{P53PAA} 共発現時には myc-SEP3 の蓄積量が著しく減少した (図2.12)。一方で、いずれかの α ヘリックス中にアミノ酸挿入変異を有する変異体 (PHYL1_{oy}^{K28KAA}、PHYL1_{oy}^{L68LAA} および PHYL1_{oy}^{Q75QAA}) は myc-SEP3 の蓄積に影響を及ぼさなかった (図2.12)。

図2.12 PHYL1_{oy}変異体の SEP3 分解能 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

N. benthamiana 葉において、サイレンシングサプレッサーP19、myc タグを付加した SEP3、および 3×flag タグを付加した各 PHYL1_{oy} 変異体を形質転換したアグロバクテリウムを OD₆₀₀ = 1.0 に調整後、1: 10: 1 の比率で混合し共発現させた。36 時間後にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により各タンパク質を検出した。Myc-SEP3 の検出には抗 myc 抗体 (α -myc) を、3×flag-PHYL1_{oy} 変異体の検出には抗 flag 抗体 (α -flag) を用いた。SDS-PAGE の泳動のコントロールとして CBB 染色を行った。

2.3.5 TRV ベクターを用いたファイロジェンの効率的な発現

アグロバクテリウム系を用いた植物への外来遺伝子の導入は、一度作製できれば種子をとったのち形質転換植物を大量に栽培可能であるが、作製には多くの時間と労力を要する。さらに、ファイロジェン形質転換植物は葉化症状を呈し、結果として不稔になるため、形質転換植物の維持が困難である。そこで、様々なファイロジェンおよびその変異体の機能を簡便かつ迅速に解析するため、ウイルスベクターとして様々な植物で利用される TRV ベクターシステム (Macfarlane, 2010) を用いたファイロジェンの植物内発現系の構築を行った。Tian ら (2014) の報告に準じ、RNA2 の CP 遺伝子直下に PHYLI_{oy} 遺伝子を導入することで、CP-PHYLI_{oy} 融合タンパク質を発現する TRV ベクターシステムを作出した (図 2.6; pTRV2-CP-PHYLI_{oy})。構築した TRV ベクターをアグロインフィルトレーションによってシロイヌナズナに接種したところ、接種後 20-30 日で軽微な花の形態異常 (非対称的なごく片および花弁) が認められたが、35S::PHYLI_{oy} 形質転換植物 (Maejima *et al.*, 2014) とは異なり、花器官の葉化は観察されなかった (図 2.13B)。なお、外来遺伝子を発現しない TRV (TRV-empty) を接種したシロイヌナズナでは花の形態異常は観察されなかった (図 2.13A)。

TRV-CP-PHYLI_{oy} がシロイヌナズナに葉化を引き起こさなかった原因の 1 つとして、ファイロジェンの N 末端にウイルスの CP タンパク質が付加したことによる機能阻害が考えられる。そこで、FMDV 2A ペプチドを CP と PHYLI_{oy} の間に挿入したコンストラクトを作出し (図 2.6; pTRV2-PHYLI_{oy})、2A ペプチドの機能により PHYLI_{oy} を単独で発現させることを試みた。TRV-PHYLI_{oy} に感染したシロイヌナズナは 35S::PHYLI_{oy} 形質転換植物と同様に葉化 (図 2.13C)、および突き抜け (図 2.13D) を誘導した。以上より、FMDV 2A ペプチドを用いた TRV ベクターの改変により、ファイロジェンあるいはその変異体の機能を簡便・迅速に検証することが可能と考えられた。以降の実験では、FMDV 2A ペプチドを用いた TRV ベクターにより、ファイロジェンとその変異体を発現させた (第 4 章)。

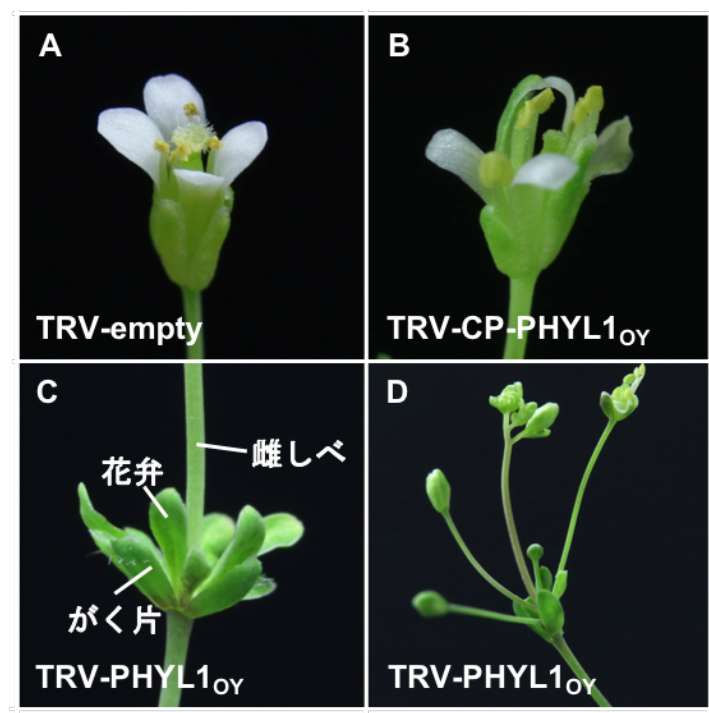


図2.13 TRV ベクターを用いたファイロジェン発現系の改良

(A) TRV-empty に感染したシロイヌナズナの花の表現型。(B) TRV-CP-PHYL1_{OY} に感染したシロイヌナズナの花の表現型。(C, D) TRV-PHYL1_{OY} に感染したシロイヌナズナの花の表現型。

