

博士論文

植物病原細菌の花き類に対する病原性に
関する研究

北沢 優悟

目次

第1章 緒言	7
1.1 植物病	7
1.2 植物の細菌病	8
1.2.1 植物病原細菌の種類	8
1.2.2 細菌病の特徴	10
1.2.3 病原細菌の特定と分類	12
1.2.4 細菌病の防除	14
1.3 植物病原細菌の病原性解析の重要性	15
1.4 花き類における細菌病	16
第2章 葉枯症状を示すコスモスより分離された細菌の病原性解析	18
2.1 序文	18
2.1.1 <i>Pseudomonas</i> 属植物病原細菌	18
2.1.2 <i>Pseudomonas</i> 属植物病原細菌の分類	20
2.1.3 <i>Pseudomonas cichorii</i>	21
2.1.4 コスモスに発生した葉枯症状	23
2.2 材料および方法	25
2.2.1 材料	25
2.2.2 症状の観察および病原細菌の分類	26
2.2.3 分離菌株の簡易分類試験	27
2.2.4 植物体への接種試験	29
2.2.5 分離菌株の細菌学的性状試験	30
2.2.6 分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列の決定	35
2.2.7 分離菌株と <i>Pseudomonas</i> 属細菌の配列同一性解析、及び系統解析	37

2.3	結果	39
2.3.1	葉枯症状を呈するコスモスの診断	39
2.3.2	病斑部からの細菌の分離	41
2.3.3	分離菌株の簡易分類	42
2.3.4	コスモスへの接種試験による病原性の検証	43
2.3.5	分離菌株の種分類	45
2.4	考察	58
2.4.1	葉枯症状を示すコスモスから分離された細菌の コスモスへの病原性	58
2.4.2	病原細菌の種分類	59
2.4.3	本病害の名称	60
2.4.4	系統解析における <i>P. cichorii</i> クレード内の分化の原因	61
第3章 phyllogen による葉化誘導機構		62
3.1	序文	62
3.1.1	ファイトプラズマ	63
3.1.2	ファイトプラズマの病原性	66
3.1.3	ファイトプラズマによる花器官の形態異常	68
3.1.4	花の ABCE モデルと MADS ドメイン転写因子	72
3.1.5	プロテアソーム	76
3.2	材料および方法	79
3.2.1	材料	79
3.2.2	OY-W 感染植物、昆虫間の PHYL1 _{OY} 発現量比較	80
3.2.3	PHYL1 _{OY} 、PHYL1 _{PnWB} 発現コンストラクトの作出	84
3.2.4	PHYL1 _{OY} 形質転換シロイヌナズナの作出	92
3.2.5	Yeast two hybrid assay (Y2H)	94
3.2.6	Bimolecular Fluorescence Complementation 法 (BiFC)	98
3.2.7	MTF の局在・蓄積量解析	102
3.2.8	タンパク質分解経路阻害実験	105
3.2.9	免疫沈降	106

3.3	結果	108
3.3.1	OY-Wにおける PHYL1 _{OY} 発現量の植物感染時と昆虫感染時の比較	108
3.3.2	PHYL1 _{OY} 、PHYL1 _{OY} Δ3~PHYL1 _{OY} Δ8の葉化誘導能	109
3.3.3	PHYL1 _{OY} 形質転換シロイヌナズナにおける AP1、CAL、SEP3 の発現量解析	111
3.3.4	PHYL1 _{OY} と MTF の相互作用解析	112
3.3.5	PHYL1 _{OY} 形質転換植物における AP1、SEP3 の下流因子の発現量解析	114
3.3.6	BiFC法を用いた MTF の多量体化への PHYL1 _{OY} の影響解析	116
3.3.7	PHYL1 _{OY} 存在下での MTF の局在・蓄積量解析	118
3.3.8	PHYL1 _{OY} による MTF の分解誘導機構の解析	121
3.3.9	PHYL1 _{OY} 存在下での SEP3 のユビキチン化の検証	123
3.3.10	PHYL1 _{PhWB} の PHYL1 _{OY} との比較	125
3.4	考察	127
3.4.1	PHYL1 _{OY} はファイトプラズマの植物感染時に機能する	127
3.4.2	PHYL1 _{OY} は MTF の分解誘導を介して、花器官に異常を誘導する	128
3.4.3	PHYL1 _{OY} による各花器官への影響	129
3.4.4	PHYL1 _{OY} の機能とユビキチン・プロテアソーム系の関連性	132
3.4.5	PHYL1 _{OY} の機能領域	132
3.4.6	phylogen の共通性	133

第4章 様々な花き類に対する phylogen の機能の検証	134
4.1 序文	135
4.2 材料と方法	135
4.2.1 材料	136
4.2.2 遺伝子のクローニング	136
4.2.3 PHYL1 _{OY} 、PHYL1 _{PnWB} のウイルスベクターへのクローニング	138
4.2.4 ALSV ベクターの植物への接種	142
4.2.5 ALSV 接種ヒマワリからのウイルス検出	143
4.2.6 ALSV 感染ペチュニアの遺伝子発現解析	144
4.2.7 Yeast two hybrid assay (Y2H)	146
4.2.8 YFP 融合 MTF の分解誘導活性試験	147
4.3 結果	148
4.3.1 ALSV-PHYL1 _{OY} 、ALSV-PHYL1 _{PnWB} 接種ペチュニアの花器官の形態	148
4.3.2 PHYL1 _{OY} 発現ペチュニアにおける遺伝子発現量解析	150
4.3.3 ALSV-PHYL1 _{OY} 、ALSV-PHYL1 _{PnWB} 接種ヒマワリ、アスターの花器官の形態	153
4.3.4 PHYL1 _{OY} と様々な花き類の MTF との結合能	157
4.3.5 PHYL1 _{OY} の様々な花き類の MTF に対する分解誘導活性試験	159
4.4 考察	161
4.4.1 phylogen は広範な被子植物の MTF を標的とする	161
4.4.2 phylogen による MTF の認識機構	163
4.4.3 phylogen 発現ペチュニアの表現型には、E クラス MTF 機能抑制が大きく関わる	164
4.4.4 PHYL1 _{OY} 発現ペチュニアと OY-W 感染ペチュニアの比較	168

第5章 総合考察	170
5.1 <i>P. cichorii</i> のコスモスに対する病原性	170
5.2 コスモス葉枯細菌病の防除	172
5.3 phyllogen がファイトプラズマ感染時に果たす役割	173
5.4 phyllogen の品種改良への利用の可能性	175
摘要	177
謝辞	182
引用文献	183

第 1 章 緒言

1.1 植物病

植物は、成育の過程で様々な外的要因による影響を受ける。その結果として植物体に障害が生じた場合、それらは「植物病」と総称される（難波 2008）。作物生産において、植物病は収量の損失につながるうえ、品質を低下させるため問題となる。全世界における植物病の被害を試算した場合、理論上可能な作物生産高の約 36%が植物病で失われていると推定される（難波 2008）。従って、安定した作物生産のためには、植物病の発生を未然に予防するとともに、発生時には適切な防除を行うことが重要である。

植物病の原因（病因）は無数に存在し、主に非生物的病因と生物的病因に大別される（眞山 2010）。非生物的病因とは物理的要因（高温や乾燥など）、化学的な要因（栄養素の欠乏や農薬の過剰散布など）の総称である。一方で、主な生物的病因としては植物を加害する微生物（ウイルス、細菌、菌類、線虫など）や昆虫、哺乳類が挙げられるほか、圃場に生える雑草も作物の栄養を収奪し、その収量・品質を低下させる。これらの生物は、種類によって病害を引き起こしやすい環境条件や伝染経路、農薬の効果等が異なる。従って、病因となる病原体によって適切な防除法は異なるため、新規病害発生時には病原体を正確に同定し、その性状を把握する必要がある。

1.2 植物の細菌病

1.2.1 植物病原細菌の種類

本研究では主に、細菌を病原体とする植物病（細菌病）を扱う。植物に病害を引き起こす細菌（植物病原細菌）は従来 6 属（*Agrobacterium*、*Corynebacterium*、*Erwinia*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*Streptomyces*）に分類されていたが（Dye *et al.*, 1980）、新種の発見や新たな分類法の提唱により、現在は 34 属に分類されその種数は 400 種を超える（表 1; Bull *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2012）。また、同一種内でも病原性に差異があるために、宿主範囲が異なる例も報告されている。この差異は主に種の下位分類群である pathovar として分類される（Dye *et al.*, 1980; Young *et al.*, 1991）。新たな種や pathovar の発見、あるいは既存種の再編は近年も続いており（Bull *et al.*, 2012）、植物病原細菌の分類体系を複雑なものとしている。植物病原細菌の一般的な分類方法については 1.2.3 項で詳細に解説する。

一部の植物病原細菌は未だ培養系が確立しておらず（難培養性植物病原細菌と総称）、種や属が定義されていないため、それらに相当する暫定的なタクソンに分類されている。難培養性植物病原細菌 [*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*、*Ca. Liberibacter*、*Ca. Phlomobacter*] は培養可能な細菌と比べて、性状や植物に対する病原性、分類方法が特殊であることが多い。そこで、以下の項では、特筆している場合を除き、培養可能な細菌を想定して記述する。

表 1 現在の植物病細菌の分類体系 (Bull *et al.*, 2010、Bull *et al.*, 2012 参照)

グラム陰性細菌		グラム陽性細菌	
属名	種数	属名	種数
1 <i>Acetobacter</i>	2	1 <i>Bacillus</i>	2
2 <i>Acidovorax</i>	7	2 <i>Clavibacter</i>	7
3 <i>Brenneria</i>	6	3 <i>Clostridium</i>	1
4 <i>Burkholderia</i>	9	4 <i>Curtobacterium</i>	6
5 <i>Enterobacter</i>	4	5 <i>Rathayibacter</i>	3
6 <i>Erwinia</i>	9	6 <i>Rhodococcus</i>	1
7 <i>Gluconobacter</i>	1	7 <i>Leifsonia</i>	4
8 <i>Herbaspirium</i>	1	8 <i>Nocardia</i>	1
9 <i>Janthinobacterium</i>	1	9 <i>Spiroplasma</i>	3
10 <i>Pantoea</i>	9	10 <i>Streptomyces</i>	17
11 <i>Pectobacterium</i>	14	11 <i>Candidatus Phytoplasma</i>	20
12 <i>Pseudomonas</i>	87		65種
13 <i>Ralstonia</i>	2		
14 <i>Rhizobacter</i>	1		
15 <i>Rhizobium</i>	5		
16 <i>Samsonia</i>	1		
17 <i>Serratia</i>	1		
18 <i>Sphingomonas</i>	2		
19 <i>Xanthomonas</i>	165		
20 <i>Xylella</i>	4		
21 <i>Xylophilus</i>	1		
22 <i>Candidatus Liberibacter</i>	3		
23 <i>Candidatus Phlomobacter</i>	1		
	336種		

1.2.2 細菌病の特徴

植物病原細菌によって引き起こされる症状は様々であり、萎凋、斑点、腐敗、枯損などに大別される（後藤 1990）。萎凋とは、植物個体の一部、あるいは全体が萎れる症状である（図 1-1A）。斑点とはその名の通り、植物の様々な部位に斑点状の病斑が生じる症状を指す（図 1-1B）。激症時には発生部位の腐敗や枯損を招くこともある。腐敗は細菌の増殖に伴い植物組織が崩壊していく症状である（図 1-1C）。枯損は植物の罹病部が乾燥・枯死する症状であり（図 1-1D）、第 2 章で扱う葉枯症状も含まれる。

図 1-1 に示した症状は細菌病に典型的な症状ではあるが、しばしば他の微生物病によっても類似した症状が誘導される。その一方で、病原体の適切な防除法はその種類によって異なるため、病原体が細菌なのかを適切に判断することが重要となる。病原細菌が植物体内に侵入し増殖すると、罹病部にしばしば水に浸ったような病斑（水浸状病斑）が生じる（図 1-2A）。水浸状病斑は、病害を細菌病と推測する重要な指標である（後藤、瀧川 1984a）。特に斑点、腐敗、枯損病害の初期症状は、水浸状病斑であることが多い。ただし、病害が伸展した場合には異なる症状へと変化することも多く、また維管束部を罹病部とする病害では水浸状病斑が観察されないことが多いため注意を要する。水浸状病斑と共に細菌病の診断の大きな根拠となるのが、罹病部からの多量の細菌の漏出（菌泥）の確認（図 1-2B, C）である（全国農村教育協会 2002）。ただし、植物病の種類によっては菌泥が全く観察されないこともある。また病害が進行しすぎている場合、腐性的な細菌が二次的に増殖し菌泥を生じる場合があり、主病原と混同しないように注意が必要である。

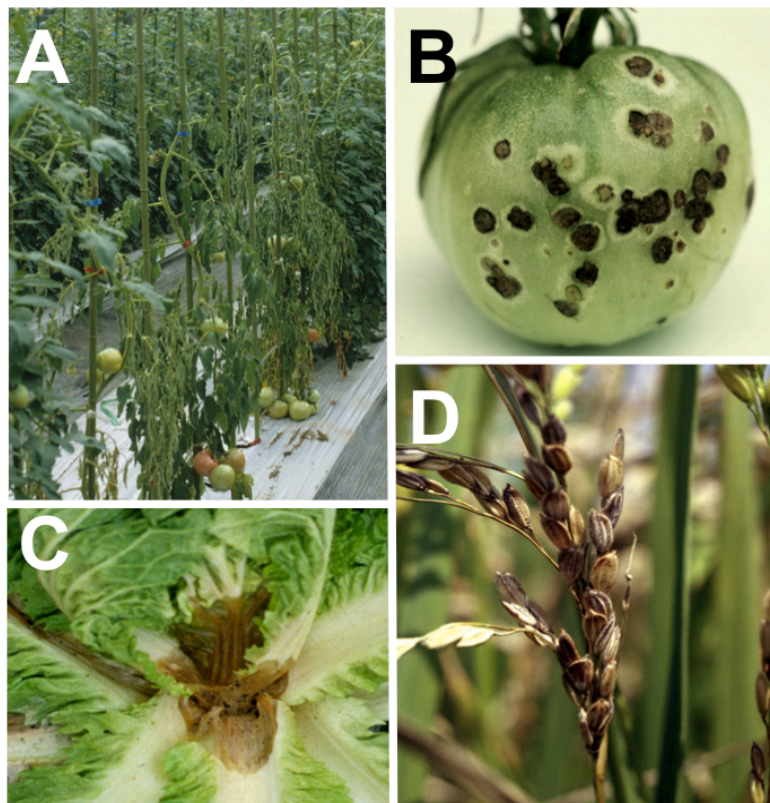


図 1-1 植物細菌病の例 (難波 2008)

- A. トマト青枯病 (萎凋) B. トマト斑点細菌病 (斑点)
 C. ハクサイ軟腐病 (腐敗) D. イネもみ枯細菌病 (枯損)

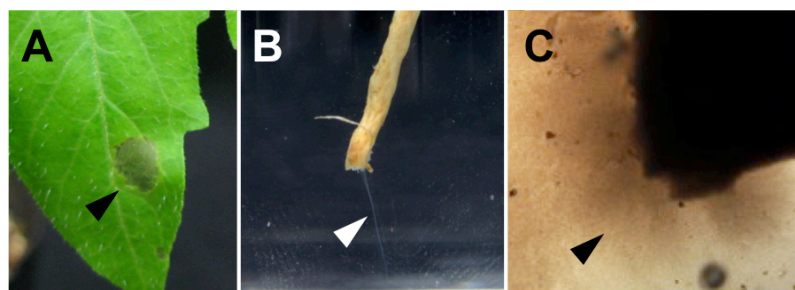


図 1-2 細菌病の特徴 (矢頭)

- A. 水浸状病斑 B. 菌泥の流出 C. 菌泥の光学顕微鏡観察

1.2.3 病原細菌の特定と分類

病害が細菌病と推測された場合には、細菌を分離し病原性を試験することで病原細菌を特定すると共に、その性状を解析し種を分類する。本項では、一連の操作について簡潔に記載する。

病原細菌の特定

一般に、ある微生物を病原体と特定するには、「コッホの原則」を満たす必要がある。コッホの原則はドイツの医学者 **Robert Koch** が提唱したもので、①ある病気の病患部に特定の微生物が検出されること、②その微生物が罹病部から純粋に分離・培養されること、③分離した微生物を健全個体に接種した際に、症状が再現されること、④再現された病患部から接種源と同一の微生物が再び検出されること、の 4 原則からなる。本来、動物の疾病の病原体確認の際の指針のひとつであったが、植物の微生物病にも準用されている（難波 2008）。

具体的な手順は以下の通りである。①細菌の検出は、前項に記した菌泥の流出を観察するのが一般的である。②菌泥を確認した病患部を採集し、細菌を培地上で培養する。菌泥が観察される病患部では病原細菌の密度が極めて高く、病原細菌由来の細菌集落が培地上に一様に形成されることが多い。分離後は由来の異なる細菌集落が混合するのを防ぐ為に、独立した集落を選抜する（単集落分離）。③分離菌株が病原細菌かは、病原性試験によって判定する。健全な宿主植物に各分離菌株を接種して、症状が再現されることを確認する。接種方法は様々であり、植物体表面に菌液を吹き付ける噴霧接種や、植物体内に注射針で菌液を注入する針接種などがある。接種方法によって症状の強弱が変化することもあるため、可能な限り自然環境下での感染に近い手法を選ぶことが望ましい（後藤、瀧川 1984b）。④接種個体で症状が再現された場合は再分離を行い、接種原と同様の細菌が分離されることを確認する。

病原細菌の分類

植物病原細菌の分類は、主に細菌学的性状試験、宿主植物範囲の検討、分子生物学的解析に基づいて行われる。細菌学的性状とは細菌の形態的性状、培養的性状、生理・生化学的性状などのものであり、各性状を既知の菌株と比較することで種を分類する。代表的な細菌学的性状として、細菌をグラム陰性細菌とグラム陽性細菌（表 1）の 2 群に大別するグラム反応がある（後藤、瀧川 1984b、1984c、1984d）。宿主植物範囲の検討は、分離源の植物とは異なる様々な植物に対する病原性試験によって行う。上述の通り、細菌の中には同一種内でも宿主範囲が異なる *pathovar* が存在する場合があるため、宿主植物範囲の検討は細菌の農業生産における危険性を把握するために重要である。分子生物学的解析は近年行われる様になった分類手法であり、ゲノム中の特定の DNA 配列を既報の菌株と比較することが多い。迅速・簡便に分類を行えるという点で極めて有益であるが、限定的な DNA 配列に基づく分類であり、細菌の性状を正確に反映しているとは限らない。そのため、必ず細菌学的性状試験などを併用して種を分類する必要がある（Wayne *et al.*, 1987; 瀧川 2001）。なお、培養系の確立していない難培養性植物病原細菌においては細菌学的性状試験や病原性試験が実施出来ないことが多いため、分子生物学的解析を中心とした分類が進められている。

1.2.4 細菌病の防除

植物細菌病の有効な防除法は、病原細菌ごとに異なる。しかしながら、概して対症的な治療は困難である。細菌病が発生してから農薬散布を行っても、感染のごく初期を除いて有効性は薄い。そのため、細菌病の防除は発生前の予防的措置と、発病植物の除去や次作の作付け体系の変更といった他植物への被害拡大の回避を中心に行われる（高橋 1991）。具体的な予防措置としては、土壤消毒や土壤の pH の調節、抵抗性品種の利用、薬剤の予防的散布等が知られている。なお、薬剤としては一般に銅剤、抗生物質等が用いられるが、不適切な使用による薬害や耐性菌の出現に留意する必要がある（高橋 1991）。なお、難培養性植物病原細菌は一般に昆虫に媒介されるため、媒介昆虫が判明している場合には殺虫剤も有効な防除策である。

1.3 植物病原細菌の病原性解析の重要性

植物病原細菌の病原性に関する解析は、2つに大別される。1つは細菌が植物に対して病害を引き起こすかを解析する病原性試験であり、1.2.3項に述べた通り、植物病の病原を究明し危険性を把握する上で重要である。もう1つの重要な観点として、その病害がどのようなメカニズムで引き起こされるかを解析する病原性機構の解析がある。

病原細菌がなぜ植物に病原性を示すのかは、細菌によって様々である。例えば、植物に青枯病を引き起こす細菌 *Ralstonia solanacearum* は、宿主の導管内で粘質性の多糖類（菌体外多糖）を分泌し、導管を閉塞させることで植物体の萎凋・枯死を誘導する（堀田、土屋 2012）。トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pathovar (pv.) *tomato* が分泌する毒素コロナチンは、植物ホルモンのジャスモン酸メチルに類似した構造を有し、ジャスモン酸メチルの標的タンパク質に結合し、ジャスモン酸経路を活性化させる（Geng *et al.*, 2014）。その結果、ジャスモン酸経路と拮抗的に機能するサリチル酸経路、及びさらに下流に位置する細菌への抵抗性反応が抑制される。以上のコロナチンの機能から、近年ジャスモン酸メチルとコロナチンが結合する宿主因子をコロナチンのみが結合出来なくなるように改変し、*P. syringae* pv. *tomato* による被害を抑制する試みが行われている（Sheard *et al.*, 2010）。このように、病原性因子の解析は、病原細菌の植物内での生態を理解する上で重要であるうえに、細菌性病害の防除にもつながりうる。

1.4 花き類における細菌病

「花き（花卉）」とは、花と卉（多くの草の意）からなり、草花の総称である。観賞用植物と同義ともされるが、その中でも花が主な鑑賞対象となる植物を花きと呼称することが多い（今西 2012）。当然、花き類の鑑賞には花器官が最も重視されるが、鉢物類などではしばしば葉姿や全体の形態も鑑賞対象となる（菊池、金浜 2013）。日本の花き栽培は 1970 年代から 1990 年代にかけて発展し、市場の整備が進んでいる（今西 2012）。また、それに平行して、輸入される花き類の量も増加している。花き栽培の特徴としては、極めて多くの種・品種が栽培されていることが挙げられ、日本で流通している花き品目は 1000 品種を超える（市村 2013）。また、品質に対する要求性が高く技術水準の高度化が進んでいること、栽培体系のなかで施設栽培の占める割合が大きいことも特徴である（今西 2012）。

花きにおける病害の発生は、植物体の収量を低下させる以外に、外観を損ない商品価値を低下させる点でも問題となりやすい。そのため、花き生産における病害防除の重要性は極めて高い。花き類における新たな病害の報告件数は 1970~1980 年代から増加しており、背景には生産市場の拡大や、栽培される花き類、栽培様式の多様化があると考えられている（三宅 2008、植松 2012）。野菜農家が同じ畑で花き生産に着手した結果、前作の野菜に発生していた病害が花きにも発生した事例も知られている（竹内、堀江 2006）。加えて、流通の発達に伴い国内外で花きの苗取引が盛んに行われるようになっており、それに伴う新たな病原体の侵入・蔓延も報告されている（植松 2011; 津田、佐野 2014）。以上のように、花き類栽培における病害発生状況は極めて流動的であると言え、個別の病害に関する知見は少ないことが多い。その結果、病害の診断や防除の取り組みが遅れることが懸念されている。

花き類に対する既知の微生物病はおよそ 7 割が糸状菌病であり、細菌病が占める割合は約 1 割である（日本植物病理学会、農業生物資源研究所 2012）。しかしながらこれらの細菌病によ

る被害は軽視出来るものではない。その理由として、1.2.4 項に述べたような細菌病の防除の難しさがある。花き類は、一部を除き非食用作物であるため、化学農薬を主体とした防除が主体となって行われてきた（市川 2006）。しかしながら 1.2.4 項に記載した通り、細菌病に対して顕著な薬効をもつ化学農薬は少ない。更に、花き類には薬害が生じやすく（市川 2006）、細菌病に有効な薬剤による薬害の発生も報告されている（堀江、合田 1996; 堀江ら 2000）。以上を踏まえ、また近年の農薬に対する消費者の忌避感や環境負荷に対する意識の向上から、現在では農薬に加えて他の様々な防除法を組み合わせた総合的病害虫管理（Integrated pest management; IPM）が重要視されつつある（植松 2006）。効率的な IPM の実施には病原体の生態を十分に理解する必要があり、次々と発生する病害の病原体の性状解析が急務となっている。

以上を要するに、細菌性植物病害の防除の為には細菌の病原性の有無を検証し、その機構を解明することが重要である。そこで本研究においては、花き類に発生している病害の中から、コスモスに発生した原因不明の病害を取り上げ、罹病植物から分離された細菌の病原性を検証し、病原細菌を特定した（第 2 章）。続いて、植物病原細菌ファイトプラズマによって生じる花器官の形態異常について、その病原性機構を解明した（第 3 章、第 4 章）。

第2章 葉枯症状を示すコスモスより分離された細菌の病原性解析

2.1 序文

花き類の細菌病の中には、未だに病原細菌やその性状が不詳なものが存在する。第1章で述べたように、これらの病害については病原細菌を同定しその細菌学的性状を明らかにしなければ、発病メカニズムの解析や効率的な防除方法の構築は困難である。本研究では、病原体が不詳であったコスモスの葉枯症状について解析を行い、本症状が植物病原細菌 *Pseudomonas cichorii* によることを明らかにした。以下に解析の基盤となった知見について述べる。

2.1.1 *Pseudomonas* 属植物病原細菌

Pseudomonas 属細菌は、 γ -Proteobacteria 綱、*Pseudomonas* 目、*Pseudomonas* 科に属するグラム陰性の好気性細菌である。比較的古くに発見された細菌属であり、現在の *Burkholderia* 属、*Ralstonia* 属などの細菌にもかつては *Pseudomonas* 属に分類されていた種が存在する (Bull *et al.*, 2010)。*Pseudomonas* 属細菌は広く環境中に生息しており、多様な性状の種が存在する。代表的なものとしては、緑膿菌 (*P. aeruginosa*; Govan and Deretic 1996) や、有機溶媒や芳香族などの分解能を有しバイオレメディエーションに向けた研究が進められている *P. putida* (Nikel *et al.*, 2014) などが挙げられる。*Pseudomonas* 属細菌の特徴として、蛍光色素産生能が挙げられる。多くの *Pseudomonas* 属細菌が蛍光色素を産生し、分類の重要な指標である。

Pseudomonas 属細菌は主要な植物病原細菌属の1つであり、*Xanthomonas* 属細菌に続いて2番目に多くの種が植物病原細菌として報告されている。宿主も種によって様々であり、日本だけでも野菜、花き類、果樹など 150 種以上の植物病の病原として報告されている (日本植物病

理学会、農業生物資源研究所 2012)。また、細菌や植物種の違いによって、斑点、腐敗、増生（がんしゅ形成）、枯損など極めて多様な病害を引き起こす。代表的な *Pseudomonas* 属植物病原細菌として、*P. syringae* が挙げられる。*P. syringae* は、種内の病原性の分化が進んでおり日本だけでも 30 種類近くの pathovar が報告されている。

2.1.2 *Pseudomonas* 属植物病原細菌の分類

Pseudomonas 属細菌は概して培養が可能であり、1.2.3 項で述べた一般的な細菌の分類法に準じて分類される。一方で、*Pseudomonas* 属細菌は主要な植物病原細菌であるため、種を判定する為の簡易な分類法がかねてより研究されていた。Lelliott らは 9 つの性状試験を基に、*Pseudomonas* 属様蛍光色素産生植物病原細菌を 7 グループに分類する方法を提案した (Lelliott *et al.*, 1966)。現在広く用いられている簡易分類法は、これを更に簡便化したものであり、*Pseudomonas* 属植物病原細菌を 5 つの性状試験によって 6 グループに分類するものである (西山 1978)。各グループの代表的な植物病原細菌は表 2-1 に示すとおりである。5 つの試験とはレバン産生能試験、オキシダーゼ活性試験、ジャガイモ塊茎腐敗能試験、アルギニン加水分解能試験、タバコ葉過敏反応誘導能試験であり、それぞれの試験の英名の頭文字をとり、LOPAT 試験と総称される。

表 2-1 LOPAT 試験による *Pseudomonas* 属植物病原細菌の簡易分類表 (西山 1978)

試験性状	類別群(西山 1978)					
	Ia	Ib	II	III	Iva	Ivb
レバン産生能	+	-	-	-	+	-
オキシダーゼ活性	-	-	-	+	+	+
ジャガイモ塊茎腐敗能	-	-	+	-	+	+
アルギニン加水分解能	-	-	-	-	+	+
タバコ過敏反応誘導能	+	+	+	+	-	-
細菌例	<i>P. syringae</i>	<i>P. delphinii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. marginalis</i>	

+: 陽性、-: 陰性

2.1.3 *Pseudomonas cichorii*

P. cichorii は、代表的な *Pseudomonas* 属植物病原細菌の 1 種であり、LOPAT 試験ではグループⅢに類別される。様々な植物に病原性を示し（多犯性）、日本ではバラ科、キク科、ユリ科など 17 種の植物に病害報告があり、うちキク科を中心とした 6 種が花き類である（表 2-2）。主に地上部に斑点性、腐敗性、枯損性病害を引き起こし、植物体の生育を阻害する。*P. cichorii* は植物の気孔を介して侵入し、表皮細胞や葉肉細胞の間隙で増殖する（Hikichi *et al.*, 1996）。また、罹病植物から雨滴などによって他の植物に伝染する他に、罹病残さを介して土壌伝染すると考えられている（Grogan *et al.*, 1977; Bazzi *et al.*, 1984）。さらに、圃場周辺の雑草が伝染源となる可能性も示唆されている（大畑ら 1982）。*P. syringae* と異なり *P. cichorii* では、pathovar の分化などは確認されていない。

表 2-2 日本で発生している *P. cichorii* による病害（日本植物病理学会、農業生物資源研究所 2012）

分類	宿主科名	宿主	病名
野菜	アオイ科	オクラ	葉枯細菌病
	ウリ科	メロン	腐敗病
	キク科	エンダイブ	腐敗病
	キク科	レタス	腐敗病
	シソ科	メボウキ	黒斑細菌病
	セリ科	セルリー	斑点細菌病
	ナス科	トウガラシ	葉枯細菌病
	ナス科	ナス	褐斑細菌病
	バラ科	イチゴ	褐斑細菌病
	ユリ科	ニンニク	春腐病
花き類	キキョウ科	カンパニュラ	褐斑細菌病
	キク科	ガーベラ	斑点細菌病
	キク科	キク	斑点細菌病
	キク科	キンセンカ	芽枯細菌病
	キク科	ハルシャギク	斑点細菌病
	キク科	ヒマワリ	葉枯細菌病
牧草	マメ科	シロクローバ	葉枯細菌病

2.1.4 コスモスに発生した葉枯症状

コスモス (*Cosmos* spp.) は、キク科 (Asteraceae) コスモス属 (*Cosmos*) の植物の総称だが、その代表的な種であるオオハルシヤギク (*Cosmos bipinnatus*) を示すことが多い。本論文の中では、後者の意味合いで用いる。コスモスは、メキシコ原産の一年生草本であり、一般に秋に白色、桃色などの様々な色の花を咲かせ、園芸植物として人気の花き類である。栽培は比較的容易であり、日当たりと水はけのよい土地であれば土質をあまり選ばずに生育する。その栽培の簡便さから、日本においては景観植物としても利用されることが多い。日本ではこれまでに 14 種類のコスモスの病害が報告されており (表 2-3)、そのうち 10 種類は菌類による病害である。その他の病害としては、ウイルス病が 1 種類、細菌 (ファイトプラズマ) 病が 1 種類、線虫病が 2 種類報告されている。

2012 年 8 月、東京大学植物病院にて葉枯症状を呈するコスモスの診断依頼を受けた。生産者によると、本病害は露地栽培中の鉢物コスモスに発生したものであり、2006 年の 8 月中旬に初めて確認された。始めは圃場の一部分でのみ病害が観察され、その後 1~2 週間のうちに圃場全体に病害が広がるとのことである。さらに、毎年同時期に病害の発生が観察されている。上記の症状を診断した結果、未報告の細菌病である可能性が高いと考えられた為、病原体の性状を明らかにすることを目的に研究を行った。

表 2-3 日本に発生しているコスモス病害（日本植物病理学会、農業生物資源研究所 2012）

区分	病名	病原
ウイルス病	モザイク病	cucumber mosaic virus (CMV)
細菌病	萎黄病	ファイトプラズマ（暫定種未同定）
菌類病	炭疽病	<i>Colletotrichum fioriniae</i> など
	半身萎凋病	<i>Verticillium dahliae</i>
	黒かび病	<i>Alternaria</i> sp.
	そうか病	<i>Sphaceloma</i> sp.
	立枯病	<i>Rhizoctonia solani</i>
	うどんこ病	<i>Sphaerotheca fusca</i>
	葉枯病	<i>Alternaria tenuissima</i>
	白斑病	<i>Entyloma cosmi</i>
	灰色かび病	<i>Botrytis cinerea</i>
	菌核病	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
線虫病	茎枯病	<i>Phomopsis arctii</i>
	根こぶ線虫病	<i>Meloidogyne javanica</i> など
	キタネグサレ線虫による病害	<i>Pratylenchus penetrans</i>

2.2 材料および方法

2.2.1 材料

本研究で病原細菌を単離したコスモスは、2012年8月に東京大学植物病院に診断依頼で持ち込まれた罹病コスモス2株である。接種試験に用いた植物は以下の通りである。ジャガイモ塊茎腐敗能試験には、市販のジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.、品種：男爵いも) の塊茎を購入して用いた。タバコ葉過敏反応誘導能試験には、播種後40日のタバコ (*Nicotiana tabacum*、品種：サムスン NN) を用いた。接種試験には、播種後3週間のコスモス (品種：センセーション)、メボウキ (*Ocimum basilicum* L.、品種：スイートバジル)、トマト (*Solanum lycopersicum* L.、品種：桃太郎ファイト)、アスター (*Callistephus chinensis* L.、品種：アレンジアスターネネ)、ゴマ (*Sesamum indicum* L.、品種：ごま王) を用いた。いずれも25°C、自然光条件下で栽培を行った。レタス (*Lactuca sativa* L.、品種不明) は市販のものを購入し、見かけ上健全な切葉を用いた。

解析に用いた植物病原細菌は以下の通りである。グラム反応試験における対照菌株として、所属研究室保有のグラム陽性細菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Cmm1 株、及びグラム陰性細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* MAFF301499 株を用いた。コスモス以外の植物への接種試験、グラム反応試験以外の細菌学的性状試験、分子生物学的解析における対照菌株として、*P. cichorii* MAFF301184 株、および MAFF301368 株を NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) ジーンバンクより購入し、実験に用いた。

2.2.2 症状の観察および病原細菌の分離

罹病株全体の観察は目視で行い、罹病部の観察は実体顕微鏡（OLYMPUS、型番：SZX16）、及び光学顕微鏡（OLYMPUS、型番：EX51）により行った。使用した培地はすべて 121 °C で 20 分間の高圧滅菌処理を行った。罹病部からの細菌の分離・保存は下記の方法に準じて行った。すなわち、罹病株 2 株の感染葉病斑部を 2 箇所ずつ採集し、100 ml ビーカーに入れスズランガーゼ（スズラン）でふたをして水道水で約 30 分水洗した。その後、クリーンベンチ内で火炎滅菌した小刃を用いて各病斑部を約 5 mm 角に切り出し、1.5 ml エッペンチューブに入れた。各エッペンに 500 µl の滅菌水を加え、切片を磨砕・懸濁した。各懸濁液 10 µl を滅菌水で 100 倍に希釈し、そのうち 100 µl を Lab-Lemco Agar [LLA, 滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco 寒天培地（Oxoid）23 g、NaCl 5 g] 平板培地上にスプレッダーで塗抹した。いずれの培地も 25°C、暗黒下に静置して 2 日間培養した。各培地上に優占的に形成された集落を一集落ずつ選抜し、白金耳で掻き取って新たな LLA 培地上に画線分離した。いずれの培地も上記の方法で再度培養し、培地上に種類の集落のみが形成されたことを確認した。以上の操作を 2 回行った。次いで、培地表面から一集落ずつ白金耳で掻き取り、10% スキムミルク溶液 [滅菌水 1000 ml あたり、スキムミルク（Difco）10 g、L-グルタミン酸ナトリウム 1.5 g] に懸濁した。以上の操作により、4 病斑それぞれを由来とする 4 菌株（UTLPPB120801~UTLPPB120804）を得た。各菌株は -80 °C で凍結保存した。以降は特に記述がない限り、試験の都度 LLA 培地上に白金耳による画線培養（25°C、2 日間）を 2 回繰り返す、形成された集落を供試した。対照菌株も同様に保存・供試した。

2.2.3 分離菌株の簡易分類試験

グラム反応、King's B 培地上での蛍光色素産生試験および LOPAT 試験を簡易分類試験として行った。各試験は既報の文献に基づいて行われた（後藤、瀧川 1984a、1984c、1984d）。なお、特に記述がない限り、使用した培地は試験管分注後もしくは、シャーレ分注前に 121 °C で 20 分間の高圧滅菌処理を行った。また各培地の pH は卓上 pH メーター (HORIBA、型番:F-52) で測定し、1M NaOH もしくは 6M HCl で調整した。各試験の詳細は以下の通りである。

グラム反応

3% KOH 25 μ l をスライドガラスに滴下し、各菌株の菌体を白金耳で懸濁した。白金耳で懸濁液を持ち上げた際に、粘ちょうして糸を引くものを陰性、引かないものを陽性と判定した。

蛍光色素産生能試験

各分離菌株を King's B 平板培地 [滅菌水 1000 ml あたり King 寒天培地 B (Sigma-Aldrich) 33 g、グリセロール (ナカライテスク) 10 ml] 上に白金耳で画線し、25 °C、暗黒条件下で 2 日間培養した。形成された集落に UV を照射し、蛍光の有無を確認した。

レバン産生能試験

各分離菌株を LLA 培地上に一回白金耳で画線培養した。形成された集落をレバン産性能試験用の平板培地 [滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco beef Extract (Oxoid) 5 g、ペプトン (Difco) 10 g、スクロース (ナカライテスク) 50 g、寒天 (ナカライテスク) 15 g] 上に白金耳で画線し、25 °C、暗黒下に静置して培養した。3 日後に集落を観察し、レバン産生による集落の盛り上がりが見られるものを陽性、観察されないものを陰性とした。

オキシダーゼ活性試験

1% テトラメチル-p-フェニレンジアミン溶液 25 μ l を濾紙に滴下し、これに各菌株の菌体をピペットマンの 20 μ l 用チップを用いてこすりつけた。10 秒程観察したのち、菌体をこすりつけた部分が青く着色するものを陽性、着色しないものを陰性とした。

ジャガイモ塊茎腐敗能試験

ジャガイモの塊茎を厚さ約 5mm の輪切りにし、2.2 項と同様に水道水で約 30 分水洗した。水洗後の塊茎の水気をペーパータオルで拭き取り、白金耳で軽く表面を傷つけて各菌株の菌体を塗り付けた。塊茎をシャーレに移し、25 $^{\circ}$ C、暗黒下で静置した。2 日後に塊茎を観察し、付傷部の腐敗が観察されたものを陽性、観察されなかったものを陰性とした。

アルギニン加水分解能試験

Thornley の培地 [滅菌水 1000 ml あたりペプトン 1 g、NaCl 5 g、 K_2HPO_4 0.3 g、フェノールレッド 0.01 g L-アルギニン・HCl (Wako) 10 g、寒天 3 g、pH 7.2] を 5 ml ずつ試験管に分注した。各菌株の菌体を白金耳で掻きとって、1.5 ml エッペンチューブ内で滅菌水 1 ml に懸濁し、約 10^8 colony forming unit (cfu) /ml の濃度に調整した。この菌液を培地に白金耳で穿刺接種し、培地上に 121 $^{\circ}$ C で 20 分間高圧滅菌処理した流動パラフィン (ナカライテスク) を 1 ml 加えた。各試験管を 25 $^{\circ}$ C で一週間静置し、培地の色が赤紅色に変化するものを陽性、橙黄色のまま変化しないものを陰性とした。

タバコ葉への過敏反応誘導能試験

各菌株の菌体を滅菌水 3 ml に懸濁し、約 10^8 cfu/ml の濃度に調整した。注射針で穴をあけたタバコの上位葉に、この菌液を 10 ml テルモシリンジを用いて葉の裏面から注入接種した。接種したタバコを 2 日間、25 $^{\circ}$ C で静置し、接種部位に細胞死が誘導されるものを陽性、されないものを陰性とした。

2.2.4 植物体への接種試験

コスモスへの接種は既報の論文を参照に行った (Suzuki *et al.*, 2002)。各菌株の菌体を 50 ml チューブ内で滅菌水 50 ml に懸濁し、約 10^8 cfu/ml の濃度に調整した。接種針によって葉身を付傷したコスモス苗 3 株に、霧吹きを用いて菌液を噴霧接種した。非接種区として、同条件のコスモス苗 2 株に菌液のかわりに滅菌水を噴霧した。各苗を 25 °C、湿潤条件に保ち、一週間経過を観察した。一週間後に接種苗から病斑部を採集し、2.2.2 項と同様の操作により細菌を分離した。コスモス以外の植物への接種は以下の通りに行った。すなわち、各菌株の菌体を 1.5 ml エッペンチューブ内で滅菌水 1 ml に懸濁し、約 10^8 cfu/ml の濃度に調整し、各植物への接種に用いた。レタスへの接種は、レタスの切葉を 2.2.2 項と同様に水道水で約 30 分間水洗し、主脈を接種針で付傷した。付傷部に菌液 10 μ l を滴下した。非接種区として、菌液のかわりに滅菌水を滴下した。メボウキ、トマト、アスター、ゴマへの接種は、各菌株をコスモスと同様に噴霧接種した。接種植物は 25 °C、湿潤条件に保ち、一週間経過を観察した。

2.2.5 分離菌株の細菌学的性状試験

集落の性状を含む 44 項目の細菌学的性状について試験を行った。なお、本項で扱っている試験は、いずれも既報の文献に基づき行われた（後藤、滝川 1984a、1984b、1984c、1984d）。集落の性状は 2.2.2 項の方法に準じて LLA 平板培地上で培養した各分離菌株を目視、および光学顕微鏡を用いて観察した。他の性質 43 項目については、以下にその詳細を記す。すべての試験において、試験する性質を有する菌株を陽性、有さないものを陰性、その中間の性状を示すものを弱陽性と判断した。また、特に記述がない限り、使用した培地の pH は 2.2.3 項の方法に準じて調整し、試験管分注後、もしくはシャーレ分注前（平板培地）に 121 °C で 20 分間の高圧滅菌処理を行った。各菌株は 2.2.2 項の方法に準じて保存・培養したのち、白金耳で菌体を掻きとって 1.5 ml チューブ内で 1 ml の滅菌水に懸濁し、約 10⁸ cfu/ml の濃度で供試した。

[OF (oxidative- Fermentative) 試験]

OF 試験用の基本培地 [滅菌水 1000 ml あたり、OF Basal Medium (Difco) 9.4 g、D-グルコース（ナカライテスク） 10 g、pH 6.8] を試験管に 7 ml ずつ分注した。各試験管は高圧滅菌後に急冷した。各菌株の菌体を滅菌水 1 ml に懸濁し、約 10⁸ cfu/ml の濃度に調整した。各菌液を 2 本の培地に白金耳で穿刺接種し、一方の培地上に高圧滅菌処理した流動パラフィン 1 ml を加えた。各試験管を 25 °C で 5 日間静置し、両試験管の培地が黄変したものを F (Fermentative)、流動パラフィンを加えていない試験管のみ培地が黄変したものを O (oxidative) とした。