2.3.6 PHYLI_{oy}変異体接種シロイヌナズナの花器官の形態

作出した TRV ベクターシステムを用いて、各 PHYLI_{oy} 変異体の葉化誘導能を検証した。その結果、TRV-PHYLI_{oy}^{P53PAA}に感染したシロイヌナズナは TRV-PHYLI_{oy}と同様に葉化を誘導した一方で、TRV-PHYLI_{oy}^{K28KAA}、-PHYLI_{oy}^{I68LAA}または-PHYLI_{oy}^{Q75QAA}に感染した植物では花の形態異常は観察されなかった (図 2.14A)。また、ナス科タバコ属のモデル植物である *N. benthamiana* においても同様の結果が得られた (図 2.14B)。各シロイヌナズナから RNA を抽出し、RT-PCR により TRV の感染を検証したところ、TRV の感染および挿入された PHYLI_{oy} 遺伝子の保持が確認された (図 2.14C)。以上より、PHYLI_{oy}の両方の α ヘリックスが葉化誘導能に重要であることが示唆された。

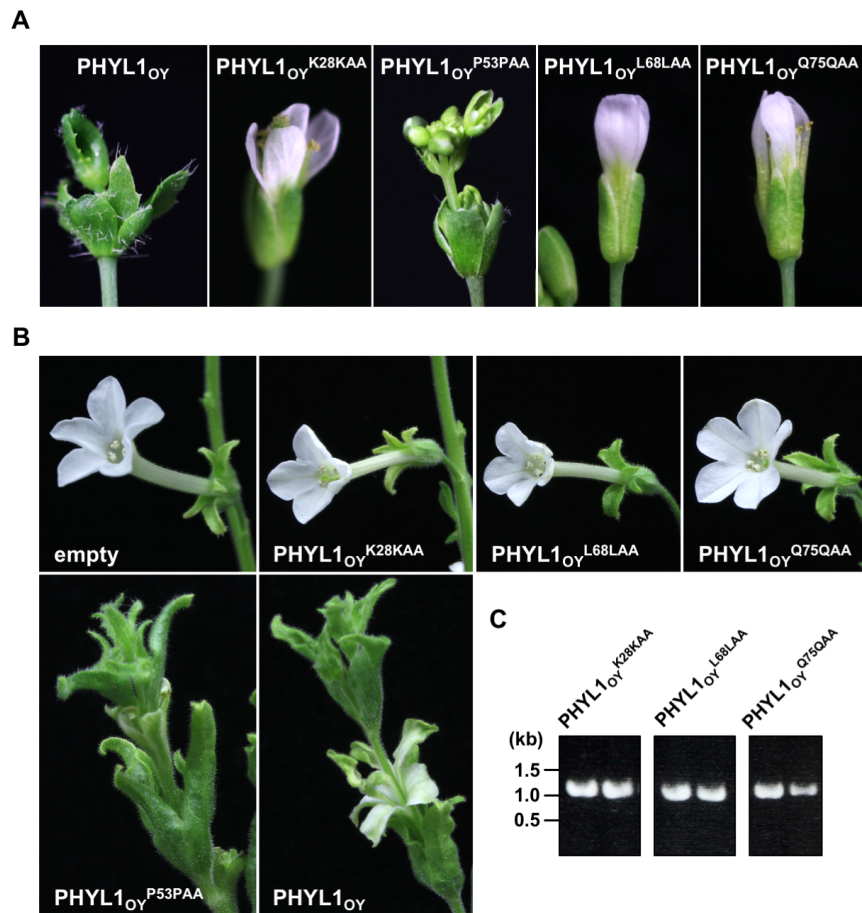


図2.14 PHYL1_{OY}変異体の葉化誘導能 (Iwabuchi *et al.*, 2019)

(A) TRV-PHYL1_{OY}変異体に感染したシロイヌナズナの花の表現型。(B) TRV-PHYL1_{OY}変異体に感染した *N. benthamiana*の花の表現型。(C) RT-PCR によるシロイヌナズナにおける TRV ベクターの感染の確認。各変異体につき2個体のシロイヌナズナを供試した。

2.4 考察

2.4.1 2つの α ヘリックス構造は葉化誘導能に重要である

本研究では、OY ファイトプラズマの持つファイロジェンである PHYLI_{OY} の結晶構造を決定した (図 2.7A)。これは、ファイトプラズマのエフェクターとしても初めての結晶構造解析事例である。PHYLI_{OY} の立体構造は、表面残基の電荷分布を除いて *Pseudomonas syringae* の持つエフェクターの 1 つである AvrRps4^c と類似し、2つの α ヘリックスからなるコイルドコイル構造を有していた (図 2.8A)。また、葉化誘導能が報告されている他の 2つのファイロジェン (SAP54, PHYLI_{PhWB}) も PHYLI_{OY} と同様にコイルドコイル構造を有していることが予測されたことから (図 2.10)、本構造がファイロジェン間で共通の構造であることが示唆された。

一般的に、コイルドコイル構造はタンパク質間相互作用に重要である (Mason *et al.*, 2004)。AvrRps4^c は本構造を有することで標的宿主因子である enhanced disease susceptibility (EDS1) および WRKY タンパク質と相互作用する (Halane *et al.*, 2018)。即ち、PHYLI_{OY} の 2つの α ヘリックスからなるコイルドコイル構造も宿主因子との相互作用に関与することが示唆される。そこで、ヘリックス 1 あるいはヘリックス 2 にアミノ酸挿入変異を導入したところ、SEP1-4 および RAD23C との相互作用 (表 2.4)、SEP3 の分解 (図 2.12)、および植物体への葉化誘導能が喪失した (図 2.14)。一方で、ループ領域へのアミノ酸挿入変異は、いずれの活性にも顕著な影響を及ぼさなかった (表 2.4, 図 2.13, 14)。以上より、両ヘリックスは宿主因子とのタンパク質相互作用を初めとしたファイロジェンの機能に重要であることが示された。