高温での生育能試験

各菌株を LLA 平板培地に白金耳で画線し、40 °C、暗黒条件で一週間静置した。一週間後に観察し集落を形成したものを陽性、形成しなかったものを陰性と判断した。

成長素要求性試験

成長素要求性試験用の基本培地 [滅菌水 1000 ml あたり $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5 g、 K_2HPO_4 0.4 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、NaCl 0.1 g、 FeCl_3 0.01 g、D-グルコース 1 g] を 500 ml ずつ作成し、うち一方に 0.3% Bacto Yeast Extract (Difco) を加え、それぞれの培地を試験管に 7 ml ずつ分注した。各菌株を双方の培地に白金耳で穿刺接種し、25 °C で一週間静置した。一週間後細菌の生育が双方で見られたものを陰性、Yeast Extract を加えた試験管でのみ観察が確認されたものを陽性と判断した。

カタラーゼ活性試験

25 μl の 3% 過酸化水素水をスライドガラスに滴下し、白金耳で掻きとった各菌株の菌体を良く懸濁した。菌体から多量の泡が発生するものを陽性、発生しないものを陰性と判断した。

レシチナーゼ活性試験

レシチナーゼ活性試験用の基本培地 (滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco beef Extract 5 g、ペプトン 10 g、NaCl 2.5 g、寒天 15 g、pH 7.0) を高圧滅菌後、卵黄エマルジョン溶液 (Merck) 50 ml およびフィルター滅菌した 0.85% NaCl を 50 ml を加えて平板培地を作成した。各菌株を培地上に白金耳で画線し、25 °C、暗黒条件で一週間静置した。形成された集落周辺に白濁を生じるものを陽性、生じないものを陰性と判断した。

チロシナーゼ活性試験

チロシナーゼ活性試験用の平板培地 [滅菌水 1000 ml あたりスクロース 5 g、ペプトン 10 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.125 g、L-チロシン (Wako) 、寒天 20 g、pH 7.2] に各菌株を白金耳で画線し、25 °C、暗黒条件で 4 日間静置した。形成された集落の周辺培地が褐色に着色するものを陽性、しないものを陰性と判断した。

硫化水素産性能試験

濾紙（東洋濾紙）を約 5 mm×50 mm に切断し、10% 酢酸鉛溶液に浸潤させたのち、121°C で 20 分間高圧滅菌した後、二週間 55°C で乾燥させた（鉛糖紙）。本試験用の培地（滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco beef Extract 5 g、ペプトン 10 g、pH 6.8）を 7 ml ずつ試験管に分注し、各菌株を培地に白金耳で穿刺接種した。試験管内部に鉛糖紙を栓に挟んで垂らし、25 °C で二週間静置した。鉛糖紙が黒色に着色するものを陽性、しないものを陰性と判断した。

硝酸塩還元性試験

硫化水素産性能試験用の培地と同様の組成の培地を 500 ml ずつ作成し、うち一方に KNO₃ 0.5 g を加えたのち試験管に 7 ml ずつ分注した。各菌株を双方の培地に白金耳で穿刺接種し、25 °C で 5 日間静置した。5 日後に判別用試薬 A（α-ナフチルアミン 0.5 g、30% 酢酸ナトリウム 100 ml）、判別用試薬 B（サルファニル酸 0.3 g、30% 酢酸ナトリウム 100 ml）を 1 ml ずつ双方の培地に添加した。試薬添加後に、KNO₃ を加えた培地を加えていない培地に比べ赤変したものを陽性とした。さらに双方の培地で差異が見られなかった菌株については、少量の亜鉛粉末を培地に加え 1 時間静置した。1 時間後、KNO₃ を加えた培地の色が変化しなかったものを陽性、加えていない培地に比べ赤変したものを陰性とした。

ゼラチン液化能試験

ゼラチン液化能試験用の培地 [滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco beef Extract 5 g、ペプトン 10 g、ゼラチン（Wako）120 g、pH 6.8] を試験管に 5 ml ずつ分注した。各菌株を培地に白金耳で穿刺接種し、20 °C で 6 週間静置した。6 週間後に培地が液化しているものを陽性、液化していないものを陰性と判断した。

Tween80 加水分解能試験

Siella の培地（滅菌水 1000 ml あたりペプトン 10 g、NaCl 5 g、CaCl₂・2H₂O 0.1 g、寒天 20 g、pH 7.0）を高圧滅菌した。フィルター濾過した 10% Tween 80（Wako）溶液を 100 ml 加えた後、平板培地とした。各菌株を培地に画線培養し、25 °C、暗黒条件で 1 週間静置した。形成された集落の周辺に不透明な白色体を形成するものを陽性、しないものを陰性と判断した。

エスクリン加水分解能試験

エスクリン加水分解能試験用の培地 [滅菌水 1000 ml あたり Lab-Lemco beef Extract 3 g、ペプトン 10 g、エスクリン（Wako） 1 g、クエン酸鉄 0.5 g、pH 7.0] を試験管に 7 ml ずつ分注した。各菌株を培地に白金耳で穿刺接種し、25 °C、暗黒条件で 1 週間静置した。1 週間後に培地が褐色から黒褐色になるものを陽性、そうでないものを陰性と判断した。

デンプン加水分解能試験

デンプン加水分解能試験用の平板培地（滅菌水 1000 ml あたりペプトン 10 g、NaCl 2.5 g、可溶性デンプン（Wako） 2 g、寒天 15 g、pH 6.8）を作成した。各菌株を培地に白金耳で画線し、25 °C、暗黒条件で 1 週間静置した。1 週間後にヨウ素・ヨウ化カリウム液（滅菌水 1000 ml あたりヨウ化カリウム 10 g、ヨウ素 3.3 g）を培地表面に流し、培地の着色を観察した。集落周辺に透明帯が観察されるものを陽性、されないものを陰性と判断した。

各種糖利用能試験

Ayers, Rupp, および Johnson の基本培地（滅菌水 1000 ml あたり NH₄H₂PO₄ 1 g、KCl 0.2 g、MgSO₄・7H₂O 0.2 g、プロモチモールブルー 0.03 g、寒天 15 g、pH 6.8）に各種糖 1 種類を 5 g 加えた培地、および糖を加えない培地を作成した。各培地を試験管に 8 ml ずつ分注し、120 °C で 1 分間高圧滅菌したのち、固めて斜面培地とした。各菌株を培地ごとに白金耳で穿刺接種し、

25 °C、暗黒条件で2週間静置した。2週間以内に糖を加えた培地のみで培地の色が黄変し、かつ菌体の増殖が見られたものを陽性、いずれかの条件を満たさないものを陰性と判断した。使用した糖の種類を以下に列挙する。

D-アラビノース (Wako)、D-セロビオース (関東化学)、D-マンノース (Sigma-Aldrich)、D-グルコース、スクロース、トレハロース (ナカライテスク)、ラクトース (関東化学)、マルトース (関東化学)、ラフィノース (関東化学)、L-ソルボース (関東化学)、D-フルクトース (関東化学)、ガラクトース (関東化学)、D-ソルビトール (関東化学)、マンニトール (ナカライテスク)、ズルシトール (関東化学)、*myo*-イノシトール (ナカライテスク)、グリセロール、サリシン (ナカライテスク)

各種有機酸利用能試験

使用した有機酸はニコチン酸 (ナカライテスク)、安息香酸 (Wako)、D-酒石酸 (関東化学)、クエン酸 (関東化学) であり、すべて Na 塩もしくは NaOH で中和したものをを用いた。ニコチン酸、安息香酸は、Ayers, Rupp, および Johnson の基本培地を用いて糖利用能試験と同様に試験を行った。ただし 2 週間以内に有機酸を加えた培地のみで培地の色が青変し、かつ菌体の増殖が見られたものを陽性、いずれかの条件を満たさないものを陰性と判断した。Ayers, Rupp, および Johnson の基本培地に代わり、D-酒石酸利用能試験は Koser の培地 (滅菌水 1000 ml あたり $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、ブロモチモールブルー 0.05 g、寒天 15 g、pH 7.2)、クエン酸利用能試験には Simmons の培地 (滅菌水 1000 ml あたり $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g、 K_2HPO_4 1 g、NaCl 5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、ブロモチモールブルー 0.02 g、寒天 15 g、pH 6.8) を用い試験を行った。判定はニコチン酸や安息香酸と同様に行った。

2.2.6 分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列の決定

2.2.2 項に記載した方法で培養した菌体を白金耳で掻き取り、1.5 ml エッペンチューブ内で滅菌水 1 ml に懸濁し、約 10^6 cfu/ml の濃度に調整した。各懸濁液を 95°C で 5 分間加熱することで菌体を破壊したのち、以降の反応の鋳型として用いた。分離菌株の 16S rDNA 領域を、細菌の 16S rDNA の保存領域に設計されたプライマーである、8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及び、1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Turner *et al.*, 1999) を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法によって増幅した。酵素として rTaq Polymerase (TaKaRa) を用い、付属の説明書に準じて試薬、プライマー、鋳型を混合し反応液を調製した。反応は 10 μl スケールで行い、反応条件は、 96°C 、3 分の熱変性に続き、35 サイクルの反応（熱変性 96°C 30 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 2 分を 1 サイクルとする）とした。反応終了後、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動法により、目的の DNA 断片（約 1,500 bp）が増幅されていることを確認した。分子量マーカーには 1 kbp DNA ladder (TaKaRa) を用いた。

ついで、得られた増幅産物の塩基配列を、dyedeoxyterminator 法によるダイレクトシーケンスにより決定した。方法は以下の通りである。5 μl の PCR 産物に対して 2 μl の ExoSAP-IT (GE Healthcare) を加え、 37°C 15 分間、 80°C 15 分間で反応させて、PCR 反応時の余剰なプライマーおよび dNTP を失活させた試料をシーケンス反応に用いた。プライマーは 8F および 1492R を用いた。反応は 10 μl スケールで行い、250 ng PCR 産物、5 μM プライマー、1.5 μl 5 \times Seq buffer (Applied Biosystems)、1 μl PreMix (Applied Biosystems) の反応組成で行った。 96°C 、3 分の熱変性に続き、25 サイクルの反応（熱変性 96°C 15 秒、アニーリング 48°C 15 秒、伸長反応 60°C 4 分を 1 サイクルとする）を行なった。反応後の試料は、カラムを用いて精製した。す

なわち、カラム担体である Sephadex G-50 SuperFine (Applied Biosystems) 適量と 300 μ l の滅菌水を 96 穴プレートの各ウェルに加え、室温で 2 時間置き水和させた。水和したものを 2600 rpm で 5 分間遠心し、カラムから過剰な水分を除去した。反応後の試料をカラムにアプライし、2600 rpm で 5 分間遠心して精製した。遠心後の精製試料は減圧乾燥機により乾燥させ、その後 15 μ l のホルムアミドで溶解し、よく混和した。95°C で 5 分間熱処理し、直ちに氷水中で急冷させて熱変性し、一本鎖の状態にした。熱変性後、PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems) により塩基配列の解読を行った。塩基配列の解析には DNA 解析ソフトウェア ATGC Ver. 4.2 (GENETYX) を用いた。

2.2.7 分離菌株と *Pseudomonas* 属細菌の配列同一性解析、および系統解析

分離菌株と対照菌株の配列を Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 5.2.1 ソフトウェア (Tamura *et al.*, 2011) 内の ClustalW を用いてマルチプルアラインメントし、配列の同一性を算出した。解析で使用した対照菌株 *P. cichorii* MAFF301184 株の 16S rDNA の部分塩基配列は、分離菌株と同様に決定した。*P. cichorii* MAFF301368 株の 16S rDNA の部分塩基配列 (AB724291; 1425 bp) は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) より入手した。次いで、分離菌株、対照菌株およびその他の *Pseudomonas* 属細菌の当該領域配列を用いた系統解析を以下の通りに行った。*Pseudomonas* 属細菌の 16S rDNA 部分塩基配列情報を DDBJ より入手した。*Pseudomonas* 属細菌と同じく *Pseudomonas* 科に属する細菌 *Rhizobacter dauci* の当該領域情報も同様に取得し、系統解析におけるアウトグループとした。供試した細菌種の詳細については表 2-4 の通りである。各細菌の塩基配列を同一性解析と同様にマルチプルアラインメントした。このアラインメントをもとに、近隣結合法 [neighbor-joining (NJ) 法] により系統樹を作成した。系統樹の描画は MEGA5.2.1 を用いた。系統樹の枝の統計的な確からしさは、元のアラインメントからブートストラップリサンプリングを 1,000 回繰り返すことで計算した。系統樹の編集は、Illustrator CS4 14.0.0 (Adobe Systems) を用いて行った。

表 2-4 系統解析に用いた菌株

種名	系統名	16S rDNA部分塩基配列 アクセッションナンバー	分離宿主	分離地	備考
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG1242	Z76651	不詳	不詳	種の標準株
<i>Pseudomonas cichorii</i>	ATCC10857	AB021398	エンダイブ	ドイツ	種の標準株
<i>Pseudomonas cichorii</i>	JBC1	JF951725	ダイズ	韓国	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF211387	AB724285	キク	沖縄県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF301158	AB724288	ナス	徳島県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF301180	AB724293	レタス	長野県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF301184		レタス	長野県	塩基配列は 本研究で決定
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF301367	AB724292	レタス	香川県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF301368	AB724291	レタス	茨城県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF302094	AB724284	ガーベラ	和歌山県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF302698	AB724286	ダイズ	山口県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF302699	AB724287	ダイズ	山口県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF311430	AB724288	ニンジン	新潟県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	MAFF730155	AB724289	フウリンソウ	三重県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	PPST50936	JQ994483	ステビア	アメリカ	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	SUPP178	AB724294	トマト	千葉県	
<i>Pseudomonas cichorii</i>	SUPP861	AB724283	オクラ	千葉県	
<i>Pseudomonas cissicola</i>	ATCC33616	AB021399	ヒラギヤブカラシ	日本	種の標準株
<i>Pseudomonas corrugata</i>	ATCC29736	D84012	トマト	イギリス	種の標準株
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM50090	Z76662	環境中	イギリス	種の標準株
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	MAFF301177	AB021381	イネ	北海道	種の標準株
<i>Pseudomonas lutea</i>	OK2	AY364537	環境中	スペイン	種の標準株
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	LMG2210	Z76663	食料品	アメリカ	種の標準株
<i>Pseudomonas meliae</i>	MAFF301463	AB021382	センダン	沖縄県	種の標準株
<i>Pseudomonas</i> <i>plecoglossicida</i>	FPC951	AB009457	アユ	徳島県	種の標準株
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	ATCC13522	AB021402	オリーブ	ユーゴスラビア	種の標準株
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	ATCC33618	D84028	マッシュルーム	イギリス	種の標準株
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	LMG2352	Z76671	インゲン	スイス	種の標準株
<i>Rhizobacter dauci</i>	ATCC43778	NR.041585	ニンジン	青森県	種の標準株

2.3 結果

2.3.1 葉枯症状を呈するコスモスの診断

2012年8月、東京大学植物病院にて葉枯症状を呈するコスモスの診断依頼を受け、検体として被害株を受領した(図 2-1A)。生産者によると、本病害は露地栽培中の鉢物コスモスに2006年の8月中旬より発生していた。症状は葉身の黒変や葉柄の褐変であり、始めは圃場の一部分でのみ病害が観察されたが、その後1~2週間のうちに圃場全体に病害が広がった。さらに、毎年同時期に同様の病害の発生が観察されるとのことであった。本研究ではまず、上記の症状の診断を行った。

受領した検体には、葉身や葉柄の所々に黒褐色から褐色で不整形の水浸状病斑が発生しており、被害が激しい部位では葉全面が枯死していた(図 2-1B, C)。被害は特に中位葉から下位葉にかけて観察され、特に下位葉はほとんど褐変枯死していた(図 2-1A、白矢頭)。以上の症状は生産者から得た情報とほぼ一致していた。また、主茎にはいかなる症状も観察されなかった。各検体から比較的新鮮な病斑部を採集し光学顕微鏡を用いて観察したところ、いずれの病斑部からも多量の細菌の漏出が確認された。コスモスに葉枯症状を引き起こす病原体としてコスモスうどんこ病菌(*Sphaerotheca fusca*)、コスモス葉枯病菌(*Alternaria tenuissima*)などの菌類が報告されているが、本検体の病斑部からはこのような病原菌類は観察されなかった。以上の所見から、本病害は細菌病であると推察された。



図 2-1 受領検体の症状

- A. 全体写真（矢頭は症状が認められた箇所）
- B, C. 葉枯症状の生じた葉

2.3.2 病斑部からの細菌の分離

日本でこれまでに報告されたコスモス属植物の細菌病は、ファイトプラズマによるコスモス萎黄病のみである（奥田ら 1976、澤柳ら 2002）。しかし、ファイトプラズマ病では一般に菌泥の漏出が認められることはないうえ、本病害では萎黄病に特徴的な植物の黄化や萎縮、叢生（枝分かれの増加）は認められず、異なる細菌を病原とすると考えられた。従ってこの病原細菌の特定のため、病斑部に存在する細菌の分離を行った。

新鮮な病斑部に存在する細菌を培養したところ、いずれの病斑部からも淡黄色の集落が優占的に生育し、本集落を形成する細菌が病原細菌であることが示唆された（図 2-2A）。そこで、これらの集落から病斑部ごとに 1 集落を分離し、4 菌株（UTLPPB120801~UTLPPB120804）を得た。

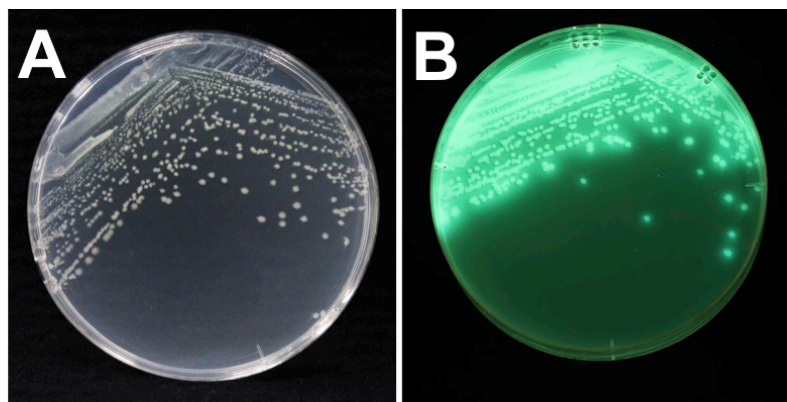


図 2-2 分離菌株（代表として UTLPPB120801 を図示）

- A. LLA 平板培地上に形成された集落
- B. King's B 平板培地地上に形成された集落の
紫外線照射下のプレート写真

2.3.3 分離菌株の簡易分類

各分離菌株の簡易分類を目的として、まずグラム反応および King's B 培地上での蛍光色素産生能を試験した。その結果、グラム反応においては、各菌株はいずれもグラム陰性細菌 *P. syringae* pv. *lachrymans* MAFF301499 株と同様の性状を示し、グラム陰性細菌であると判断された。また、King's B 平板培地上で各分離菌株が形成した集落に紫外線を照射したところ、いずれも緑色蛍光を発した (図 2-2B)。従って各分離菌株は緑色蛍光色素産生能を有する細菌種と判断された。King's B 培地上での緑色蛍光色素産生能は *Pseudomonas* 属細菌の典型的な特徴であり、各分離菌株が *Pseudomonas* 属細菌であることが強く示唆された。そこで、5 種類の試験項目によって *Pseudomonas* 属植物病原細菌を簡易に分類するための LOPAT 試験 (Lelliott *et al.*, 1966; 西山 1978) を各分離菌株に対して行い、その種を推定した。各分離菌株は同一の性状を示し、いずれもオキシダーゼ活性、タバコ葉への過敏感反応誘導能を有していたが、レバン産生能、ジャガイモ塊茎腐敗能、アルギニン加水分解能を有していなかった。この性状は西山の文献におけるグループ III に類別される *P. cichorii* の性状と一致していた (表 2-5)。従ってコスモスより分離された 4 菌株はいずれも *P. cichorii* であると推測された。

表 2-5 LOPAT 試験の結果

試験性状	コスモス分離菌株 (菌株数=4)	類別群(西山 1978)					
		Ia	Ib	II	III	Iva	Ivb
レバン産生能	-	+	-	-	-	+	-
オキシダーゼ活性	+	-	-	-	+	+	+
ジャガイモ塊茎腐敗能	-	-	-	+	-	+	+
アルギニン加水分解能	-	-	-	-	-	+	+
タバコ過敏反応誘導能	+	+	+	+	+	-	-
細菌例		<i>P. syringae</i>	<i>P. delphinii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. marginalis</i>	

-; 陰性、+; 陽性

2.3.4 コスモスへの接種試験による病原性の検証

罹病個体から分離された微生物の接種により症状が再現されること、および接種原と同じ微生物が再分離されることは、コッホの原則を満たし、病原を特定するために極めて重要である(1.2.3 項参照)。従って本研究において分離された 4 菌株について、コスモスへの接種による症状の再現、および接種個体からの再分離を行った。

原症状を観察した結果、症状は葉のみに認められていた(図 2-1)。そこで本病原細菌は葉面に付着・侵入することで病原性を示すと考え、健全コスモス苗に各分離菌株の菌液を噴霧接種した。接種苗を 3~4 日間湿潤状態に保ったところ、いずれの分離菌株を接種した植物でも、葉身や葉柄に黒褐色から黒色で不整形の水浸状病斑が形成された。この病斑はやがて葉全面に拡大して、葉の枯死を引き起こした(図 2-3A, B)。病斑は葉の付傷部にも無傷部にも形成された(図 2-3B)。なお、茎には病斑が形成されなかった。以上の症状は 2.3.1 項に述べた原症状に酷似していた。病斑部から細菌を分離したところ、接種菌株と同様に淡黄色の集落を形成する細菌が極めて高率に分離された。非接種区(菌液ではなく滅菌水を噴霧接種した株)では上記のような症状は認められなかった(図 2-3C)。以上の結果から、分離細菌がコスモスに対する病原性を有することが明らかとなった。

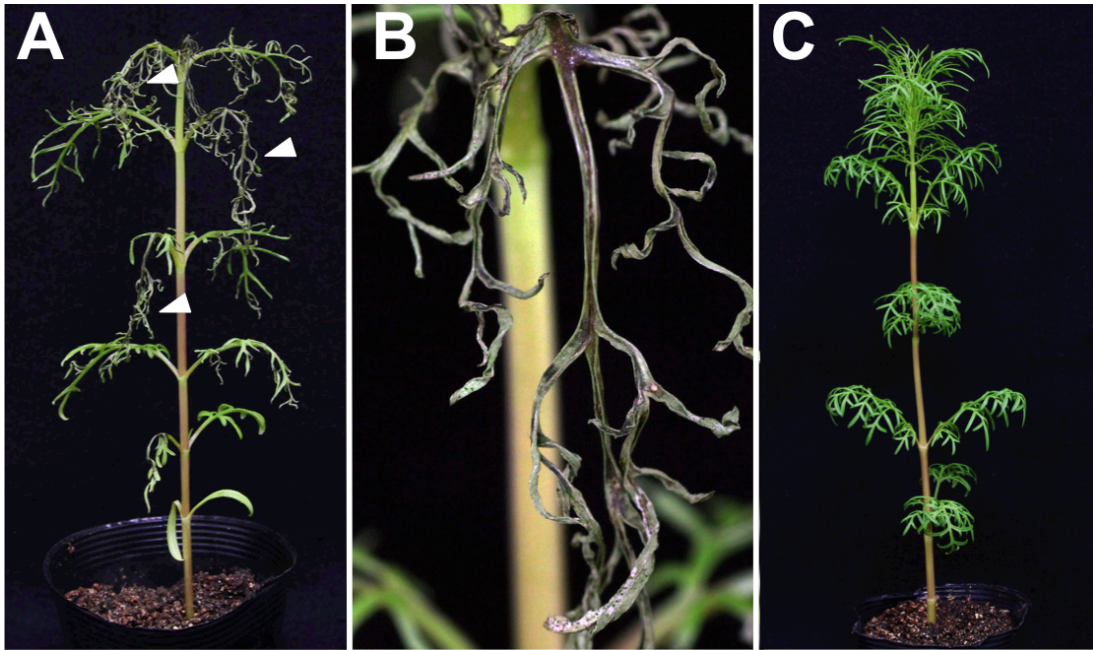


図 2-3 コスモスへの接種試験結果（接種 4 日後、菌株は UTLPPB120801）

- A. 接種植物全体写真（矢頭は病斑部）
- B. 無傷部位に生じた葉枯症状
- C. 無接種植物全体写真

2.3.5 分離菌株の種の分類

分離菌株の種を分類することを目的とし、他植物への接種試験、細菌学的性状試験、分子生物学的解析を行った。本項では、それらの結果について記述する。なお、簡易分類法に基づいた試験により、分離菌株は *P. cichorii* と推測されているため、*P. cichorii* 2 菌株 (MAFF301184 株、MAFF301368 株) を実験の対照菌株として用いた。

他植物への接種試験

分離菌株は多犯性植物病原細菌である *P. cichorii* と推測されたため、各分離菌株をレタス (キク科)、アスター (キク科)、トマト (ナス科)、メボウキ (シソ科)、ゴマ (ゴマ科) といった様々な植物に接種し、病原性を検証した。各分離菌株はコスモスに対して同等の病原性を示したことから、本試験においては代表として UTLPPB120801 株のみを用いた。

各菌株をレタスに対しては針接種、その他の植物に対しては有傷噴霧接種した。その結果、すべての植物種において非接種区では異常が生じなかったが、UTLPPB120801 株を接種した植物体において、刺針部に 1 週間以内に褐色から黒色の水浸状病斑が生じた (図 2-4~図 2-8、白矢頭)。噴霧接種を行った植物のうち、アスター (図 2-5)、トマト (図 2-6)、メボウキ (図 2-7) では無傷部にも病斑が形成されたが (赤矢頭)、ゴマ (図 2-8) の無傷部に症状は見られなかった。2 種類の *P. cichorii* 対照菌株を接種した場合も同様の症状が生じた。以上のことから、本分離菌株は、様々な科の植物に対して病原性を有する多犯性植物病原細菌であると考えられた。

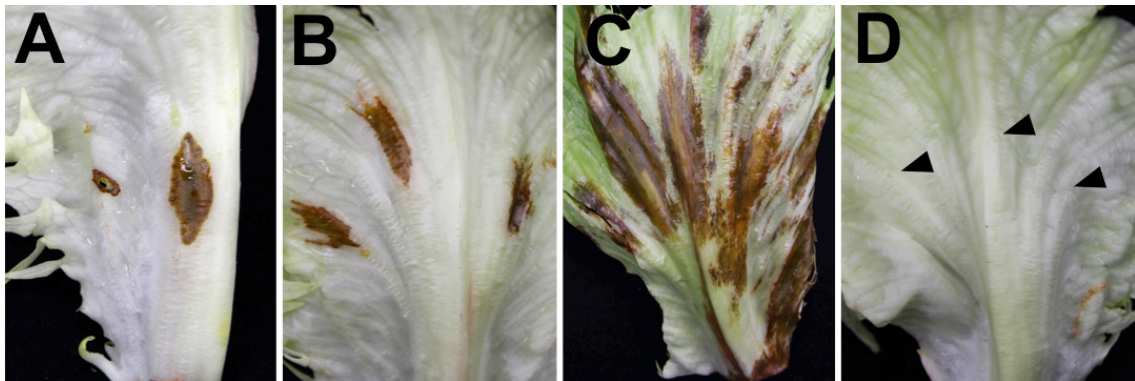


図 2-4 レタスへの接種試験結果（接種 2 日後）

- A. UTLPPB120801 接種株 B. MAFF301184 接種株
 C. MAFF301368 接種株 D. 無接種株（黒矢頭は付傷部）

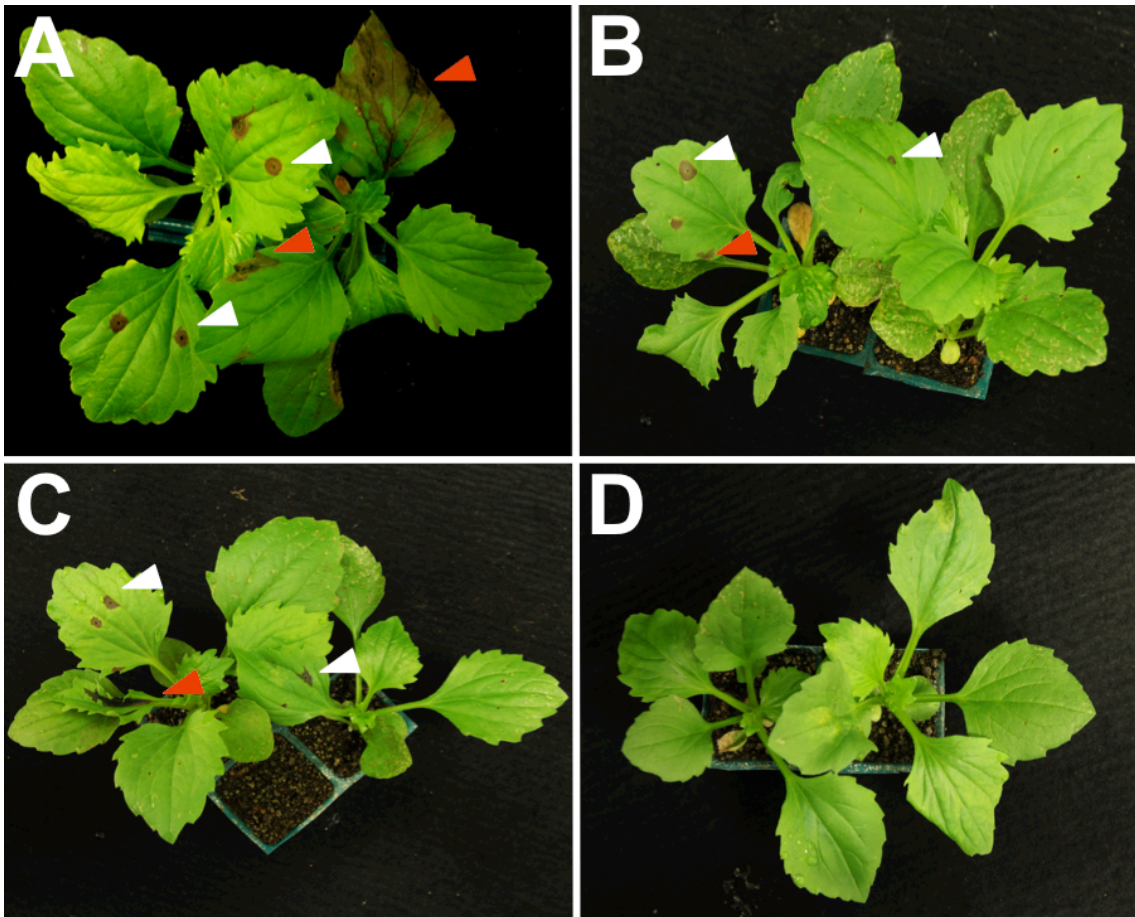


図 2-5 アスターへの接種試験結果（接種 3 日後、矢頭は病斑部）

- A. UTLPPB120801 接種株 B. MAFF301184 接種株
 C. MAFF301368 接種株 D. 無接種株

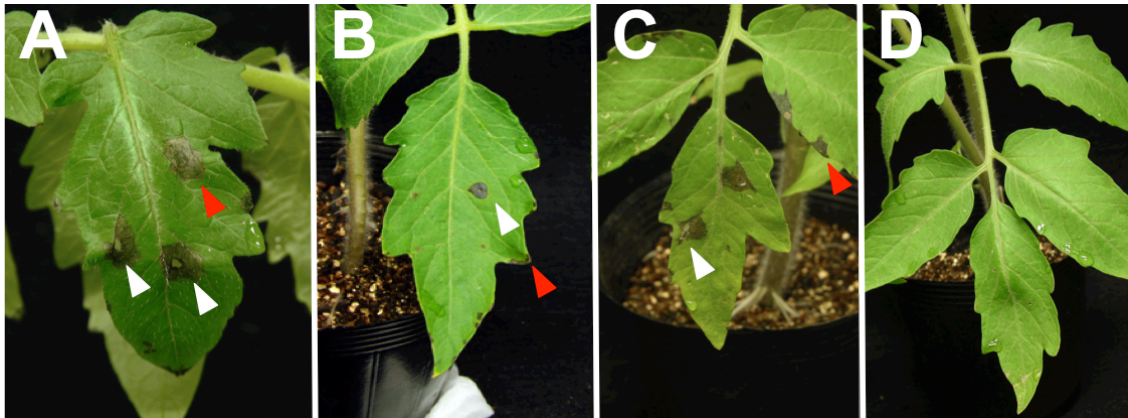


図 2-6 トマトへの接種試験結果（接種 3 日後、矢頭は病斑部）
 A. UTLPPB120801 接種株 B. MAFF301184 接種株
 C. MAFF301368 接種株 D. 無接種株

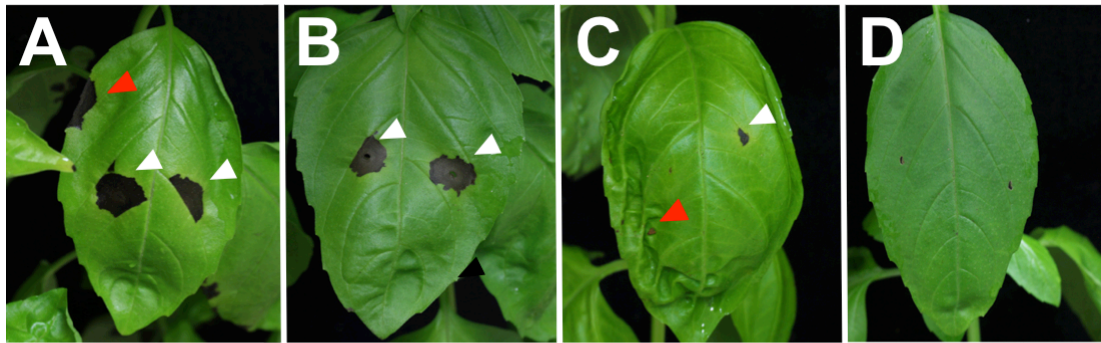


図 2-7 メボウキへの接種試験結果（接種 6 日目、矢頭は病斑部）
 A. UTLPPB120801 接種株 B. MAFF301184 接種株
 C. MAFF301368 接種株 D. 無接種株

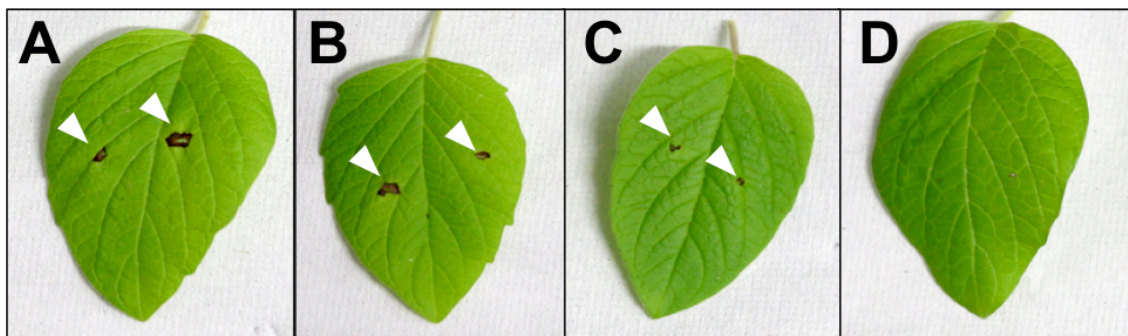


図 2-8 ゴマへの接種試験結果（接種 10 日目、矢頭は病斑部）
 A. UTLPPB120801 接種株 B. MAFF301184 接種株
 C. MAFF301368 接種株 D. 無接種株

分離菌株の細菌学的性状

各分離菌株の複数の細菌学的性状を試験し、対照菌株と同様の性状を有しているか比較した。まず、細菌集落の性状について検討を行ったところ、各分離菌株はいずれも LLA 培地上で淡黄色の円形集落を形成し、集落は盛り上がりせず扁平であり、集落の縁は全縁もしくは鈍鋸歯状縁であった（図 2-9）。対照菌株として用いた *P. cichorii* 2 株も、同一培養条件で同様のコロニーを形成した。

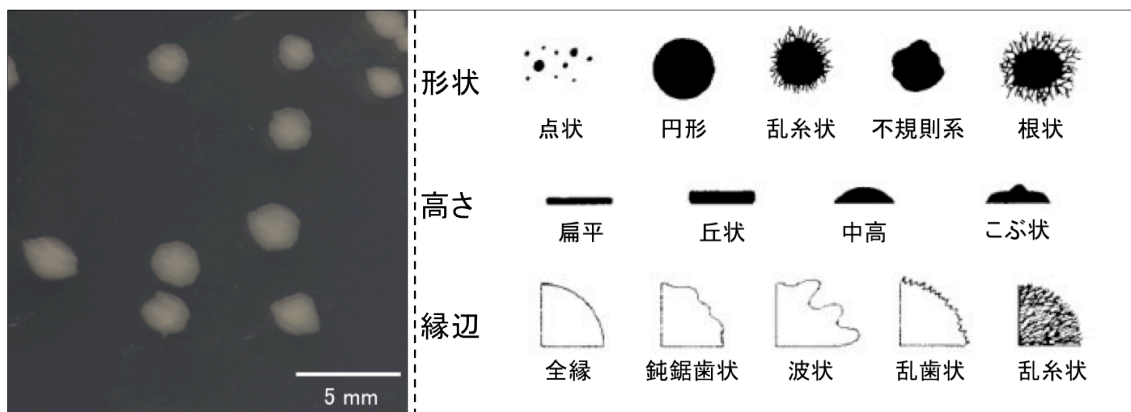


図 2-9 LLA 培地における分離菌株の集落

代表して UTLPPB120801 株を図示。右図は一般的な集落の性状の例

(出典 : <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3136-colony-morphology-protocol>、一部加筆)

次いで、生理学的、生化学的性質に関する 43 項目の細菌学的性状に関しての試験を行った。結果は、簡易分類に用いた試験も含め表 2-6 にまとめた。各分離菌株はいずれも、カタラーゼ活性、硝酸塩還元能、Tween 80 加水分解能、エスクリン加水分解能、でんぷん加水分解能を有していたが、レシチナーゼ活性、チロシナーゼ活性、硫化水素産生能、ゼラチン液化能は有していなかった。糖利用能については、いずれも D-マンノース、D-グルコース、D-フルクトース、ガラクトースを利用して酸を生じたが、D-アラビノース、D-セロビオース、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトース、ラフィノース、L-ソルボース、サリシンは利用しなかった。有機酸利用能については、いずれもマンニトール、*myo*-イノシトール、グリセロール、クエン酸を利用しアルカリを生じた。また、対照菌株は D-酒石酸培地を利用可能だったが、培地の青変の進行や菌体の増殖は遅かったため、弱い D-酒石酸利用能を有していると判断された。また、D-ソルビトール、ズルシトール、安息香酸、ニコチン酸利用能は有していなかった。以上の結果は分離菌株間で一致しており、性状の差異は見受けられなかった。対照菌株は分離菌株とほぼ同等の性状を有していたが、いくつかの試験で異なる性状を示した。すなわち、両菌株は硝酸塩還元能を有しておらず、D-酒石酸を他の有機酸と同等に利用可能であった。さらに、*P. cichorii* MAFF301184 株はタバコ葉化敏感反応誘導能が弱く、MAFF301368 株はカタラーゼ活性が弱かった。これらの結果から、分離菌株は既知の *P. cichorii* と極めて近い性質を有すると考えられた。

表 2-6 分離菌株及び対照菌株の性状試験結果

(他菌株と異なる性状は赤字で表記)

性状	コスモス分離菌株	対照菌株 (<i>P. cichorii</i>)	
	(n = 4)	MAFF301184	MAFF301368
グラム反応	—	—	—
蛍光色素産生能	+	+	+
レバン産性能	—	—	—
オキシダーゼ活性	+	+	+
ジャガイモ塊茎腐敗能	—	—	—
アルギニン加水分解能	—	—	—
タバコ葉過敏間反応誘導能	+	+W	+
OF試験	O	O	O
高温での生育能	—	—	—
成長素要求性	—	—	—
カタラーゼ活性	+	+	+W
レシチナーゼ活性	—	—	—
チロシナーゼ活性	—	—	—
H ₂ S産生能	—	—	—
硝酸塩還元能	+	—	—
ゼラチン液化能	—	—	—
Tween 80加水分解能	+	+	+
エスクリン加水分解能	+	+	+
でんぷん加水分解能	+	+	+
糖・有機酸利用能			
D-アラビノース	—	—	—
D-セロビオース	—	—	—
D-マンノース	+	+	+
D-グルコース	+	+	+
スクロース	—	—	—
トレハロース	—	—	—
ラクトース	—	—	—
マルトース	—	—	—
ラフィノース	—	—	—
L-ソルボース	—	—	—
D-フルクトース	+	+	+
ガラクトース	+	+	+
D-ソルビトール	—	—	—
マンニトール	+	+	+
ズルシトール	—	—	—
myo-イノシトール	+	+	+
グリセロール	+	+	+
D-酒石酸	+W	+	+
安息香酸	—	—	—
クエン酸	+	+	+
ニコチン酸	—	—	—
サリシン	—	—	—

+ 陽性, - 陰性, +W 弱陽性

O Oxidative

分子生物学的解析

分離菌株が *P. cichorii* であるか検証を進めることを目的に、各分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列を決定し対照菌株、及び様々な *Pseudomonas* 属細菌の配列と比較した。

各分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列（約 1,500 bp）を PCR により増幅した後、当該領域の一部配列（1374 bp）を決定し、分離菌株間および対照菌株との塩基配列の同一性を比較した。その結果、各分離菌株間では当該領域の配列は完全に一致していた（図 2-10）。分離菌株と対照菌株を比較したところ、分離菌株の配列は *P. cichorii* MAFF301184 株、MAFF301368 株のものとそれぞれ 99.1%、99.3% の同一性を示した。

次に、分離菌株と様々な種の *Pseudomonas* 属細菌の 16S rDNA 部分塩基配列を用いて系統解析を行った。分離菌株の塩基配列を、対照菌株を含む様々な *P. cichorii* 菌株、およびその他の代表的な *Pseudomonas* 属細菌の標準株の当該領域塩基配列とともにアライメントし、NJ 法により系統樹を作成した（図 2-11）。その結果、分離菌株は標準菌株（ATCC10857）を含むすべての *P. cichorii* 菌株とともに、他の *Pseudomonas* 属細菌から独立したクレードを形成した（図 2-11A）。

P. cichorii のクレードはさらに 2 つのサブクレードに分かれ、分離菌株は対照菌株や標準菌株と異なるサブクレードに属した。しかしながら、各サブクレード内の菌株間で、分離地や宿主に共通点は認められなかった（図 2.11B）。サブクレードの分化の原因を調べるために、上述のアライメント結果を用いて *P. cichorii* 菌株間の 16S rDNA 部分塩基配列を比較したところ、サブクレード間で同一性が低い領域（24、もしくは 26 塩基）が 5'末端側に見出された（図 2-12）。この領域はサブクレード内では保存性が高く、サブクレード 1 内の菌株間では 95.8~100%、サブクレード 2 内の菌株間で 100%（一部配列が未読の MAFF301184 株を除く）の同一性を示

した。一方でサブクレード間の当該領域の同一性は 57.7~61.5% と非常に低かった。各菌株は、当該領域以外は全て 90% 以上の高い同一性を示したため、系統解析におけるサブクレードの分化はこの領域由来のものと考えられた。

UTLPPB120801	GTAG - AGAGGTGCTTGCACCTCTTGA - GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	48
UTLPPB120802	GTAG - AGAGGTGCTTGCACCTCTTGA - GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	48
UTLPPB120803	GTAG - AGAGGTGCTTGCACCTCTTGA - GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	48
UTLPPB120804	GTAG - AGAGGTGCTTGCACCTCTTGA - GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	48
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GCAGCACAGGTACTTGTACCGGGTGGC GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	50
P._cichorii_MAFF301184	AGCACAGGTACTTGTACCGGGTGGC GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG	48
UTLPPB120801	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	98
UTLPPB120802	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	98
UTLPPB120803	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	98
UTLPPB120804	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	98
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	100
P._cichorii_MAFF301184	CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAA	98
UTLPPB120801	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	148
UTLPPB120802	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	148
UTLPPB120803	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	148
UTLPPB120804	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	148
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	150
P._cichorii_MAFF301184	TACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT	148
UTLPPB120801	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	198
UTLPPB120802	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	198
UTLPPB120803	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	198
UTLPPB120804	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	198
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	200
P._cichorii_MAFF301184	ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC	198
UTLPPB120801	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	248
UTLPPB120802	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	248
UTLPPB120803	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	248
UTLPPB120804	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	248
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	250
P._cichorii_MAFF301184	AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC	248
UTLPPB120801	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	298
UTLPPB120802	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	298
UTLPPB120803	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	298
UTLPPB120804	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	298
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	300
P._cichorii_MAFF301184	TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC	298
UTLPPB120801	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	348
UTLPPB120802	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	348
UTLPPB120803	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	348
UTLPPB120804	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	348
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	350
P._cichorii_MAFF301184	AATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC	348
UTLPPB120801	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	398
UTLPPB120802	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	398
UTLPPB120803	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	398
UTLPPB120804	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	398
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	400
P._cichorii_MAFF301184	GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTCGTTACCTAATACGTG	398
UTLPPB120801	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	448
UTLPPB120802	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	448
UTLPPB120803	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	448
UTLPPB120804	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	448
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	450
P._cichorii_MAFF301184	ACGATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC	448
UTLPPB120801	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	498
UTLPPB120802	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	498
UTLPPB120803	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	498
UTLPPB120804	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	498
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	500
P._cichorii_MAFF301184	AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA	498

図 2-10 分離菌株と対照菌株の 16S rDNA 部分塩基配列の配列比較

MAFF301368 は、分離菌株と同一性を示した領域のみを图示

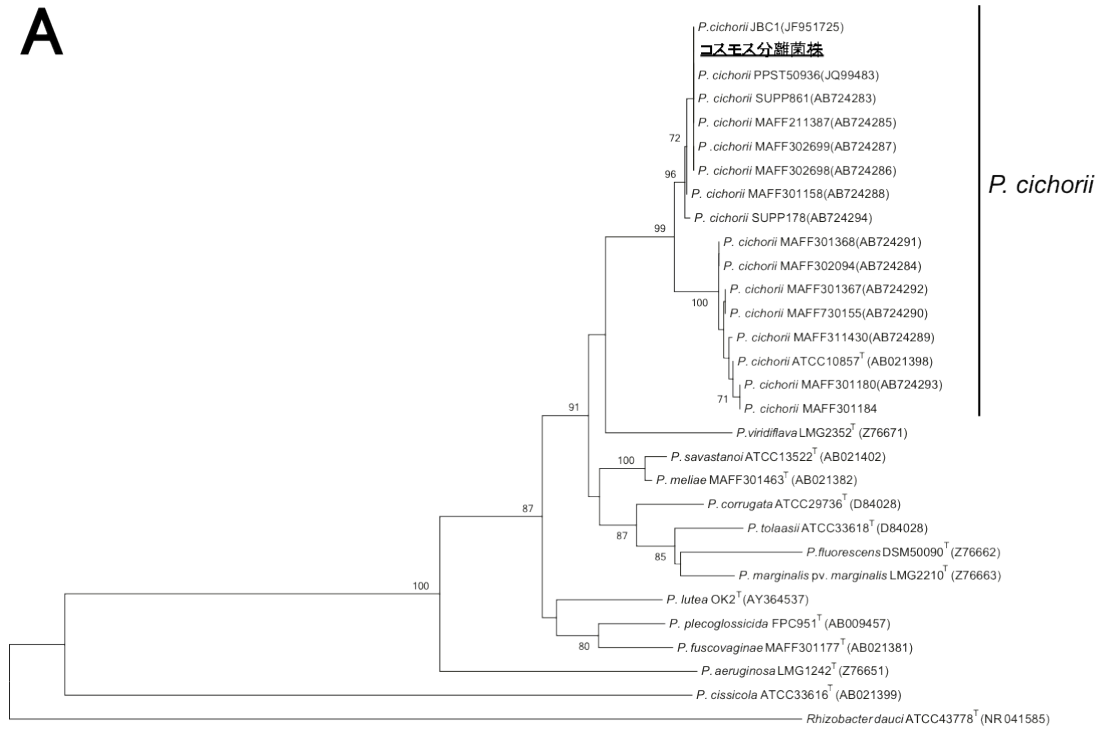
UTLPPB120801	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	548
UTLPPB120802	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	548
UTLPPB120803	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	548
UTLPPB120804	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	548
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	550
P._cichorii_MAFF301184	AAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA	548
UTLPPB120801	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	598
UTLPPB120802	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	598
UTLPPB120803	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	598
UTLPPB120804	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	598
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	600
P._cichorii_MAFF301184	CCTGGGAACATGCATCCAAAACATGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGT	598
UTLPPB120801	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	648
UTLPPB120802	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	648
UTLPPB120803	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	648
UTLPPB120804	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	648
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	650
P._cichorii_MAFF301184	GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG	648
UTLPPB120801	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	698
UTLPPB120802	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	698
UTLPPB120803	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	698
UTLPPB120804	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	698
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	700
P._cichorii_MAFF301184	TGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT	698
UTLPPB120801	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	748
UTLPPB120802	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	748
UTLPPB120803	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	748
UTLPPB120804	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	748
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	750
P._cichorii_MAFF301184	GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGT	748
UTLPPB120801	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	798
UTLPPB120802	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	798
UTLPPB120803	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	798
UTLPPB120804	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	798
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	800
P._cichorii_MAFF301184	CAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTT AGTGGCGCAGCTAACGCATTA	798
UTLPPB120801	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	848
UTLPPB120802	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	848
UTLPPB120803	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	848
UTLPPB120804	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	848
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	850
P._cichorii_MAFF301184	AGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTG	848
UTLPPB120801	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	898
UTLPPB120802	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	898
UTLPPB120803	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	898
UTLPPB120804	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	898
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	900
P._cichorii_MAFF301184	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTT AATTCGAAGCAACGC	898
UTLPPB120801	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	948
UTLPPB120802	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	948
UTLPPB120803	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	948
UTLPPB120804	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	948
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	950
P._cichorii_MAFF301184	GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAGTGAACCTTACCAGAGATGGTTT	948
UTLPPB120801	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	998
UTLPPB120802	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	998
UTLPPB120803	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	998
UTLPPB120804	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	998
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	1000
P._cichorii_MAFF301184	GGTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCTATGGCTGTCGTCAGCTCG	998

図 2-10 続き

UTLPPB120801	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1048
UTLPPB120802	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1048
UTLPPB120803	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1048
UTLPPB120804	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1048
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1050
P._cichorii_MAFF301184	TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTT	1048
UTLPPB120801	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1098
UTLPPB120802	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1098
UTLPPB120803	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1098
UTLPPB120804	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1098
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1100
P._cichorii_MAFF301184	AGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA	1098
UTLPPB120801	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1148
UTLPPB120802	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1148
UTLPPB120803	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1148
UTLPPB120804	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1148
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1150
P._cichorii_MAFF301184	CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGG	1148
UTLPPB120801	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1198
UTLPPB120802	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1198
UTLPPB120803	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1198
UTLPPB120804	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1198
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1200
P._cichorii_MAFF301184	GCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGG	1198
UTLPPB120801	TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1248
UTLPPB120802	TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1248
UTLPPB120803	TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1248
UTLPPB120804	TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1248
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1250
P._cichorii_MAFF301184	TGGAGCTAATCTCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACT	1248
UTLPPB120801	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1298
UTLPPB120802	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1298
UTLPPB120803	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1298
UTLPPB120804	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1298
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1300
P._cichorii_MAFF301184	CGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGG	1298
UTLPPB120801	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1348
UTLPPB120802	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1348
UTLPPB120803	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1348
UTLPPB120804	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1348
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1350
P._cichorii_MAFF301184	TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG	1348
UTLPPB120801	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1374
UTLPPB120802	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1374
UTLPPB120803	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1374
UTLPPB120804	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1374
P._cichorii_MAFF301368(AB724291)	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1376
P._cichorii_MAFF301184	GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA	1374

図 2-10 続き

A



B



図 2-11 分離菌株、及び *Pseudomonas* 属細菌の 16S rDNA を用いた系統樹

A. 全菌株を用いた系統樹 B. *P. cichorii* のクレードのみの拡大図

ブートストラップ値は 70 以上の数値のみ表示した。種の標準株は、系統名の最後に上付き文字で「T」と表記した。括弧内にアクセシオンナンバーを表記した。

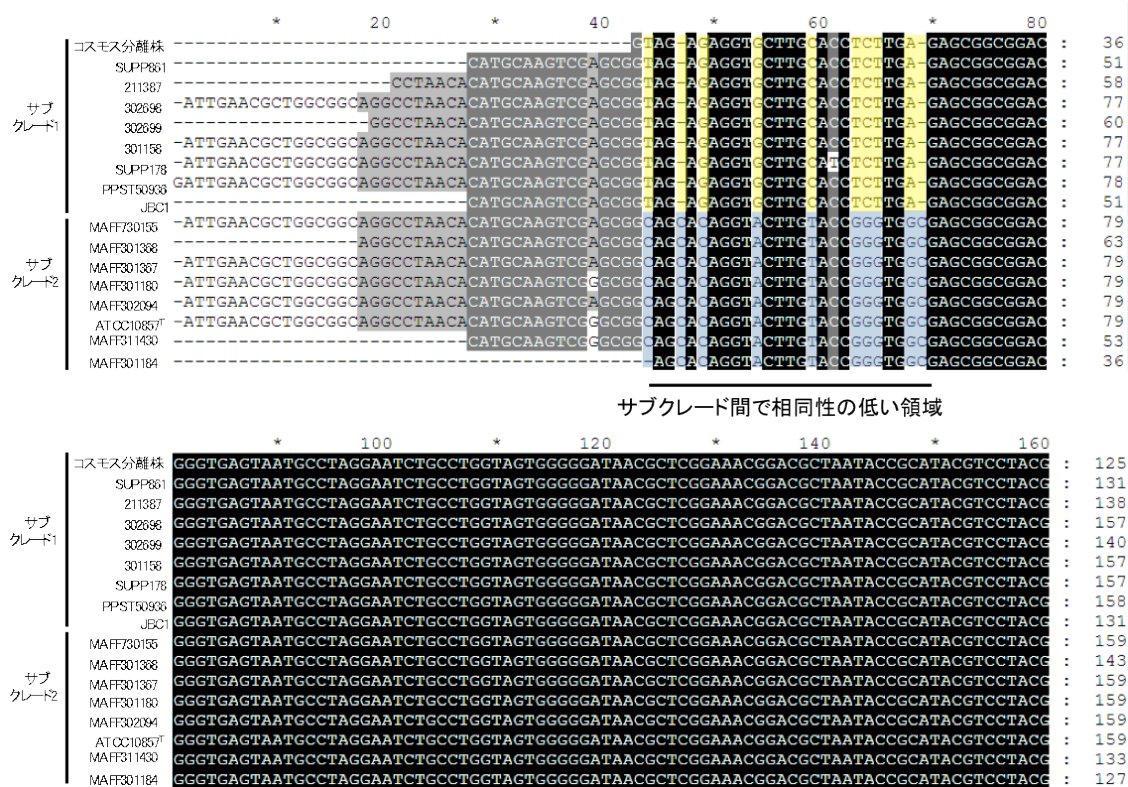


図 2-12 *P. cichorii* 16S rDNA 部分塩基配列の比較
5'末端側のみを表示。-は未読部分を意味している。

2.4 考察

2.4.1 葉枯症状を示すコスモスから分離された細菌のコスモスへの病原性

本研究では葉枯症状が細菌病であるという推察に基づき、病斑部から細菌を分離した。分離された細菌が病原体であることを証明するには、コッホの原則を満たさなくてはならない。すなわち、①特定の病気の病患部に特定の微生物が検出されること、②その微生物が罹病植物から純粋に分離・培養されること、③培養した微生物を健全植物に接種した際に、もとの症状が再現されること、④接種により再現された病患部から接種源と同一の微生物が再び検出されること、である。本研究では分離細菌が病原体であることを、本原則に従い証明した。すなわち、①葉枯症状を示す検体では、検鏡した全ての病斑部より細菌の漏出が確認され、②いずれの病斑部からも同種の細菌が分離され、③分離菌株を健全なコスモス苗に接種した際にもとの症状が再現され、④接種個体に生じた病斑部からは接種原と同一の細菌が再検出された。これらの結果はコッホの原則を満たしており、分離菌株はコスモスへの病原性を有し、葉枯症状を引き起こす病原細菌であると結論付けることができる。

2.4.2 病原細菌の種の分類

分離菌株の性状を解析した結果、分離菌株は *P. cichorii* と分類された。その根拠は以下の 3 つである。①分離菌株 UTLPPB120801 と対照菌株の *P. cichorii* は広範な植物種に病原性を示し、分離菌株は *P. cichorii* と同じく多犯性であると考えられた (図 2-4~2-8)。②分離菌株と対照菌株は同様の集落を形成したほか、後述する点を除き、試験した細菌学的性状ではほぼ同等の性状を示した (表 2-6)。③分離菌株の 16S rDNA 部分塩基配列は、対照菌株と高い同一性を示した (図 2-10)。さらに、分離菌株と様々な *Pseudomonas* 属細菌の当該配列を用いて系統樹を作成したところ、分離菌株は標準菌株 (ATCC10857) を含むすべての *P. cichorii* 菌株とともに、他の *Pseudomonas* 属細菌から独立したクレードを形成した (図 2-11A)。

なお、細菌学的性状における分離菌株と対照菌株の相違点は以下のとおりであった。①分離菌株は硝酸塩還元能を有したが、対照菌株はいずれも硝酸塩還元能を有さなかった、②分離菌株は D-酒石酸利用能が弱かったが、対照菌株は他の有機酸と同等の D-酒石酸利用能を有していた、③分離菌株、および MAFF301184 株は同等のカタラーゼ活性を有していたが、MAFF301368 株はそれらと比較して弱いカタラーゼ活性を有していた、④分離菌株、および MAFF301368 株は同等のタバコ葉過敏反応誘導能を有していたが、MAFF301184 株はやや弱い誘導能を有していた。以上の結果において、本分離菌株を *P. cichorii* と分類する上で問題となり得るのは、分離菌株と対照菌株の間で明確に差異が生じた①および②である。しかし、*P. cichorii* の硝酸塩還元能、D-酒石酸利用能は菌株によって差異が生じることが知られており、硝酸塩還元能を有する菌株、D-酒石酸利用能を有さない菌株も知られる (Lelliott *et al.*, 1966; Pernezny *et al.*, 1994; 井上ら 2013)。従って、分離菌株と対照菌株の病原性に明瞭な差が認められないことと併せ、上記の性状の差異は分離菌株を *P. cichorii* と分類する上で問題とならないと結論付けた。

2.4.3 本病害の名称

前項までの結果から、コスモスに葉枯症状を引き起こす病原細菌が *P. cichorii* であることが明らかとなった。*P. cichorii* は多犯性植物病原細菌であり（表 2-2）、日本においてもヒマワリ（後藤、岡部 1954）、レタス（土屋ら 1976）、ガーベラ（河原林ら 1984）、キク（川久保、後藤 1987）、キンセンカ（鶴巻ら 2005）、エンダイブ（末永ら 2006）、オオキンケイギク（久保ら 2009）などのキク科植物において、本細菌による病害が報告されている。また *P. cichorii* は、実験的にコスモスに対して病原性を示すことが報告されている（Tanaka *et al.*, 2011）。以上の知見は、*P. cichorii* によるコスモス病害の発生の可能性を示すものであった。しかし、コスモスの栽培過程において *P. cichorii* による病害が確認されたのは初めてである。

新たな病害が発生した場合、その症状を適切に表現している病名を付ける必要がある。*P. cichorii* による病害には、その症状により様々な病名が付けられているが、比較的良く用いられる病名は腐敗病（レタス、エンダイブ、メロン）、褐斑細菌病（イチゴ、カンパニュラ、ナス）、斑点細菌病（ガーベラ、セルリー、オオキンケイギク）、葉枯細菌病（オクラ、シロクローバ、トウガラシ、ヒマワリ）の 4 種である。本病害においては、罹病組織は腐敗せず枯死すること、観察された病斑は黒褐色から黒色であったことから、腐敗病、褐斑細菌病の病名は不適切であると考えられた。また、病斑部は最終的に葉枯症状を呈すること、および観察された病斑の多くが不整形であったことから、斑点細菌病よりも葉枯細菌病のほうが本病害を適切に表していると考えられた。従って、本病害を *P. cichorii* によるコスモス葉枯細菌病 (bacterial leaf blight disease) と提案した。

2.4.4 系統解析における *P. cichorii* クレード内の分化の原因

16S rDNA に基づく系統解析において、*P. cichorii* のクレードは更に 2 つのサブクレードに分化することが示された。*P. cichorii* のクレードがこのように分化することは過去にも報告がある（井上ら 2013）が、その由来は明らかではなかった。複数の *P. cichorii* 系統の 16S rDNA 領域を比較したところ、この分化は 16S rDNA の局所的な領域の違いに由来すると考えられた（図 2-12）。サブクレード内での当該領域の保存性は極めて高く、*P. cichorii* は遺伝的に 2 型に分化していることが示唆された。今後、16S rDNA 以外の様々な遺伝子についても菌株間の比較を行い、本仮説を検証したい。一方で、各サブクレード内の菌株に、分離宿主や分離地の共通性は見受けられなかった（図 2-11 B）。また、コスモスより分離された菌株と対照菌株は異なるサブクレードに属したが、その細菌学的性状や病原性の差異は本研究ではほとんど認められなかった。従って、サブクレード間で表現型に何らかの差異が生じているのかは、本研究からは判断できない。分離菌株と対照菌株 2 株の間で性状が異なった硝酸塩還元能や酒石酸利用能にサブクレード間で変異が生じている可能性もあるが、比較菌株数が少なく検証は不十分である。サブクレード間の表現型に差異が生じているかを検証する為には、更に多くの来歴の異なる菌株を収集し、より詳細に性状試験、病原性試験を行う必要があるだろう。

以上を要するに、コスモスに生じた葉枯病害の病原細菌を単離し、その性状と病原性に基づき *P. cichorii* と同定した。また、*P. cichorii* は 16S rDNA 配列の部分領域に基づき 2 つの遺伝型にわかれることを示唆した。今後の課題としては、*P. cichorii* のコスモスへの病原性機構の詳細な解析や、防除法の確立が挙げられるが、それに関しては総合考察で触れたい。

第3章 *phyllogen* による葉化誘導機構

3.1 序文

植物病原細菌ファイトプラズマは、感染植物に様々な症状を引き起こす。その中でも特徴的なものとして花器官形態の異常がある。感染植物の花には、花器官が緑色に着色する緑化 (*virescence*) や葉に類似した構造物に変化する葉化 (*phyllody*)、雌蕊が茎に変化し先端に新たな花器官が形成される突き抜け (*loss of floral determinacy*) などが生じる (*Maejima et al.*, 2014)。このような症状を誘導する病原性因子として、ファイトプラズマに保存された分泌タンパク質 *phyllogen* が同定されている (*MacLean et al.*, 2011; 前島ら 2013) が、その機能は明らかでない。本章では、*phyllogen* が花器官形成に関わる MADS ドメイン転写因子のプロテアソームを介した分解を誘導し、花器官の形態異常を引き起こすことを明らかにした。以下に、本研究を進める上で基盤となった知見を記す。

3.1.1 ファイトプラズマ

ファイトプラズマ属細菌 (*Candidatus Phytoplasma* spp.) は、Firmicutes 門、Mollicutes 綱に属するグラム陽性細菌であり (Oshima *et al.*, 2013)、本論文ではファイトプラズマと総称する。ファイトプラズマは退行的進化を遂げた細菌であり、生命にとって必須とされていた FoF₁ 型 ATP 合成酵素のサブユニットを含め、多くの代謝関連タンパク質をコードする遺伝子を保持していない (Oshima *et al.*, 2004)。従って、ファイトプラズマは生育に必要な栄養素の多くを宿主から収奪する必要があると考えられ、それら全てをまかなう人工培養系は確立されていない。ファイトプラズマは培養系が存在せず、第 2 章で行ったような分類のための各種試験が困難であることから、属および種レベルで暫定的な地位 (*Candidatus*) が与えられている。以上の事情のため、ファイトプラズマの分類法は 1.2.3 項に述べた一般細菌の分類法とは大きく異なり、分子生物学的手法を主として行われている。すなわち、新たにファイトプラズマが検出された場合、その 16SrRNA 遺伝子配列 (1,200 bp 以上) を、各ファイトプラズマ暫定種の参照系統 (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology で定められた暫定種の代表的系統) の配列と比較する。16S rRNA 遺伝子の配列同一性が既存の暫定種のものより 97.5% 以上の場合はその暫定種に分類され、いずれの参照系統とも 97.5% を下回る場合には新たな暫定種が提唱される。ただし、暫定種との配列類似性が 97.5% を上回る場合でも、媒介昆虫、引き起こす症状などの病原体としての特徴が大きく異なる場合には新たな暫定種として提案されることもある。現在ファイトプラズマ属にはおよそ 40 の暫定種が提唱されている (Maejima *et al.*, 2014; 図 3-1)。本論文では、簡便化のためファイトプラズマの暫定種に関しても「種」と表記する。

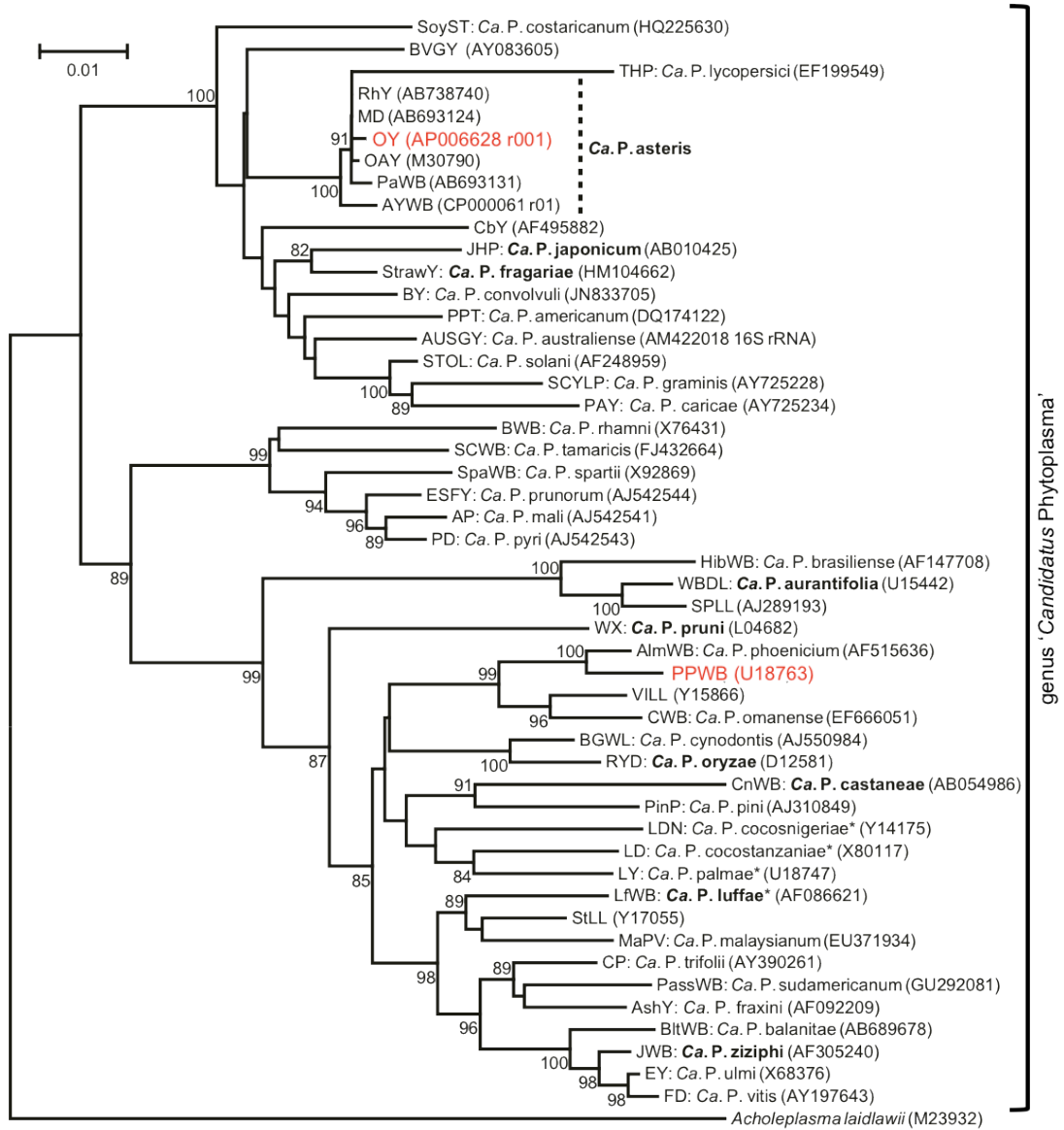


図 3-1 ファイトプラズマの 16S rDNA 配列に基づく系統樹 (Maejima *et al.*, 2014、一部加筆)

学名、および系統名を用いて表記。種が未同定の系統は系統名のみ記載。太字の種は日本で発生報告がある種であり、* は種名が提案されてる段階のものを示す (IRPCM 2004)。本実験で扱う phylogen の単離源の系統は、赤字で表記した。アクセションナンバーは括弧内に表記。バーは進化距離を表す。なお、図中で略した種名、系統名の正式な表記は以下の通り。*AlmWB* almond witches' broom, *AP* apple proliferation, *AshY* ash yellows, *AUSGY* Australian grapevine yellows, *AY-WB* aster yellows phytoplasma strain witches' broom, *BGWL* Bermuda grass white leaf, *BitWB* Balanites triflora witches' broom, *BVGY* Buckland Valley grapevine yellows, *BWB* buckthorn witches' broom, *BY* bindweed yellows, *Ca. P.* Candidatus Phytoplasma, *CbY* chinaberry yellows, *CnWB* chestnut witches' broom, *CP* clover proliferation, *CWB* cassia witches' broom, *ESFY* European stone fruit yellows, *EY* elm yellows, *FD* flavescence dore e of grapevine, *HibWB* hibiscus witches' broom, *JHP* Japanese hydrangea phyllody, *JWB* jujube witches' broom, *LD* coconut lethal yellowing, substrain Tanzanian lethal disease, *LDN* coconut lethal yellowing, substrain Nigerian Awka disease, *LY* coconut lethal yellowing, *LfWB* loofah witches' broom, *MaPV* Malaysian periwinkle virescence, *MD* mulberry dwarf, *OAY* oenothera aster yellows, *OY* onion yellows, *PassWB* passion fruit witches' broom, *PaWB* paulownia witches' broom, *PAY* papaya, *PD* pear decline, *PinP* pine phytoplasma, *PPT* potato purple top wilt, *PPWB* Caribbean pigeon pea witches' broom, *RhY* rhus yellows, *RYD* rice yellow dwarf, *SCWB* salt cedar witches' broom, *SCYLP* sugarcane yellow leaf syndrome, *SoyST* soybean stunt, *SpaWB* spartium witches' broom, *SPLL* sweet potato little leaf, *STOL* stolbur, *StrawY* strawberry yellows, *THP* 'Hoja de perejil' (parsley leaf) of tomato, *VILL* vigna little leaf, *WBDL* witches' broom disease of lime, *WX* western X-disease

3.1.2 ファイトプラズマの病原性

ファイトプラズマは感染植物の篩部細胞内に局在し、ヨコバイやキジラミなどの篩部吸汁性昆虫により伝搬されると考えられている (Christensen *et al.*, 2005)。ファイトプラズマが感染可能な植物は多数報告されており、ファイトプラズマ属全体を通しては数百種の植物に対する感染が報告されている (Hogenhout *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 2013)。一方で、ファイトプラズマの接種には媒介昆虫を用いるのが主であり、媒介昆虫が不詳な種も多いため、個別の種の宿主範囲は正確には理解されていない。ただし、*Ca. P. asteris* (キク科、バラ科、ユリ科などに感染)、*Ca. P. pruni* (ナス科、キク科、リンドウ科などに感染) のように、複数の植物に感染する種も報告されており (Chaturvedi *et al.*, 2010; Maejima *et al.*, 2014)、少なくともこれらの種は広範な植物に感染可能であることが推察される。

ファイトプラズマ感染植物に生じる症状は様々であり (図 3-2)、例えば *Ca. P. asteris* が感染した植物には黄化、萎縮、叢生 (枝分かれの激化)、花器官の形態異常 (後述) が生じることが報告されている (Bertaccini and Duduk 2010; Maejima *et al.*, 2014)。また、*Ca. P. solani* が感染したジャガイモでは上位葉が紫色に変色する purple top 症状が生じる (Ember *et al.*, 2011)。近年、分子生物学的研究手法の発展、ファイトプラズマのゲノム情報の解読 (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)、植物の発達メカニズムなどの知見の集積によって、ファイトプラズマがこれらの病害を誘導する機構は明らかになりつつある。例えば、Hoshi らは *Ca. P. asteris* タマネギ萎黄病系統弱毒株 (onion yellows strain mild-type line; OY-M) が分泌する低分子ペプチド TENGU がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) や *Nicotiana benthamiana* に萎縮・叢生症状を誘導することを報告し、TENGU がオーキシン関連経路を阻害している可能性を示している (Hoshi *et al.*, 2009)。また、*Ca. P. asteris* aster yellows strain (AY-WB) の分泌タンパク質 SAP11 も植物に萎縮症

状を誘導し、植物のジャスモン酸経路を阻害していることが報告されている (Sugio *et al.*, 2011)。

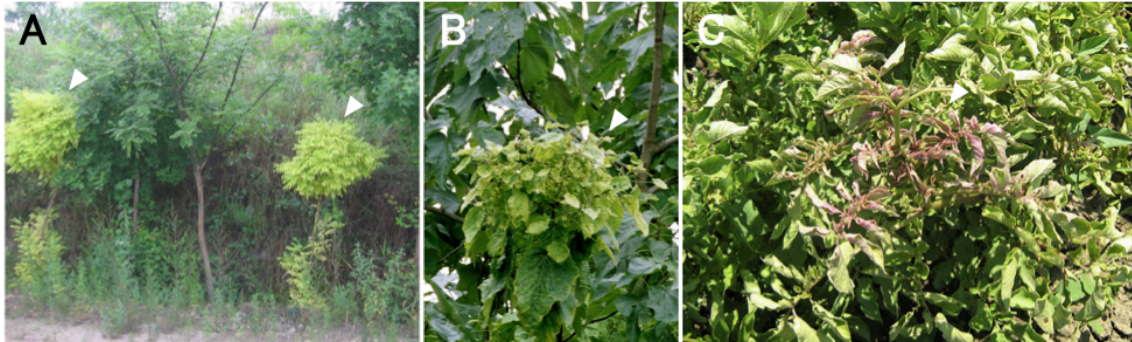


図 3-2 ファイトプラズマ感染植物に誘導される症状の例 (矢頭)

- A. エンジュの萎縮・黄化症状 (Bertaccini and Duduk 2010 より抜粋、一部加筆)
- B. キリの萎縮・叢生症状 (てんぐ巣症状; Maejima *et al.*, 2014 より抜粋、一部加筆)
- C. ジャガイモの purple top 症状 (Ember *et al.*, 2011、一部加筆)

3.1.3 ファイトプラズマによる花器官の形態異常

上述した通り、ファイトプラズマによって引き起こされる症状は多岐にわたるが、中でも特徴的なものとして花器官の形態異常が挙げられる（図 3-3）。ファイトプラズマに感染した植物には、花器官の葉への転換（葉化）、緑変（緑化）、雌蕊の茎への転換やその先端部での新たな花芽の形成（突き抜け）などが生じる（Bertaccini and Duduk 2010; Maejima *et al.*, 2014）。ファイトプラズマ感染による花器官の形態異常は様々な植物で報告されており、病原体となるファイトプラズマも多種が知られている。葉化や突き抜けが生じた花器官には新たな篩部組織が形成されることから、ファイトプラズマはこのような形態異常を誘導することで、自身の生育可能な部位を増やしていると考えられる。実際に、葉化した花器官にファイトプラズマが局在することが報告されている（Arashida *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2011）。また、葉化や突き抜けが雄蕊や雌蕊に生じた花は不稔となるため、本症状の発生は農業生産に深刻な被害を及ぼし得る。一方で特に花き類においては、葉化した花の独特の外観が人を惹き付け、ファイトプラズマ感染植物が珍重されていた事例も存在する（Wang and Maramorosch 1988; Strauss 2009）。



図 3-3 様々なファイトプラズマ感染植物における花器官の形態異常（一部加筆）

- A. アジサイの葉化症状（Maejima *et al.*, 2014 より抜粋、矢頭）
- B. ムラサキバレンギクの葉化症状（Bertaccini and Duduk 2010 より抜粋、矢頭）
- C. ニチニチソウの緑化症状（Bertaccini and Duduk 2010 より抜粋、矢頭）
- D. ゴマの葉化症状（Akhtar *et al.*, 2009、一部加筆）
- E. ヒマワリの葉化・突き抜け症状（Guzmán *et al.*, 2014）

以上を踏まえ、多くの研究者がファイトプラズマによる花器官の形態異常誘導機構に興味を抱き、解析を行っていた (Himeno *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011) が、その詳細は長年不明であった。しかしながら、近年、このファイトプラズマ特異的な症状の誘導機構に関する知見が、少しずつ報告されてきている。

ファイトプラズマは宿主細胞内に寄生する細菌であり、Sec システムと呼ばれる分泌装置を用いて、自身のタンパク質を細胞外へと分泌すると考えられている (Maejima *et al.*, 2014) 。これらのタンパク質は宿主の細胞内で作用するため、感染時に重要な機能を担うとされる。実際、3.1.2 項に述べたファイトプラズマの病原性因子 (TENUGU、SAP11) は、いずれも分泌タンパク質である。そこで、MacLean らは、AY-WB 系統のゲノム中に予測された分泌タンパク質のスクリーニングを行い、シロイヌナズナに葉化や突き抜けを誘導する病原性因子 SAP54 を同定した (MacLean *et al.*, 2011; 図 3-4A) 。SAP54 のホモログは複数種のファイトプラズマに見出されており (図 3-5A) 、その中の 1 つである *Ca. P. asteris* タマネギ萎黄病系統強毒株 (onion yellows strain wild-type line; OY-W) がもつホモログ PHYLL1_{OY} も、SAP54 と同様にシロイヌナズナに葉化や緑化、突き抜けを誘導することが報告されている (前島ら 2013; 当時は c5-22 と表記; 図 3-4B) 。また、peanuts witch's broom phytoplasma (PnWB 系統; *Ca. P. aurantifolia* に近縁だが種は未同定) の有するホモログ PHYLL1_{PnWB} は、PHYLL1_{OY}、SAP54 との配列同一性は低いものの (図 3-5) 、同様にシロイヌナズナに葉化を誘導する (Yang *et al.*, 2015; 図 3-4C) 。我々は、これらの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 (図 3-5) 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、phyllody-inducing gene family (phyllody; phyllody は葉化の意) と総称している。

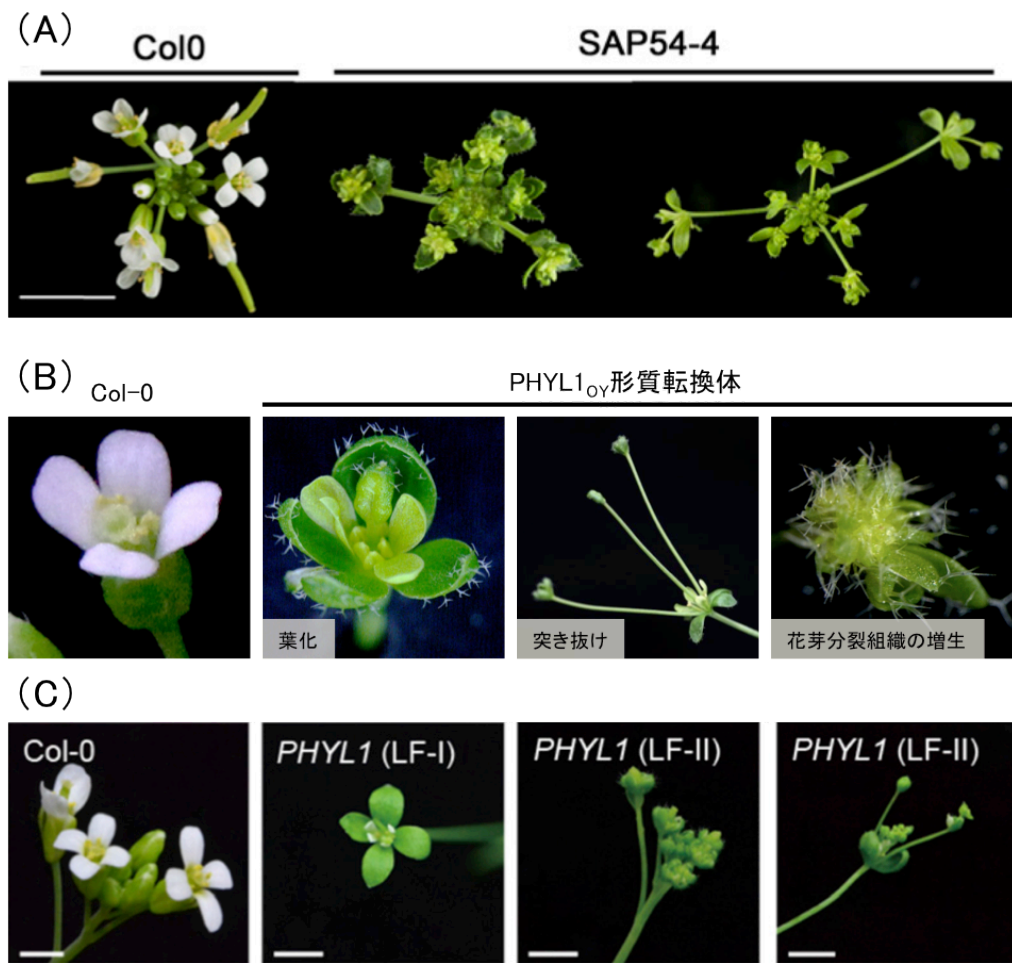
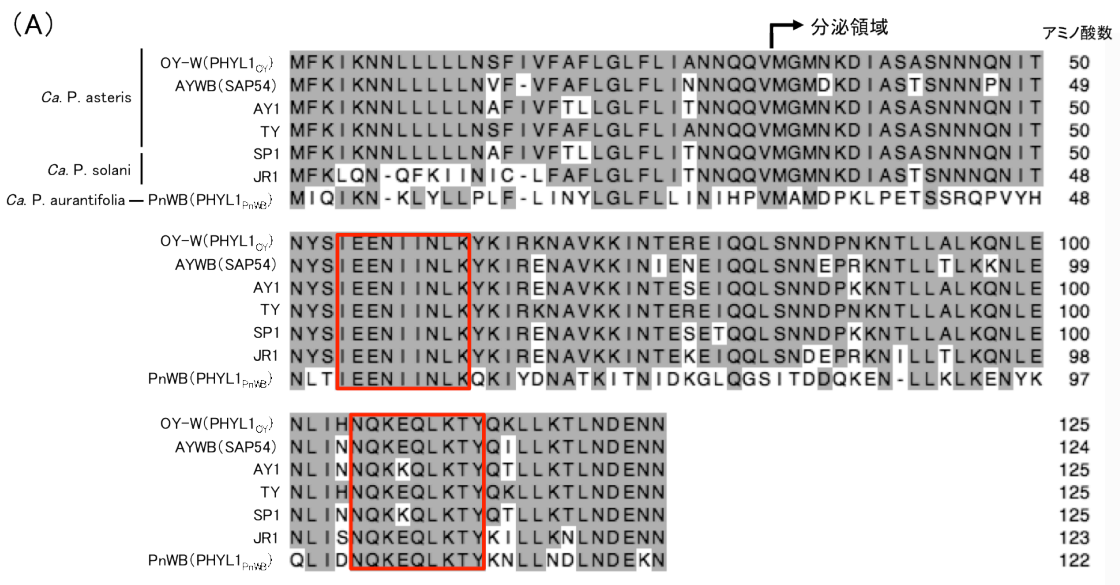


図 3-4 phyllogen 形質転換シロイヌナズナの表現型

- A. SAP54 形質転換シロイヌナズナの表現型 (MacLean *et al.*, 2011 より抜粋)
- B. PHYL1_{oy} 形質転換シロイヌナズナの表現型 (前島ら 2013 より抜粋、一部加筆)
- C. PHYL1_{PnWB} 形質転換シロイヌナズナの表現型 (Yang *et al.*, 2015 より抜粋)



(B)

全長	分泌領域	OY-W (PHYL1 _{OY})	AYWB (SAP54)	AY1	TY	SP	JR1	PnWB (PHYL1 _{PnWB})
OY-W(PHYL1 _{OY})			86.81%	93.41%	100%	92.31%	86.81%	47.78%
AYWB(SAP54)		88.71%		87.91%	86.81%	86.81%	89.01%	50.00%
AY1		92.00%	87.90%		93.41%	98.90%	86.81%	46.67%
TY		100%	88.71%	92.00%		92.31%	86.81%	47.78%
SP1		91.20%	87.10%	92.00%	91.20%		85.71%	46.67%
JR1		78.05%	81.30%	77.24%	78.05%	76.42%		48.89%
PnWB(PHYL1 _{PnWB})		47.54%	49.18%	46.72%	47.54%	46.72%	45.08%	

図 3-5 既報のファイトプラズマゲノムに見出される phylogen

(A) phylogen のアミノ酸配列。左に系統名と暫定種名(あるいは最も近縁な暫定種名)を表記した(出典は後述)。phylogen に名称がついている場合は、系統名に続く括弧内に表記した。アライメントは MEGA5.2.1 (Tamura *et al.*, 2011) 内の ClustalW を用いて行った。PHYL1_{OY} と同じ配列は黒抜きで図示した。分泌領域内に、2 箇所の保存性が高い領域(赤枠内)が見出される。

(B) phylogen の全長、分泌領域のアミノ酸配列の同一性。ClustalW を用いて算出。同一性が 80% 以上の場合は背景を赤色で、70%-80% の場合は橙色で、70% 未満の場合は水色で図示した。

AY1 Jomantiene *et al.*, 2007; AYWB MacLean *et al.*, 2011; JR1 Saccardo *et al.*, 2012; OY-W 前島ら 2013; PnWB Yang *et al.*, 2015; SP1 Jomantiene *et al.*, 2007; TY Jomantiene *et al.*, 2007

3.1.4 花の ABCE モデルと MADS ドメイン転写因子

本項、及び次項では、phylogen の機能を解析する上で重要となる植物の因子について詳述したい。本項では、本研究から phylogen の標的であることが明らかとなった、花器官形成に関わる MADS ドメイン転写因子について述べる。