2.4.2 α ヘリックスを介した MTF および RAD23 との結合様式

ファイロジェンファミリーの特徴の1つとして、2つの α ヘリックス内に疎水性残基が繰り返し存在し、その保存性が高いことが挙げられる (図 2.9A)。興味深いことに、ファイロジェンが標的とする MTF の K ドメインも、同様に2つの α ヘリックス構造をもち、その内部に疎水性残基の繰り返しを有する (Rümler *et al.*, 2018)。これらの残基は MTF が多量体化を形成する際の疎水性相互作用面として働くことが示唆されている (Puranik *et al.*, 2014)。また、タイプ II の MTF の間で K ドメイン内のアミノ酸配列は保存性が高く、特に、ファイロジェンの標的となる E クラスの MTF では K ドメイン内の疎水性残基が植物間でよく保存されている (図 2.2C, D; Rümler *et al.*, 2018)。以上のようなファイロジェンと MTF の立体構造の類似性から、ファイロジェンと MTF の相互作用は MTF どのような多量体化形成と類似している可能性が高い。即ち、ファイロジェンは MTF どのような多量体化形成と同様に、両因子の α ヘリックスの疎水性相互作用面を介して MTF を認識する可能性がある (Rümler *et al.*, 2015)。このような分子機構はファイロジェンが様々な植物に葉化を誘導する上で重要であると考えられる。

RAD23 はファイロジェンと相互作用し、葉化誘導に必須な宿主因子であるが (MacLean *et al.*, 2014) その相互作用様式は不詳である。Y2H の結果、ヘリックス領域に変異導入された PHYLI_{OY} 変異体 (PHYLI_{OY}^{K28KAA}、PHYLI_{OY}^{L68LAA} および PHYLI_{OY}^{Q75QAA}) は RAD23C とも結合できず、それぞれの α ヘリックスは MTF だけでなく、RAD23C との相互作用にも重要であることが示された (表 2.4)。一方で、RAD23 のもつ4つの機能ドメインはそれぞれ異なるタンパク質と相互作用し、その相互作用様式も解析されつつあるものの (図 2.2E)、ファイロジェンがいずれのドメインに結合するかは不明である。そのため、その結合様式を両者の立体構造や既存の知見に基づき予測することは、現状難しい。今後は三者の立体構造情報に基づいて、MTF の分解誘導において、ファイロジェンが α ヘリク

スを介してどのように MTF と RAD23 の両タンパク質に相互作用できるのか、詳細に解析されることが期待される。

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

本箇所については、5 年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開

謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物医科学研究室 難波成任 特任教授ならびに植物病理学研究室 山次康幸 教授には懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りましたことを衷心より感謝申し上げます。さらに、学部学生時より6年間に渡って常に真剣に、厳しく、そして親身に指導していただいたことに、この場を借りて、心から感謝と尊敬の念を申し上げます。

法政大学 生命科学部 大島研郎 教授、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 前島健作 助教には平素の研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり、多くの有益なご助言をいただきましたことを厚く御礼申し上げます。また、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室および植物医科学研究室内の博士研究員、学生、卒業生、技術補佐員、非常勤職員のみなさまには研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり、様々な面でのご支援をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

引用文献

- Abagyan R, Totrov M, Kuznetsov D.** (1994) ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J Comput Chem.* 15: 488–506.
- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D66:* 213–221.
- Akhtar KP, Sarwar G, Dickinson M, Ahmad M, Haq MA, Hameed S, Iqbal JM.** (2009) Sesame phyllody disease: symptomatology, etiology and transmission in Pakistan. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 5: 477–486.
- Anabestani A, Izadpanah K, Abbà S, Galetto L, Ghorbani A, Palmano S, Siampour M, Veratti F, Marzachi C.** (2017) Identification of putative effector genes and their transcripts in three strains related to '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. *Microbiol Res.* 199: 57–66.
- Andersen MT, Liewing LW, Havukkala I, Beever RE.** (2013) Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' reveals genome plasticity. *BMC Genomics.* 14: 529.

Arashida R, Kakizawa S, Hoshi A, Ishii Y, Jung H-Y, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2008a) Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA Cell Biol.* 27: 209–217.

Arashida R, Kakizawa S, Ishii Y, Hoshi A, Jung H-Y, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2008b) Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (Amp) gene and in situ detection of Amp from malformed flowers infected with Japanese hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology.* 98: 769–775.

Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research.* 44: W344–W350.

Bai XD, Zhang JH, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA. (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol.* 188: 3682–3696.

Bai X, Correa VR, Toruño TY, Ammar el-D, Kamoun S, Hogenhout SA. (2009) AY-WB

phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol Plant Microbe Interact.* 22: 18–30.

Barbosa JC, Eckstein B, Bergamin Filho A, Bedendo IP, Kitajima EW. (2012) Molecular

characterization of a phytoplasma of group 16SrIX related to '*Ca. Phytoplasma phoenicium*' in periwinkle in Brazil. *Trop Plant Pathol.* 37: 130–135.

Berg M, Seemüller E. (1999) Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes

coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene.* 226: 103–109.

Bertaccini A, Davis RE, Hammond RW, Vibio M, Bellardi MG, Lee IM. (1992) Sensitive

detection of mycoplasma-like organisms in field-collected and *in vitro* propagated plants of *Brassica*, *Hydrangea* and *Chrysanthemum* by polymerase chain-reaction. *Ann Appl Biol.* 121: 593–599

Blattný jun C, Blattný sen C. A virus green petals disease offragaria ananassa. (1959) *Folia*

Microbiol. 4: 345–350.

Bogan AA, Thorn KS. (1998) Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol.* 280: 1–9.

Branden CI, Tooze J. (2000) タンパク質の構造入門. Newton Press.

Cai H, Wang L, Mu W, Wan Q, Wei W, Davis RE, Chen H, Zhao Y. (2016) Multilocus genotyping of a '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'-related strain associated with cauliflower phyllody disease in China. *Ann Appl Biol.* 169: 64–74

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 10: 421.