典型的な花器官は、萼、花弁、雄蕊、雌蕊の4つの器官から構成されている。各器官の発達機構は、シロイヌナズナ、キンギョソウ (*Antirrhinum majus*)、ペチュニア (*Petunia × hybrida*) をモデル植物として盛んに研究されてきた (Robles and Pelez 2004; Davies *et al.*, 2006; Rijpkema *et al.*, 2006a)。その結果、転写因子をコードする遺伝子群 (花のホメオティック遺伝子群) が複合的に発現することで、各器官の分化が決定されることが明らかとなっている。これらのホメオティック遺伝子群の機能を説明するために、「花の ABC モデル」が提唱された (Coen and Meyerowitz 1991)。本モデルでは、ホメオティック遺伝子群はその機能から3つのクラス (A クラス、B クラス、C クラス) に分類される。花芽分裂組織 (floral meristem: FM) において A クラスの遺伝子のみが発現した部位は萼へ、A クラスと B クラスの遺伝子が発現した部位は花弁へ、B クラスと C クラスの遺伝子が発現した部位は雄蕊へ、C クラス遺伝子のみが発現した部位では雌蕊へと分化する。近年では、さらに E クラスのホメオティック遺伝子群が報告されており (Pelaz *et al.*, 2000; Honma and Goto 2001)、これらを加えて ABC モデルを発展させた「ABCE モデル」が新たに提唱されている (図 3-6)。本モデルにおいて、E クラス遺伝子は全ての花器官の形成に関与していると考えられている。ABCE クラスの遺伝子は、その殆どが MADS ドメイン転写因子 (MADS-domain transcription factor; MTF) をコードしている。MTF は MADS ドメインと呼ばれる DNA 結合領域を有する転写因子の総称であり、広く真核生物に見出される。その中で、ABCE クラスの MTF はいずれも、植物特異的な MTF 群である MIKC-type MTF に属する。MIKC-type MTF は、MADS ドメインの他に3つのドメイン

ンを有しており、これらのドメインは MTF のタンパク質間相互作用、DNA との結合能を制御している (Smaczniak *et al.*, 2012)。これらのドメインの機能によって、ABCE クラスの MTF は互いに結合しヘテロ四量体を形成する (カルテットモデル; Theissen and Saedler 2001; Theissen *et al.*, 2016; 図 3-6)。この四量体が各器官形成のための遺伝子の発現を誘導しており、形成される四量体の種類によって下流で応答する遺伝子群が異なるため、それぞれの花器官の分化が生じると考えられている。ABCE 遺伝子のホモログは広く植物に見出されており (Zahn *et al.*, 2005a; Zahn *et al.*, 2005b; Shan *et al.*, 2007; Dreni and Kater 2014)、B、C、E クラス遺伝子に関しては、多くの双子葉植物・単子葉植物においてコードされる MTF の機能も保存されていることが報告されている (Cui *et al.*, 2010; Heijmans *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2015)。従って、ABCE モデルは、植物種による多少の差異はあるものの、被子植物全般にある程度適用可能と考えられている (Soltis *et al.*, 2007)。

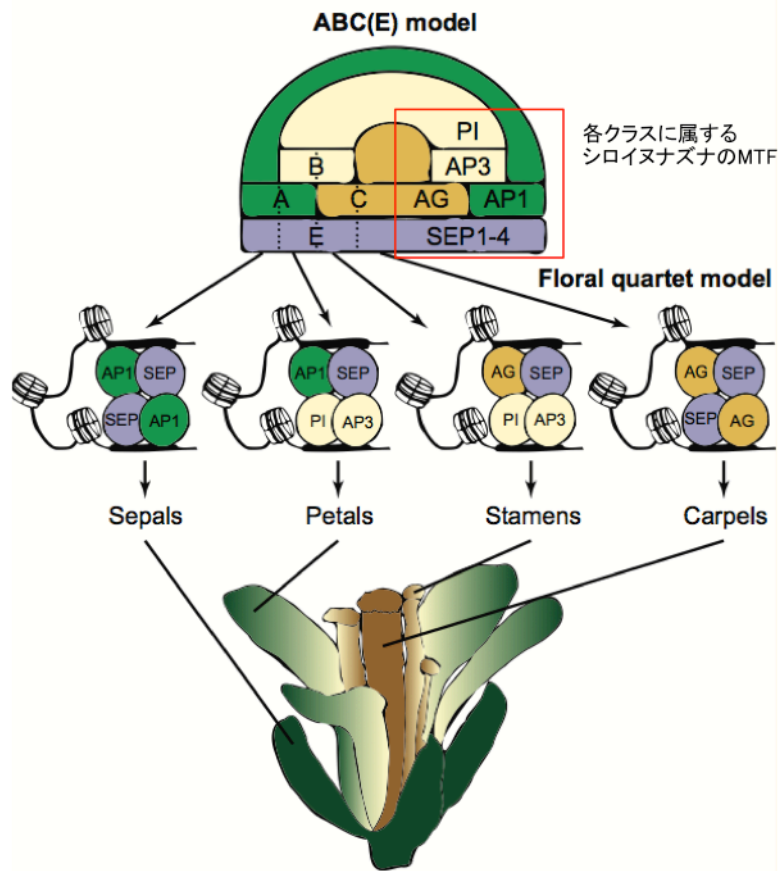


図 3-6 シロイヌナズナの ABCE モデルとカルテットモデル (Smaczniak *et al.*, 2012、一部加筆)
 ABCE モデル (上図) では、A、E クラスの遺伝子が萼 (Sepal) を、A、B、E クラスの遺伝子が花弁 (Petal) を、B、C、E クラスの遺伝子が雄蕊 (Stamen) を、C、E クラスの遺伝子が雌蕊 (Carpel) を分化させると考えられる。シロイヌナズナでは各クラスに属する MTF として、AP1 (A クラス)、PI・AP3 (B クラス)、AG (C クラス)、SEP1・SEP2・SEP3・SEP4 が知られる。SEP と AP1、SEP と AG、AP3 と PI からなるヘテロ二量体が、さらに器官特異的な組み合わせで四量体を形成する特異的な四量体を形成することで花器官の分化が生じる (カルテットモデル)。

ABCE クラスの MTF は花器官分化に重要な機能を担っているため、これらの遺伝子を欠失・発現抑制した植物では異常な花器官が誘導される。例えば、シロイヌナズナにおいて、A クラスの MTF 遺伝子である *APETALA1* (*AP1*) を欠失した変異体では、萼が葉のような構造に変化

し二次花が形成される (Bowman *et al.*, 1993; Gregis *et al.*, 2006 ; 図 3-7A)。また、*AP1* および近縁な MTF である *CAULIFLOWER* (*CAL*) の二重変異体では、花器官が分化せず花芽組織が増生してカリフラワー様の構造が形成される (Bowman *et al.*, 1993 ; 図 3-7B)。また E クラス MTF である *SEPALLATA1* (*SEP1*)、*SEP2*、*SEP3*、*SEP4* は機能的に重複しており、単一遺伝子の変異体は顕著な形態的異常を示さないが、*SEP1*、*SEP2*、*SEP3* の三重変異体では全ての花器官が萼に似た構造に変化し、花の中央から突き抜けが生じる (Pelaz *et al.*, 2000; Ditta *et al.*, 2004; 図 3-C)。さらに、*SEP1-SEP4* の四重変異体では全花器官が葉に変化し、突き抜けもより激しくなる (Ditta *et al.*, 2004)。これらの表現型は、ファイトプラズマ感染時や *phyllagen* の形質転換によって誘導される花の形態異常に類似している。さらに、ファイトプラズマ感染植物では、MTF を含む花器官形成関連遺伝子の発現量が変動することが報告されている (Pracros *et al.*, 2006; Cettul and Firrao 2011; Himeno *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011)。従って、*phyllagen* による花器官の形態異常誘導には、MTF が何らかの形で関与している可能性が考えられた。

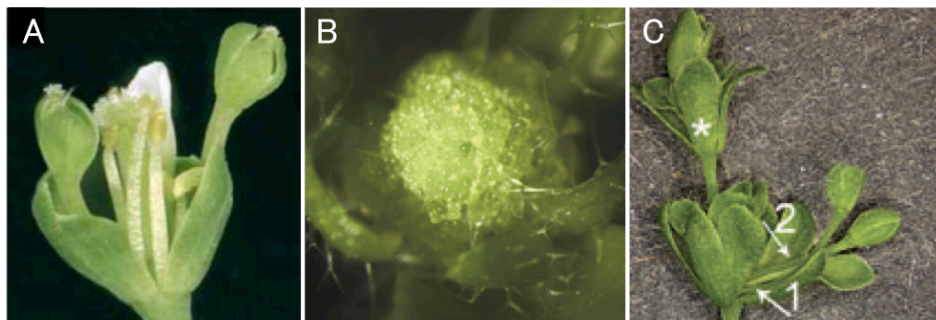


図 3-7 MTF を欠失したシロイヌナズナの花器官の表現型

- A. *ap1* 変異体に見られる二次花の形成 (Gregis *et al.*, 2006 より抜粋)
- B. *ap1/cal* 二重変異体における花芽組織の増生 (Ditta *et al.*, 2004 より抜粋)
- C. *sep1/sep2/sep3* 三重変異体の花器官の葉に類似した構造への転換と、二次花の形成 (Gregis *et al.*, 2008 より抜粋)

3.1.5 プロテアソーム

生物は自身の細胞内環境を制御するため、構造が異常なタンパク質や不要となったタンパク質を分解する機構を有している。プロテアソームはタンパク質分解機能を担う巨大なタンパク質複合体であり、真核生物に広く保存されている（八代田、村田 2012）。プロテアソームは60を超えるサブユニットから形成されており、大きく2つの複合体（20S プロテアソーム、19S 制御粒子）から構成される（Wang and Deng 2011; 図 3-8）。20S プロテアソームはプロテアーゼ活性を有し、タンパク質分解の中心的な役割を担っている。7種類の α サブユニット（ $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ）、 β サブユニット（ $\beta 1$ - $\beta 7$ ）がそれぞれ α リング、 β リングと呼ばれる環状構造を形成し、それらが $\alpha \beta \beta \alpha$ の順に連なって20Sサブユニットとなる。サブユニットの中で実際にタンパク質分解活性を有するのは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ である。19S制御粒子は一般に20Sサブユニットの両側に1つずつ結合しており（図 3-8）、分解の標的となるタンパク質と結合し、その立体構造を壊して20Sプロテアソームへと送り込む（八代田、村田 2012）。

プロテアソームによって分解されるタンパク質には特異性があり、一般的に複数のユビキチンからなるポリユビキチン鎖によって修飾された（ポリユビキチン化）タンパク質が標的となる（Raasi and Wolf 2007）。ユビキチンは76アミノ酸からなるタンパク質であり、プロテアソーム同様に真核生物に広く保存されている。タンパク質のポリユビキチン化は3種類の酵素、ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）、ユビキチン転移酵素（ユビキチンリガーゼ; E3）によって行われる。ユビキチンは始めにE1と結合し、活性化する。その後、ユビキチンはE2、E3へと受け渡され、E3が認識するタンパク質のリシン残基へと付加される（Ye and Rape 2009）。E1、E2に比べてE3として働くタンパク質は非常に多く（シロイヌナズナの既知のE1は2種、E2は約40種なのに対し、E3は1400種以上が知られる）、ユビキチン化されるタンパク質の特異性は主にE3によって決定されると考えられている（Wang and

Deng 2011)。ユビキチン化の様式は複数知られており、一般にプロテアソームへの運搬シグナルとなるのは、ユビキチンの 48 番目のリシン残基に次のユビキチンが結合することで形成されるポリユビキチン鎖である (Ye and Rape 2009; Walsh and Sadanandom 2014)。ポリユビキチン化されたタンパク質は 19S 制御粒子中の Rpn10、Rpn13 に結合し、20S プロテアソームへと運ばれて分解される (八代田、村田 2012)。タンパク質分解に先立って、ユビキチンは脱ユビキチン化酵素の働きで標的タンパク質から解離し、分解を免れる (Sharma and Pandey 2015)。このように、タンパク質のポリユビキチン化とプロテアソームによる分解は極めて密接な関係にあることから、両者をユビキチン-プロテアソーム系と総称することも多い。ただし一部のタンパク質においては、ユビキチン化を介さずにプロテアソームで分解される事例も知られている (Kahana 2009)。

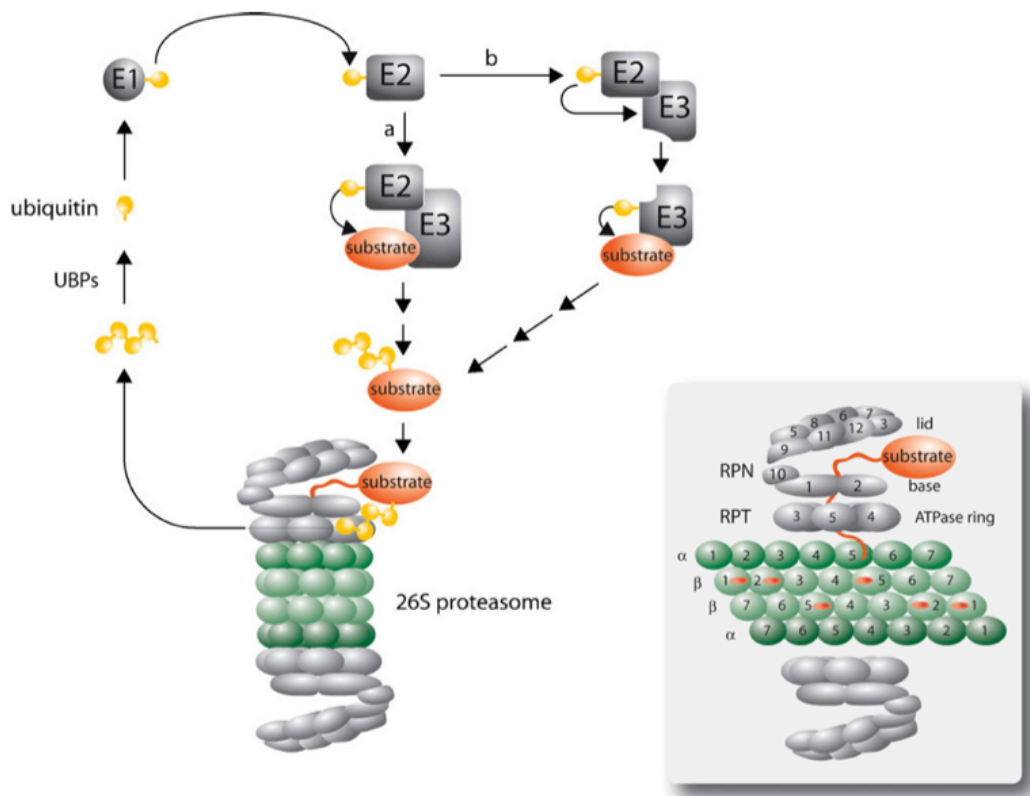


図 3-8 プロテアソームの構造と、ユビキチン-プロテアソーム系 (Raasi and Wolf 2007)

26S プロテアソームは 20S プロテアソーム (緑) と 2 つの 19S 制御粒子 (灰色) から構成される。ユビキチン (黄色) は E1、E2、E3 を介して、E3 が認識する基質 (橙色) のリシン残基に結合する。E3 へのユビキチンの転移は生じない場合もある。基質に結合したユビキチンの 48 番目のリシン残基に更にユビキチンが結合し、ポリユビキチン鎖が形成される (ポリユビキチン化)。ポリユビキチン化されたタンパク質は 26S プロテアソームへと運ばれ、20S プロテアソーム中の β 1、 β 2、 β 5 サブユニットの活性によって分解される。ユビキチンは、基質の分解前に脱ユビキチン化酵素 (図中では UBPs と表記) によって遊離し、再利用される。

3.2 材料および方法

3.2.1 材料

シロイヌナズナ、*Nicotiana benthamiana*、シュンギク（品種：さとゆたか；サカタのタネ）はいずれも種子から栽培した。栽培条件は、シロイヌナズナでは 23°C、16 時間明期、8 時間暗期の条件であり、残りの 2 種では 25°C、自然光下である。

接種試験では、萎黄病を示すタマネギより分離されたファイトプラズマ [*Candidatus Phytoplasma asteris onion yellows* 系統 (OY-W)] (塩見ら、1998) を用いた。OY-W は PHYLL1oy の単離源であり、シュンギク、及び媒介昆虫であるヒメフタテンヨコバイ (*Macrostelea striifrons*) を用いて維持した。

本章で用いたシロイヌナズナの遺伝子は表 3-1 の通りである。またファイトプラズマの phylogen から、PHYLL1oy、および PHYLL1pnWB を用いた。両ホモログはいずれも、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導することが報告されている (前島ら 2013; Yang *et al.*, 2015)。各遺伝子の詳細なクローニング方法、実験用コンストラクトの作出方法は別個に記載する。

表 3-1 本章で用いたシロイヌナズナの遺伝子

遺伝子名	クラス/機能	用いた実験
<i>AP1</i>	A	定量 RT-PCR、Y2H、BiFc、分解誘導活性試験
<i>CAL</i>	花芽組織の分化 (<i>AP1</i> と一部機能重複)	Y2H、分解誘導活性試験
<i>AP3</i>	B	定量 RT-PCR
<i>P1</i>	B	定量 RT-PCR
<i>AG</i>	C	定量 RT-PCR、BiFc
<i>SEP1</i>	E	分解誘導活性試験
<i>SEP2</i>	E	分解誘導活性試験
<i>SEP3</i>	E	定量 RT-PCR、Y2H、BiFc、分解誘導活性試験
<i>SEP4</i>	E	分解誘導活性試験
<i>AGL24</i>	Flowering time gene	定量 RT-PCR
<i>SOC1</i>	Flowering time gene	定量 RT-PCR
<i>SVP</i>	Flowering time gene	定量 RT-PCR

3.2.2 OY-W 感染植物、昆虫間の PHYL10Y 発現量比較

接種試験

OY-W 感染シロイヌナズナを作出するため、シロイヌナズナ（エコタイプ Bay-0）25 株に対して 25 頭の OY-W 感染ヒメフタテンヨコバイを加えて、1 週間吸汁させた。その後ヨコバイを取り除き、後述の方法で RNA を抽出した。2 週間後にファイトプラズマ検出用 LAMP キット（ニッポンジーン）によって、シロイヌナズナにおけるファイトプラズマ感染の有無を確認した。操作は付属のマニュアルに従った。感染が確認された植物の地上部から RNA を抽出した。

RNA 抽出

1. サンプルを液体窒素を用いて磨砕し、ISOGEN（ニッポンジーン） 1 ml を添加した。
2. 磨砕液を 1.5 ml チューブに移し、15,000 rpm、4°C で 12 分間遠心した。
3. 上清を別チューブに移し、クロロホルム（ナカライテスク）200 μ l を加え、良く混合した。
4. 15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。
5. 上清を別チューブに移し、2-プロパノール（ナカライテスク）500 μ l を加え、良く混合した。
6. 15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心した。
7. 上清を廃棄し、70%エタノール 1 ml を加えて 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。
8. 上清を廃棄し、5 分間減圧乾燥機で RNA を乾燥させた。
9. 得られた RNA を RNase free water 約 30 μ l に溶解し、Recombinant RNase Inhibitor (40U/ μ l、TaKaRa) 0.2 μ l を添加した。
10. 超微量分光光度計 NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定し、-80°C で保存した。
11. 抽出 RNA と DNase を下記組成で混合し、37°C で 1.5-2 時間反応させた

組成	(\times 1)
rDNase I (TaKaRa)	2 μ l
10x reaction buffer for rDNase (TaKaRa)	10 μ l
100 mM CaCl ₂	1 μ l
RNA + DW	86 μ l
+ Recombinant RNase inhibitor (TaKaRa)	1 μ l
<hr/>	
Total	100 μ l

12. 反応液を等量の RNase free water、酸性フェノール、クロロホルム 100 μ l ずつと混合し、12,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。
13. 手順 4~9 を繰り返し RNA 精製、濃度測定を行い、-80°C で保存した。

cDNA 合成

得られた RNA 500 ng を鋳型として、Random Primer による cDNA 合成を行った。合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い、以下の組成の反応液を加えて 25°C で 10 分、37°C で 120 分間反応させた。反応液は、-30°C で保存した。

組成	(×1)
10x RT buffer	1 µl
25x dNTP Mix	0.5 µl
10x Random Primer	1 µl
RNA+DW	7.1 µl
+ Multiscribe RTase	0.5 µl
<hr/>	
Total	20 µl

定量 RT-PCR

cDNA を 100 倍に希釈し、後述の組成・反応時間で定量 RT-PCR を行った。反応には SYBR PreMix Ex Taq (TaKaRa) を用いた。内部標準遺伝子として、ファイトプラズマ内のタンパク質翻訳時に機能する伸長因子 (Elongation factor) である、*tufB* 遺伝子を用いた (Oshima *et al.*, 2011)。定量 RT-PCR に用いたプライマー、及びその標的遺伝子は表 3-2 にまとめる。

組成	(×1)	反応時間		
Primer F (5 µM)	1.2 µl	Hold	95°C	00:30
Primer F (5 µM)	1.2 µl	2 step PCR	95°C	00:05
SYBR PreMix Ex Taq	10 µl		60°C	00:30
DW	5.6 µl		95°C	00:15
+ cDNA	2 µl	Dissociation	60°C	00:30
<hr/>			95°C	00:15
<hr/>		<hr/>		

表 3-2 PHYL1_{oy} の定量 RT-PCR に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子
Tuf1	GCTAAAACCTTGTCACGTTGTACG	<i>tufB</i>
Tuf2	CGGAAATAGAATTGAGGACGGT	<i>tufB</i>
PHYL1_F	TTATTGAATTCGTTTATTGTATTTGCTTTC	<i>PHYL1_{oy}</i>
PHYL1_R	TCTTTATTCATCCCCATTACTTGTTG	<i>PHYL1_{oy}</i>

3.2.3 PHYLL1_{OY}、PHYLL1_{PnWB} 発現コンストラクトの作出

本項以降の実験では、PHYLL1_{OY}、PHYLL1_{PnWB} を植物細胞内で発現させ、機能を解析した。いずれも本来 N 末端に分泌シグナルを有すると推定されているが、細胞外へ分泌される際に本シグナル配列は切断され、それ以外の領域が機能すると考えられている (前島ら 2013; 図 3-9)。そこで、本項以降の実験では、両ホモログのシグナル配列を除いた領域のみを植物内で発現させた。以降は、当該領域を PHYLL1_{OY}、PHYLL1_{PnWB} と呼称する。



図 3-9 PHYLL1_{OY}、及びその変異体の略図

コドン頻度改変 PHYLL1_{OY}、PHYLL1_{OY}Δ8、PHYLL1_{PnWB} 配列の合成

植物内でのタンパク質発現量を増加させるために、両ホモログのコドン使用頻度をシロイヌナズナのものに合わせた配列を合成した。PHYLL1_{OY} については、コドン頻度の改変はかずさ DNA 研究所のコドン使用頻度データベース (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) に基づき、自身で行った。塩基配列は図 3-10A に示す。また、合成はオペロンバイオテクノロジー株式会社に依頼し、PHYLL1_{OY}、PHYLL1_{OY}Δ8(N 末端 2~7 番目のアミノ酸欠失変異体) を合成した (図 3-9)。

合成配列は同社の使用しているクローニングベクターである p-EX-A ベクターの KpnI、XhoI サイト内にクローニングされた。

PHYL1_{PnWB} の合成はライフテクノロジーズ株式会社に依頼し、同社のプログラムに基づきコドン頻度を改変した。最適化後の塩基配列は図 3-10B のとおりである。依頼配列は塩基配列断片として合成され、pENTA ベクター（後述）にクローニングするため、5'端に (5'-AAGGAACCAATTCAGTCATG-3') を、3'端に (5'-AAGCTGGGTCTAGAT-3') を付加した。

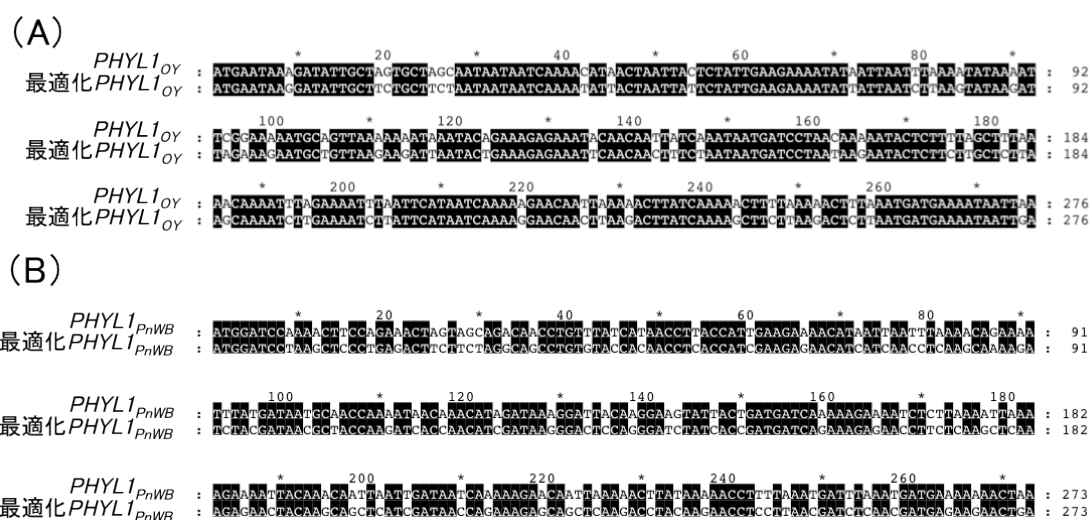


図 3-10 最適化 PHYL1_{OY} (A)、PHYL1_{PnWB} (B) の塩基配列（改変部位は白背景で表示）

pENTA へのクローニング (pENTA-PHYL1_{OY}、pENTA-PHYL1_{OY}Δ8、pENTA-PHYL1_{PnWB})

pENTA ベクターは、pENTR ベクター (Invitrogen) 由来の組換え配列 (*attL* 配列カセット) を有し (Himeno *et al.*, 2010)、対となる組換え配列 (*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換えが可能である (LR 反応)。本研究では合成した配列を 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換えを行った。pENTA へのクローニングについて、詳細な手順を下記に記す。

(PHYL1_{oy}, PHYL1_{oy}Δ8 のクローニング)

1. pENTA(ベクター)、合成配列の挿入された pEX-A(インサート)を制限酵素 *Kpn*I (TaKaRa)、及び *Xho*I (TaKaRa) 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。

組成	(×1)
10x M Buffer	3 μl
<i>Kpn</i> I	0.5 μl
<i>Xho</i> I	0.5 μl
+ DNA+DW	26 μl
<hr/>	
Total	30 μl

2. 0.7%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 Ultra Clean Gel DNA Extraction Kit (MO-BIO) 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った。
3. ベクターとインサートを混合し、Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を等量加えて 16°C で 15 分間反応させた。
4. ライゲーション後のサンプルに大腸菌 DH5α 株のコンピテントセル (TaKaRa) を 100 μl 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 分間静置した後、SOC 培地 [1000 ml 当たりの組成: 0.5 g NaCl, 20 g Bacto-tryptone, 5 g Yeast extract, 終濃度 2.5 mM KCl, 終濃度 10 mM MgCl₂, 終濃度 10 mM MgSO₄, 終濃度 20 mM glucose (pH7.0)] を 1 ml 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 (1000 ml 当たり、10 g Bacto-tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl, 15 g Agarose, 100 μg/ml Ampicillin) に塗抹して 37°C で 1 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 液体培地 (1 L 当たりの組成: 16 g

Bacto-tryptone、10 g Yeast extract、5 g NaCl、100 µg/ml Ampicillin) 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。得られたプラスミドにインサート配列が挿入されていることを確認するため、0.7%アガロースゲルによる電気泳動を行い、ベクター配列とのサイズを比較した。

9. ベクター上に設計されたプライマー (M13F、M13R ; 配列は表 3-3 に表記) を用いて dyedeoxyterminator 法によるダイレクトシーケンスを行った。詳細な試薬組成・反応条件は 2.2.6 項に準じた。

(PHYL1_{PnWB} のクローニング)

1. pENTA (ベクター) を制限酵素 *SaI*-HF (NEB)、及び *EcoRV*-HF (NEB) 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。

組成	(×1)
10x CutSmart Buffer (NEB)	3 µl
<i>SaI</i> -HF	0.5 µl
<i>EcoRV</i> -HF	0.5 µl
+ DNA+DW	26 µl
Total	30 µl

2. ゲル精製後のベクターとインサートを混合し、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。
3. 大腸菌への形質転換、プラスミド精製、配列の確認は上述のものと同様に行った。

pENTA-PHYL1_{0Y}Δ3~PHYL1_{0Y}Δ7 の作出

PHYL1_{0Y}Δ8 同様に、N 末端 2 番目から順に 6 番目のアミノ酸まで欠失させた変異体 (PHYL1_{0Y}Δ3~PHYL1_{0Y}Δ7 ; 図 3-9) を、inverse PCR により作出した。表 3-3 に記したプライマーを用い、pENTA-PHYL1_{0Y} を鋳型として PHYL1_{0Y}Δ3 ~ PHYL1_{0Y}Δ5 を、pENTA-PHYL1_{0Y}Δ8 を鋳型として PHYL1_{0Y}Δ6、PHYL1_{0Y}Δ7 を作出した。変異導入、ライゲーションはそれぞれ GeneArt® Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) 、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit により行い、付属のマニュアルに準じて操作を行った。また、大腸菌への形質転換、プラスミド精製、配列確認は pENTA-PHYL1_{0Y} のクローニングと同様に行った。

LR 反応

pFAST02 (インプラントイノベーショonz) は植物での遺伝子発現用ベクターであり、T-DNA 領域に存在する 35S プロモーター配列の直下に、LR 反応を介して目的配列を挿入可能である。PHYL1_{0Y} をシロイヌナズナに形質転換するため、LR 反応により、*PHYL1_{0Y}*、*PHYL1_{PnWB}* 配列を pFAST02 ベクターへとクローニングした (pFAST-PHYL1_{0Y}、pFAST-PHYL1_{PnWB}) 。また、PHYL1_{0Y} 変異体の配列も同様の手法でクローニングした (pFAST-PHYL1_{0Y}Δ3~PHYL1_{0Y}Δ8) 。詳細な手順は下記に記す。

1. 目的遺伝子の挿入された pENTA ベクターと pFAST02 を混合し、Gateway® LR Clonase® Enzyme mix (ThermoFisher Scientific) による LR 反応を行った。操作は、付属マニュアルに準じた。
2. pENTA-PHYL1_{0Y} 作出時と同様の手法で大腸菌に形質転換し、プラスミドを回収した。選抜用抗生物質として Spectinomycin (100 μg/ml) を用いた。

3. プラスミドに目的遺伝子が挿入されたことを、ベクター上に設計されたプライマー (attB1F、attB2R ; 配列は表 3-2 に表記) を用いた PCR によって、目的遺伝子と同等のサイズの断片が増幅されるかで確認した。反応組成・条件は下記の通りである。

組成	(×1)	反応時間	
		温度	時間
10x rTaq buffer (TaKaRa)	1 μl	96°C	00:30
2 mM dNTPs	0.8 μl	96°C	00:15
Primer F (5 μM)	0.8 μl	55°C	00:30 30 cycles
Primer F (5 μM)	0.8 μl	72°C	01:00
rTaq (TaKaRa)	0.1 μl	72°C	07:00
Templete DNA	1 μl	4°C	∞
+ DW	5.5 μl		
Total	10 μl		

表 3-3 3.2.3 項で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	用途
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	pENTA のインサートチェック
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	pENTA のインサートチェック
attB1F	ACAAGTTTGTACA AAAAAAGCAGGCT	pFAST のインサートチェック
attB2R	ACCACTTTGTACA AAGAAAGCTGGGT	pFAST のインサートチェック
49LD2-F	CGACTGGATCCGGTACCATGGATATTGCTTCTG CTTCTAA	pENTA-PHYL1 α Δ 3 作製
49LD2-R	TTAGAAGCAGAAGCAATATCCATGGTACCGGAT CCAGTCG	pENTA-PHYL1 α Δ 3 作製
49LD3-F	CGACTGGATCCGGTACCATGATTGCTTCTGCTT CTAATAA	pENTA-PHYL1 α Δ 4 作製
49LD3-R	TTATTAGAAGCAGAAGCAATCATGGTACCGGAT CCAGTCG	pENTA-PHYL1 α Δ 4 作製
49LD4-F	CGACTGGATCCGGTACCATGGCTTCTGCTTCTA ATAATAA	pENTA-PHYL1 α Δ 5 作製
49LD4-R	TTATTATTAGAAGCAGAAGCCATGGTACCGGAT CCAGTCG	pENTA-PHYL1 α Δ 5 作製
49SD5-F	CGACTGGATCCGGTACCATGTCTGCTTCTAATA ATAATCAAAATAT	pENTA-PHYL1 α Δ 6 作製
49SD5-R	ATATTTTGATTATTATTAGAAGCAGACATGGTA CCGGATCCAGTCG	pENTA-PHYL1 α Δ 6 作製
49SD6-F	CGACTGGATCCGGTACCATGGCTTCTAATAATA ATCAAAATAT	pENTA-PHYL1 α Δ 7 作製
49SD6-R	ATATTTTGATTATTATTAGAAGCCATGGTACCG GATCCAGTCG	pENTA-PHYL1 α Δ 7 作製

pFAST-PHYL1_{OY}, PHYL1_{OY}Δ3~PHYL1_{OY}Δ8, PHYL1_{PnWB}のアグロバクテリウムへの形質転

換

1. 各プラスミド溶解液 1.5 μl をアグロバクテリウム EHA105 株 (Hood *et al.*, 1993) のコンピ
テントセル 30 μl と混合し、氷上で 5 分間静置した。
2. 液体窒素で 1 分間凍結させた後、SOC 培地 1ml を加えて 28°C で 1 時間震盪培養した。
3. 菌体を集菌し、LB/Spectinomycin 平板培地に塗抹して、28°C で 2 日間静置した。
4. 単コロニーを YT/Spectinomycin 液体培地で培養し、等量の 50%グリセロールと混合して液
体窒素で急冷した (グリセロールストック)。作成したストックは-80°C で保存し、実験ご
とに取り出して用いた

3.2.4 PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナの作出

PHYL1_{0Y}、PHYL1_{0Y}Δ3~PHYL1_{0Y}Δ8 変異体のシロイヌナズナへの形質転換 (Floral Dip 法)

1. 滅菌爪楊枝で各グリセロールストックを1欠片取り出し、100 ml YT/Spectinomycin 液体培地で一晩培養した。
2. 菌液を 3000 rpm で 10 分間遠心し、菌体を回収した。
3. 菌体を 5%スクロース溶液に再懸濁し、超微量分光光度計 NanoDrop2000c を用いて OD₆₀₀ 値を 0.8 に調整した。
4. つぼみの複数ついたシロイヌナズナ (エコタイプ Col-0) を複数株用意し、開花した花をはさみで取り除いた。
5. 菌液に 0.05%の SilwetL-77 (Solarbio) を添加し、つぼみを数秒間菌液に浸けた。
6. つぼみに付着した菌液を拭き取り、一晩多湿条件で暗所に置いた後、通常条件で生育させた。
7. 約 1 ヶ月後に種子を回収し、形質転換が成功した種子を pFAST02 ベクターの T-DNA 中に挿入された種子特異的 GFP 発現コンストラクトに由来する蛍光の有無で選抜した。
8. 選抜した種子を通常条件で生育させ、形成された花器官の表現型を観察した。

PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナからの定量 RT-PCR

形質転換遺伝子の発現を確認するため、形成された未開花なつぼみを 1~10 個採集し、液体窒素中で磨砕した。RNA 抽出、RT 反応、PHYL1_{0Y} 特異的な定量 PCR を 3.2.2 項に準じ行った。また、各遺伝子の標準化にはシロイヌナズナのアクチン遺伝子を用いた。同様にして、複数の宿主因子の発現量を PHYL1_{0Y} 形質転換シロイヌナズナと非形質転換シロイヌナズナと比較した。使用したプライマーは表 3-4 に記す。

表 3-4 3.2.4 項で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子	参考文献
AtActin-F	TGGCATCACACTTTCTACAA	<i>Actin</i>	Yamaji <i>et al.</i> , 2012
AtActin-R	CCACTGAGCACAATGTT	<i>Actin</i>	Yamaji <i>et al.</i> , 2012
		<i>PHYL1or</i>	
PHYL1_2F	CAACAACCTTTCTAATAATGATCC	(最適化)	本実験で構築
		<i>PHYL1or</i>	
PHYL1_2R	TTGATAAGTCTTAAGTTGTTC	(最適化)	本実験で構築
			Teper-Bamnlker and
AtSEP3_F	CTAAGACTAAGGTTAGCTGATGGGTA	<i>SEP3</i>	Samach, 2005
			Teper-Bamnlker and
AtSEP3_R	ATGATGACGACCGTAGTGATCAA	<i>SEP3</i>	Samach, 2005
AtAP1_F	GGAGCAGCAGCTTGACACTG	<i>AP1</i>	本実験で構築
AtAP1_R	TGGAGCTCATTGATGGACTCG	<i>AP1</i>	本実験で構築
AtCAL_F	AAAGGAGAAGGAGATACAGGAGG	<i>CAL</i>	本実験で構築
AtCAL_R	CTGTGGTACATCGTCGACGC	<i>CAL</i>	本実験で構築
AtAG_F	TGTTCTTCTCCCCCAACAGCAAT	<i>AG</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtAG_R	GAGGAATCTCCTCCTAGCTCCGAT	<i>AG</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtPI_F	AAATCTGATGGCTGTGAGCAC	<i>PI</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtPI_R	TCTGGTGGTCTCGGACTTTGTC	<i>PI</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtAP3_F	TGGGCCACTCAATATGAGCGAATG	<i>AP3</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtAP3_R	ACACTCACCTAGCCTCTGCTTGAT	<i>AP3</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtSVP_F	TGGTTTGACGCGTGTGATTG	<i>SVP</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
AtSVP_R	CCCTTTTTCTGAAGTTCGCTGA	<i>SVP</i>	Czechowski <i>et al.</i> , 2004
P7	AGCTGCAGAAAACGAGAAGCTCTCTG	<i>SOC1</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007
P8	GGGCTACTCTCTTCATCACCTCTTCC	<i>SOC1</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007
P15	GAGGCTTTGGAGACAGAGTCGGTGA	<i>AGL24</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007
P16	AGATGGAAGCCCAAGCTTCAGGGAA	<i>AGL24</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007

3.2.5 Yeast two hybrid assay (Y2H)

Y2H 法はタンパク質間相互作用を解析する為に広く用いられる手法であり、酵母細胞内で 2 つのタンパク質を発現させ相互作用の有無を検証する (Fields and Song 1989)。本項では酵母の転写因子 GAL4 が 2 つのドメイン (binding domain、activation domain) に分割可能なことを利用し、両ドメインを PHYL1_{oY}・PHYL1_{PnWB}、又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

PHYL1_{oY}、PHYL1_{oY}Δ8、PHYL1_{PnWB} を pGBKT7 ベクター (Clontech) にクローニングし、GAL4 binding domain (BD) を付加した。同様に MTF 遺伝子である API、CAL、SEP3、および MTF でない転写因子の WUS を pGADT7 ベクター (Clontech) にクローニングし、GAL4 activation domain (AD) 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。3.2.4 項で合成したシロイヌナズナ cDNA を鋳型として用い、PHYL1_{oY} 等の増幅には各遺伝子がクローニングされた pENTA ベクター (3.2.3 項に記載) を用いた。使用したプライマーは表 3-5 に記す。反応条件は以下の通りである。

組成	(×1)	反応時間	
		温度	時間
10x KOD plus neo buffer (TOYOBO)	5 μl	96°C	00:30
2 mM dNTPs	5 μl	96°C	00:15
25 mM MgSO ₄	2 μl	55°C	00:30
Primer F (5 μM)	3.2 μl	68°C	02:00
Primer F (5 μM)	3.2 μl	68°C	07:00
KOD plus neo (TOYOBO)	1 μl	4°C	∞
Templete DNA	0.5 μl		
+ DW	30.1 μl		
Total	50 μl		

2. 3.2.3 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 *Nde*I-HF (NEB)、*Eco*RI (NEB) であり、メーカー推奨のバッファーを用いた。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を、3.2.3 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 (共通)、AD3'R (pGADT7 ベクター用)、BD3'R (pGBKT7 ベクター用) である。配列は表 3-5 に記載した。

表 3-5 3.2.5 項で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子
SEP3-ADF	ACCAGATTACGCTCAAATGGGAAGAGGGAGAGTAGA	<i>SEP3</i>
SEP3-ADR	ATGCCACCCCGGGTGGCCTCAAATAGAGTTGGTGTTCAT	<i>SEP3</i>
AP1-ADF	ACCAGATTACGCTCAAATGGGAAGGGGTAGGGTTCA	<i>AP1</i>
AP1-AD3R	ATGCCACCCCGGGTGGCCTCATGCGGCGAAGCAGCC	<i>AP1</i>
CAL-ADF	ACCAGATTACGCTCAAATGGGAAGGGGTAGGGTTGA	<i>CAL</i>
CAL-ADR	ATGCCACCCCGGGTGGCCTCAAGCGGCGTAACAGCCAA	<i>CAL</i>
WUS-ADF	ACCAGATTACGCTCAAATGGAGCCGCCACAGCATCA	<i>WUS</i>
WUS-ADR	ATGCCACCCCGGGTGGCCTAGTTCAGACGTAGCTCAA	<i>WUS</i>
PHYL1-BDF	AGAGGAGGACCTGCAAATGAATAAAGATATTGCTAGTGCTAGC	<i>PHYL1_{oy}</i>
PHYL1Δ8-BDF	AGAGGAGGACCTGCAAAGCAATAATAATCAAAACATAACTAATTACTC	<i>PHYL1_{oy}Δ8</i>
		<i>PHYL1_{oy}l</i>
PHYL1-BDR	CGACGGATCCCCGGGCCTTAATTATTTTCATCATTTAAAGTTTTTAAAAG	<i>PHYL1_{oy}Δ8</i>
PNWB_to_pGB		
KT7F	AGAGGAGGACCTGCATATGGATCCTAAGCTCCC	<i>PHYL1_{pNB}</i>
pENTA_to_p		
GBKT7_R	CGACGGATCCCCGGGAATTTGTACAAGAAGCTGGGTCTAGAT	<i>PHYL1_{pNB}</i>
		pGADT7/pG
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG	BKT7
AD3'R	CTGTGCATCGTGCACCATCT	pGADT7
BD3'R	TTTTCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC	pGBKT7

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 (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 Yeast Protocols Handbook (http://download.bioon.com.cn/upload/month_0812/20081212_14884cc2b24e2458c6beaHMeT8k3EWPd.attach.pdf) に従い、形質転換を行ったのち、BD、AD の相互作用を検証した。実験に用いたプラスミドの組み合わせは以下の通りである。

	AD	BD
試験区 1	WUS	PHYL1 _{oy}
試験区 2	AP1	
試験区 3	SEP3	
試験区 4	CAL	
試験区 5	WUS	PHYL1 _{oy} Δ8
試験区 6	AP1	
試験区 7	SEP3	
試験区 8	CAL	
試験区 9	WUS	BD (挿入遺伝子なし)
試験区 10	AP1	
試験区 11	SEP3	
試験区 12	CAL	
試験区 13	AD (挿入遺伝子なし)	PHYL1 _{PnWB}
試験区 14	AP1	
試験区 15	SEP3	