Carle P, Malembic-Maher S, Arricau-Bouvery N, Desqué D, Eveillard S, Carrère S, Foissac X. (2011) Flavescence dorée phytoplasma genome: a metabolism oriented towards glycolysis and protein degradation. *Bull Insectol.* 64: S13-S14.

Chang SH, Cho ST, Chen CL, Yang JY, Kuo CH. (2015) Draft genome sequence of a 16SrII-A subgroup phytoplasma associated with purple coneflower (*Echinacea purpurea*) witches' broom disease in Taiwan. *Genome Announc.* 3: e01398-15.

Chang SH, Tan CM,, Wu CT, Lin TH, Jiang SY, Liu RC, Tsai MC, Su LW, Yang JY. (2018) Alterations of plant architecture and phase transition by the phytoplasma virulence factor SAP11. *J Exp Bot.* 69: 5389–5401.

- Chaturvedi Y, Rao GP, Tiwari AK, Duduk B, Bertaccini A.** (2010) Phytoplasma on ornamentals: detection, diversity and management. *Acta Phytopathol Hun.* 45: 31–69.
- Cho ST, Lin CP, Kuo CH.** (2019) Genomic characterization of the periwinkle leaf yellowing (PLY) phytoplasmas in Taiwan. *Front microbiol.* 10: 2194.
- Choueiri E, Salar P, Jreijiri F, El Zammar S, Massaad R, Abdul-Nour H, Bové JM, Danet JL, Foissac X.** (2007) Occurrence and distribution of ‘*Candidatus* Phytoplasma trifolii’ associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. *Eur J Plant Pathol.* 118: 411–416.
- Chung WC, Chen LL, Lo WS, Lin CP, Kuo CH.** (2013) Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. *PLoS One.* 8: e62770.
- Coetzee B, Douglas-Smit N, Maree HJ, Burger JT, Krüger K, Pietersen G.** (2019) Draft Genome Sequence of a “*Candidatus* Phytoplasma asteris”-Related Strain (Aster Yellows, Subgroup 16SrI-B) from South Africa. *Microbiol Resour Announc.* 8: e00148-19.
- Concepcion JC, Franceschetti M, Maqbool A, Saitoh H, Terauchi R, Kamoun S, Banfield MJ.** (2018) Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. *Nature Plants.* 4:576–585.

- Contaldo N, Mejia JF, Paltrinieri S, Calari A, Bertaccini A.** (2012) Identification and GroEL gene characterization of green petal phytoplasma infecting strawberry in Italy. *Phytopathogenic Mollicutes* 2: 59–62.
- Cousin MT, Sharma AK.** (1986) Association of mycoplasma-like organisms (MLOs) with mild type of hydrangea virescence: A study with 60-1000 nm thick sections. *J Phytopathol.* 115: 274–282.
- Cui W, Quiroga N, Curkovic ST, Zamorano A, Fiore N.** (2019) Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile. *Eur J Plant Pathol.* 155: 1039.
- Dantuma NP, Heinen C, Hoogstraten D.** (2009) The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. *DNA Repair.* 8: 449–460.
- Davis RE, Harrison NA, Zhao Y, Wei W, Dally EL.** (2016) ‘*Candidatus* Phytoplasma hispanicum’, a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 3463–3467.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS.** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45: 616–629.

Eckardt NA. (2003) MADS monsters: Controlling floral organ identity. *Plant Cell* 15: 803–805.

Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.

Emsley P, Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D60*: 2126–2132.

Farmer LM, Book AJ, Lee KH, Lin YL, Fu H, Vierstra RD. (2010) The RAD23 family provides an essential connection between the 26S proteasome and ubiquitylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 22: 124–142.

Fernández FD, Meneguzzi NG, Guzmán FA, Kirschbaum DS, Conci VC, Nome CF, Conci LR. (2015) Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 65: 2741–2747.

Fernández FD, Debat HJ, Conci LR. (2019) Molecular characterization of effector protein SAP54 in *Bellis virescence* phytoplasma (16SrIII-J). *Trop. plant pathol.* 44: 392–397

Ferrario S, Immink RG, Shchennikova A, Busscher-Lange J, Angenent GC. (2003) The MADS box gene FBP2 is required for SEPALLATA function in petunia. *Plant Cell.* 15: 914–925.

Fischer A, Santana-Cruz I, Wambua L, Olds C, Midega C, Dickinson M, Kawicha P, Khan Z, Masiga D, Jores J, Schneider B. (2016) Draft Genome Sequence of '*Candidatus* Phytoplasma oryzae' Strain Mbita1, the Causative Agent of Napier Grass Stunt Disease in Kenya. *Genome Announc.* 4: e00297–16.

Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni MJ, Pennington HG, Kamoun S, Banfield MJ. (2017) Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 81: e00066-16.

Fránová J, Špak J, Šimková M. (2013) First report of a 16SrIII-B subgroup phytoplasma associated with leaf reddening, virescence and phyllody of purple coneflower. *Eur J Plant Pathol.* 136: 7–12

Gao Y, Sun S-Q, Guo H-C. (2016) Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol J.* 13: 107.

Gonella E, Tedeschi R, Crotti E, Alma A. (2019) Multiple guests in a single host: interactions across symbiotic and phytopathogenic bacteria in phloem-feeding vectors – a review. *Entomol Exp Appl.* 167: 171–185.

Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater MM. (2006) AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 18: 1373–1382.

Gundersen DE, Lee IM, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ, Davis RE, Kingsbury DT. (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Sys Bacteriol*. 46: 64–75,

Gurr GM, Johnson AC, Ash GJ, Wilson BAL, Ero MM, Pilotti CA, Dewhurst CF, You MS. (2016) Coconut lethal yellowing diseases: a phytoplasma threat to palms of global economic and social significance. *Front Plant Sci*. 7: 1521.

Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 23: 1089–1097.

Halane MK, Kim SH, Spears BJ, Garner CM, Rogan CJ, Okafor EC, Su J, Bhattacharjee S, Gassmann W. (2018) The bacterial type III-secreted protein AvrRps4 is a bipartite effector. *PLoS Pathog*. 14: e1006984.

Hearon SS, Lawson RH, Smith FF, Mckenzie JT, Rosen J. (1976) Morphology of filamentous forms of mycoplasma-like organisms associated with Hydrangea virescence. *Phytopathology*. 66: 608–616.

Himeno M, Maejima K, Komatsu K, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. (2010) Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. *Virology*. 396: 69–75.

Himeno M, Neriya Y, Minato N, Miura C, Sugawara K, Ishii Y, Yamaji Y, Kakizawa S, Oshima K, Namba S. (2011) Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *Plant J*. 67: 971–979.

Hiruki C, Rong XD, Deng SJ. (1994) Hydrangea virescence, a disease associated with mycoplasma-like organism in Canada. *Acta Hort*. 377: 325–333.

Holm L, Rosenström P. (2010) DALI server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res*. 38: W545–549.

Honetšlegrová JF, Vibio M, Bertaccini A. (1996) Electron microscopy and molecular identification of phytoplasmas associated with strawberry green petals in the Czech Republic. *Eur J Plant Pathol*. 102: 831–835.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Research. 2: 208–218.

Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, Ishii Y, Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 6416–6421.

Hugouvieux V, Silva CS, Jourdain A, Stigliani A, Charras Q, Conn V, Conn SJ, Carles CC, Percy F, Zubieta C. (2018) Tetramerization of MADS family transcription factors SEPALLATA3 and AGAMOUS is required for floral meristem determinacy in Arabidopsis. Nucleic Acids Res. 46: 4966–4977.

Illergård K, Ardell DH, Elofsson A. (2009) Structure is three to ten times more conserved than sequence--a study of structural response in protein cores. Proteins. 15: 499–508.

IRPCM. (2004) '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int J Syst Evol Microbiol. 54: 1243–1255

Iwabuchi N, Endo A, Kameyama N, Satoh M, Miyazaki A, Koinuma H, Kitazawa Y, Maejima K, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2018) First report of '*Candidatus* Phytoplasma

malaysianum' associated with *Elaeocarpus* yellows of *Elaeocarpus zollingeri*. J Gen Plant Pathol. 84: 160–164.

Iwabuchi N, Maejima K, Kitazawa Y, Miyatake H, Nishikawa M, Tokuda R, Koinuma H, Miyazaki A, Nijo T, Oshima K, Yamaji Y, Namba S. (2019) Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. Biochem Biophys Res Commun. 513: 952–957.

Jakovljević M, Jović J, Mitrović M, Krstić O, Kosovac A, Toševski I, Cvrković T. (2015) *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae), a natural vector of 16SrIII-B phytoplasma causing multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense*. Ann Appl Biol. 167: 406–419.

Jiang H, Wei W, Saiki T, Kawakita H, Watanabe K, Sato M. (2004) Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. J Gen Plant Pathol. 70: 168–173.

Johansen LK, Carrington JC. (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. Plant Physiol. 126: 930–938.

Jomantiene R, Davis RE, Maas J, Dally EL. (1998) Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal

protein gene operon sequences. International Journal of Systematic Microbiology. 48: 269–277.

Jomantiene R, Davis RE. (2006) Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. FEMS Microbiol Lett 255: 59–65.

Jomantiene R, Zhao Y, Davis RE. (2007) Sequence-Variable Mosaics: Composites of Recurrent Transposition Characterizing the Genomes of Phylogenetically Diverse Phytoplasmas. DNA and Cell Biol. 26: 557–564.

Jung HY, Yae MC, Lee JT, Hibi T, Namba S. (2003) Aster yellows subgroup (*Candidatus* Phytoplasma sp. AY 16S-group, AY-sg) phytoplasma associated with porcelain vine showing witches' broom symptoms in South Korea. J Gen Plant Pathol. 69: 208–209.

Kabsch W. (2010) XDS. Acta Cryst. D66: 125–132.

Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, Nishigawa H, Jung HY, Sawayanagi T, Tsuchizaki T, Miyata S, Ugaki M, Namba S. (2001) Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. Mol Plant-Microbe Interact. 14: 1043–1053.

- Kakizawa S, Makino A, Ishii Y, Tamaki H, Kamagata Y.** (2014) Draft genome sequence of “Candidatus Phytoplasma asteris” strain OY-V, an unculturable plant-pathogenic bacterium. *Genome Announc.* 2: e00944-14.
- Kaminska M, Korbin M.** (1999) Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiol Plant.* 21: 21–26.
- Kanehira T, Hirokoshi N, Yamakita Y, Shinohara M.** (1996) Occurrence of hydrangea phyllody in Japan and detection of the causal phytoplasma. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 62: 537–540.
- Kaufmann K, Melzer R, Theißen G.** (2005) MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene.* 347: 183–198.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (eds)** (2011) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: The Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Elsevier).
- Kitamura Y, Hosokawa M, Uemachi T, Yazawa S.** (2009) Selection of ABC genes for candidate genes of morphological changes in hydrangea floral organs induced by phytoplasma infection. *Scientia horticultrae.* 122: 603–609.