3.2.6 Bimolecular Fluorescence Complementation 法 (BiFC)

BiFC 法は生体内でタンパク質間相互作用の様子を観察する為の手法である (Hu *et al.*, 2002)。yellow fluorescent protein (YFP) などの蛍光タンパク質を 2 領域に分割し、それぞれ 2 種のタンパク質に融合させて生体内で発現させる。タンパク質間相互作用に応じて分割された蛍光タンパク質も再度結合し蛍光を発するため、その蛍光の様子を観察することで、相互作用の検出が可能である。本項では BiFC 法を用いて MTF 間相互作用を検出し、PHYL1_{0Y} が与える影響を解析した。なお MTF、PHYL1_{0Y} のネガティブコントロールとして、それぞれ MTF でない転写因子である bZIP63 (Walter *et al.*, 2004)、および植物細胞内で 酵素活性をしめさないとされる β -glucuronidase (GUS; Jefferson 1987) を用いた。

宿主因子のクローニング

pEarleyGate vector series (Earley *et al.*, 2006) は LR 反応を介して様々なタグタンパク質を標的配列に付加し、植物内で発現可能である。本実験では *SEP3*、*API*、*CAL*、*AG*、及び MTF でない転写因子 *bzip63* を pENTA にクローニングし、LR 反応を介して改変 pEarleyGate ベクター (Okano *et al.*, 2014) に挿入することで、NYF (YFP の N 末端 155 アミノ酸)、あるいは CYF (YFP の C 末端 84 アミノ酸) を付加した。詳細な手順は以下の通りである。

1. pENTA ベクターを 3.2.3 項での操作に準じ、制限酵素で切断した。使用した制限酵素は *SaI*-HF と *EcoRV*-HF (*API* クローニング用)、または *SaI*-HF と *EcoRI*-HF (*SEP3*、*CAL*、*AG* クローニング用)、*SaI*-HF と *XhoI* (*bZIP63* クローニング用) である。バッファーは各組み合わせに対しメーカー推奨のものを用いた。
2. 各遺伝子を、3.2.4 項同様にシロイヌナズナの cDNA より合成した。使用したプライマーは表 3.5 に記す。なお、*bZIP63*、*API* は終止コドンを除いてクローニングした。*bZIP63* 配列

は、1 同様に *SaII*-HF、*XhoI* で処理した。

3. ベクターとインサートを GeneArt® Site-Directed Mutagenesis System、もしくは Ligation-Convenience Kit (*bZIP63* のみ)を用いてライゲーションした。操作は 3.2.3 項に準じた。
4. 大腸菌への形質転換、プラスミド精製、インサートの確認は 2.2.3 項の記載に準じた。
5. 3.2.3 項同様に LR 反応を行い、コンストラクトの確認を行った。作成したコンストラクトは表 3-6 の通りである。大腸菌の選抜には Kanamycin を用いた。
6. 3.2.4 項同様にプラスミドをアグロバクテリム EHA105 株に形質転換し、グリセロールストックを作成した。選抜には Kanamycin を用いた。

表 3-6 3.2.6 項で用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子
	CTTTAAAGGAACCAATTCAGAAATGGGAAGAGGGAGAGTA	
PENTASEP3-F	GAAT	<i>SEP3</i>
pENTASEP3-R	CTCGAGTGC GGCCGCGAATTTCAAATAGAGTTGGTGTCAT	<i>SEP3</i>
AP1F	AAGGAACCAATTCAGTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAA	<i>AP1</i>
AP1mnsTR	AAGCTGGGTCTAGATATGCGGCGAAGCAGCCAAGG	<i>AP1</i>
	CTTTAAAGGAACCAATTCAGAAATGGGAAGGGGTAGGGTT	
PENTACAL-F	GA	<i>CAL</i>
PENTACAL-R	CTCGAGTGC GGCCGCGAATTTCAAGCGGCGTAACAGCCAA	<i>CAL</i>
cAG-F	AAGGAACCAATTCAGTCATGGCGTACCAATCGGAGCT	<i>AG</i>
cAG-tR	CTCGAGTGC GGCCGCGAATTTTACACTAACTGGAGAGCG	<i>AG</i>
Sal_bZIP63_F	GCGTCGACTTTGAAACCAAAAAAAAAATAAATAAAA	<i>bZIP63</i>
bZIP63_XhoI_R	CTCGAGGGCTGATCCCCAACGCTTCGA	<i>bZIP63</i>

N. benthamiana での一過的発現

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、T-DNA 領域上に目的遺伝子をクローニングしたベクターを導入したアグロバクテリウムを植物組織の細胞間隙に注入することで、アグロバクテリウムの接種と形質転換を行う。各タンパク質の発現用アグロバクテリウムを YT 液体培地で一晩培養し、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 (pH5.6) , 150 μM アセトシリニンゴン、pH5.6) で調整した。なお、PHYL1_{oy}、PHYL1_{oy}Δ8 の発現には、3.2.4 項で作成した pFAST 由来のコンストラクトを用いた。GUS の発現には当研究室で構築済のコンストラクト (pEarleyGate100 に GUS が挿入され、35S プロモーターで発現するもの) を用いた。各アグロバクテリウム液は以下の様に混合した。

試験区 1	bZIP63-NYF	bZIP63-CYF	GUS
試験区 2			PHYL1 _{oy}
試験区 3			PHYL1 _{oy} Δ8
試験区 4	NYF-SEP3	AP1-CYF	GUS
試験区 5			PHYL1 _{oy}
試験区 6			PHYL1 _{oy} Δ8
試験区 7	NYF-SEP3	CYF-AG	GUS
試験区 8			PHYL1 _{oy}
試験区 9			PHYL1 _{oy} Δ8
混合比	1	1	10

注射針で穴をあけた *N. benthamiana* 上位葉に、この菌液を 10 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 2 日間、25 °C で静置した。

蛍光観察

接種部から約 5 mm 角の植物片をカミソリで切り出し、共焦点蛍光顕微鏡で YFP 蛍光の局在を観察した。また、いずれの BiFC シグナルも核で円形状に観察されたことから、葉 2.4 mm² に相当する視野の蛍光画像 (524 x 524 dpi) を取得し、画像処理ソフト Image J 1.44o (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて、蛍光を発する核数を数えた。具体的には画像を 8 bit の白黒画像に変換したのち、色彩を反転させた。この画像中で一定以上の濃さ、大きさのシグナル数を測定し、蛍光シグナル数とした。

3.2.7 MTF の局在・蓄積量解析

クローニング

宿主因子 (AP1、SEP1-3、CAL、bZIP63) に YFP を付加するため、3.2.6 項と同様の手法を用いて、LR 反応により各遺伝子を pENTA ベクターから pEarleyGate101 ベクター、または 104 ベクターにクローニングした。SEP3、CAL、bZIP63 に関しては既に pENTA にクローニングしているコンストラクト (3.2.6 項) を用いた。ただし、SEP3 に関しては終止コドンを除いたコンストラクトも、GeneArt® Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を用いた点変異導入によって作出し、LR 反応に用いた。使用したプライマーは SEP3mnsTF (5'-ATGACACCAACTCTATTAATTCGCGGCCGCACTCGAG-3') と SEP3mnsTR (5'-CTCGAGTGCGGCCGCGAATTAATAGAGTTGGTGTTCAT-3') である。AP1 遺伝子については終止コドンが付加したコンストラクトを作出するため、3.2.6 項と同様の手法で pENTA へのクローニングから行った。PCR に使用したプライマーは、AP1F (5'-AAGGAACCAATTCAGTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAA-3') と AP1plsTR (5'-AAGGAACCAATTCAGTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAA-3') である。SEP1 (Accession No. ; NM_121585)、SEP2 (Accession No. ; NM_111098)、SEP4 (Accession No. ; NM_126418) は遺伝子合成 (ライフテクノロジーズジャパン株式会社に発注) 後に、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit を用いて pENTA (SalI-HF、EcoRI で切断済) へクローニングし、そのコンストラクトを用いた。合成塩基配列からは終止コドンを除き、5'端に (5'-AAGGAACCAATTCAGTCATG-3') を、3'端に (5'-CTCGAGTGCGGCCGCGAATT-3') を付加した。作出したプラスミドの精製、確認は 3.2.3 項に準じて行った。LR 反応によって作出したコンストラクトは、3.2.4 項同様にアグロバクテリム EHA105 株に形質転換し、グリセロールストックを作成した。選抜には Kanamycin を用いた。

N. benthamiana 葉における MTF の局在観察

3.2.6 項と同様の手法で各 YFP 融合タンパク質を *N. benthamiana* 葉で発現させて、36 時間後に蛍光を観察し、局在や蓄積量に PHYL1_{oY}、PHYL1_{PnWB} が与える影響を解析した。アグロバクテリウム菌液の混合比は以下の通りである。

(PHYL1_{oY})

試験区 1	bZIP63-YFP	GUS
試験区 2		PHYL1 _{oY}
試験区 3		PHYL1 _{oY} Δ 8
試験区 4	YFP-AP1	GUS
試験区 5		PHYL1 _{oY}
試験区 6		PHYL1 _{oY} Δ 8
試験区 7	YFP-CAL	GUS
試験区 8		PHYL1 _{oY}
試験区 9		PHYL1 _{oY} Δ 8
試験区 10	SEP1-YFP	GUS
試験区 11		PHYL1 _{oY}
試験区 12	SEP2-YFP	GUS
試験区 13		PHYL1 _{oY}
試験区 14	YFP-SEP3	GUS
試験区 15		PHYL1 _{oY}
試験区 16		PHYL1 _{oY} Δ 8
試験区 17	SEP4-YFP	GUS
試験区 18		PHYL1 _{oY}
混合比	1	10

(PHYL1_{PnWB})

試験区 1	SEP3-YFP	GUS
試験区 2		PHYL1 _{PnWB}
混合比	1	1

イムノブロット法

接種葉を 36 時間後に回収し、YFP を認識する抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質を検出した。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砕し、0.5 g/ml になるようにタンパク質抽出用 1x サンプルバッファー [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% 2-メルカプトエタノール、2% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、5% スクロース、プロモフェノールブルー少量) を加えて混合した。
2. 抽出液を 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清を回収して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、ウェット式転写法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) 膜上に転写した。転写後の PVDF メンブレンは 5% スキムミルク中で 1 時間以上震盪し、ブロッキングした。
5. YFP 融合タンパク質を、抗 GFP モノクローナル抗体 (Roshe) で標識した。
6. 未反応な抗体を除去した後、horseradish peroxidase (HRP) 標識された抗マウス抗体 (GEヘルスケア) を用いて、二次抗体反応を行った。
7. 未反応な抗体を除去したのち、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて、標識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。
8. 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。

3.2.8 タンパク質分解経路阻害実験

PHYL1_{0Y}が標的 MTF の分解を誘導する可能性が示されたため、宿主のタンパク質分解経路の関与を検証した。植物が有する主要タンパク質分解経路であるプロテアソーム、およびオードファジীর阻害剤による PHYL1_{0Y}への影響を検証した。詳細な手法は以下の通りである。

1. YFP-SEP3、PHYL1_{0Y}を、3.2.7 項と同様にアグロインフィルトレーション法によって、*N. benthamiana* 葉で一過的に共発現させた。なお、両コンストラクト形質転換用アグロバクテリウムは等量混合した。
2. 24 時間後に、20 μ M Clasto-lactacystin β -lactone (プロテアソーム阻害剤)、5 mM 3-Methyladenine (オードファジীর阻害剤)、もしくは Dimethyl sulfoxide (DMSO; ネガティブコントロール、滅菌水で 100 倍希釈したものを使用) を接種葉に注入した。
3. 3.2.7 項と同様に、接種 36 時間後 (阻害剤処理 12 時間後) に接種葉における蛍光を観察した。

3.2.9 免疫沈降

PHYL1_{oy} 存在下で SEP3 がユビキチン修飾を受けるかを検証するため、免疫沈降による YFP-SEP3 の精製とイムノブロット法によるユビキチン化 YFP-SEP3 の検出を行った。詳細な手順は以下の通りである。

1. 3.2.7 項と同様にアグロインフィルトレーション法によって、タンパク質を *N. benthamiana* 葉で発現させた。各コンストラクト発現用アグロバクテリウムの混合比は以下の通りである。

試験区 1	YFP-SEP3	バッファーのみ
試験区 2	YFP-SEP3	PHYL1 _{oy}
試験区 3	bZAIP63-YFP	PHYL1 _{oy}
混合比	1	1

2. 36 時間後に接種葉を採集し、1x RIPA バッファー [1.5 M NaCl, 0.12 M Sodium Deoxycholate, 10% Nonidet P-40, 1% SDS, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)] を 1g/ 2ml になるように添加して、氷上で磨砕した。
3. 抽出液を 10,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を回収した。うち 60 µl を 20 µl のタンパク質抽出用 4x サンプルバッファー（組成は 3.2.7 項参照）と混合した (Input)。
4. 残った抽出液をサンプルごとに 1 ml ずつエッペンチューブに回収し、2 µg の抗 GFP モノクローナル抗体を加えて 4°C で 1 時間攪拌した。
5. 抗 GFP モノクローナル抗体に結合するアフィニティー担体である Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE ヘルスケア) を加えて、さらに 4°C で 1 時間攪拌した。
6. 抽出液を 1,000 rpm 4°C で 1 分間遠心し、上清を取り除いて担体を回収した。
7. 回収した担体の洗浄のため、1 ml の 1x RIPA バッファーを添加し、再遠心して再び上清を取り除いた (5 回繰り返した)
8. 担体に 50 µl のタンパク質抽出用 1x サンプルバッファーを添加した (Output)

9. Input、Output を 95°C で 5 分間加熱して、熱変性させた。Output は瞬間遠心後、上清を回収することで担体から遊離したタンパク質を回収した。

10. Input、Output を 5 μ l ずつ用いて、3.2.7 項と同様にイムノブロットを行い、YFP 融合タンパク質を検出した。Output に関しては、同時に抗ユビキチンポリクローナル抗体 (Agisera) を用いたイムノブロットを行いユビキチン化タンパク質を検出した。その際の二次抗体反応には HRP 標識された抗ウサギ抗体 (GE ヘルスケア) を用いた。

3.3 結果

3.3.1 OY-W における *PHYL1_{OY}* 発現量の植物感染時と昆虫感染時の比較

ファイトプラズマは植物と昆虫という異なる生物に適応するため、宿主に応じて自身の遺伝子の発現量を変化させることが知られている (Oshima *et al.*, 2011)。*PHYL1_{OY}* の機能について示唆を得る為に、OY-W における *PHYL1_{OY}* の発現量を植物感染時と昆虫感染時で比較した。定量 RT-PCR の結果、*PHYL1_{OY}* の発現量は植物感染時に有意に増加し、昆虫感染時に比して約 3 倍発現していた (図 3-11)。

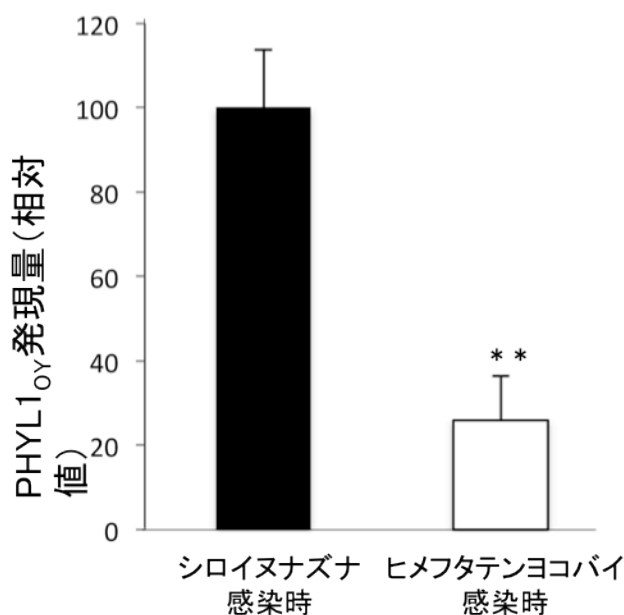


図 3-11 OY-W ファイトプラズマにおける、宿主間での *PHYL1_{OY}* 発現量比較

感染宿主から抽出した RNA による定量 RT-PCR によって測定した。*PHYL1_{OY}* 発現量は伸長因子 *tufB* を標準化遺伝子として相対化した。実験は試験区ごとに 4 反復行い、平均値、標準偏差を求め、学生 T 検定によって有意差を算出した (**: $P < 0.01$)。図はシロイヌナズナにおける発現量を 100 として表示し、エラーバーは標準偏差を表す。

3.3.2 PHYL1_{0Y}、PHYL1_{0Y}Δ3～PHYL1_{0Y}Δ8 の葉化誘導能

PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナでは、葉化や突き抜けなどの花器官の形態異常が誘導される(前島ら 2013)。そこで、PHYL1_{0Y}の機能領域についての知見を得る為に、N 末端 3 番目のアミノ酸から 8 番目のアミノ酸までを順番に欠失させた変異体 (PHYL1_{0Y}Δ3～PHYL1_{0Y}Δ8 ; 図 3-9) をシロイヌナズナで発現させて、表現型を PHYL1_{0Y} 形質転換シロイヌナズナと比較した。遺伝子発現には 35S プロモーターを用いた。なお、PHYL1_{0Y}を含め各タンパク質はコドン頻度を植物のものに合わせて最適化し、その塩基配列を形質転換した。

最適化 PHYL1_{0Y}を形質転換したシロイヌナズナでは、非最適化 PHYL1_{0Y}を形質転換した過去の知見(図 3-4)と同様に、全ての花器官に形態異常が誘導された(図 3-12)。萼は最も影響を受けやすく、葉のような構造物に変化しトライコームに覆われていた(35S::PHYL1_{0Y} line10)。同様に、花弁も完全に緑変した。雄蕊は最も PHYL1_{0Y}による影響を受けにくく形態の異常は生じていなかったが、やや緑変したのに加えて、裂開せず不稔症状を呈していると考えられた。また、雌蕊は茎に変化して先端に花序が形成された。加えて、雌蕊先端部や葉化した萼の脇からは二次花が形成され、この花も同様に葉化していた(35S::PHYL1_{0Y} line2)。また一部の植物体では、葉化した萼が形成されたものの、それ以外には花序分裂組織が分化しなかった(35S::PHYL1_{0Y} line8)。PHYL1_{0Y}Δ3～PHYL1_{0Y}Δ7 を形質転換したシロイヌナズナにおいても、PHYL1_{0Y} 形質転換シロイヌナズナと同様に花器官の形態異常が観察された(35S::PHYL1_{0Y}Δ3～35S::PHYL1_{0Y}Δ7)。従って、これらの変異体は PHYL1_{0Y}と同等の機能を有すると考えられた。その一方で、PHYL1_{0Y}Δ8 を形質転換したシロイヌナズナにおいては野生型と同様の花器官形成が観察された(35S::PHYL1_{0Y}Δ8)ため、PHYL1_{0Y}Δ8 は形態異常誘導能を喪失していると考えられた。PHYL1_{0Y}の発現は、定量 RT-PCR により確認した。



図 3-12 PHYL1_{oy} 及び変異体を形質転換したシロイヌナズナの花器官

3.3.3 PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナにおける *AP1*、*CAL*、*SEP3* の発現量解析

PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナにおいて、Aクラス、EクラスのMTF遺伝子の変異体に類似した形態異常が誘導されることは、PHYL1_{0Y}によってこれらのMTFの機能が阻害される可能性を示唆している。そこで本仮説を検証するため、AクラスMTFである*AP1*や近縁なMTFである*CAL*、EクラスMTFである*SEP3*に着目し、PHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナのみにおける各MTF遺伝子の発現量を、野生型植物と比較した。解析には、PHYL1_{0Y}挿入部位が異なる3つの形質転換ラインを用いた。定量RT-PCRの結果、いずれの形質転換シロイヌナズナにおいても各遺伝子の発現量は野生型植物と同程度であり、統計的に優位な差は認められなかった(図3-13)。従って、*AP1*、*CAL*、*SEP3*の遺伝子発現量はPHYL1_{0Y}によって影響を受けないことが示唆された。

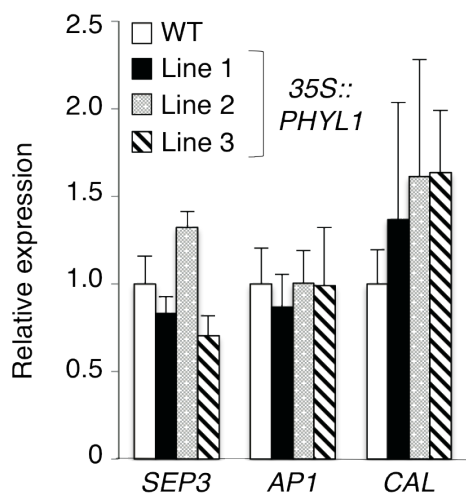


図3-13 PHYL1_{0Y}を形質転換したシロイヌナズナにおける*SEP3*、*AP1*、*CAL*の発現量
野生型、及びPHYL1_{0Y}形質転換シロイヌナズナ3ラインの花芽からRNAを抽出し、定量RT-PCRによって各遺伝子の発現量を定量した。ラインごとに4個体からRNAを抽出し、個体ごとの遺伝子発現量をアクチン遺伝子の発現量をもとに相対化したのち、平均値と標準偏差を求めた。図では、野生型シロイヌナズナにおける各遺伝子の発現量を1として示している。barは標準偏差を示す。

3.3.4 PHYL1_{oy} と MTF との相互作用解析

PHYL1_{oy}が AP1、CAL、SEP3 の遺伝子発現に影響を示さなかったことから、続いて PHYL1_{oy} が各タンパク質と相互作用し機能を阻害しているかを、Yeast two hybrid assay (Y2H; 3.2.5 項) を用いて検証した。酵母の転写因子 GAL4 の AD ドメインを融合した SEP3 (AD-SEP3)、AP1 (AD-AP1)、CAL (AD-CAL) のいずれかを、BD ドメイン融合 PHYL1_{oy} (BD-PHYL1_{oy}) と共発現させた場合、GAL4 の機能が回復し選択培地上での酵母の生育が認められた(図 3-14)。一方で、WUS (頂芽や花芽分裂組織の形成に働く MTF でない転写因子) を用いて実験を行った場合、AD-WUS を BD-PHYL1_{oy} と共発現させた酵母は選択培地上で生育しなかった。また、各 AD ドメイン融合タンパク質を BD ドメインと共発現させた酵母も、選択培地上では生育しなかった。以上より、PHYL1_{oy} が SEP3、AP1、CAL と相互作用することが示された。また、BD 融合 PHYL1_{oy}Δ8 (BD-PHYL1_{oy}Δ8) を用いて試験を行った場合にも、同様の結果が得られた。従って、葉化誘導能を欠失した変異体である PHYL1_{oy}Δ8 も SEP3、AP1、CAL と相互作用することが示された。

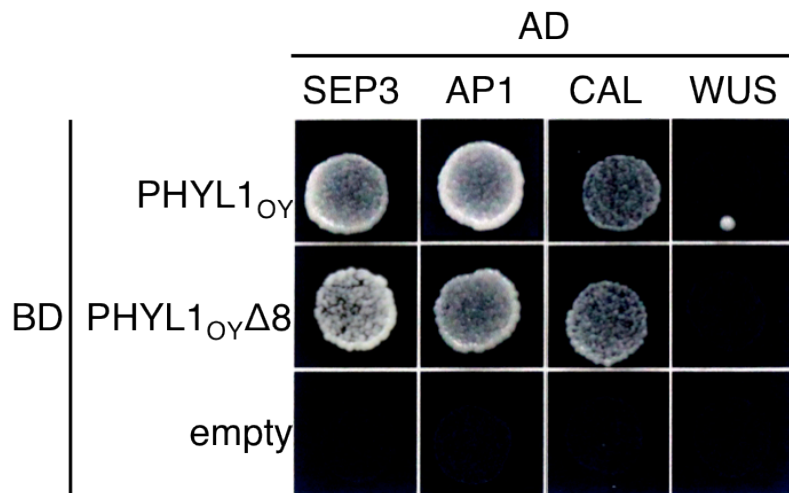


図 3-14 MTF と PHYL1_{0Y} の Yeast two hybrid

pGADT7 ベクターにクローニングし AD を付加した MTF と、pGBKT7 ベクターにクローニングし BD を付加した PHYL1_{0Y} を酵母細胞内で共発現させて、相互作用の有無を検証した。形質転換した酵母は -LWH 培地で生育させた。-LWH 培地は、酵母に必要な最小限の栄養素からロイシン(L)、トリプトファン(W)、ヒスチジン(H)を抜いた培地である。pGADT7、pGBKT7 にはそれぞれロイシン合成酵素、トリプトファン合成酵素がクローニングされており、両プラスミドを有する酵母はこれらのアミノ酸を合成可能である。従って、ADタンパク質とBDタンパク質が相互作用し GAL4 転写因子が機能した場合のみ、酵母内のヒスチジン生合成関連経路が活性化し、酵母が本培地上で生育可能になる。各コンストラクトを形質転換した酵母を、OD=0.1 になるように滅菌水中に懸濁し、10 μl の菌液を培地に滴下した。培地は 30°C で 4 日間培養し、酵母の生育を確かめた。

3.3.5 PHYL1_{0Y}形質転換植物における AP1、SEP3 の下流因子の発現量解析

PHYL1_{0Y} との相互作用によって MTF が機能を阻害されているかを検証するため、AP1 や SEP3 によって発現を制御される MTF 遺伝子の発現量を、PHYL1_{0Y}形質転換植物において定量した。実験には、両タンパク質に発現を正に制御される MTF 遺伝子である *APETALA3*(*AP3*)、*PISTILLATA* (*PI*) (共にクラス B 遺伝子)、負に制御される MTF 遺伝子である *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1* (*SOC1*)、*SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*)、*AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) (いずれも *flowing time gene*) を用いた (Ng and Yanofsky 2001; Gregis *et al.*, 2008; Immink *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012)。また、SEP1-4 の四重変異体の花芽において発現量が低下する *AGAMOUS* (*AG*; クラス C 遺伝子; Liu *et al.*, 2009) についても解析を行った。解析には、PHYL1_{0Y}挿入部位が異なる 3 つの形質転換植物ラインを用いた。

野生型植物、および PHYL1_{0Y}形質転換植物のつぼみから抽出した RNA を用いて定量 RT-PCR を行った結果、PHYL1_{0Y}形質転換植物ではクラス B 遺伝子 2 つの発現量がいずれも著しく低下していた (図 3-15)。対照的に、*AGL24* の発現量に優位な差は認められなかったものの、*SOC1*、*SVP* の発現量は上昇しており、PHYL1_{0Y}形質転換植物では *flowing time gene* の発現量が上昇していると考えられた。これらの結果から、SEP3、AP1 による下流遺伝子の発現制御が PHYL1_{0Y}によって阻害されていることが示唆された。一方で *AG* の発現量は野生型植物と同程度であり、PHYL1_{0Y}は *AG* の発現量に影響しないことが示唆された。

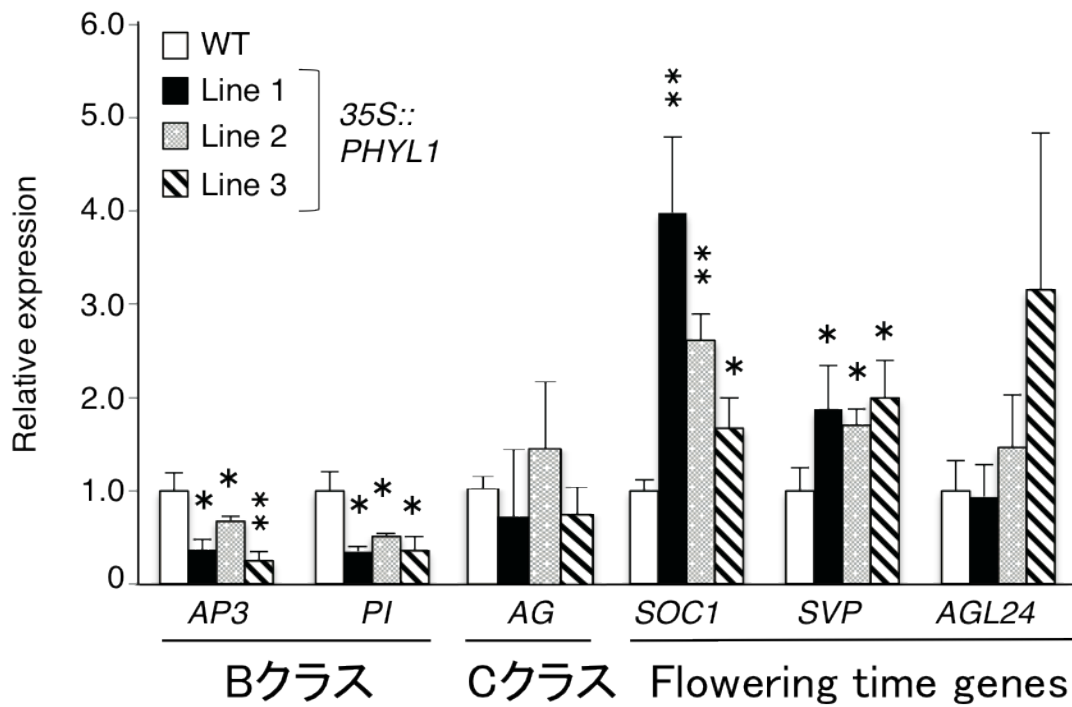


図 3-15 PHYL1_{OY} を形質転換したシロイヌナズナにおける MTF 遺伝子の発現量

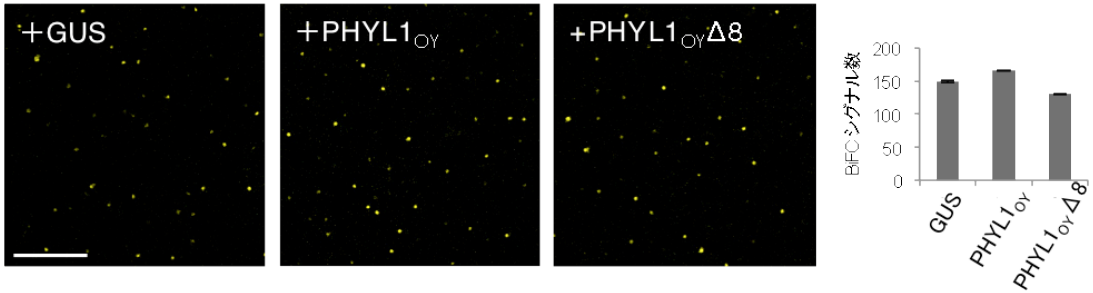
野生型、及び PHYL1_{OY} 形質転換シロイヌナズナ 3 ラインの花芽から RNA を抽出し、定量 RT-PCR によって各遺伝子の発現量を定量した。ラインごとに 4 個体から RNA を抽出し、個体ごとの遺伝子発現量をアクチン遺伝子の発現量をもとに相対化したのち、平均値と標準偏差を求めた。図では、野生型シロイヌナズナにおける各遺伝子の発現量を 1 として示している。bar は標準偏差を示す。* は各試験区間で統計的に有意な差があったことを示している (* p<0.05; ** p<0.01)。

3.3.6 BiFC 法を用いた MTF の多量体化への PHYL1_{0Y} の影響解析

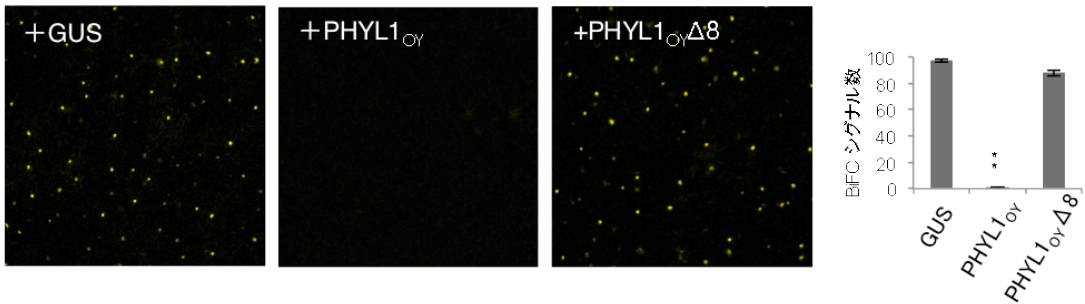
SEP3、AP1 は核に局在し、SEP3-AP1 や SEP3-AG などの二量体を形成し、花器官の分化を制御する (Immink *et al.*, 2009; Smaczniak *et al.*, 2012; 図 3-6)。PHYL1_{0Y} が SEP3、AP1 と相互作用し機能を阻害することから、これらの MTF の多量体形成が PHYL1_{0Y} によって阻害されている可能性を考え、BiFC 法を用いて *in planta* で解析した。BiFC には、SEP3、AP1、AG に YFP の N 末端側 (NYF)、あるいは C 末端側 (CYF) を融合させたコンストラクトを用いた。また、核でホモ二量体化する塩基性ロイシンジッパー転写因子である bZIP63 (Walter *et al.*, 2004) を、コントロールとして用いた。

N. benthamiana 葉において、NYF-SEP3 と AP1-CYF をネガティブコントロールである GUS と共発現させた結果、核での YFP 蛍光が認められ、これまでの知見 (Immink *et al.*, 2009; Smaczniak *et al.*, 2012) と同様に SEP3 と API は核内で相互作用していると考えられた (図 3-16 左図)。一方で両者を PHYL1_{0Y} と共発現させた場合、この蛍光が著しく減衰するのが観察された。画像解析ソフトを用いて蛍光シグナル数を定量し統計処理を行った結果、シグナル数が有意に低下していることが確かめられた (図 3-16 右図)。従って SEP3-AP1 ヘテロ二量体の形成が PHYL1_{0Y} によって阻害されることが示された。NYF-SEP3 と CYF-AG を共発現させた場合も、GUS 共発現時は核に観察される蛍光が PHYL1_{0Y} 共発現時には消失し、相互作用が阻害されていることが示された。bZIP63-NYF と bZIP63-CYF を発現させた場合、GUS 共発現時にも PHYL1_{0Y} 発現時にも核内に蛍光が観察され、蛍光シグナル数も変動していなかった。従って、PHYL1_{0Y} は bZIP63 ホモ二量体の形成には影響しないと考えられた。以上のことから、PHYL1_{0Y} は植物における標的 MTF を含む複合体の形成を特異的に阻害していると考えられた。一方で PHYL1_{0Y} Δ8 を共発現させた場合には、いずれの実験区においても YFP 蛍光の減衰は認められず、PHYL1_{0Y} Δ8 は各複合体の形成を阻害しないと考えられた。

bZIP63-NYF + bZIP63-CYF



NYF-SEP3 + CYF-AP1



NYF-SEP3 + CYF-AG

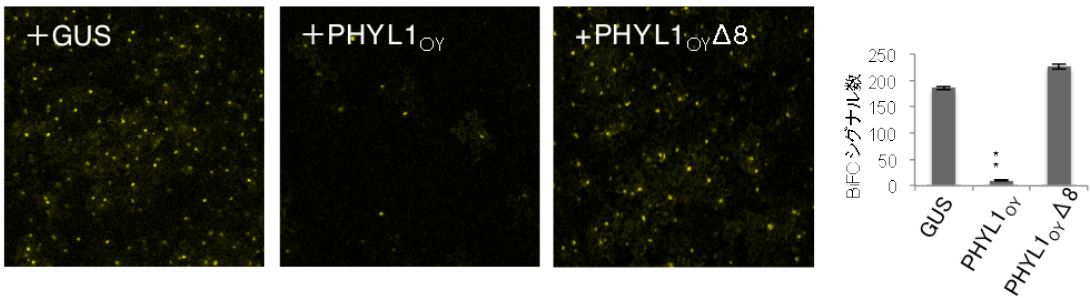


図 3-16 BiFC 法による MTF 二量体の観察と PHYL1_{OY}、PHYL1_{OY}Δ8 が与える影響の解析

NYF または CYF を付加した MTF を、*N. benthamiana* 葉において GUS、PHYL1_{OY}、PHYL1_{OY}Δ8 と共発現させた後、36 時間後に YFP 蛍光を観察した。写真中の bar は 200 μm を示す。また、2.4mm² の葉面積内において蛍光が見られた核の数を、画像解析ソフト ImageJ で BiFC シグナル数を定量化することで測定した。各試験区を *N. benthamiana* 葉 4 枚で発現させ、その全てでシグナル数を測定して平均値、標準偏差を算出した結果をグラフに示す。グラフの bar は標準偏差を示す。* * は各 GUS 区に比べて統計的に有意な差があったことを示している[p<0.01]。

3.3.7 PHYL1_{0Y} 存在下での MTF の局在・蓄積量解析

前項の結果より PHYL1_{0Y} は標的 MTF の複合体形成を阻害することが示されたが、その詳細なメカニズムは未解明であり、様々な可能性が考えられる。例えば、MTF 間相互作用に関わる部位に競争的に結合している、結合した MTF の細胞内局在を変化させて相互作用因子と接触出来なくさせる、結合した MTF の蓄積量を減少させている、などである。本項では、PHYL1_{0Y} による MTF の複合体形成阻害メカニズムについて更なる知見を得るため、PHYL1_{0Y} が標的 MTF の局在や蓄積量に与える影響を検証した。

YFP を融合させた MTF (AP1、CAL、SEP3) を、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* 葉で一過的に発現させ、GUS、PHYL1_{0Y}、PHYL1_{0Y}Δ8 のいずれかと共発現させた際の YFP 蛍光を観察した (図 3-17 左図)。GUS と共発現させた場合には、YFP-SEP3、YFP-AP1、およびコントロールである bZIP63-YFP 由来の蛍光は核に観察された。また YFP-CAL 由来の蛍光は細胞質に観察された。PHYL1_{0Y} と共発現させた場合、bZIP63-YFP の局在は変わらなかったが、YFP-SEP3、YFP-AP1、YFP-CAL 由来の蛍光は PHYL1_{0Y} 存在下で著しく減衰した。いずれの MADS ドメイン転写因子の局在も、PHYL1_{0Y}Δ8 の共発現時には変化しなかった。このことから、PHYL1_{0Y} 存在下で標的 MYF の蓄積量が低下していることが示唆された。

更なる検証のため、アグロインフィルトレーション後の葉から全タンパク質を抽出し、イムノブロッティングにより YFP 融合タンパク質の検出を行った。その結果、YFP-SEP3、YFP-AP1、YFP-CAL の蓄積量は、GUS 共発現時に比べて PHYL1_{0Y} 共発現時に著しく低下していた (図 3-17 右図)。一方で蛍光観察の結果と同様に、PHYL1_{0Y}Δ8 の共発現時には YFP-SEP3、YFP-AP1、YFP-CAL の蓄積量は GUS 共発現時と同程度であった。また、bZIP63-YFP の蓄積量は PHYL1_{0Y}、PHYL1_{0Y}Δ8 発現によって影響を受けなかった。

SEP3 と同じく E クラスに属する、SEP1、SEP2、SEP4 についても GUS と PHYL1_{oy} を用いて同様の実験を行った。その結果、SEP1、SEP2、SEP4 も、PHYL1_{oy} 存在下で蓄積量が低下した。以上の結果より、PHYL1_{oy} 存在下では、何らかの経路によって A クラス、E クラスの MTF の分解が誘導されることが示唆された。加えて、PHYL1_{oy} の N 末端の 8 アミノ酸は MTF との相互作用には必要ないものの、それらの分解を誘導するには重要であると考えられた。

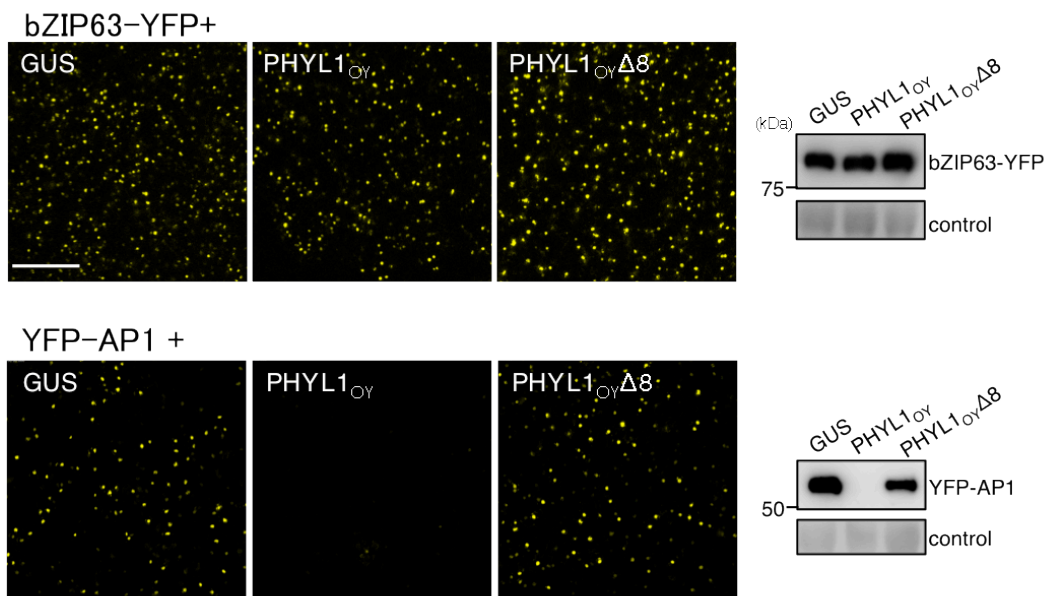


図 3-17 PHYL1_{oy}、PHYL1_{oy}Δ8 による MTF の蓄積量への影響

YFP を付加した MTF を、*N. benthamiana* 葉において GUS、PHYL1_{oy}、PHYL1_{oy}Δ8 と共発現させた後、36 時間後に YFP 蛍光を観察した(左図)。蛍光写真中の bar は 200 μm を示す。さらに各葉からタンパク質を抽出し、YFP 融合タンパク質を抗 GFP モノクローナル抗体を用いたイムノブロット法により検出した(右図)。抽出した全タンパク質の量(control)は、検出後のメンブレンを CBB 染色し Rubisco 大サブユニットを染色することで確認した。