- Kitazawa Y, Iwabuchi N, Himeno M, Sasano M, Koinuma H, Nijo T, Tomomitsu T, Yoshida T, Okano Y, Yoshikawa M, Maejima K, Oshima K, Namba S.** (2017) Phytoplasma-conserved phylogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading oral MADS domain proteins. *J Exp Bot.* 68: 2799–2811.
- Ku C, Lo W-S, Kuo C-H.** (2013) Horizontal transfer of potential mobile units in phytoplasmas. *Mobile Genetic Elements.* 3: e26145.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemüller E.** (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. *BMC Genomics.* 9: 306.
- Kube M, Mitrović J, Duduk B, Rabus R, Seemüller E.** (2012) Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *Sci World J.* 185942.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870–1874.
- Kumari S, Nagendran K, Rai AB, Singh B, Rao GP, Bertaccini A.** (2019) Global Status of phytoplasma diseases in vegetable crops. *Front Microbiol.* 10: 1349–1349.

Lai X, Daher H, Galien A, Hugouvieux V, Zubieta C. (2019) Structural basis for plant MADS transcription factor oligomerization. *Computational and structural biotechnology journal*. 17: 946–953.

Lee IM, Shao J, Bottner-Parker KD, Gundersen-Rindal DE, Zhao Y, Davis RE. (2015) Draft Genome Sequence of '*Candidatus* Phytoplasma pruni' Strain CX, a Plant-Pathogenic Bacterium. *Genome Announc.* 3: e01117–15.

Liao YT, Lin SS, Lin SJ, Sun WT, Shen BN, Cheng HP, Lin CP, Ko TP, Chen YF, Wang HC. (2019) Structural insights into the interaction between phytoplasmal effector causing phyllody 1 (PHYLL1) and MADS transcription factor. *Plant J.* 100: 706–719.

Liljas A, Liljas L, Piskur J, Lindblom G, Nissen P, Kjeldgaard M. (2012) 構造生物学. 化学同仁. 京都.

Lupas AN, Bassler J. (2017) Coiled Coils - A Model System for the 21st Century. *Trends Biochem Sci.* 42: 130–140.

MacLean AM, Sugio A, Makarova OV, Findlay KC, Grieve VM, Toth R, Nicolaisen M, Hogenhout SA. (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 157: 831–841.

Macfarlane SA. (2010) Tobraviruses--plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol Plant Pathol.* 11: 577–583.

MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzanich K, Zdziarska AM, Angenent GC, Immink RG, Hogenhout SA. (2014) Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* 12: e1001835.

Maejima K, Iwai R, Himeno M, Komatsu K, Kitazawa Y, Fujita N, Ishikawa K, Fukuoka M, Minato N, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2014) Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phylogen, induces phyllody. *Plant J.* 78: 541–554.

Maejima K, Kitazawa Y, Tomomitsu T, Yusa A, Neriya Y, Himeno M, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2015) Degradation of class E MADS-domain transcription factors in *Arabidopsis* by a phytoplasmal effector, phylogen. *Plant Signal Behav.* 10: e1042635.

Marccone C. (2014) Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Ann Appl Biol.* 165: 199–221.

Marccone C. (2017) Elm yellows: A phytoplasma disease of concern in forest and landscape ecosystems. *Forest Pathol.* 47: e12324.

- Mason JM, Arndt KM.** (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem.* 5: 170–176.
- Melo LA, Ventura JA, Costa H, Kitajima EW, Ferreira J, Bedendo IP.** (2018) Delineation of a novel subgroup 16SrXIII-J phytoplasma, a ‘*Candidatus* Phytoplasma hispanicum’-related strain, based on computer-simulated RFLP and phylogenetic analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68: 962–966.
- Minato N, Komatsu K, Okano Y, Maejima K, Ozeki J, Senshu H, Takahashi S, Yamaji Y, Namba S.** (2014a) Efficient foreign gene expression in planta using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch Virol.* 159: 885–896.
- Minato N, Himeno M, Hoshi A, Maejima K, Komatsu K, Takebayashi Y, Kasahara H, Yusa A, Yamaji Y, Oshima K, Kamiya Y, Namba S.** (2014b) The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Sci Rep.* 4: 7399.
- Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Mölling K, Broecker F, Beyerlein P, Büttner C, Bertaccini A, Kube M.** (2014) Generation and analysis of draft sequences of ‘stolbur’

phytoplasma from multiple displacement amplification templates. J Mol Microb Biotech. 24: 1–11.

Miyatake H, Hasegawa T, Yamano A. (2006) New methods to prepare iodinated derivatives by vaporizing iodine labelling (VIL) and hydrogen peroxide VIL (HYPER-VIL). Acta Cryst. D62: 280–289.

Miyazaki A, Shigaki T, Koinuma H, Iwabuchi N, Rauka GB, Kembu A, Saul J, Watanabe K, Nijo T, Maejima K, Yamaji Y, Namba S. (2018) '*Candidatus* Phytoplasma noviguineense', a novel taxon associated with Bogia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of New Guinea. Int J Syst Evol Microbiol. 68: 170–175.

Muhire BM, Varsani A, Martin DP. (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLoS One 9: e108277.

Mulpuri S, Muddanuru T. (2016) Molecular identification of a 16SrII-D phytoplasma associated with sunflower phyllody in India. Australasian Plant Dis Notes. 11: 20.

Musetti R, Pagliari L. (Eds.). (2019) Phytoplasmas: Methods and Protocols. Springer New York.

Music MS, Samarzija I, Hogenhout SA, Haryono M, Cho ST, Kuo CH. (2019) The genome of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ strain SA-1 is highly dynamic and prone to adopting foreign sequences. *Syst appl microbiol.* 42: 117–127.

Nabi S, Madhupriya Dubey DK, Rao GP, Baranwal VK, Sharma P. (2015) Molecular characterization of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ subgroup I-B associated with sesame phyllody disease and identification of its natural vector and weed reservoir in India. *Australasian Plant Pathol.* 44: 289–297.

Namba S, Oyaizu H, Kato S, Iwanami S, Tsuchizaki T. (1993) Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 43: 461–467.

Namba S. (2019) Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 95: 401–418.

Navratil M, Valova P, Fialova R, Lauterer P, Safarova D, Stary M. (2009) The incidence of “stolbur” disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). *Crop Prot.* 28: 898–904.

Nejat N, Sijam K, Abdullah SNA, Vadamalai G, Dickinson M. (2009) Phytoplasmas associated with disease of coconut in Malaysia: phylogenetic groups and host plant species. *Plant Pathol.* 58: 1152–1160

Ng M, Yanofsky MF. (2001) Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1.

Plant Cell. 13: 739–753.

Nishigawa H, Miyata S, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, Matsuda I,

Tsuchizaki T, Namba S. (2001) In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins.

Microbiology. 147: 507–513.

Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M, Namba S.

(2002a) Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? Microbiology. 148: 1389–1396.

Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M, Namba S.

(2002b) A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. Gene. 298: 195–201.

Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, Neriya Y, Netsu O, Minato N, Yoshida T, Maejima K,

Oshima K, Komatsu K, Yamaji Y, Namba S. (2014) In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. Plant Cell. 26:

2168–2183.

Orlovskis Z, Hogenhout SA. (2016) A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Front Plant Sci.* 7: 885.

Orlovskis Z, Canale MC, Haryono M, Lopes JRS, Kuo C-H, Hogenhout SA. (2017) A few sequence polymorphisms among isolates of maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Ann Bot.* 119: 869–884.

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H-Y, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet.* 36: 27–29.

Oshima K, Maejima K, Namba S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Front Microbiol.* 4: 230.

Pacifico D, Galetto L, Rashidi M, Abbà S, Palmano S, Firrao G, Bosco D, Marzachi C. (2015) Decreasing global transcript levels over time suggest that phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. *Appl Environ Microbiol.* 81: 2591–602.

Pallen MJ, Wren BW. (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature.* 449: 835–842.

Pecher P, Moro G, Canale MC, Capdevielle S, Singh A, MacLean A, Sugio A, Kuo CH, Lopes

JRS, Hogenhout SA. (2019) Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of Arabidopsis versus maize. *PLoS Pathog.* 15: e1008035.

Pei J, Kim BH, Grishin NV. (2008) PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* 36: 2295–2300.

Pérez-López E, Dumonceaux TJ. (2016) Detection and identification of the heterogeneous novel subgroup 16SrXIII-(a/I)I phytoplasma associated with strawberry green petal disease and Mexican periwinkle virescence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 66: 4406–4415.

Pérez-López E, Rodríguez-Martínez D, Olivier CY, Luna-Rodríguez M, Dumonceaux TJ.

(2017) Molecular diagnostic assays based on cpn60 UT sequences reveal the geographic distribution of subgroup 16SrXIII- (A/I) I phytoplasma in Mexico. *Sci Rep.* 7: 950.

Pérez-López E. (2019) Strawberry green petal disease: beautiful symptoms, devastating disease. *Revista de Biología Tropical.* 4.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.

(2004) UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25: 1605–1612.

Pracros P, Renaudin J, Eveillard S, Mouras A, Hernould M. (2006) Tomato flower

abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 19: 62–68.

Puranik S, Acajjaoui S, Conn S, Costa L, Conn V, Vial A, Marcellin R, Melzer R, Brown E,

Hart D, Theißen G, Silva CS, Parcy F, Dumas R, Nanao M, Zubieta C. (2014) Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in Arabidopsis. *Plant Cell.* 26: 3603–3615.

Quaglino F, Kube M, Jawhari M, Abou-Jawdah Y, Siewert C, Choueiri E, Sobh H, Casati P,

Tedeschi R, Lova MM, Alma A, Bianco PA. (2015) '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' associated with almond witches'-broom disease: from draft genome to genetic diversity among strain populations. *BMC Microbiol.* 15: 148.

Rao GP, Nabi SU, Madhupriya. (2015) Overview on a century progress of research on sesame phyllody disease. *Phytopath Moll.* 5: 74–83

Rümpler F, Gramzow L, Theißen G, Melzer R. (2015) Did convergent protein evolution enable phytoplasmas to generate 'zombie plants'? *Trends Plant Sci.* 20: 798–806.

Rümpler F, Theißen G, Melzer R. (2018) A conserved leucine zipper-like motif accounts for strong tetramerization capabilities of SEPALLATA-like MADS-domain transcription factors. *J Exp Bot.* 69: 1943–1954.

Saeki Y. (2017) Ubiquitin recognition by the proteasome. *J Biochem.* 161:113–124.

Saccardo F, Martini M, Palmano S, Ermacora P, Scortichini M, Loi N, Firrao G. (2012) Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII. *Microbiology.* 158: 2805–2814.

Salehi M, Siampour M, Esmailzadeh-Hosseini SA, Bertaccini A. (2015) Characterization and vector transmission of phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. *Bulletin of Insectology.* 68: 311–319.

Salehi M, Esmailzadeh Hosseini SA, Salehi E, Bertaccini A. (2017) Genetic diversity and vector transmission of phytoplasmas associated with sesame phyllody in Iran. *Folia Microbiol.* 62: 99–109.

Sawayanagi T, Horikoshi N, Kanehira T, Shinohara M, Bertaccini A, Cousin MT, Hiruki C,

Namba S. (1999) '*Candidatus* Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1275–1285.

Schneider B, Seemüller E. (1994a) Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol.* 60: 3409–3412.

Schneider B, Seemüller E. (1994b) Studies on taxonomic relationships of mycoplasma-like organisms by southern blot analysis. *J Phytopathol.* 141: 173–185.

Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y,

Namba S. (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J Gen Virol.* 90: 1014–1024.

Shimada TL, Shimada T, Hara-Nishimura I. (2010) A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 61: 519–28.

Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K. (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development.* 139: 3081–3098.

Sohn KH, Zhang Y, Jones JD. (2009) The *Pseudomonas syringae* effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function. *Plant J.* 57: 1079–1091.