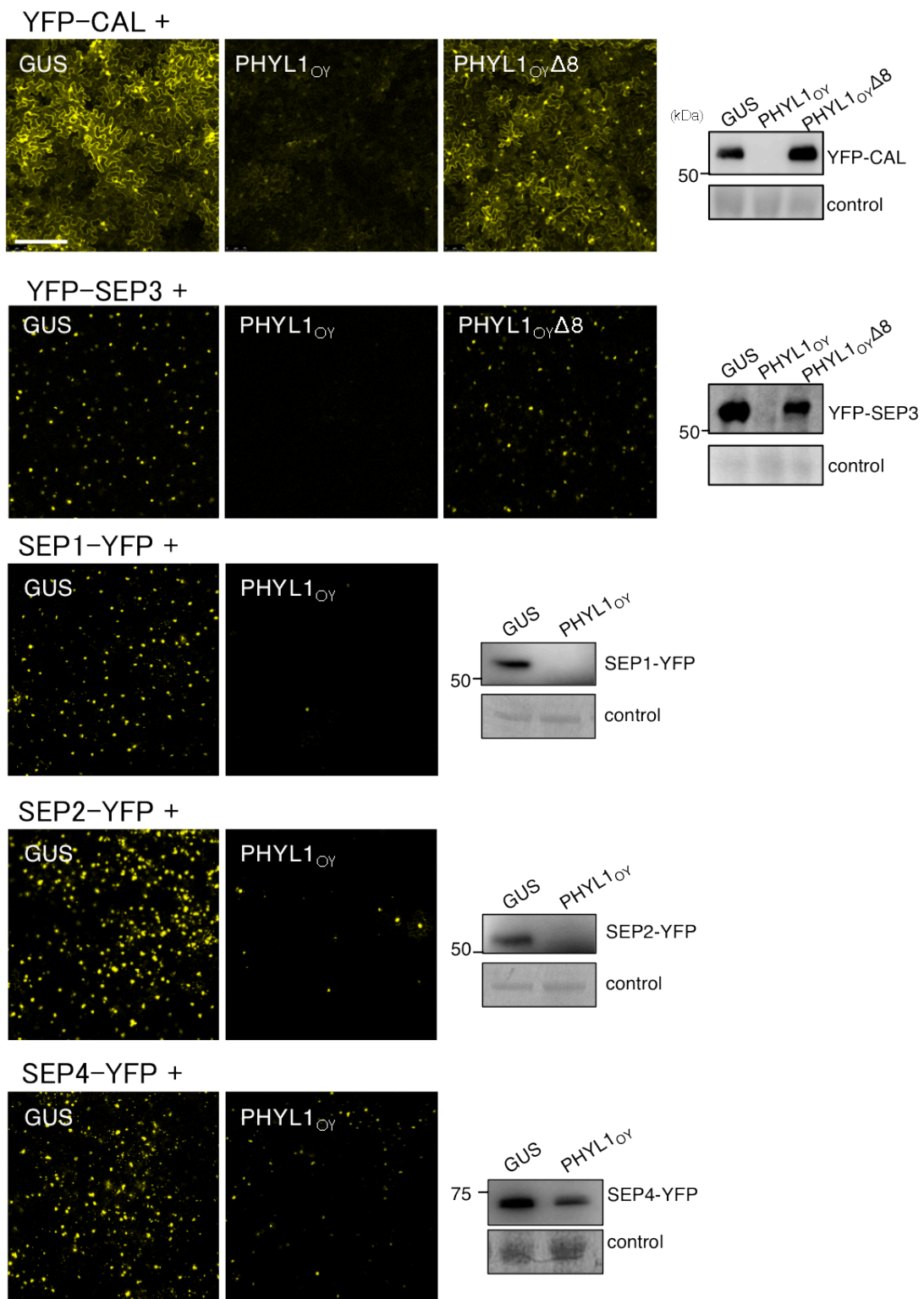


図 3-17 続き

3.3.8 PHYLL1_{0Y}による MTF の分解誘導機構の解析

前項の実験から、PHYLL1_{0Y} が MTF の分解を誘導することが示された。そこで、PHYLL1_{0Y} がタンパク質分解活性を持っているのか、あるいは植物が有する何らかのタンパク質分解経路を利用しているのかを調べる為に、植物が持つ主要なタンパク質分解経路であるプロテアソーム、およびオートファジーの PHYLL1_{0Y} の機能への関与を検証した。

前述した様に、YFP を融合した MTF を PHYLL1_{0Y} と植物細胞内で共発現させると、MTF の分解に伴い YFP 蛍光が消失する。そこで、YFP-SEP3 を PHYLL1_{0Y} と共発現させたのちに、プロテアソーム阻害剤である Clasto-lactacystin β -lactone (CLL)、もしくはオートファジー阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA) を処理し、YFP 蛍光を観察した。コントロールとして CLL の溶媒である DMSO を処理した場合、YFP-SEP3 の蛍光は観察されず、非処理時と同様に PHYLL1_{0Y} による YFP-SEP3 の分解誘導が生じていることが確認された。一方、同一条件で CLL を注入した場合、YFP-SEP3 の蛍光が観察されるようになった。従って、PHYLL1_{0Y} による YFP-SEP3 の分解誘導は、CLL によって阻害されると考えられた。3-MA を処理した場合には、DMSO 処理時と同様に YFP 蛍光は観察されず、PHYLL1_{0Y} の YFP-SEP3 分解誘導能は影響を受けないと考えられた。以上の結果から、PHYLL1_{0Y} による MTF の分解誘導には宿主植物のプロテアソームが寄与している可能性が示唆された。

YFP-SEP3 + PHYL1_{OY} +

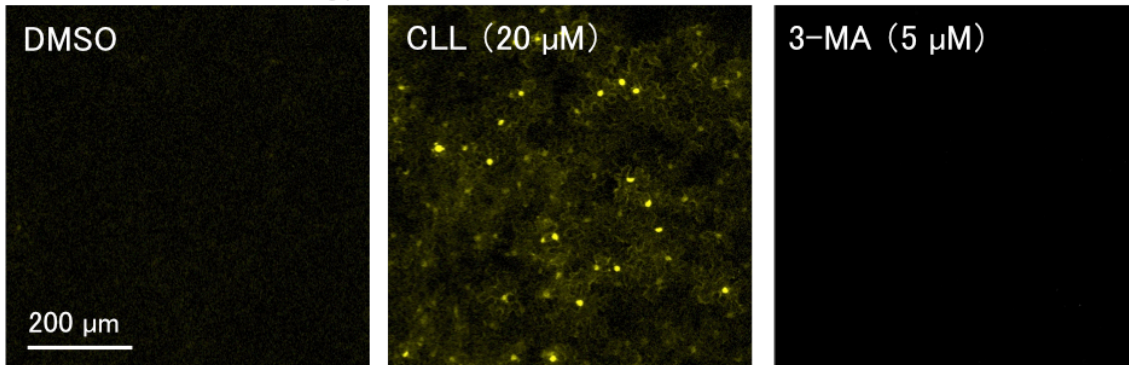


図 3-18 プロテアソーム、オートファジー阻害による、PHYL1_{OY} による MTF 分解誘導への影響
YFP-SEP3 を、*N. benthamiana* 葉において GUS、PHYL1_{OY}、PHYL1_{OY}Δ8 と共発現させた後、24 時間後にプロテアソーム阻害剤 (CLL)、またはオートファジー阻害剤 (3-MA) を注入し、36 時間後に YFP 蛍光を観察した。

3.3.9 PHYL1_{oY} 存在下での SEP3 のユビキチン化の検証

3.1.5 項で述べたように、プロテアソームで分解を受けるタンパク質の多くは、ユビキチンタンパク質が複数結合したポリユビキチン鎖によって修飾を受けている（ポリユビキチン化）。またポリユビキチン鎖は一般に、標的タンパク質のリジン残基を修飾することが知られている。前項において、PHYL1_{oY}による標的 MTF の分解誘導へのプロテアソームの関与が示唆されたが、標的 MTF がその際ポリユビキチン修飾を受けるかは不明である。しかし、標的である MTF は全てリジン残基を有していたため、これらの MTF が PHYL1_{oY} 存在下でポリユビキチン化しているのかを検証した。

検証のため、PHYL1_{oY} と YFP-SEP3 または bZIP63-YFP を、アグロインフィルトレーション法によって *N. benthamiana* 葉で共発現させた。PHYL1_{oY} による分解誘導の際に標的のポリユビキチン化が起きるのであれば、YFP-SEP3 はポリユビキチン化し、bZIP63-YFP はポリユビキチン化しないと推定される。本仮説を検証するため、接種葉から各 YFP 融合タンパク質を抗 GFP 抗体による免疫沈降法により回収し、ポリユビキチン化の有無を確かめた。まず、接種葉由来の抽出液 (input)、および抗 GFP 抗体による免疫沈降後の回収産物 (output) に含まれる YFP 融合タンパク質を抗 GFP 抗体によるイムノブロット法で検出したところ、予想分子量と同程度の大きさのタンパク質が検出された (図 3-19)。従って、植物細胞内における YFP 融合タンパク質の発現・回収は、十分に行われていると考えられた。そこで、output 中に含まれるユビキチン化タンパク質を抗ユビキチン抗体で検出したところ、YFP-SEP3 よりも高分子量の位置に、タンパク質のポリユビキチン修飾時に典型的にみられるスメア状のバンドが検出された。このことから、SEP3 が PHYL1_{oY} 存在時にポリユビキチン化されていることが示唆された。

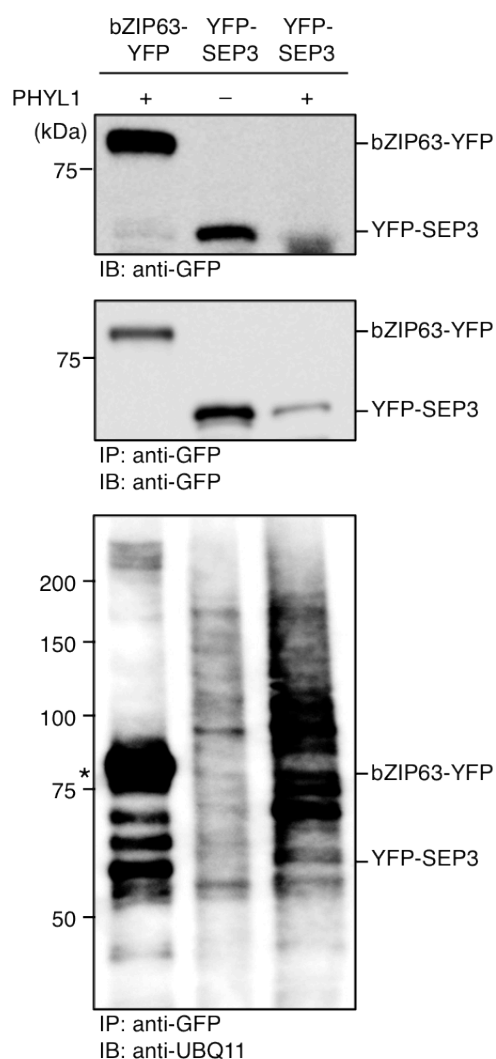


図 3-19 PHYL1_{0Y} 存在下での SEP3 のユビキチン化の検証

(上図) bZIP63-YFP、YFP-SEP3 を PHYL1 と共発現させた *N. benthamiana* 葉から、36 時間後にタンパク質を抽出し、抗 GFP 抗体による検出を行った結果。目的のタンパク質が発現しているのが示されている。なお、PHYL1_{0Y} 存在下で SEP3 の蓄積量が低いのは、分解誘導されている為と考えられる。

(中図) 各葉から抽出したタンパク質を抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降法により精製し、精製産物を抗 GFP 抗体により検出した結果。目的のタンパク質が精製されているのが示されている。

(下図) 免疫沈降後の精製産物を、抗ユビキチン抗体で検出した結果。YFP-SEP3 発現区では、PHYL1_{0Y} 存在時特異的に、複数のバンドが YFP-SEP3 よりも高分子量の位置にラダー状に確認される。bZIP63-YFP を PHYL1_{0Y} と共発現させた場合には、このような高分子量のバンドは確認されない。

3.3.10 PHYL1_{PnWB} の PHYL1_{OY} との比較

PHYL1_{PnWB}は peanut witches' broom phytoplasma (PnWB) から単離された PHYL1_{OY} のホモログであり、シロイヌナズナと同様に葉化誘導能を有している (Yang *et al.*, 2015)。そこで、両者が同様の機構を有しているかを検証するため、PHYL1_{PnWB} の MTF との結合能、および分解誘導能を検証した。

Y2H の結果、BD ドメイン融合 PHYL1_{PnWB} (BD-PHYL1_{PnWB}) を AD-AP1、AD-SEP3 と共発現させた酵母では、GAL4 の機能が回復し選択培地上での酵母の生育が認められた (図 3-20A)。一方で、BD-PHYL1_{PnWB} を AD ドメインと共発現させた酵母は、選択培地上では生育しなかった。以上より、PHYL1_{PnWB} も PHYL1_{OY} 同様に SEP3、AP1、CAL と相互作用することが示された。そこで、PHYL1_{PnWB} の SEP3 分解誘導活性を *in planta* で検証した。SEP3-YFP を PHYL1_{PnWB} と共発現させて蓄積量をイムノブロット法によって検証したところ、GUS 共発現時に比べて著しく減少していた (図 3-20B)。従って、PHYL1_{OY} 同様に PHYL1_{PnWB} も SEP3 分解誘導活性を有すると考えられた。以上の結果より、PHYL1_{PnWB} は PHYL1_{OY} と類似した機能を有しており、MTF の分解誘導によって花器官の形態異常を引き起こしていると考えられた。

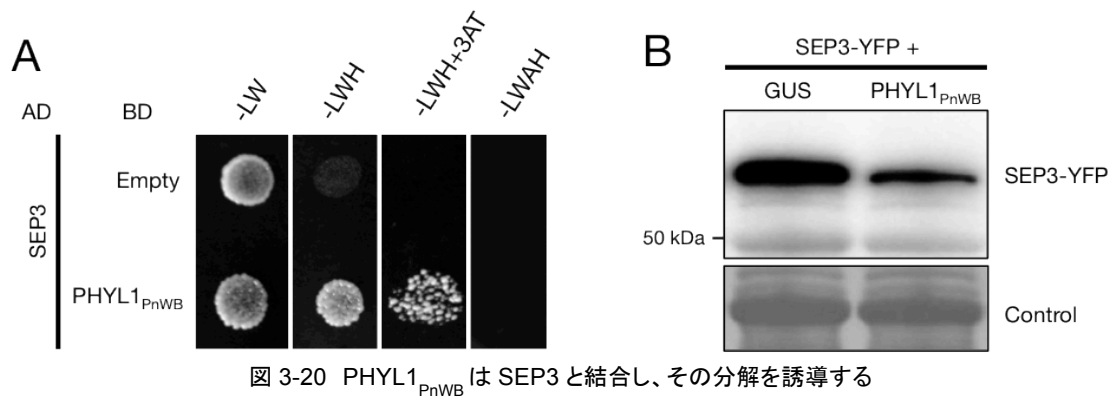


図 3-20 PHYL1_{PnWB} は SEP3 と結合し、その分解を誘導する

A. PHYL1_{PnWB} と SEP3 との Y2H

pGADT7 ベクターにクローニングし AD を付加した MTF と、pGBKT7 ベクターにクローニングし BD を付加した PHYL1_{PnWB} を酵母細胞内で共発現させて、相互作用の有無を検証した。形質転換した酵母は 4 種類の培地で生育させた。-LW 培地は、酵母に必要な最小限の栄養素から更にロイシン(L)、トリプトファン(W)を抜いたものである。従って、通常の酵母は生育出来ない一方で pGADT7、pGBKT7 にはそれぞれロイシン合成酵素、トリプトファン合成酵素がクローニングされており、両プラスミドを有する酵母は-LW 培地に生育可能である。-LWH 培地は -LW 培地からさらにヒスチジン(H)を抜いたものであり、-LWH+3AT 培地は-LWH 培地にヒスチジン合成酵素の阻害剤である 3-amino-1,2,4-Triazole(5 mM)を加えたものである。-LWAH 培地は-LW 培地からヒスチジン、アデニン(A)を抜いたものである。これらの培地では、酵母は AD タンパク質と BD タンパク質が相互作用し GAL4 転写因子が機能した場合のみ、ヒスチジンやアデニンの生合成関連経路が活性化し、酵母が生育可能になる。選択性は-LWAH>-LWH+3AT>-LWH の順に高い。

各コンストラクトを形質転換した酵母は、一度-LW 培地で生育させたのち、OD=0.1 になるように滅菌水中に懸濁し、10 µl の菌液を培地に滴下した。培地は 30°C で 4 日間培養し、酵母の生育を確かめた。

B. PHYL1_{PnWB} による SEP3 の分解誘導活性試験

SEP3-YFP を、*N. benthamiana* 葉において GUS、PHYL1_{PnWB} と共発現させた後、36 時間後に、各葉からタンパク質を抽出した。全タンパク質から SEP3-YFP を、抗 GFP モノクローナル抗体を用いたイムノブロット法により検出した。抽出した全タンパク質の量は、検出後のメンブレンを CBB 染色し、Rubisco 大サブユニットを検出することで確認した。

3.4 考察

3.4.1 PHYL1_{OY}はファイトプラズマの植物感染時に機能する。

3.3.1 項に記載した様に、ファイトプラズマは植物感染時と昆虫感染時に自身の遺伝子発現量を変動させ、異なる環境に適応している。従って、特定のファイトプラズマ遺伝子の植物-昆虫間での発現量を比較することで、その遺伝子の機能について示唆を得ることが可能である。例えば、OY-W が有するてんぐ巢症状誘導因子 TENGU は植物感染時に発現量が増加することが示されており、ファイトプラズマは宿主植物内で積極的に TENGU を分泌し症状を誘導させていると考えられている (Hoshi *et al.*, 2009)。一方で、ファイトプラズマの主要膜抗原タンパク質である Amp は、昆虫のマイクロフィラメントと結合し媒介特異性を決定しているとされるが (Suzuki *et al.*, 2006)、植物感染時にも昆虫感染時と同程度に発現しており、植物内でも何らかの機能を有すると推察されている (Oshima *et al.*, 2011)。以上の知見に基づき、本研究では始めに PHYL1_{OY} の発現量を昆虫感染時と植物感染時で比較し、PHYL1_{OY} が主に機能するのはいずれの宿主内なのかを解析した。その結果、PHYL1_{OY} は、植物感染時に昆虫感染時に比べて約 3 倍高発現していた (図 3-11)。従って、PHYL1_{OY} は植物宿主内で積極的に発現しており、植物宿主内での機能が主である可能性が強く示唆された。

3.4.2 PHYL1_{oy}は MTF の分解誘導を介して、花器官に異常を誘導する

PHYL1_{oy}形質転換植物における遺伝子発現解析の結果、*AP1* (A クラス) や *SEP3* (E クラス) の遺伝子発現量は変動していなかった (図 3-13) もの、両 MTFs によって正に制御されるクラス B 遺伝子 (*AP3*, *PI*) の発現量は減少しており、負に制御される flowering time gene (*SOC1*, *SVP*) の発現量は上昇していた (図 3-15)。従って、PHYL1_{oy}が *AP1* や *SEP3* の機能をタンパク質レベルで阻害していることが強く示唆された。実際に、PHYL1_{oy}は *AP1* や *SEP3*, *CAL* と酵母内で結合することが確かめられ (図 3-14)、*in planta* でこれらの MTF (*SEP1*, *SEP2*, *SEP4* を含む) の分解を誘導した (図 3-17)。また、BiFC の結果から、PHYL1_{oy}は 標的 MTF の分解によって、それらの MTF を含む複合体の形成を阻害すると考えられた (図 3-16)。以上の結果から、PHYL1_{oy}が A クラスや E クラスの MTF に結合することで、その分解を誘導し、機能を抑制していることが強く示唆された。

3.1.4 項に述べた様に A クラスや E クラスの MTF、または *CAL* の欠失は、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導する。加えて、PHYL1_{oy}の標的 MTF を同時に発現抑制した場合にも、PHYL1_{oy} 形質転換体に類似した表現型が観察されることが知られている。すなわち、Schwab らは RNA サイレncing を介して *AP1*, *CAL*, *SEP1-4*, *FUL* (*FRUITFULL*; *AP1*, *CAL* に近縁な MTFs) の遺伝子発現を同時に抑制した (Schwab *et al.*, 2006)。その結果、PHYL1_{oy}形質転換植物のように萼や花弁の葉化、雌蕊の突き抜けや二次花の形成が認められている。以上の様に、PHYL1_{oy}の標的 MTF の変異体が PHYL1_{oy}形質転換シロイヌナズナに類似した形態を示すことは、PHYL1_{oy}により誘導される MTF の分解と葉化症状の関連性を強く示唆している。

3.4.3 PHYLL1_{oy}による各花器官への影響

前述の通り、花器官の分化に関わる ABCE クラスの MTF の内、A クラス、E クラスの MTF は PHYLL1_{oy} の標的となり、分解を誘導される。また、その結果、その下流因子である B クラス MTF (*AP3*、*PI*) の発現量が低下した (図 3-15)。一方、PHYLL1_{oy} 形質転換植物においては、C クラス MTF である *AG* の遺伝子発現量は変動しなかった (図 3-15)。B クラス、C クラスの MTF に PHYLL1_{oy} が結合するかは本実験では未検証であるが、以上の結果から、PHYLL1_{oy} は少なくとも A クラス、E クラスの MTF を直接的に、B クラスの MTF を間接的に機能阻害していると考えられる。

上記の考察から推測されるファイトプラズマ感染時の葉化症状の分子メカニズムのモデルを、図 3-21 に示す。花のカルテットモデルによると、花器官の運命は、SEP と *AP1*、SEP と *AG*、*AP* と *PI* からなるヘテロ二量体がさらに器官特異的な組み合わせで四量体を形成することで決定される (図 3-6)。PHYLL1_{oy} により A クラス、E クラスの MTF が分解誘導されることで、SEP-*AP1*、および SEP-*AG* ヘテロ二量体の形成頻度は著しく減少する。同様に、B クラス MTF の遺伝子発現量が低下することで、*AP3* と *PI* のヘテロ二量体の形成頻度も減少すると考えられる。これらの結果、萼においては四量体の構成因子全てが分解されるため、最も大きい影響が生じる。花卉においては、構成因子の 2 つが分解され残りの 2 つの発現が抑制されることで、萼よりは穏やかな影響を受ける。雄蕊では、構成因子の内 1 つが分解され 2 つが発現抑制を受けるが、残りの 1 つは影響を受けない。従って、最も PHYLL1_{oy} による影響を受けにくい。雌蕊では、花卉同様に構成因子の 2 つが分解、2 つが発現抑制を受けることで、やや穏やかな影響が生じる。以上のモデルは実際に PHYLL1_{oy} 形質転換植物に見られた表現型に合致している。すなわち萼はもっとも激しい形態異常が生じ、トライコームを伴う葉に類似した構造物に変化していたが、雄蕊には不稔症状や緑変は観察されたものの、形態の異常は生じなかった。

PHYLL1_{oy}の植物内での機能はまだ完全には明らかになっていないが、本モデルは現状の知見を踏まえたうえで、PHYLL1形質転換体の特徴的な表現型を十分に説明出来ていると考える。

なお、花器官の葉化に加えて、PHYLL1_{oy}形質転換植物においては、雌蕊先端部に新たな花芽の形成が認められたほか、葉化した萼の葉腋からの二次花の形成が認められた(図 3-12)。このような表現型が生じた理由として、PHYLL1_{oy}形質転換植物における *flowering time gene* の発現量上昇が考えられる(図 3-15)。これらの遺伝子は二次花の形成を誘導し(Liu *et al.*, 2007)、AP1、SEP3によって負に制御される (Gregis *et al.*, 2008; Immink *et al.*, 2012)。従って、PHYLL1_{oy}形質転換植物において SEP3、AP1 の機能が抑制された結果、これらの遺伝子の発現量が上昇し、上述のような表現型が生じたと考えられる。

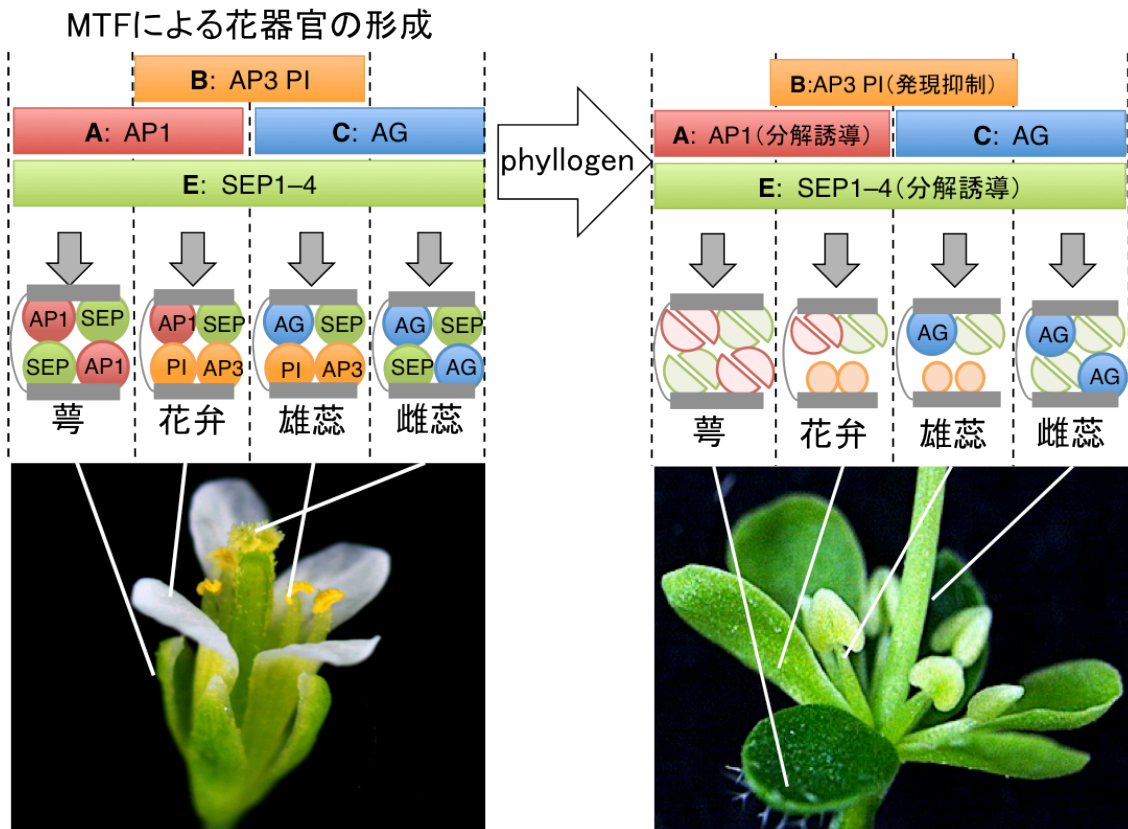


図 3-21 phyllagen による葉化誘導機構のモデル図

左図は、シロイヌナズナの花器官形成機構を示している。ABCDE クラスに属する MTF が組織特異的な二量体 (AP1-SEP3、PI-AP3、AG-SEP) を形成したあと、更に四量体を形成して機能すると考えられている (カルテットモデル)。phyllagen はこれらの MTF の内 A クラス、E クラスの MTF タンパク質の分解を誘導し、B クラスの MTF 遺伝子の発現を抑制する (右図)。その結果、各器官に与える影響に差異が生じ、本研究で観察されたような表現型が生じることが示唆される。

3.4.4 PHYL1_{0Y}の機能とユビキチン・プロテアソーム系の関連性

PHYL1_{0Y}の SEP3 分解誘導活性は、プロテアソーム阻害剤である CLL を作用させた場合に低下した (図 3-18)。従って、PHYL1_{0Y}による標的 MTF の分解誘導は、プロテアソームを介して行われている可能性が高い。一般に、プロテアソームはポリユビキチン化されたタンパク質を認識して分解するが、本実験でも PHYL1_{0Y}存在下で YFP-SEP3 がユビキチン化されている可能性が示唆されている (図 3-19)。ただし、本実験では免疫沈降時で SEP3 を精製しているため、SEP3 を含む何らかの複合体が精製されてしまい、その中に含まれる SEP3 以外の因子がユビキチン化されている可能性は捨てきれない。今後、SEP3 のユビキチン化部位の特定や非ユビキチン化 SEP3 の作出を行い、PHYL1_{0Y}による SEP3 の分解誘導におけるユビキチン化の関与を、更に検証する必要があるだろう。

3.4.5 PHYL1_{0Y}の機能領域

PHYL1_{0Y}Δ3~PHYL1_{0Y}Δ8 の形質転換の結果、PHYL1_{0Y}Δ8 のみが葉化誘導能を示さなかった (図 3-12)。その理由として、PHYL1_{0Y}Δ8 は PHYL1_{0Y}の標的 MTF の分解を誘導出来ず (図 3-17)、多量体形成を阻害出来ないことが示されている (図 3-16)。従って、PHYL1_{0Y}の N 末端側には PHYL1_{0Y}が機能する上で重要な働きを担う領域が存在していると考えられる。興味深いことに、その一方で、PHYL1_{0Y}Δ8 は PHYL1_{0Y}と同様に標的 MTF への結合能を有することが Y2H によって示唆されている (図 3-14)。このことから、PHYL1_{0Y}による MTF の分解誘導には標的 MTF との結合だけでは不十分な可能性が示唆された。

3.4.7 *phyllogen* の共通性

本実験では、PHYL1_{0Y}とは異なるファイトプラズマから単離された *phyllogen* である PHYL1_{PnWB} についても機能解析を行った。PHYL1_{PnWB} と PHYL1_{0Y} 間での同一性は約 49% と高くはないが (図 3-5)、PHYL1_{PnWB} は PHYL1_{0Y} と同様に、MTF への結合能、分解誘導能を示し (図 3-20)、類似した機能を有すると考えられた。これまでに *phyllogen* は複数のファイトプラズマから見出されており (図 3-5A)、うち PHYL1_{0Y} と同じく *Ca. P. asteris* から検出された SAP54 は、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導する (図 3-4)。これらのホモログはいずれも PHYL1_{0Y} との同一性が 85% 以上であり (図 3-5B、分泌領域のみの場合)、PHYL1_{0Y} と類似した機能を有している可能性は高い。以上を踏まえると、*phyllogen* 間で機能は保存されており、いずれも MTF の分解を誘導し機能を阻害することで、花器官の形態異常を誘導すると示唆される。また、既報の *phyllogen* ホモログの配列中には 2 箇所の高度に保存された領域が見出される (図 3-5A)。従って、本領域は *phyllogen* の機能に重要である可能性が高く、今後機能解析を行う上で重要な標的となるであろう。一方で、PHYL1_{0Y} において機能に重要であると考えられた N 末端部は PHYL1_{PnWB} では保存されていない。従って、当該領域が *phyllogen* において普遍的な機能を有しているかは判断出来ず、今後解析を行う必要がある。

図に示した通り、ゲノム情報の集積に伴い、*phyllogen* は複数種のファイトプラズマに見出されている。しかし、アジサイに葉化病を引き起こす *Ca. P. japonicam* (兼平ら 1996) など、植物に葉化を引き起こすにも関わらず *phyllogen* が見出されていないファイトプラズマも多く存在する。これらのファイトプラズマが *phyllogen* を有しているのかは興味深い課題であり、今後の研究の進展に期待したい。

第4章 様々な花き類に対する **phyllogen** の機能の検証

4.1 序文

これまでに、3種の **phyllogen** (PHYL1_{OY}、PHYL1_{PnWB}、SAP54) が、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導することが報告されている (MacLean *et al.*, 2011; 前島ら 2013; Yang *et al.*, 2015)。また前章では、その原因が **phyllogen** によるシロイヌナズナの A クラス、E クラスの MTF の分解誘導であることを示した。一方で、これらの研究は形質転換系の確立したモデル植物であるシロイヌナズナを主とした解析を行っており、他の植物に対しての **phyllogen** の機能は十分に解析されてない。ファイトプラズマは双子葉植物・単子葉植物を含めた被子植物全般に感染し、異常な花器官の形成を誘導することが報告されている (Chaturvedi *et al.*, 2010)。そのため、実際にファイトプラズマによる被害が報告されている花き類において、**phyllogen** が花器官の発達に影響を与えているのか、またその機作は MTF の分解誘導なのかを検証することは、ファイトプラズマの病原性を理解する上で重要である。しかし、これらの花き類はシロイヌナズナに比べて形質転換が困難であり、**phyllogen** を発現させてその影響を解析することが容易でないことも事実である。

そこで本章では、**phyllogen** の様々な花き類に対しての機能を解析するため、ウイルスベクターの利用を試みた。広範な植物に感染するリンゴ小球形潜在ウイルス (apple latent spherical virus ; ALSV) をベクターとして、**phyllogen** をナス科植物 (ペチュニア)、キク科植物 (ヒマワリ、アスター) で発現させ、花器官形態の異常が誘導されるかを実験した。加えて、**phyllogen** がシロイヌナズナと同様の機構で様々な花き類に対し花器官の形態異常を誘導する可能性を検証するため、上記 2 科の植物に加えユリ科の単子葉植物であるテッポウユリの MTF の分解を PHYL1_{OY} が誘導するかを検証した。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

本章で用いた植物は *Nicotiana benthamiana*、ペチュニア (*Petunia x hybrida*、品種：バカラホワイト)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*、品種：ビッグスマイル)、アスター (*Callistephus chinensis*、品種：ネネホワイトインプ) である。いずれも種子から育成し、25°C、自然光下で生育させた。本章から用いた遺伝子を表 4-1 に記す。様々な花き類の A クラス、E クラス遺伝子を用いて実験を行った。*LMADS3* は、配列の N 末端が未報告のため、部分配列を用いた。

表 4-1 第 4 章から用いた植物遺伝子

遺伝子名	植物	科	綱	クラス	用いた実験	Accession No.
<i>PFG</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	A ^a	Y2H、分解誘導活性試験、定量 RT-PCR	AF176782
<i>FBP29</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	A ^a	定量 RT-PCR	AF335245
<i>AP2A^b</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	A ^a	定量 RT-PCR	AF132001
<i>GLO1</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	B	定量 RT-PCR	AY532265
<i>DEF</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	B	定量 RT-PCR	DQ539416
<i>FBP6</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	C	定量 RT-PCR	X68675
<i>pMADS3</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	C	定量 RT-PCR	X72912
<i>FBP2</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	E	Y2H、分解誘導活性試験、定量 RT-PCR	M91666
<i>FBP5</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	E	定量 RT-PCR	AF335235
<i>FBP13</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	Flowering time gene ^c	定量 RT-PCR	AF335237
<i>FBP25</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	Flowering time gene ^c	定量 RT-PCR	AF335243
<i>UNS</i>	ペチュニア	ナス科	双子葉植物綱	Flowering time gene	定量 RT-PCR	AF335238
<i>CDM111</i>	キク	キク科	双子葉植物綱	A	Y2H、分解誘導活性試験	AY173054
<i>CDM44</i>	キク	キク科	双子葉植物綱	E	Y2H、分解誘導活性試験	AY173057
<i>LMADS^d</i>	テッポウユリ	ユリ科	単子葉植物綱	A	Y2H、分解誘導活性試験	HQ149332
<i>LMADS^e</i>	テッポウユリ	ユリ科	単子葉植物綱	E	Y2H、分解誘導活性試験	AY826062

^a A クラス遺伝子のホモログと推定されているが、詳細な機能は不明。

^b 非 MTF タンパク質をコードする遺伝子

^c *A. thaliana* の flowering time gene である *AGL24* のホモログと推定されているが、詳細な機能は不明。

^d コドン頻度を改変して実験に用いた(後述)。

^e 部分配列を実験に用いた。

4.2.2 遺伝子のクローニング

遺伝子配列の合成

各 MTF の遺伝子配列は、ライフテクノロジーズジャパン株式会社に依頼して合成した。いずれの遺伝子も終止コドンを除き、pENTA ベクターにクローニングするため 5'端に (5'-AAGGAACCAATTCAGTCATG-3') を、3'端に (5'-AAGCTGGGTCTAGAT-3') を付加した。LMADS6 は報告された塩基配列の合成が困難であったため、コドンを同社のプログラムによって改変して合成した。改変後の塩基配列は図 4-1 のとおりである。

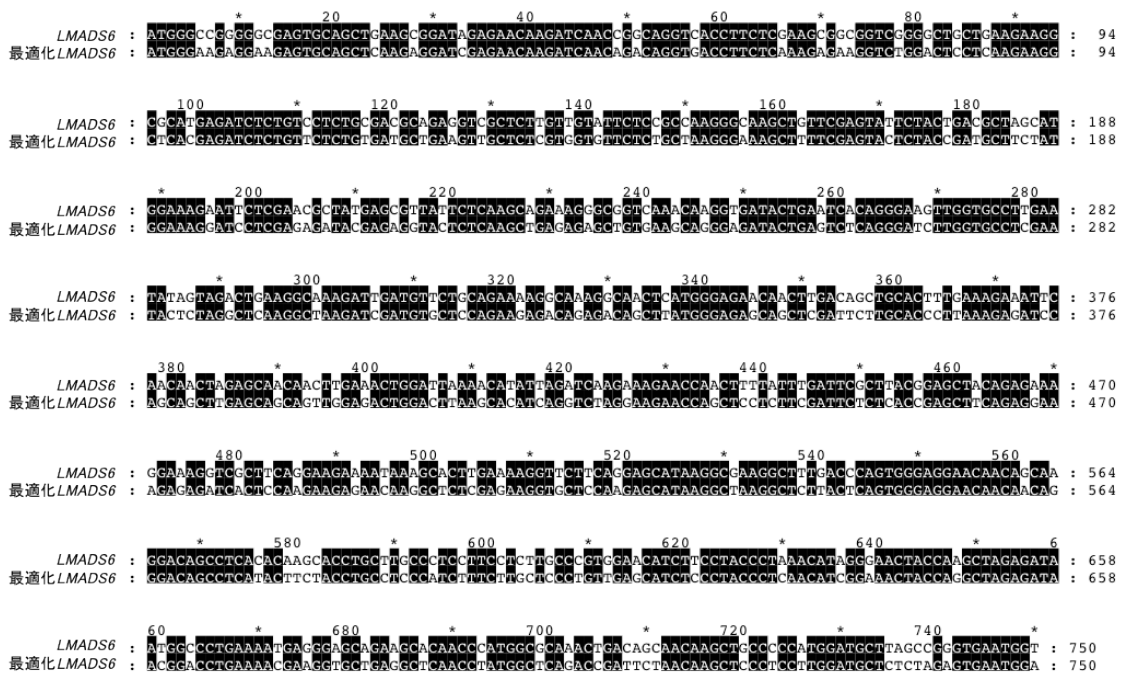


図 4-1 実験に用いた LMADS6 の改変配列

塩基配列合成が困難であったため、コドン頻度を改変して実験に用いた。

白背景で示した部分が改変部位である。

遺伝子のクローニング

植物細胞内での発現のため、各遺伝子をバイナリベクターにクローニングした。まず、制限酵素 *SaI*-HF (NEB)、*EcoRV*-HF (NEB) で切断した pENTA ベクターに合成配列をクローニングした。クローニングには GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を使い、3.2.3 項に準じて行った。作出したプラスミドの精製、確認も同項に準じて行った。次いで、各 MTF 遺伝子配列を LR 反応により pEarleyGate101 ベクター (Earley *et al.*, 2006) にクローニングし、C 末端に YFP を付加した。いずれのコンストラクトも、3.2.3 項の記述に準じてアグロバクテリウム EHA105 株に形質転換した。Y2H のため、各 MTF 遺伝子を PCR で増幅したのち pGADT7 ベクターにクローニングし、N 末端に GAL4 AD ドメインを付加した。なお、PCR の際に、いずれの遺伝子配列にも終止コドン付加した。それ以外の操作は 3.2.5 項に準じた。使用したプライマーは表 4-2 の通りである。

表 4-2 各遺伝子の pGADT7 ベクターへのクローニングに用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子
FBP2_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGGGAAGAGGTAGAGTTGAG	<i>FBP2</i>
FBP2_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATCAAGGCAACCAGCCAGCC	<i>FBP2</i>
FPG_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGATGGGAAGAGGAAGAGTGCAG	<i>FBP29</i>
FPG_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATTAGCCATTAAGATGGCGAAG	<i>FBP29</i>
CDM44_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGGGAAGAGGTCGAGTTGAGC	<i>CDM44</i>
CDM44_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATCACTGATACCATCCTGG	<i>CDM44</i>
CDM111_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGGGAAGAGGTAAGGTACAG	<i>CDM111</i>
CDM111_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATTAAGATGGAAAGCACCTC	<i>CDM111</i>
LMADS3_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGGAGCTGTCCGTGCTCTGTG	<i>LMADS3</i>
LMADS3_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATTACATCCATGCTGGAGC	<i>LMADS3</i>
LMADS6_to_pGADT7_F	ACCAGATTACGCTCATATGGGAAGAGGAAGAGTGCAG	<i>LMADS6</i>
LMADS6_pGADT7_R	TGCCCACCCGGGTGGAATCATCCATTCCTCTAGAG	<i>LMADS6</i>

4.2.3 PHYL1_{OY}、PHYL1_{PnWB} のウイルスベクターへのクローニング

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むことで、その遺伝子を発現するように改変したウイルスのことである (Pogue *et al.*, 2002)。ウイルスの宿主での感染、増殖に応じて外来遺伝子も発現するため、発現効率が高いという利点がある。一方で、ベクターとして用いるウイルスは目的の植物に対して感染能を有する必要があり、感染による植物への影響が小さいほど望ましい。すなわち、宿主範囲が広く病原性が低いウイルスが、ウイルスベクターとして有用とされる。

本実験では、ALSV をウイルスベクターとして、PHYL1_{OY}、PHYL1_{PnWB} のペチュニア、ヒマワリ、アスターでの発現を試みた。ALSV は 2 分節のプラス一本鎖 RNA をゲノムとする、セコウイルス科チェラウイルス属の植物ウイルスである (図 4-2; Li *et al.*, 2000)。各分節 (RNA1、RNA2) にはポリプロテインがコードされ、RNA2 にコードされるポリプロテインは、4 つのタンパク質に切断されて機能する。ALSV は、顕著な症状を誘導することなくバラ科、ナス科、アブラナ科などの植物に感染し、外来遺伝子を発現可能であるため、広範囲な植物に適応可能なウイルスベクターとして利用されている (Li *et al.*, 2004; Yamagishi *et al.*, 2011)。

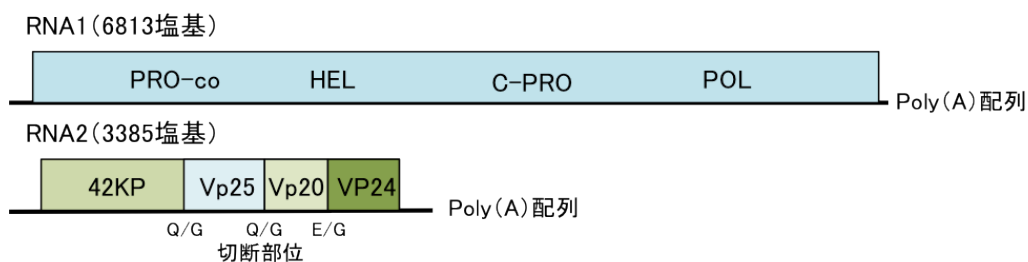


図 4-2 ALSV ゲノムの模式図 (Li *et al.*, 2000; Igarashi *et al.*, 2009 参照)

RNA1 には 1 つのポリプロテインがコードされ、4 モチーフ [Protease cofactor (PRO-co); NTP-binding helicase (HEL); cysteine protease (C-PRO); RNA polymerase (POL)] が見出される。RNA2 にも 1 つのポリプロテインがコードされており、4 タンパク質に切断されて機能すると推定される。42KP はウイルスの細胞間移行に関与すると考えられており、Vp25 から Vp24 はウイルス粒子を構成するタンパク質である。

ウイルスベクターの構築

上述の通り、ALSV は 2 分節ゲノムのウイルスであり、接種時には各分節 (RNA1、RNA2) を植物細胞内で発現させる必要がある。各分節の発現用コンストラクトは、岩手大学農学部 of 吉川信幸教授に分譲頂いた pEALSR1、pEALSR2L5R5 (図 4-3; Li *et al.*, 2004) をもとに作出した。両プラスミドには、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 42KP コード領域と VP25 コード領域の間にマルチクローニングサイト (MCS) が挿入されている。RNA2 からポリプロテインが翻訳された際、MCS 領域の両端にウイルスのプロテアーゼに認識される配列が付加されているため、外来遺伝子は完全に切り離されて植物細胞内で発現すると考えられる。

アグロインフィルトレーション用のコンストラクトを作出するため、分譲いただいたコンストラクト中の 35S プロモーターおよび ALSV 配列を、3.2.5 項同様に KOD plus neo (TOYOBO) を用いて PCR で増幅した。PCR で用いたプライマーは、ALSV-CAMBIAF、および ALSV-CAMBIAR である (配列は表 4-3 に記載)。バイナリベクターである pCAMBIA1301 (Center for the Application of Molecular Biology of International Agriculture) を、制限酵素 *EcoRI*-HF (NEB)、*PmaCI* (TaKaRa) を用いて切断し、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用いて増幅産物をライゲーションした。操作は 3.2.3 項に準じて行った。RNA1、RNA2 をクローニングしたベクターを、それぞれ pCAM-ALSV1 と pCAM-ALSR2L5R5 とする。