Sohn KH, Hughes RK, Piquerez SJ, Jones JD, Banfield MJ. (2012) Distinct regions of the *Pseudomonas syringae* coiled-coil effector AvrRps4 are required for activation of immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 16371–16376.

Strauss E. (2009) Phytoplasma research begins to bloom. *Science.* 325: 388–390.

Su YT, Chen JC, Lin CP. (2011) Phytoplasma-induced floral abnormalities in *Catharanthus roseus* are associated with phytoplasma accumulation and transcript repression of floral organ identity genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 24: 1502–1512.

Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, Himeno M, Oshima K, Namba S. (2013) The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiol.* 162: 2005–2014.

Sugio A, Kingdom HN, MacLean AM, Grieve VM, Hogenhout SA. (2011) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: E1254–E1263.

Sugio A, Hogenhout SA. (2012) The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Curr Opin Microbiol.* 15: 247–254.

Tanaka M, Tanaka C, Usugi T, Uematsu S, Ebihara Y. (2008) Occurrence of strawberry yellows caused by '*Candidatus* Phytoplasma fragariae'. *Jpn J Phytopathol.* 74: 258.

Terwilliger TC, Grosse-Kunstleve RW, Afonine PV, Moriarty NW, Zwart PH, Hung L-W, Read RJ, Adams PD. (2008) Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Cryst.* D64: 61–69.

Terwilliger TC, Adams PD, Read RJ, McCoy AJ, Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Afonine PV, Zwart PH, Hung L-W. (2009) Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Cryst.* D65: 582–601.

Theißen G, Saedler H. (2001) Plant biology: floral quartets. *Nature.* 409: 469–471.

Tian J, Pei H, Zhang S, Chen J, Chen W, Yang R, Meng Y, You J, Gao J, Ma N. (2014) TRV–GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *J Exp Bot.* 65: 311–322.

Toruño TY, Musić MS, Simi S, Nicolaisen M, Hogenhout SA. (2010) Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol.* 77: 1406–1415.

Tsuchiya H, Ohtake F, Arai N, Kaiho A, Yasuda S, Tanaka K, Saeki Y. (2017) In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-Linked Chain Specificity of the Proteasome. *Mol Cell.* 66: 488-502.e7

Wang J, Song L, Jiao Q, Yang S, Gao R, Lu X, Zhou G. (2018) Comparative genome analysis of jujube witches'-broom Phytoplasma, an obligate pathogen that causes jujube witches'-broom disease. *BMC Genomics.* 19: 689.

Wang N, Yang H, Yin Z, Liu W, Sun L, Wu Y. (2018) Phytoplasma effector SWP1 induces witches' broom symptom by destabilizing the TCP transcription factor BRANCHED1. *Mol Plant Pathol.* 19: 2623–2634.

Wei W, Wu W, Davis RE, Lee IM, Zhao Y. (2016) Development of molecular markers and a diagnostic tool for investigation of coinfections by and interactions between potato purple top and potato witches'-broom phytoplasmas in tomato. *Ann App Biol.* 168: 133–141.

Weintraub PG, Beanland L. (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol.* 51: 91–111.

Welvaert W, Sakyn G, Lagasse A. (1975) Recherches sur les symptômes de la virescence chez l'Hydrangea macrophylla Thumb. Phytopathology. 83: 152–158.

Wirthmueller L, Maqbool A, Banfield MJ. (2013) On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. Nat Rev Microbiol. 11: 761–776

Wu MF, Sang Y, Bezhani S, Yamaguchi N, Han SK, Zhenteng Li Z, Su Y, Slewinski TL, Wagner D. (2012) SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA. 109: 3576–3581.

Yamaji Y, Kobayashi T, Hamada K, Sakurai K, Yoshii A, Suzuki M, Namba S, Hibi T. (2006) In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. Virology. 347: 100–108.

Yang CY, Huang YH, Lin CP, Lin YY, Hsu HC, Wang CN, Liu LY, Shen BN, Lin SS. (2015) MicroRNA396-targeted SHORT VEGETATIVE PHASE is required to repress flowering and is related to the development of abnormal flower symptoms by the phyllody symptoms1 effector. Plant Physiol. 168: 1702–1716.

Zamorano A, Fiore N. (2016) Draft genome sequence of 16SrIII-J phytoplasma, a plant pathogenic bacterium with a broad spectrum of hosts. *Genome Announc.* 4: e00602-16.

Zhang T, Zhao Y, Juntheikki I, Mouhu K, Broholm SK, Rijpkema AS, Kins L, Lan T, Albert VA, Teeri TH, Elomaa P. (2017) Dissecting functions of SEPALLATA-like MADS box genes in patterning of the pseudanthial inflorescence of *Gerbera hybrida*. 216: 939–954

Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9: 40.

Zwolińska A, Krawczyk K, Borodynko-Filas N, Pospieszny H. (2019) Non-crop sources of Rapeseed Phyllody phytoplasma ('*Candidatus* Phytoplasma asteris': 16SrI-B and 16SrI- (B/L)), and closely related strains. *Crop Protection.* 119: 59–68.

河合剛太, 坂本泰一, 根本直樹. (2018) エッセンシャル 構造生物学. 講談社. 東京.

川原田邦彦, 三上常夫, 若林芳樹. (2010) 日本のアジサイ図鑑. 柏書房. 東京

土居養二, 寺中理明, 與良清, 明日山秀文. (1967) クワ萎縮病、ジャガイモてんぐ巢病、Aster yellows 感染ペチュニアならびにキリてんぐ巢病の罹病茎葉節部に見出された Mycoplasma 様 (あるいは PLT 様) の微生物について. *日植病報.* 33: 259–266.

難波成任. (2017) 創造する破壊者 ファイトプラズマ: 生命を操る謎の細菌. 東京大学出版会.

宮武秀行. (2007) 蒸気拡散によるヨウ素化誘導体作製方法. 日本結晶学会誌. 49: 137-140.