次いで、pCAM-ALSR2L5R5 の MCS およびその周辺配列の改変を行った。pCAM-ALSR2L5R5 の MCS には *XhoI*、*SmaI*、*BamHI* 認識配列が存在するが、その内 *XhoI*、*SmaI* 認識配列がベクター内の別の箇所が存在していた為、本配列を *SaII*、*BlnI*、*Aor51HI*、*BamHI* 認識配列に置換した。具体的には pCAM-ALSR2L5R5 を鋳型に PCR を行い、ALSV 配

列断片を増幅した。PCR で用いたプライマーは 1301ALSV-newRest-F、および 1301ALSV-newRest-R であり（配列は表 4-3 に記載）、1301ALSV-newRest-R には改変 MCS 配列が付加されている。増幅断片は、上述の方法で pCAM-ALSR2L5R5[*SacI* (NEB)、*BamHI*-HF で切断済み]にライゲーションした (pCAM-ALSV2)。さらに、MCS 両端のプロテアーゼ認識部位に相当する塩基配列が完全に同一であったため、相同組換えによって MCS 領域が抜け落ちる可能性を考慮し、C 末端側の当該配列のコドン頻度を改変した。pCAM-ALSV2 を鋳型として PCR を行い、ALSV 配列断片を増幅した。PCR で用いたプライマーは 1301ALSV-newRest-F、および ALSV-NewCodon-R（配列は表 4-3 に記載）であり、ALSV-NewCodon-R には改変配列が付加されている。増幅断片は、上述の方法で pCAM-ALSV2 [*SaII*-HF (NEB)、*BamHI*-HF で切断済み]にライゲーションした (ALSV-empty)。

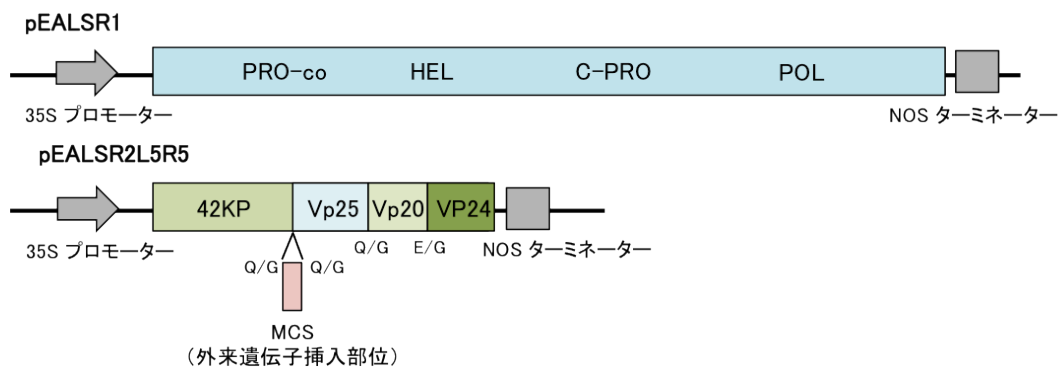


図 4-3 pEALSR1、pEALSR2L5R5 の模式図 (Li *et al.*, 2004)

RNA1、RNA2 に由来する配列が 35S プロモーターによって植物細胞内で発現する。pEALSR2L5R5 では、ウイルスの 42KP と Vp25 をコードする領域の間にマルチクローニングサイト(MCS)が挿入されており、外来遺伝子を本領域にクローニングする。MCS 領域の両端にはウイルス配列に由来する切断部位がクローニングされ、外来遺伝子はウイルスタンパク質から切断されて機能する。本実験では、図示した領域をバイナリベクターである pCambia1301 にクローニングし、MCS およびその周辺配列を改変したものを、ウイルスベクターとして実験に用いた。

PHYL1_{OY}、PHYL1_{PnWB}のウイルスベクターへの挿入

ALSV-empty に *PHYL1_{OY}*、*PHYL1_{PnWB}* 遺伝子を挿入した。pENTA-PHYL1_{OY}、pENTA-PHYL1_{PnWB}を鋳型にPCRを行い、各配列を増幅した。使用プライマーは表 4-3 に記す。増幅断片、pCAM-ALSV2opt は 3.2.3 項に準じて制限酵素 *SaI*-HF、*Bam*HI-HF で切断し、ライゲーションから挿入配列の確認までを行った。シーケンス解析による挿入配列の確認には、遺伝子増幅に用いたプライマーを使用した。以降、*PHYL1_{OY}*、*PHYL1_{PnWB}* 遺伝子をクローニングしたベクターを、それぞれ ALSV-PHYL1_{OY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} と呼称する。ALSV-empty を含めた各ベクターは、3.2.3 項と同様にアグロバクテリウム EHA105 株に形質転換した。

表 4-3 ウイルスベクターの構築に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	使用目的
alsv-cambiaF	CTATGACCATGATTACGAATGTAACGACGCGCCAGT	pCAM-ALSR2L5R5 の構築
alsv-cambiaR	GGTCACCTGTAATTCACACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT ^a	pCAM-ALSR2L5R5 の構築
1301ALSV-newRest-F	GGACTCTTCCGGGTGGAGACGCCC	pCAM-ALSV2 の構築
1301ALSV-newRest-R	TTTGGATCCAGCGCTCCTAGGGTCGACTGTGAAATCAGGGCCCTGACCTTCT	pCAM-ALSV2 の構築
ALSV-newCodon-R	TTTGTGACAGTAAAGTCTGGTCCCTTGTCCCTCCAACAAATTTGGGTCAGATCTATGCAAACCTAG	ALSV-empty の構築
Phyl1opt2_ALSVver2_F	CCGCTCGAGATGAACAAGGATATCGCTTC	PHYL1 _{OY} のクローニング
KallR_to_ALSV_R	TGACCTTCTAGCAGGGATCCGTTGTTCTCATCGTTGAGGG	PHYL1 _{OY} のクローニング
Bam-c0190optRmnsT	TGACCTTCTAGCAGGGATCCGTTCTTCTCATCGTTGAGATC	PHYL1 _{PnWB} のクローニング
Bam-c0680optRmnsT	TGACCTTCTAGCAGGGATCCGAGATGGTCCCTAGATTTGTTC	PHYL1 _{PnWB} のクローニング

^aA、C、G の縮重プライマー

4.2.4 ALSV ベクターの植物への接種

ALSV ゲノムの第一分節、および各第二分節を発現するためのアグロバクテリウムを 3.2.6 項と同様の手法で混合し、ペチュニア、ヒマワリ、アスターにアグロインフィルトレーション法によって接種した。なお、ウイルス感染効率を上昇させるため、tomato bushy stunt virus の RNA サイレンシングサプレッサーである P19 (Silhavy *et al.*, 2002) を、共発現させた。P19 発現用コンストラクトやそれを形質転換したアグロバクテリウムは、過去に当研究室で作出したものをを用いた (Senshu *et al.*, 2009)。各コンストラクトの混合比は以下のとおりである。

	RNA1	RNA2	
試験区 1	pCAM-ALSV1	ALSV-empty (挿入遺伝子なし)	P19
試験区 2		ALSV-PHYL1 _{oY}	
試験区 3		ALSV-PHYL1 _{PnWB}	
混合比	10	10	1

接種には、播種後 3 週間のペチュニア、2 週間のヒマワリ、4 週間のアスターを用いた。接種後の植物は 25°C、明期 16 時間、暗期 8 時間の条件で生育させて、形態を観察した。

4.2.5 ALSV 接種ヒマワリからのウイルス検出

ヒマワリの筒状花・舌状花における ALSV 感染の有無を確認するため、ウイルス接種後約 8 週間の植物の RNA を抽出し、RT-PCR を行った。3.2.2 項の方法に準じて RNA 抽出、cDNA 合成を行ったのち、ALSV の第二分節ゲノムを特異的に増幅するよう設計したプライマー 2600F (5'-AGTGCTTCCACTCGTTTTAC-3')、3000R (5'-GTAGCATGACCACTCATGAT-3') を用いた PCR を行い、ウイルスを検出した。なお、本プライマーセットはゲノム中の MCS を含む領域を増幅するように設計されており、増幅産物のサイズから外来遺伝子が保持されているか判別可能である。PCR は KOD Fx (TOYOBO) を用いて行い、反応の組成は以下の通りである。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。

組成	(×1)	反応時間	
		温度	時間
2x KOD FX buffer (TOYOBO)	5 µl	96°C	00:30
2 mM dNTPs	2 µl	96°C	00:15
Primer F (5 µM)	0.6 µl	55°C	00:30
Primer R (5 µM)	0.6 µl	68°C	01:00
KOD FX	0.1 µl	68°C	07:00
Templete DNA	0.3 µl	4°C	∞
+ DW	1.4 µl		
Total	10 µl		

4.2.6 ALSV 感染ペチュニアの遺伝子発現解析

ALSV-PHYL1_{0Y} 接種ペチュニアにおける MTF 遺伝子の発現量変動を解析するため、花芽(約 5 mm~1 cm) から RNA を抽出し、定量 RT-PCR に供した。PHYL1_{0Y} が発現している花芽のみから RNA を抽出するため、形態の変異した花が観察されて以降に形成された花芽から RNA を抽出した。9 個体から独立して RNA を抽出し、1 個体につき約 10 個の花芽を実験に用いた。また、対象として ALSV-empty 感染植物からも同時期に RNA を抽出した。

花芽からの RNA 抽出から定量 RT-PCR までは、3.2.2 項の記載に準じて行った。各遺伝子の定量 PCR に用いたプライマーは表 4-4 に記す。また遺伝子発現量の標準化は、既報の論文 (Rijkema *et al.*, 2006b; Himeno *et al.*, 2011) に従い、ハウスキーピング遺伝子である、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の発現量と比較することで行った。

表 4-4 ペチュニア遺伝子の定量 RT-PCR に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	標的遺伝子	参考文献
PhAP2A-F	CGGCTCATCAAATTATCAGATTCA	<i>AP2A</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
PhAP2A-R	AGGAGGTAAATTGGATTGCCATT	<i>AP2A</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
PhGLO1-F	AATGAGGTTCTGAGGATGATGAGG	<i>GLO1</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)
PhGLO1-R	CTTCGCCAATTTCTCCCATATTCC	<i>GLO1</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)
PhDEF-F	AGAAGAAGGTCAGGAATGTGGAAG	<i>DEF</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)
PhDEF-R	GTTGAAGGCGTAAGGCTAATATGC	<i>DEF</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)
PMADS3-rt2F	AAACACGACAAATCGGCAAG	<i>PMADS3</i>	本研究
PMADS3-rt2R	CTTCAGCATCACAGACACAGA	<i>PMADS3</i>	本研究
FBP6-F	ACCATGCCGATTCCACAAGTA	<i>FBP6</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP6-R	CCTCTCCAACAATTTGCCTGTTA	<i>FBP6</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP2-F	GTGGCAGCAAAATGCACAAG	<i>FBP2</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP2-R	TTGGCCCTGCTCCTCCTAC	<i>FBP2</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP5-F	TATGATCCAGCTACTTCAAGCCAA	<i>FBP5</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP5-R	TTATGGTACATTACAGCATCCAAC	<i>FBP5</i>	Himeno <i>et al.</i> , (2011)
FBP13-rtF	ATGGTCTTACAGTTGAGGATGATTG	<i>FBP13</i>	本研究
FBP13-rtR	GCTTCCCCATTTGAGTTTGCT	<i>FBP13</i>	本研究
PhUNS-rtF	TCAGGGCGCGAAAGATG	<i>UNS</i>	本研究
PhUNS-rtR	TTGATGCTTGTCTCTGTTGAAGG	<i>UNS</i>	本研究
FBP25-rtF	GACAACCTTAACAGCAGGGCAAG	<i>FBP25</i>	本研究
FBP25-rtR	TATCAGCATCACAAAGAGTGGAGAG	<i>FBP25</i>	本研究
PhGAPDH-F	ACCACTGTCCACTCACTTACTG	<i>GAPDH</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)
PhGAPDH-R	TGCTGCTAGGAATGATGTTGAATG	<i>GAPDH</i>	Rijkema <i>et al.</i> , (2006b)

4.2.7 Yeast two hybrid assay (Y2H)

Y2H は、3.2.5 項に準じて行った。実験に用いた AD ベクター、BD ベクターの組み合わせは以下のとおりである。

	AD	BD
試験区 1	PFG	BD (挿入遺伝子なし)
試験区 2		PHYL1oy
試験区 3	FBP2	BD
試験区 4		PHYL1oy
試験区 5	CDM111	BD
試験区 6		PHYL1oy
試験区 7	CDM44	BD
試験区 8		PHYL1oy
試験区 9	LMADS6	BD
試験区 10		PHYL1oy
試験区 11	LMADS3	BD
試験区 12		PHYL1oy

4.2.8 YFP 融合 MTF の分解誘導活性試験

N. benthamiana における YFP 融合タンパク質の発現は、アグロインフィルトレーション法により行った。各試験区におけるアグロバクテリウムの混合比は本項の最後に記載する。分解誘導活性の評価は 3.2.6 項に準じ、共焦点顕微鏡による観察を行い、一定面積内の核における YFP シグナルを定量することで行った。なお、ネガティブコントロールとして、前章同様に非 MTF である bZIP63 を用いて同様の試験を行った。

試験区 1	PFG-YFP	GUS
試験区 2		PHYL1oy
試験区 3	FBP2-YFP	GUS
試験区 4		PHYL1oy
試験区 5	CDM111-YFP	GUS
試験区 6		PHYL1oy
試験区 7	CDM44-YFP	GUS
試験区 8		PHYL1oy
試験区 9	LMADS6-YFP	GUS
試験区 10		PHYL1oy
試験区 11	LMADS3-YFP	GUS
試験区 12		PHYL1oy
試験区 13	bZIP63-YFP	GUS
試験区 14		PHYL1oy
混合比	1	10

4.3 結果

4.3.1 ALSV-PHYL1_{OY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ペチュニアの花器官の形態

前章で記載した通り、phyllongen はシロイヌナズナの A クラス、E クラスの MTF の分解を誘導することで、花器官の形態異常を引き起こすと考えられた。そこで本章では、phyllongen が花き類に対しても同様に機能するかを検証した。まず、PHYL1_{OY}、PHYL1_{PnWB} を、ALSV ベクターを用いてペチュニアで発現させ、表現型の観察を試みた。ペチュニアを始めに用いたのは、ペチュニアがシロイヌナズナ同様に ABCE クラスの遺伝子の研究におけるモデル植物であり (Gerats and Vandenbussche 2005; Rijpkema *et al.*, 2006a)、ファイトプラズマの感染によって、葉化などの形態異常が誘導される (Himeno *et al.*, 2011) ためである。

ALSV-empty を接種したペチュニアでは、花器官に形態の変化は生じていなかった (図 4-4)。その一方で、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニアでは、一部、あるいは全ての花器官に形態の異常が生じた (図 4-4)。両植物体の花を解剖し、器官ごとに比較した結果を図 4-5 に記す。ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニアの花では、萼はもっとも異常が生じやすく、葉に類似した形態に変化し肥大していた。花弁は主脈先端部の側部から緑変し、小型化した。また、緑変した箇所にはトライコームが形成されていた。雄蕊は各花器官のなかで最も変異が生じにくかったが、一部の花において花粉が形成されず、不稔症状が生じていると思われた。また、それらの雄蕊の先端部には緑色の構造物が構成された。雌蕊では柱頭などが正常に形成されず、代わりに表面にトライコームが形成された葉に類似した構造物に変異していた。またこの構造物には新たな花芽が形成され、つぼみに分化した。以上から、PHYL1_{OY} は、ペチュニアにも花器官の形態異常を誘導すると考えられた。ALSV-PHYL1_{PnWB} 接种植物においても、ALSV-PHYL1_{OY} 接种植物と酷似した形態異常が観察された (図 4-4)。したがって PHYL1_{PnWB} も PHYL1_{OY} と同様にペチュニアに形態異常を誘導可能であると考えられた。

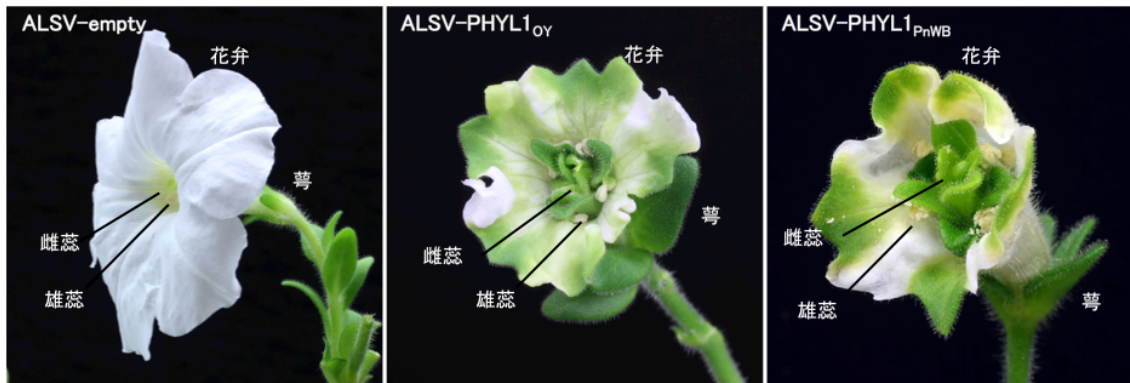


図 4-4 ALSV 接種ペチュニアにおける花器官

ALSV-empty 接種ペチュニアにおいては、いずれの花器官にも形態の異常は認められなかった。一方で、ALSV-PHYL1_{OY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} を接種したペチュニアでは、互いに類似した花器官形態の異常が観察された。いずれの ALSV も、播種後 3 週間のペチュニアに接種した。

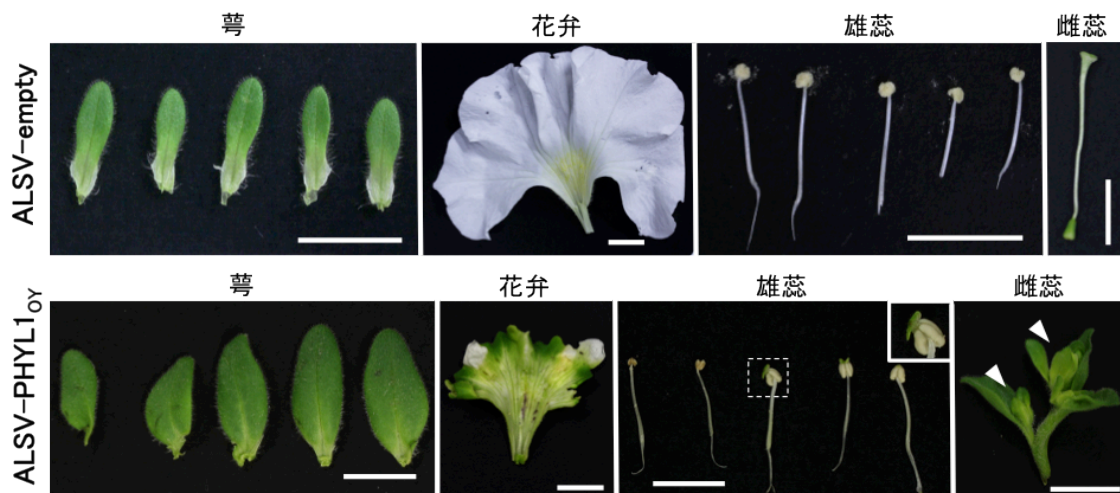


図 4-5 ALSV-empty、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニアの各花器官形態

ALSV-empty 接種ペチュニアに比べて、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニアでは、萼が肥大化し形態が葉に類似しているのが観察された。また、花卉が小型化し、先端部から緑変していた。一部の雄蕊では花粉が形成されず、先端部に緑色の構造物が形成された(図右上)。雌蕊では、柱頭の代わりに葉や新たな花芽(矢頭)や葉が形成された。図中の bar は、いずれも 1 cm を示す。

4.3.2 PHYL10Y 発現ペチュニアにおける遺伝子発現量解析

前章に記載したとおり、PHYL10Yを形質転換したシロイヌナズナでは、標的 MTF の分解誘導に伴い関連する MTF 遺伝子の発現量が変動することが示されている。PHYL10Y がペチュニアにも形態異常を誘導したため、PHYL10Y形質転換ペチュニアにおける MTF 遺伝子の発現量の変動を解析した。すなわち、ALSV-PHYL10Y 接種ペチュニアのつぼみから抽出した RNA を用いて、ABCE クラスに属する遺伝子、および *flowering time gene* の発現量を解析し、ALSV-empty 接种植物のつぼみにおける発現量を比較した (図 4-6)。以下に、その結果を各クラスの遺伝子ごとに記載する。

A クラスの遺伝子として、MTF 遺伝子の *PETUNIA FLOWERING GENE* (*PFG*; Immink *et al.*, 1999)、*FLORAL-BINDING PROTEIN 29* (*FBP29*; Immink *et al.*, 2003)、および非 MTF 遺伝子である *AP2A* (Maes *et al.*, 2001) の発現量を解析した。なお、いずれの遺伝子も詳細な機能解析はされておらず、他种植物の遺伝子との相同性をもとに A クラス遺伝子と類推されているのみである。定量 RT-PCR の結果、3 遺伝子の発現量とも、ALSV-empty 接种植物と ALSV-PHYL10Y 接种植物における有意な差は認められなかった。従って、ペチュニアの A クラス遺伝子の発現に、PHYL10Y は影響しないことが示唆された。

B クラスの遺伝子として、MTF 遺伝子の *DEFICIENS* (*DEF*; van der Krol *et al.*, 1993)、*GLOBOSA 1* (*GLO1*; Vandenbussche *et al.*, 2004) の発現量を解析した。定量 RT-PCR の結果、2 遺伝子とも ALSV-PHYL10Y 接种植物において、ALSV-empty 接种植物に比べて発現量が減少しており統計的に有意な差が認められた。従って、ペチュニアの B クラス遺伝子の発現量は、PHYL10Y 存在下で減少すると考えられた。

C クラスの MTF 遺伝子である *Petunia MADS 3* (*PMADS3*; Tsuchimoto *et al.*, 1993)、*FBP6* (Kater *et al.*, 1998) について解析したところ、*FBP6* の発現量は ALSV-PHYL10Y 接种植物に

において有意に減少しており、PHYL1_{oy}存在下で発現が抑制されることが示唆された。*pMADS3* においても、統計学的に有意な差は認められなかったものの (P 値=0.057)、ALSV-PHYL1_{oy} 接种植物において発現量は減少傾向にあった。以上のことから、ペチュニアの C クラス遺伝子の発現量は、PHYL1_{oy}存在下で減少している可能性が示唆された。

E クラスの遺伝子である *FBP2* (Immink *et al.*, 2002)、*FBP5* (Ferrario *et al.*, 2003) の発現量は、いずれも ALSV-PHYL1_{oy}接种植物において有意に減少していた。従って、B クラス遺伝子と同様に E クラス遺伝子の発現量も、PHYL1_{oy}によって抑制されると考えられた。

ペチュニアの *flowering time gene* として機能する *UNSHAVEN*(*UNS*; Ferrario *et al.*, 2004)、およびシロイヌナズナの *flowering time gene* である *AGL24* のホモログである *FBP13*, *FBP25* (Immink *et al.*, 2003) の発現量については、ALSV-empty 接种植物と ALSV-PHYL1_{oy} 接种植物の間で有意な差は認められなかった。従って、ペチュニアの *flowering time gene* の発現に、PHYL1_{oy}は影響しないことが示唆された。

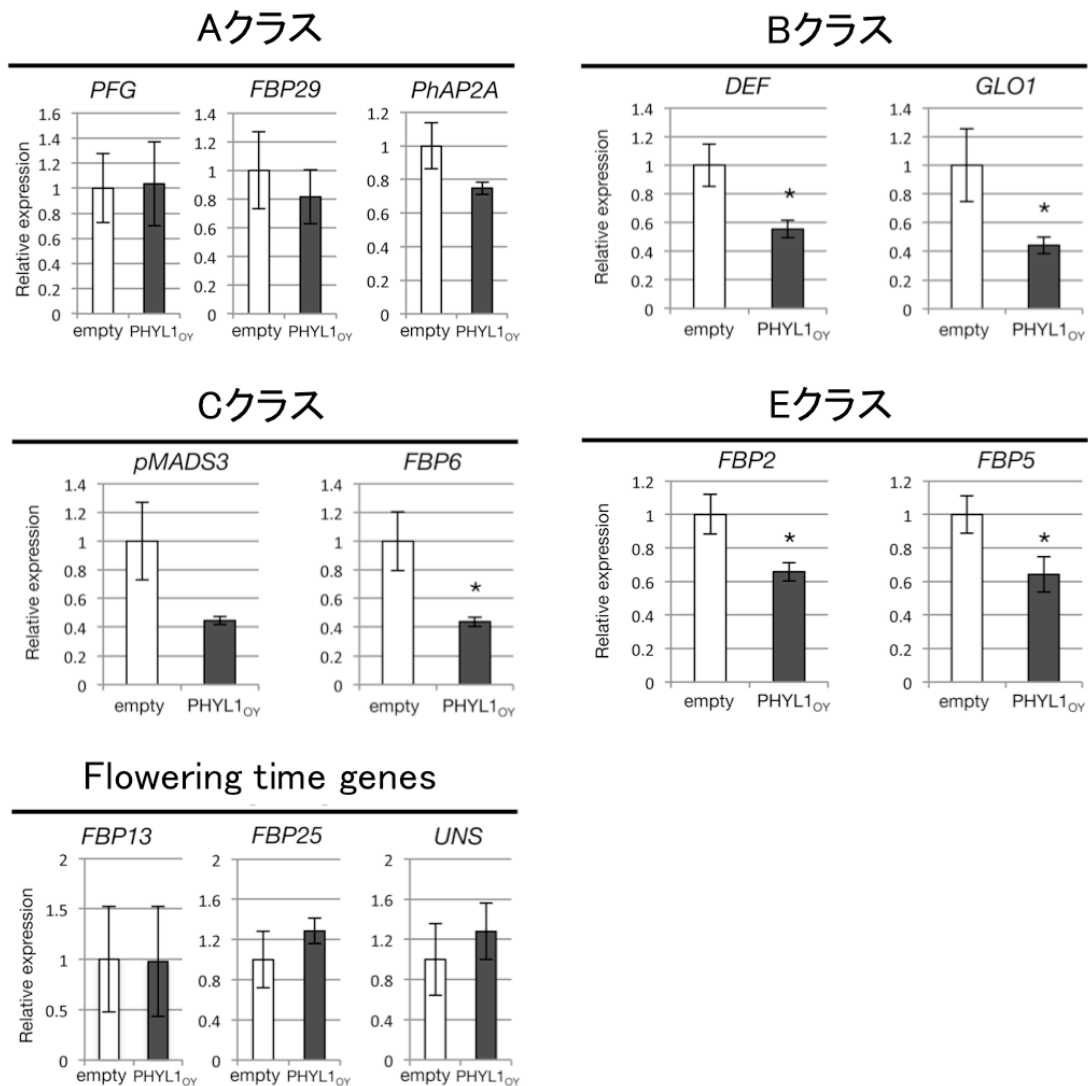


図 4-6 ALSV-empty、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニアの ABCE クラス遺伝子の発現量の比較

ALSV-empty 接種ペチュニア、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ペチュニア RNA を抽出し、定量 RT-PCR によって各遺伝子の発現量を比較した。ウイルスごとに 9 個体から RNA を抽出し、個体ごとの遺伝子発現量を *GADPH* 発現量をもとに相対化したのち、平均値と標準偏差を求めた。図では、ALSV-empty における各遺伝子の発現量を 1 として示している。bar は標準偏差を示す。* は各試験区間で統計的に有意な差があったことを示している [p<0.05; スチューデントの T 検定 (両側検定)]。

4.3.3 ALSV-PHYL1_{oY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリ、アスターの花器官の形態

PHYL1_{oY}、PHYL1_{PnWB} がペチュニアに花形態の異常を誘導したことから、やはりファイトプラズマ感染時に花器官の形態異常が生じる (Guzmán *et al.*, 2014) ヒマワリ (キク科) に、ALSV-empty、ALSV-PHYL1_{oY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} を接種し表現型を観察した (図 4-7)。ALSV-empty を接種したヒマワリにおいては、花器官に形態変化は認められなかった。また、ALSV-PHYL1_{oY} を接種したヒマワリでも形態異常は誘導されなかったが、舌状花の小型化が認められた。一方で、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリにおいては異常な花器官の形成が認められた。ヒマワリには筒状花と舌状花の二種類の花が形成されるが、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接种植物ではいずれの花にも形態異常が生じた (図 4-8)。すなわち、筒状花においては、萼の葉化や伸長、萼の外側に位置する包葉の緑変が認められた。一部の花においては更に激しい形態異常が生じ、花弁や雌蕊も葉のような構造に変化しているのが観察された。なお、雄蕊の構造変化の有無は未検証である。舌状花は筒状花にくらべて形態異常が生じにくかったが、一部の花弁が小型化し、わずかに緑変しているのが観察された。以上のことから、PHYL1_{PnWB} はヒマワリに花器官の形態異常を誘導することが示された。

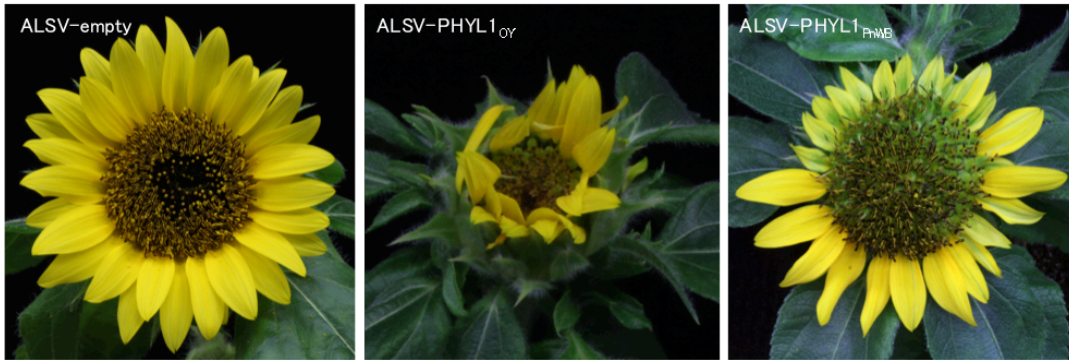


図 4-7 ALSV 接種ヒマワリにおける花器官

ALSV-empty 接種ヒマワリ、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ヒマワリにおいては、花器官の小型化は観察されたが、形態の異常は認められなかった。一方で、ALSV-PHYL1_{PnWB} を接種したヒマワリでは、花器官形態の異常が観察された。いずれの ALSV も、播種後 3 週間のヒマワリに接種した。

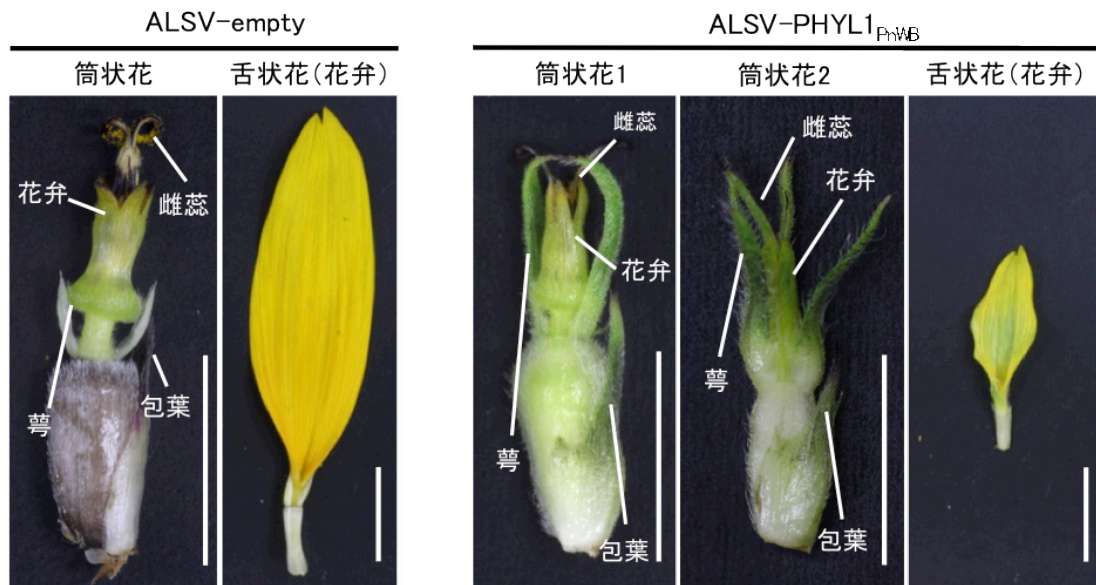


図 4-8 ALSV-empty、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリの各花器官形態

ALSV-empty 接種ヒマワリでは、筒状花、舌状花共に花器官に異常は観察されなかった。ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリの筒状花では、萼や包葉の緑変・伸長が観察され、一部の花(筒状花 2)では花弁、雌蕊も緑変した。また、舌状花の花弁の小型化や緑変も認められた。図中の bar は、いずれも 1 cm を示す。

ALSV-PHYL1_{OY} 接種ヒマワリと ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリとの間で見られた差異が何に起因するのかを調べるため、各ヒマワリの筒状花、および舌状花から RNA を抽出し、ALSV の感染を RT-PCR により検証した。その結果、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ヒマワリの舌状花、筒状花においては ALSV 由来と思われる増幅産物が確認されたものの、予想サイズより小さいものがほとんどであり、PHYL1_{OY} 遺伝子が ALSV 感染の過程でウイルスゲノムより抜け落ちていていると考えられた (図 4-9)。一方で、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリの舌状花、筒状花においては、PHYL1_{PnWB} を含む配列長に相当するサイズの増幅産物が明瞭に確認された。以上のことから、ヒマワリにおいては、PHYL1_{OY} は何らかの理由で ALSV ゲノムから脱落しやすく、ALSV-PHYL1_{OY} 接種ヒマワリでは花器官の形態異常が誘導されない可能性が考えられた。

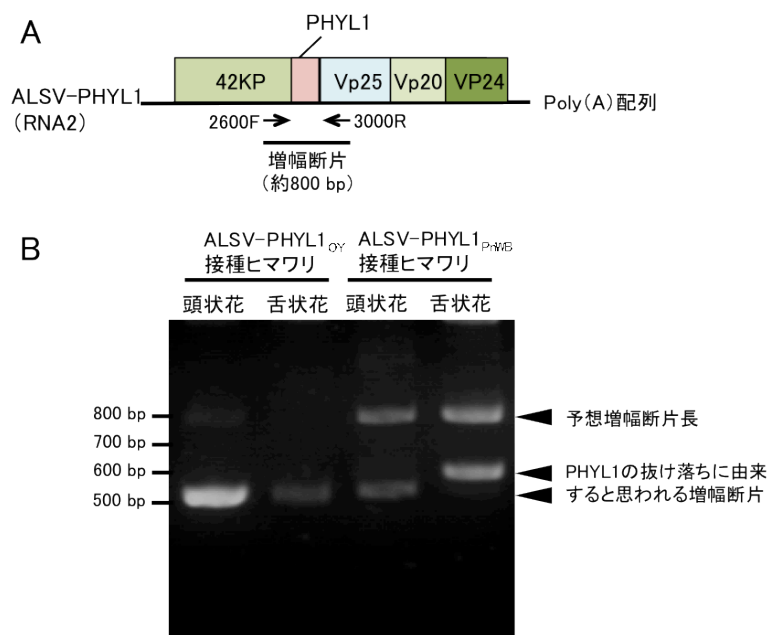


図 4-9 ALSV-PHYL1_{OY}、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種ヒマワリからの ALSV 特異的 RT-PCR

- A. 特異的プライマーの設計部位。PHYL1 が挿入されている場合、約 800 bp の断片が増幅される
- B. RT-PCR の結果。ALSV-PHYL1_{OY} 接種植物では、舌状花・筒状花共に予想より短い長さの断片が主に増幅され、PHYL1_{OY} は大部分のウイルスのゲノムから抜け落ちていていると考えられた。一方で ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種植物では、抜け落ちに由来すると思われる断片の増幅も認められるが、舌状花・筒状花共に予想通りの長さの断片が増幅され、PHYL1_{PnWB} は PHYL1_{OY} よりウイルスのゲノムに保持されることが示唆された。

次いで、同じくファイトプラズマ感染時に花器官の形態異常が生じるキク科植物である (Sinha and Paliwal 1969)、アスターにおいて同様の実験を行った。ヒマワリにおいて ALSV ベクターからの PHYL1_{oY} の抜け落ちが生じやすい可能性が示唆されたことから、ALSV-empty、ALSV-PHYL1_{PnWB} のみを接種した。その結果、ヒマワリと同様に、ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種時のみ花器官の形態異常が誘導された (図 4-10)。すなわち、筒状花において、萼、花弁、雌蕊の緑変が観察された。また舌状花においては、萼の葉化、花弁の緑変や奇形、雌蕊の緑変が観察された。従って、PHYL1_{PnWB} はアスターにも花器官の形態異常を誘導することが示された。以上より、PHYL1_{PnWB} はキク科植物に対して、花器官の形態異常を誘導可能と考えられた。

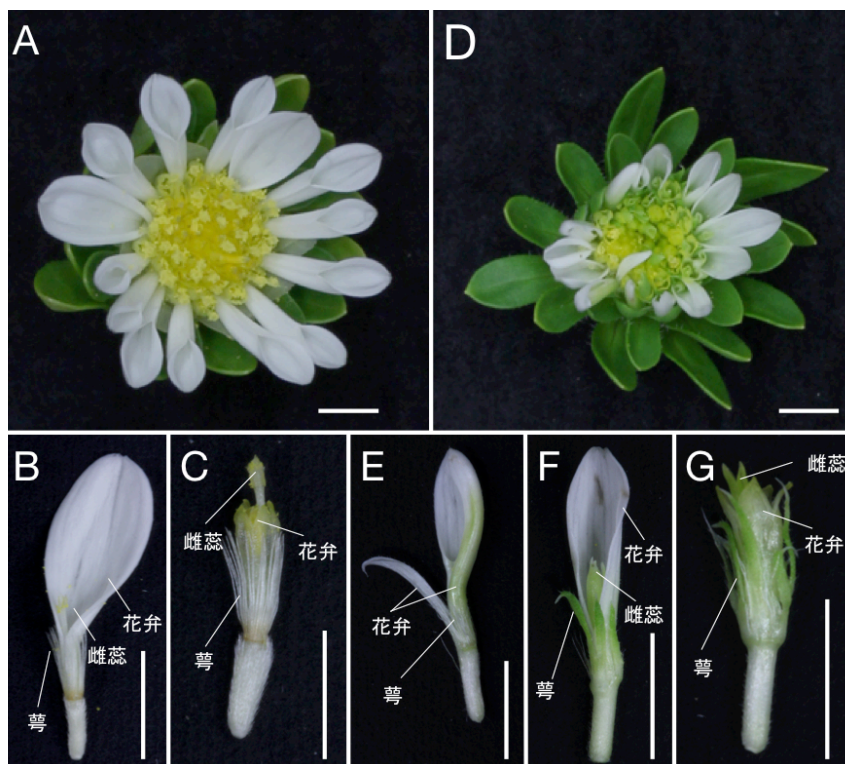


図 4-10 ALSV 接種アスターにおける花器官

A-C. ALSV-empty 接種アスターの花器官。舌状花(B)、筒状花(C)ともに、異常は認められなかった。D-G. ALSV-PHYL1_{PnWB} 接種アスターの花器官。舌状花においては花弁の緑変や奇形が認められる (E)ほか、萼、雌蕊の緑変が観察された(F)。筒状花においても、萼、花弁、雌蕊が緑変していた(G)。図の bar は 1 cm を示す。

4.3.4 PHYL1_{OY} と様々な花き類の MTF との結合能

前述の通り、少なくとも PHYL1_{OY} はペチュニアに対して、PHYL1_{PnWB} はペチュニアと 2 種のキク科植物（ヒマワリ、アスター）に対して、形態異常を誘導する活性を有することが示された。そこで、これらの花器官の形態異常が、シロイヌナズナ同様に MTF の機能阻害によって生じているのかを検証するため、PHYL1_{OY} がペチュニア、および代表的なキク科植物であるキクの A クラス、E クラスの MTF に結合するかを、Y2H によって試験した。加えて、より広範な植物に対して形態異常を誘導可能か考察するため、単子葉植物であるテッポウユリ（ユリ科）の MTF に対する結合性も試験した。なお、PHYL1_{OY} のみを用いた理由は、前章で PHYL1_{OY} と PHYL1_{PnWB} の機能が類似していることが示唆されており、かつ PHYL1_{OY} の単離源である OY-W 系統が属する *Ca. P. asteris* 種が、ペチュニア、キク、ユリの全てに感染するためである (Kamińska and Dziekanowska 2002; Raj *et al.*, 2007; Himeno *et al.*, 2011)。

GAL4 AD ドメインを付加した各 MTF を BD-PHYL1_{OY} と共発現させた酵母では、GAL4 の機能が回復し、酵母の選択培地での生育が認められた (図 4-11)。一方で、BD ドメインのみと共発現させた場合には、酵母の選択培地における生育が顕著に抑制された。AD ドメインと BD-PHYL1_{OY} の共発現時にも選択培地における酵母の生育が抑制されることは、前章で既に示している (図 3-14)。以上のことより、PHYL1_{OY} は、用いた MTF と酵母細胞内で相互作用すると考えられた。

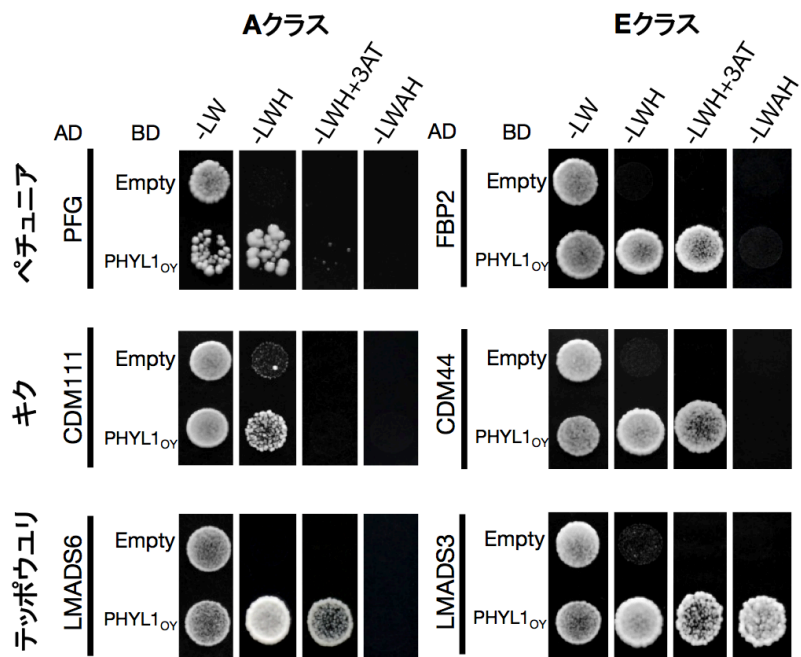


図 4-11 様々な花き類の MTF と PHYL1_{OY} の Yeast two hybrid

pGADT7 ベクターにクローニングし AD を付加した MTF と、pGBKT7 ベクターにクローニングし BD を付加した PHYL1_{OY} を酵母細胞内で共発現させて、相互作用の有無を検証した。形質転換した酵母は 4 種類の培地で生育させた。各培地の説明は図 3-14 に記載した。

各コンストラクトを形質転換した酵母は一度 -LW 培地で生育させたのち、OD=0.1 になるように滅菌水中に懸濁し、10 μ l の菌液を培地に滴下した。培地は 30°C で 4 日間培養し、酵母の生育を確かめた。

4.3.5 PHYL1_{oY}の様々な花き類の MTF に対する分解誘導活性試験

Y2H によって、PHYL1_{oY}が様々な花き類の MTF と相互作用することが示されたことから、植物細胞内で PHYL1_{oY}が MTF の分解誘導活性を示すかを検証した。アグロインフィルトレーション法によって YFP 融合 MTF と GUS を *N. benthamiana* 葉で共発現させたところ、YFP-SEP3 (前章に記載) 及び bZIP63-YFP と同様に、YFP 蛍光の核への局在が認められた (図 4-12)。一方で、PHYL1_{oY}と共発現させた場合には、YFP 蛍光の著しい減衰が観察された。画像解析ソフト ImageJ を用いて一定面積内の蛍光シグナル数を定量した結果、PHYL1_{oY}共発現時の蛍光シグナル数は GUS 共発現時と比べて有意に減少していた。ネガティブコントロールとして用いた bZIP63-YFP 由来の蛍光シグナル数は、GUS 共発現時と PHYL1_{oY}共発現時との間で変動しなかった。以上より、各 MTF の蓄積量が PHYL1_{oY}共発現時に減少していることが示され、PHYL1_{oY}が各 MTF の分解を誘導することが強く示唆された。

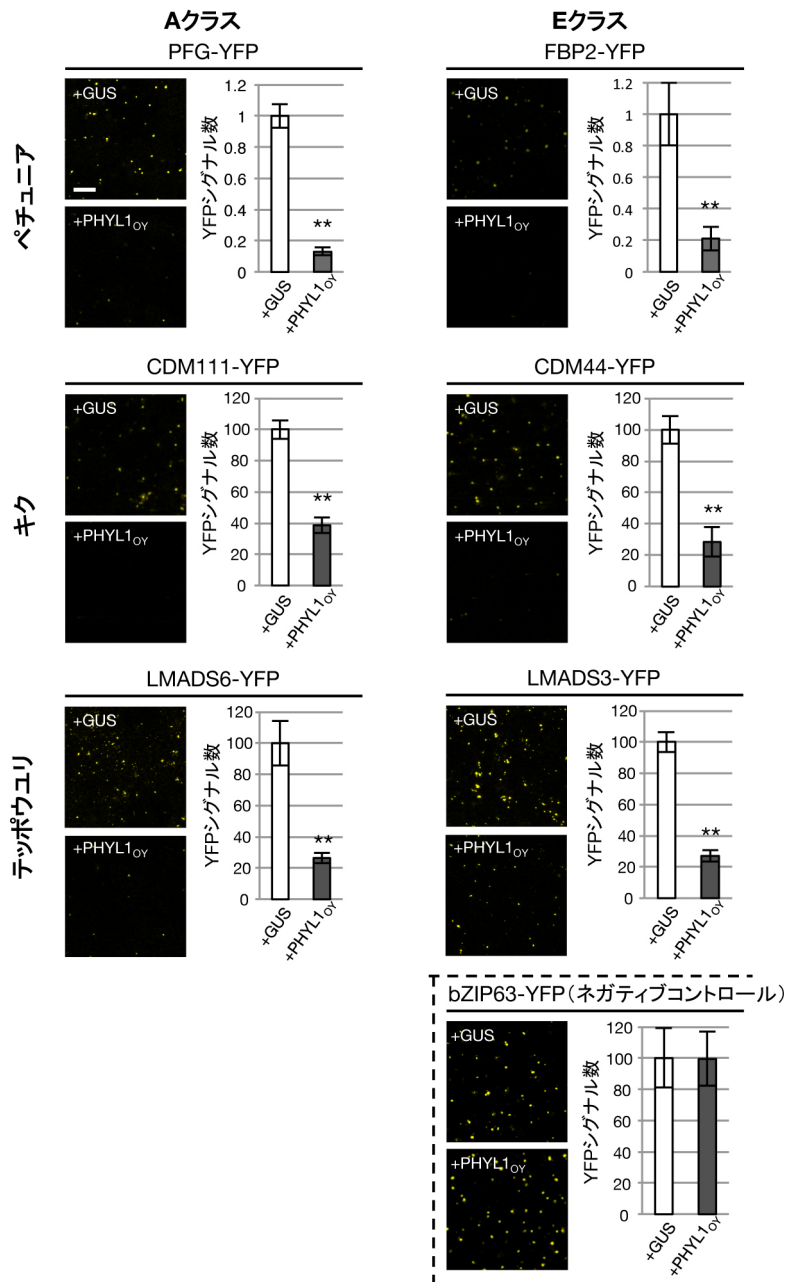


図 4-12 PHYL1_{oy} による様々な花き類の MTF の分解誘導活性

C 末に YFP を付加した各 MTF を、*N. benthamiana* 葉において GUS、PHYL1_{oy} と共発現させた後、36 時間後に YFP 蛍光を観察した。蛍光写真中の bar は 100 μm を示す。また、2.4mm² の葉面積内において蛍光が見られた核の数を、YFP シグナルの数を画像解析ソフト ImageJ で定量化することで測定した。各試験区を *N. benthamiana* 葉 4 枚で発現させ、その全てでシグナル数を測定して平均値、標準偏差を算出した結果をグラフに示す。GUS 共発現区における平均値を 1 として表示しており、bar は標準偏差を示す。* * は各試験区間で統計的に有意な差があったことを示している[p<0.01; スチューデントの T 検定(片側検定)]。試験区ごとに、少なくとも 3 反復の実験を行い、再現性を確認した。

4.4 考察

4.4.1 *phylogen* は広範な被子植物の MTF を標的とする。

PHYL1_{oY}、PHYL1_{PnWB} を ALSV ベクターによって発現させたペチュニア（ナス科）では、花器官が葉のような構造物へと転換する形態異常が観察された（図 4-4, 5）。さらに PHYL1_{oY} は、ペチュニアの A クラス、E クラスの MTF と相互作用し（図 4-11）、*N. benthamiana* の葉で共発現させた場合に両 MTF の分解を誘導する（図 4-12）ことが示された。以上のことから、*phylogen* はペチュニアの MTF を標的とし、シロイヌナズナと同様に MTF の分解誘導を介してペチュニアの花の形態異常を誘導することが強く示唆された。なお、ペチュニアにおける既知の MTF の機能や、ファイトプラズマ感染時に見られる症状との関連性については、後の項で詳細に考察したい。

ペチュニアに加えて、PHYL1_{PnWB} を ALSV ベクターによって発現させたヒマワリ、アスター（ともにキク科）においても、やはり花器官において、花弁の緑化や、萼の伸長などの形態異常が認められた（図 4-7, 8, 10）。PHYL1_{oY} を ALSV ベクターによって発現させたヒマワリでは花器官の異常が認められなかったが、舌状花の花弁が小型化していた（図 4-7）。ALSV-PHYL1_{oY} 接種ヒマワリでは PHYL1_{oY} のウイルスゲノムからの抜け落ちが生じていることが示唆されており（図 4-9）、植物体内における PHYL1_{oY} の発現量は低いと考えられる。本研究では、PHYL1_{oY} がキクの A クラス、E クラスの MTF と相互作用し（図 4-11）、両 MTF の分解を *in planta* で誘導可能である（図 4-12）ことを示している。従って、PHYL1_{oY} を形質転換などでキク科植物において十分量発現させた場合には、PHYL1_{PnWB} と同様に花器官の形態異常を誘導可能である可能性が高い。前章の研究を踏まえて考えると、*phylogen* は、少なくとも 3 科の双子葉植物（アブラナ科、ナス科、キク科）の A クラス、E クラスの MTF を標的とし、その分解誘導を介して各植物の花器官の形態異常を誘導可能と考えられた。

本研究では更に、PHYLL10Yが単子葉植物であるテッポウユリ（ユリ科）のAクラス、EクラスのMTFを標的とし、*N. benthamiana*葉において各MTFの分解を誘導する（図4-11, 12）ことを示した。ユリ類はファイトプラズマ感染時に花器官に形態異常が生じることが報告されており（Chaturvedi *et al.*, 2010）、これらの症状に *phyllogen* が関与している可能性がある。また、PHYLL10Yが単子葉植物と双子葉植物のMTFをいずれも標的とすることは、被子植物全般のAクラス、EクラスMTFが *phyllogen* の標的となることを示唆している。加えて、*N. benthamiana*において、PHYLL10YによるMTFの分解誘導にはプロテアソームが関与することが示されている（前章参照）。プロテアソーム関連因子は被子植物間で保存されており（Ingvarsdén and Veierskov 2001）、*phyllogen* は他植物でもプロテアソーム系を利用出来る可能性が高い。以上より、*phyllogen* は被子植物に対し普遍的に機能し、各植物のAクラス、EクラスMTFのプロテアソームを介した分解を誘導可能である可能性が考えられた。

phyllogen による様々な被子植物のAクラス、EクラスMTFの分解誘導が、それらの植物において花器官の形態異常を誘導するかは興味深い点である。第3章に詳述した通り、ABCEモデルは被子植物全般におおよそ適用されると考えられており（Soltis *et al.*, 2007）、Aクラス、Eクラスに属するMTFの機能阻害によって花器官に変異が生じることを示す事例は多数の植物で報告されている（Yu and Goh *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2007; Acri-Nunes-Miranda and Mondragón-Palomino 2014; Kubota and Kanno 2015）。例えば、キンポウゲ科の双子葉植物 *Nigella damascena* では、Eクラス遺伝子の発現抑制によって花器官の代わりに包葉が形成される（Wang *et al.*, 2015）。また、単子葉植物のイネでは、EクラスのMTF遺伝子である *OsMADS7*、*OsMADS8* の発現を抑制することで、葉化等の花器官の形態異常が生じる（Cui *et al.*, 2010）。以上のことから、*phyllogen* によるMTFの分解誘導によって、単子葉植物を含めた広範な被子植物において花器官の形態異常が生じる可能性は十分に考えられる。

4.4.2 *phyllogen* による MTF の認識機構

前項に述べた通り、PHYLL10Y は双子葉植物、単子葉植物を含む少なくとも 4 科 (アブラナ科、ナス科、キク科、ユリ科) の植物の MTF に結合することが示された。このことから、*phyllogen* は様々な植物の A クラス、E クラスの MTF に保存された領域を認識していると考えられる。近年、*phyllogen* の 1 つである SAP54 が、AP1 や SEP3 の K ドメインに結合することが報告された (MacLean *et al.*, 2014)。また、SEP3 の K ドメインの結晶構造解析が報告されている (Puranik *et al.*, 2014)。Rümppler らは、以上の知見と *phyllogen* の *in silico* での構造予測から、*phyllogen* と SEP3 の結合様式を予測している (Rümppler *et al.*, 2015)。しかしながら、この予測された結合様式の検証は現在のところ行われていない。様々な A クラス、E クラス MTF の K ドメイン配列を比較することで *phyllogen* が認識するモチーフを同定し、本結合様式が検証できる可能性があるだろう。

4.4.3 phylogen 発現ペチュニアの表現型には、E クラス MTF 機能抑制が大きく関る

ペチュニアは ABCE クラス MTF 研究におけるモデル植物であり、各 MTF 遺伝子の変異体に関する研究が多数報告されている (Rijkema *et al.*, 2006a; 図 4-13~16)。例えば、B クラス MTF の機能を抑制した変異体では、花卉の主脈の緑変や、雄蕊の雌蕊への転換などが観察される (Vandenbussche *et al.*, 2004; 図 4-14)。C クラス MTF の機能を抑制した変異体では雄蕊の花弁への転換が生じ、“八重咲き”の花が形成される (Heijmans *et al.*, 2012a; 図 4-15)。

本研究で phylogen を発現させたペチュニアの表現型は、様々なペチュニア変異体の中で、E クラス遺伝子の変異体の形質に特に類似していた。ペチュニアの E クラス MTF 遺伝子である *FBP2* および *FBP5* を欠失した変異体においては、花卉の緑変、雄蕊先端部の萼に類似した構造への転換、雌蕊の葉に類似した構造への転換などが観察される (Vandenbussche *et al.*, 2003; 図 4-16)。E クラス遺伝子の発現を抑制した場合にも類似した形態異常が観察されるほか、雌蕊から新たな花芽が形成される (Angenent *et al.*, 1994)。花卉の緑変は B クラス変異体においても観察されているが、B クラス変異体では緑変が主脈部で生じるのに対し、E クラス変異体では花卉先端から緑変が始まる。ALSV ベクターを用いて *PHYL1_{OY}* や *PHYL1_{PnWB}* を発現させたペチュニアにおいても、E クラス変異体と同様に、花卉先端からの緑変、雄蕊先端部の緑色構造への転換、雌蕊の葉や花芽への転換が観察された (図 4-4, 5)。このことは、phylogen による形態異常の誘導には、E クラス MTF の分解が大きく影響していることを示唆するものである。なお、*PHYL1_{OY}* は、E クラス MTF に加えて A クラス MTF も標的とすることが本研究から示されているが、A クラス遺伝子の機能はペチュニアでは詳細に解析されておらず、本研究で観察された異常な花器官形成における A クラス MTF 分解の関与は不明瞭である。既知の知見として、*API* のホモログである *PFG* の発現を抑制したペチュニアにおいては、花器官の形成頻度が低下することが報告されているが、これらのペチュニアで形成される花には表現型の異常が認めら

れていない (Immink *et al.*, 1999)。このことから、本研究で *phyllogen* を発現させたペチュニアに観察された花器官の異常は、主に E クラス MTF の分解が誘導された結果である可能性が高いと考えられる。ただし、本研究で観察された萼の肥大 (図 4-5) は E クラス変異体では報告されておらず、萼の肥大に A クラス MTF の分解が関与している可能性は十分に考えられる。

PHYL1_{oy} を発現させたペチュニアの花芽における MTF の発現量の変動も、E クラス変異体の知見に類似していた。すなわち、PHYL1_{oy} を発現させたペチュニアにおいては、B クラス、C クラスの MTF の発現量が低下していた (図 4-6) のと同様に、E クラス遺伝子の発現を抑制したペチュニアにおいても、B クラス、C クラスの発現量が低下することが報告されている (Angenent *et al.*, 1994)。PHYL1_{oy} 発現ペチュニアと E クラス変異体における MTF 発現量変動の類似性は、少なくともペチュニアにおいては、*phyllogen* による花器官の形態異常誘導には E クラスの MTF の分解が大きく関与することを支持するものである。ABCE モデルにおいて、E クラスは全ての花器官の分化に関与するクラスであり、*phyllogen* による分解誘導の影響が大きいのは妥当であろう。

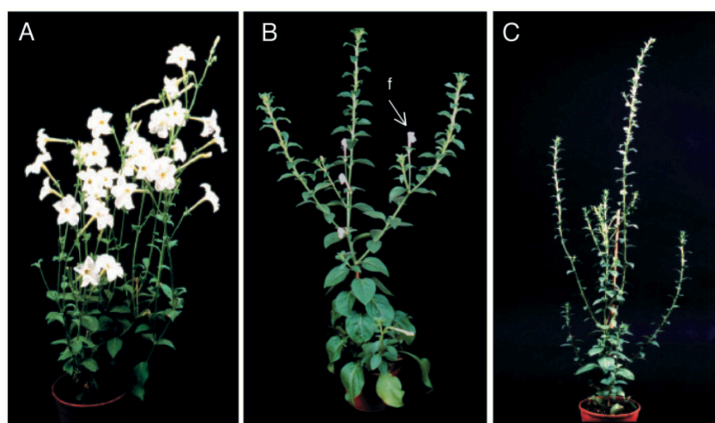


図 4-13 *PFG* (*AP1* ホモログ) 発現抑制ペチュニアの表現型 (Immink *et al.*, 1999 より抜粋)

A. *PFG* の発現を抑制していないペチュニア

B-C. *PFG* の発現を抑制したペチュニア。花器官の形成頻度が著しく減少する。

一方で形成された花 (図 B、矢印) には形態の異常は認められない。

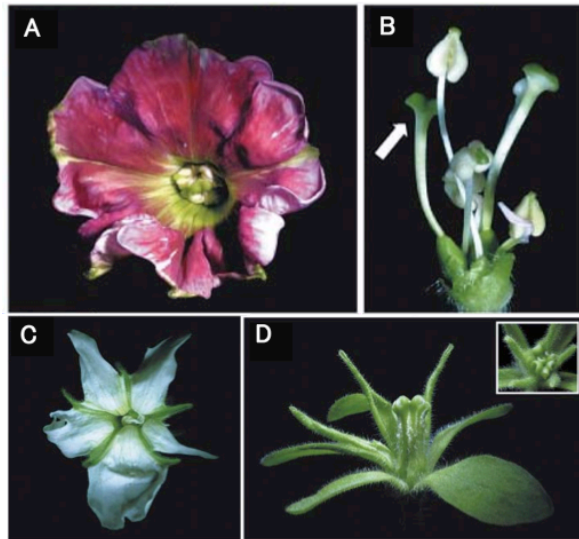


図 4-14 ペチュニアの B クラス遺伝子の発現抑制に生じる表現型
(Vandenbussche *et al.*, 2004 より抜粋、一部加筆)

- A. 花卉主脈部の緑変 (*glo1 GLO2glo2* 変異体)
- B. 雄蕊の雌蕊への転換 (矢印; *glo1 GLO2glo2* 変異体)
- C. 花卉主脈部の萼への転換と、花卉の形態異常 (*DEFdef glo1* 変異体)
- D. 花卉、雄蕊、雌蕊の萼への転換と、癒着した雌蕊群の形成 (*phdef phglo2* 変異体)

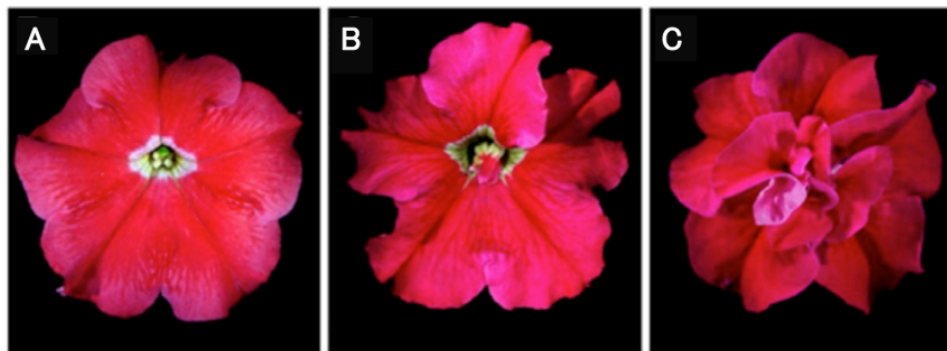


図 4-15 ペチュニアの C クラス遺伝子の発現抑制により生じる表現型
(Heijmans *et al.*, 2012a より抜粋、一部加筆)

- A. 野生型ペチュニア
- B. 雌蕊の花弁への転換 (*FBP6fbp6* 変異体で pMADS3 の発現を抑制)
- C. 雄蕊・雌蕊の花弁への転換 (*fbp6fbp6* 変異体で pMADS3 の発現を抑制)



図 4-16 ペチュニアの *FBP2*、*FBP5*(E クラス遺伝子)の欠失により生じる表現型

(Vandenbussche *et al.*, 2003 より抜粋、一部加筆)

- A. 花の形態。左から順に *fbp5* 変異体、*fbp2* 変異体、*fbp2 fbp5* 変異体。*fbp2* 変異体、*fbp2 fbp5* 変異体では花卉先端部からの緑変と花卉の小型化が認められる。
- B. 雌蕊の子房。左から順に *fbp2 fbp5* 変異体、*fbp5* 変異体、*fbp2 fbp5* 変異体の縦断面。*fbp2 fbp5* 変異体では子房が葉のような構造へと転換している。
- C. 雄蕊先端部。左から順に *fbp5* 変異体、*fbp2* 変異体、*fbp2 fbp5* 変異体。*fbp2 fbp5* 変異体において緑変と萼様構造への転換が認められる。

4.4.4 PHYLL1_{OY} 発現ペチュニアと OY-W 感染ペチュニアの比較

PHYLL1_{OY}の単離源である OY-W 系統は、ペチュニア感染時にも花器官の形態異常を誘導し、MTF の発現量変動を引き起こすことが報告されている (Himeno *et al.*, 2011)。一方で、PHYLL1_{OY}発現ペチュニアと OY-W 感染ペチュニアにおける花器官や MTF 発現変動様式を比較すると、両者には差異が見受けられる。例を挙げると、Himeno らの報告によると OY-W 感染ペチュニアにおいては花卉の緑変が主脈から生じ (図 4-17)、E クラスよりもむしろ B クラスの変異体に類似しているとされる。また、OY-W 感染ペチュニアでは、雄蕊において E クラス遺伝子の発現量が増加している、雌蕊で C クラス遺伝子の発現量が増加しているなど、MTF 発現量の変動様式にも差異があることが示唆されている。このような差異が生じた理由としては、以下のような可能性が考えられる。まず、ファイトプラズマ感染時と ALSV を用いて PHYLL1_{OY} を発現させた時とでは、PHYLL1_{OY} の蓄積量や発現部位が異なる可能性である。続いて、MTF の機能に影響を与えるファイトプラズマ因子が、PHYLL1_{OY} の他にも存在する可能性が挙げられる。これまでに、ファイトプラズマ感染時に叢生症状を誘導する病原性因子として、TENGU (Hoshi *et al.*, 2009) と SAP11 (Sugio *et al.*, 2011) の 2 種類の分泌タンパク質が報告されている。PHYLL1_{OY}においても、類似した機能を持つ因子が別に存在し、感染時に複合的な影響をもたらしていることは考えられる。花器官形態の異常というファイトプラズマに特異的な症状を誘導するメカニズムを正確に理解する為には、今後 PHYLL1_{OY}による影響と感染時に生じる影響を更に詳細に比較すると共に、他の分泌タンパク質の機能を解析することが重要となるであろう。

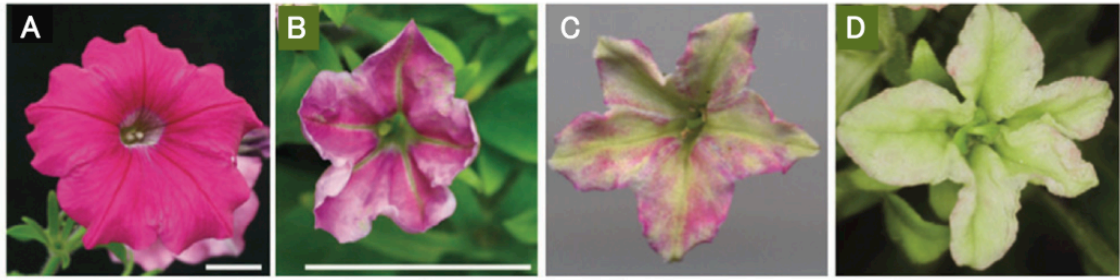


図 4-17 OY-W 感染によってペチュニアに誘導される花器官の異常

(Himeno *et al.*, 2011 より抜粋、一部加筆)

A. 健全ペチュニアの花。

B-D. 感染ペチュニアの花。主脈部から緑変し(B、C)、劇症時は花卉全体の緑変など(D)が見受けられる。

第5章 総合考察

第1章で述べた通り、花き類における細菌病害は、その防除の困難さゆえに大きな損失をもたらし得る。また、病原細菌の病原性・病原性機構の解析は、病原細菌の伝染環・危険性を把握する上で重要であり、病害の防除戦略を構築する上でも基盤となり得る。本研究では、コスモスに葉枯病害を引き起こす細菌の病原性を解析し、*Pseudomonas cichorii* であると同定した（第2章）。また、花き類を含めた様々な植物に花器官の形態異常を誘導するファイトプラズマの病原性因子、phylogen の機能を解析した（第3、4章）。これらの結果を踏まえ、本章では両細菌の病原性について更なる考察を加え、今後の展望について述べる。

5.1 *P. cichorii* のコスモスに対する病原性

第2章では、コスモスに生じた葉枯症状が、*P. cichorii* によるコスモス葉枯細菌病であることを明らかにした。また、分離菌株は既知の *P. cichorii* とほぼ同様の病原性や細菌学的性状を示すと考えられた。以上の結果と先行研究を踏まえ、本項ではコスモス葉枯細菌病が *P. cichorii* によってどのように引き起こされるのかについて考察する。2.1.3 項でも述べた通り、*P. cichorii* は多犯性の植物病原細菌である。しかしながら、その発病メカニズムは宿主によって異なることが示唆されている。一般に植物病原細菌の病原性には、宿主環境を制御するために宿主細胞内に分泌されるタンパク質（エフェクター）と、エフェクターを分泌する為のタイプ III 分泌装置が関与する（He *et al.*, 2004; Tampakaki *et al.*, 2010）。*P. cichorii* においても、タイプ III 分泌装置の構成に関わる *hrp* 遺伝子群のうち *hrpS*、または *hrpL* を欠失した変異体は、ナスへの病原性を喪失することが報告されており（Hojo *et al.*, 2008）、タイプ III 分泌装置から放出されるエフェクターがナスへの感染に寄与していることが示唆される。一方で各変異体はレタ

スに対しては病原性を維持していることが示されており (Hojo *et al.*, 2008)、*P. cichorii* の病原性におけるタイプ III 分泌装置の関与は宿主により異なると考えられる。Hojo らは、死細胞から主に栄養を収奪する (腐性) 病原細菌 *Pectobacterium carotovora* (*Erwinia carotobora*) の *hrpN* (*hrp* 遺伝子群の 1 つ) 変異体で病原性が低下しないこと (Cui *et al.*, 1996) などに着目し、ナスに比べてレタスにおいては *P. cichorii* はより腐性的に病原性を示すのではないかと考察している。それでは、コスモスにおいてはどうかであろうか。Tanaka ら (2011) は *hrcC* (*hrp* 遺伝子群の 1 つ) を欠失した *P. cichorii* を様々なキク科植物に接種し、病原性が喪失した場合と保持された場合があったことを報告している。その結果、*hrcC* 変異体はレタスに対して Hojo らの研究と同様に病原性を示し、コスモスにおいても同様であった。また、*hrp* 遺伝子以外の病原性関連遺伝子である aldehyde dehydrogenase gene (*aldH*) や、N-acyltransferase family gene (*pat*) を欠失した変異体も、レタスやコスモスに病原性を示した。従って、コスモスやレタスなどキク科植物に対する *P. cichorii* の病原性は上記で調べられた既知の病原性因子に依らない可能性が高く、今後の解析に期待したい。

コスモス葉枯細菌病は、植物体の葉を枯死させることで生育阻害を引き起こし、発生圃場に甚大な被害を与えるものであった。レタスにおいては、*P. cichorii* は主に葉の気孔部から侵入すると考えられており、その被害も葉身部が中心である (Hikichi *et al.*, 2014)。本研究で行ったコスモスへの接種試験において、分離菌株は有傷部位以外から植物体に感染可能なことが示されており (図 2-3)、既知の分離株同様にコスモス葉の気孔部から自然感染可能な可能性が高い。我が国で発生している *P. cichorii* による他のキク科植物への病害においても、多くは葉身への被害を主とする (後藤、岡部 1954; 土屋ら 1976; 河原林ら 1984; 川久保、後藤 1987; 鶴巻ら 2005; 末永ら 2006; 久保ら 2009)。またコスモス葉枯細菌病においても、今回の観察からは葉身の枯死が主な症状であると考えられた。葉身部以外の器官に被害が生じるかは不詳である

が、受領した検体、および接種個体では主茎部において被害が確認されなかったため、少なくとも主茎部には自然感染下でも被害が生じる可能性は低い。一方、花き類における最も重要な要素である花器官に対し、本病による被害が生じるのかは未検証である。上述した他のキク科植物における研究においても花器官への病原性を検証した事例は少ないが、キンセンカにおいては、*P. cichorii* 感染時に花蕾の枯死が生じることが報告されている（鶴巻ら 2005）。従って、*P. cichorii* によるコスモスの花器官への被害が生じる可能性も考えられる。そのような事例に備え、本研究で分離した菌株の接種実験によって、*P. cichorii* の花器官への病原性を検証することは、コスモス栽培における *P. cichorii* の危険性を把握する上で重要であろう。

5.2 コスモス葉枯細菌病の防除

コスモスの細菌性の葉枯症状は今回初めて報告された病害であり、有効な防除手段は未開発である。しかし、本研究によりコスモスに葉枯症状を引き起こす病原細菌が *P. cichorii* と同定されたことから、*P. cichorii* の伝染環に関する知見を踏まえて、想定される防除法を考察したい。

2.1.3 項に述べた様に、*P. cichorii* は植物の地上部に気孔を介して侵入し、細胞間隙で増殖する（Hikichi *et al.*, 1996）。一般に、地上部に病害を引き起こす植物病原細菌の伝染には、雨滴などの飛沫が大きな役割を果たす（後藤 1990）。発生圃場からの報告によると、本病害は初発生後に圃場全体に急速に蔓延すると考えられるが、この急速な蔓延には降雨や灌水による水滴の飛散が寄与している可能性が高い。従って灌水方法の検討や、雨滴があたらない場所への栽培場所の移動により被害の軽減が図れると考えられる。次いで、本病害は毎年の発生が認められていることから、病原細菌が何らかの形で圃場周辺に残存していると考えられる。*P. cichorii* は多犯性植物病原細菌であり、栽培圃場周辺の雑草に感染した *P. cichorii* が作物への伝染源となることが示唆されている（大畑ら 1982）。従って圃場周辺に雑草が繁茂している場合には、

なるべく除去するのが望ましい。また、*P. cichorii* は罹病残さを介して土壌にも残存し、降雨時の泥はねなどを介して他植物へ伝染すると考えられている (Grogan *et al.*, 1977; Bazzi *et al.*, 1984)。本病害の発生が認められたコスモスは鉢物栽培であるため、一度使用した土が次作以降も使用されるかは不明だが、一度使用した土は圃場から除去しなるべく健全な土を使用する必要があるだろう。最後に、本病が *P. cichorii* による病害であることから、本病害に有効と考えられる薬剤について記載する。一般に細菌病に対する薬剤として、ストレプトマイシン等の抗生物質や無機銅剤、オキシリニック酸剤などが用いられる。本病原細菌 *P. cichorii* による重要病害であるレタス腐敗病についても同様であり、特に降雨前日や直後の散布が有効であると考えられている (全国農村教育協会、2002)。従ってこれらの薬剤を予防的に散布することで被害の抑制効果が期待できる。ただし、*P. cichorii* には銅剤耐性菌やストレプトマイシン耐性菌の出現が報告されており (松崎 1989; 小木曾、清水 1991)、薬剤の過剰な散布には注意を要する。

5.3 *Phyllogen* がファイトプラズマ感染時に果たす役割

本研究の第3章、第4章から、*Phyllogen* は様々な植物に対してAクラス、EクラスのMTFの分解を誘導することで、花器官の形態異常を誘導することが示唆された。ファイトプラズマは篩部局在性の細菌であり、植物体内において感染可能な部位は制限されている (Maejima *et al.*, 2014) が、感染時に生じる葉や茎へと転換した花器官では、篩部が形成されファイトプラズマが感染することが報告されている (Arashida *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2011)。従って、*Phyllogen* による花器官への形態異常の誘導は、ある植物個体内におけるファイトプラズマの感染可能部位を増やし、ファイトプラズマの総蓄積量を上昇させると考えられる。興味深いことに、Suらは葉化した花器官には周辺の葉よりも多くのファイトプラズマが感染していることを示してお

り、ファイトプラズマの増殖に好適な状態へと宿主環境が制御されているのではないかと考察している (Su *et al.*, 2011)。以上を考えると、*phyllogen* は花器官の形態異常誘導を介して、ファイトプラズマ感染を利していると判断出来る。これまでに、日本では 86 種 (うち花き類は 23 種)、世界では数百種の植物にファイトプラズマの感染が報告されている (Hogenhout *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 2013)。*phyllogen* が様々な植物に対して機能を有することは、ファイトプラズマがこのように広い宿主に適応する上で有益だろう。

興味深いことに、*phyllogen* が形態異常誘導以外にも機能を有していることを示唆する知見が、近年報告されている。Orlovskis and Hogenhout (2016) は、*phyllogen* の 1 つである SAP54 の形質転換シロイヌナズナでは、媒介昆虫をより誘引する様になることを報告している。また同氏らは、MTF 変異により花器官が変異した植物体では昆虫誘引能が上昇しなかったことや、栄養成長段階の SAP54 形質転換シロイヌナズナにおいても昆虫誘引能が上昇したことから、この誘引能は花器官の形態異常誘導とは独立の現象であると考察している。ファイトプラズマが昆虫媒介性の病原細菌であることを考えると、形態異常誘導と同様に昆虫誘引も重要な機能である。従って、*phyllogen* による昆虫誘引がどのようなメカニズムで生じるのか、また形態異常誘導能と同じく様々な植物に対して有効なのかを解析する必要があるだろう。

ファイトプラズマの有する病原性因子として、*phyllogen* の他にこれまで 2 種類の分泌タンパク質 (TENGU、SAP11) が同定されている。TENGU は植物体の萎縮や叢生 (枝分かれの激化) を誘導し (Hoshi *et al.*, 2009)、SAP11 は萎縮症状を誘導する (Sugio *et al.*, 2011)。興味深いことに、これらの病原性因子は全て広範な植物に対して機能することが示唆されている。すなわち、本研究から *phyllogen* は少なくとも 3 科 (アブラナ科・ナス科・キク科) で機能することが確かめられている。同様に TENGU は *A. thaliana* (アブラナ科)、*N. benthamiana* (ナス科) で機能することが知られている (Hoshi *et al.*, 2009; Sugawara *et al.*, 2013; Minato *et al.*,

2015)。加えて、SAP11 は *A. thaliana* (アブラナ科)、*N. benthamiana* (ナス科) で機能する他、リンゴ (バラ科) においても機能する可能性が示唆されている (Sugio *et al.*, 2011; Sugio *et al.*, 2014; Janik *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016)。ファイトプラズマは、このように多くの植物に対して機能する病原性因子を多数持つことで、広範な植物に適応し感染効率を高めているのかもしれない。ファイトプラズマには、これらの病原性因子以外にも多くの分泌タンパク質が存在することが予想されており (Hoshi *et al.*, 2009)、それらのタンパク質がどれだけの宿主内で、どのように機能するかを解析することはファイトプラズマの宿主適応機構を解明するうえで重要となるだろう。

5.4 *phyllogen* の品種改良への利用の可能性

花器官形態の変異した花は独特の外見となるため、その新奇性から園芸的に珍重されることがある。有名な事例は、雄蕊や雌蕊が花弁に変異する”八重咲き”である。また、葉化や緑化した植物個体も珍しい品種として市場に流通することがある。例えば、サクラソウ (*Primula vulgaris*) では、萼が葉に変化した”Jack in the green”品種が複数作出されている他、コウシンバラ (*Rosa chinensis*) には全ての花器官が葉化した”*viridiflora*”品種が知られている。ファイトプラズマ感染植物に見られる花器官の形態異常も例外ではなく、過去には感染植物が珍重されていた事例も存在する (Wang and Maramorosch 1988; Strauss 2009)。しかし、周辺作物への影響を考えると、感染植物を品種として用いるのは当然ながら望ましくない。本研究によって、*phyllogen* は、標的 MTF の分解誘導を介して、花器官の形態異常を誘導することが示された (第3章)。また、*phyllogen* は、種を問わず様々な植物に対して機能することが示唆された (第4章)。従って、*phyllogen* を様々な花き類で発現することで、ファイトプラズマを感染させることなく、新たな形状の花を持った個体が作出できる可能性があるだろう。非食用作物である花き類にお

いては既に、遺伝子組み換え技術を用いて作出された「青いバラ（サントリーフラワーズ）」等の品種が市場に流通しており、**phyllogen** がそれらに続く新品種の作出に寄与出来る可能性は十分にある。

以上を要するに、本研究で明らかとした知見は、コスモスに生じた葉枯症状の病原細菌である *Pseudomonas cihorii* や、様々な花き類に花器官の形態異常を誘導するファイトプラズマの病原性や感染環を理解し、病害の防除技術や新たな花の形質を開発する上で重要である。本研究が、今後これら細菌病に関する更なる病原性メカニズムの解明やその農業現場における利用に向けた基盤となれば幸いである。

摘要

花き類における細菌病は、植物体の生育を阻害するだけでなく、外観を損ない商品価値を低下させるために大きな問題となり得る。病害の原因となる細菌（病原細菌）は、種によって伝染環、宿主範囲などが異なるため、病原細菌に応じた適切な防除法を構築する必要がある。従って病害発生時には、細菌の病原性試験を介して病原細菌を正確に同定する必要がある。また細菌の性状をさらに把握するには、それらの細菌の病原性機構を解明することが重要であり、防除戦略の構築に向けた基盤ともなり得る。以上を踏まえ、本研究ではコスモスに発生した新規細菌病の病原細菌の同定を行った。また、複数の花き類に花器官形態の異常を誘導する病原細菌ファイトプラズマについて、その病原性因子の機能を解析した。

1. 葉枯症状を示すコスモスより分離された細菌の病原性解析

コスモス (*Cosmos bipinnatus* Cav.) はメキシコ原産のキク科植物であり、日本では景観植物として頻りに利用される。2012年に東京大学植物病院に葉枯症状を呈するコスモスの診断依頼があり、検体の観察から細菌による病害と推定された。日本では細菌によるコスモスの葉枯症状は報告されていないため、被害部から細菌を分離し、病原性を解析した。被害部からは、LAB-LEMCO 寒天平板培地に淡黄色の集落を形成する細菌が優占的に分離された。病斑部ごとに単一の集落を再度分離し、計4分離菌株 (UTLPPB120801~ UTLPPB120804) を得た。簡易分類試験の結果から、分離菌株はいずれも様々な植物に病原性を示すことが知られる植物病原細菌 *Pseudomonas cichorii* である可能性が示唆された。分離菌株が病原細菌であるかを検証するため、コスモスに対する病原性を解析した。分離菌株をコスモスに噴霧接種したところ、葉枯症状が再現され、罹病部からは接種細菌と同様の集落を形成する細菌が高率に分離された。

従って、分離菌株はコスモスに対して病原性を有し、本病害の病原細菌であると考えられた。

さらに、コスモス以外の植物（レタス、メボウキ、トマト、ゴマ、アスター）に対する分離菌株の病原性を試験したところ、いずれの植物種にも病原性を有していた。

最後に分離菌株の種の分類を目的とし、その細菌学的性質の試験を行った。分離菌株の糖利用能や酵素活性などの 43 項目の細菌学的性状を試験し既報の *P. cichorii* 株と比較したところ、ほぼ全ての項目で性状が一致していた。加えて、16S rDNA の部分配列を用いた系統解析を行ったところ、分離菌株の配列は既報の *P. cichorii* と共に、他の *Pseudomonas* 属細菌とは独立した同一のクレードを形成した。以上の結果より分離菌株を *P. cichorii* と分類した。*P. cichorii* は多犯性の植物病原細菌であり、日本において複数のキク科植物に病害を引き起こすことが報告されているほか、実験的にはコスモスに病原性を持つことが過去に報告されている。しかし、日本におけるコスモス栽培において *P. cichorii* による病害の発生が確認されたのは初めてである。本病害が *P. cichorii* によることが明らかになったことから、本病害の防除には他作物における *P. cichorii* の防除法が有効であると考えられた。

2. *phyllogen* による葉化誘導機構

ファイトプラズマは、花き類を含めた様々な植物に感染する篩部局在性の植物病原細菌である。ファイトプラズマは感染植物に様々な症状を引き起こすが、特徴的なものとして花器官の葉化や突き抜け（雌蕊の茎への変化）といった形態異常の誘導がある。これまで、ファイトプラズマに保存された分泌タンパク質 Phyllody-inducing gene family (*phyllogen*) が、シロイヌナズナに花器官の形態異常を誘導することが知られているが、その機能は明らかでない。植物の花器官分化では、A、B、C、E の 4 クラスに分類される MADS-box 転写因子 (MADS transcription factor; MTF) が器官特異的な組み合わせで機能する (ABCE モデル)。A、E ク

ラスの MTF が欠失したシロイヌナズナでは、*phyllogen* 形質転換シロイヌナズナと同様の花器官の変異が観察されるため、*phyllogen* がこれらの機能を阻害している可能性が考えられた。

そこで本研究では、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma wild line; OY-W) が持つ *phyllogen* (PHYL1_{OY}) と、シロイヌナズナの MTF である APETALA1 (AP1; クラス A)、SEPALLATA3 (SEP3; クラス E) の相互作用を解析した。Yeast two hybrid 法により、PHYL1_{OY} は両 MTF と結合することが示された。さらに、これらの MTF から成る多量体の形成が PHYL1_{OY} によって阻害されることが、*in planta* で示された。また、PHYL1_{OY} を形質転換したシロイヌナズナにおいては、AP1 や SEP3 による遺伝子の発現制御が阻害されていた。以上のことから、*phyllogen* は A クラス、E クラスの MTF の機能を阻害し、シロイヌナズナに花器官の形態を誘導すると考えられた。

phyllogen による標的 MTF の機能阻害機構を更に解析するため、YFP を付加した標的 MTF を *Nicotiana benthamiana* 葉において PHYL1_{OY} と共に一過的に発現させ、YFP 蛍光を観察した。その結果、YFP 融合 MTF の蛍光は PHYL1_{OY} 存在時には著しく減衰していた。このことから PHYL1_{OY} によって MTF の蓄積量が低下したと考えられた。従って、PHYL1_{OY} 存在下でこれらの MTF は分解へと誘導されるものと考えられ、分解誘導経路のさらなる解析を行った。その結果、植物細胞内の主要なタンパク質分解経路であるプロテアソームを阻害した場合に、PHYL1_{OY} による YFP-SEP3 の分解誘導が抑制された。以上より、*phyllogen* は標的 MTF のプロテアソームを介した分解を誘導し、花器官の形態異常を引き起こすと考えられた。

3. 様々な花き類に対する *phyllogen* の機能の検証

ファイトプラズマは双子葉植物・単子葉植物を含めた被子植物全般に感染し、異常な花器官の形成を誘導する。そこで、*phyllogen* がシロイヌナズナと同様に様々な植物においても、花器官の形態異常を誘導するかを解析した。広範な植物に感染するリンゴ小球形潜在ウイルス (apple latent spherical virus ; ALSV) をベクターとして、PHYL1_{oY}、または peanut witches' broom phytoplasma (PnWB) の *phyllogen* (PHYL1_{PnWB}) をナス科植物のペチュニアで発現させた。その結果、PHYL1_{oY}、PHYL1_{PnWB} を発現させたペチュニアでは全ての花器官に異常が生じ、*phyllogen* はペチュニアに対しても花器官形態の異常を誘導すると考えられた。また、これらのペチュニアの形態や花芽における MTF 遺伝子の発現様式は、E クラス MTF 変異体のものに類似しており、*phyllogen* による E クラス MTF の機能の阻害が形態異常の誘導に大きく寄与していることが示唆された。次いで、PHYL1_{PnWB} をキク科のヒマワリ、アスターに同様の手法で発現させたところ、いずれの植物にも花器官の形態異常が誘導された。加えて、PHYL1_{oY} は、ペチュニア、及びキク (キク科) の A クラス、E クラスの MTF と相互作用し、その分解を誘導することが確かめられた。以上のことから、*phyllogen* は少なくともアブラナ科 (シロイヌナズナ)、ナス科 (ペチュニア)、キク科 (ヒマワリ・アスター) の双子葉植物に対して活性を有することが示された。さらに、PHYL1_{oY} は単子葉植物であるユリ (ユリ科) の A クラス、E クラスの MTF も、上述の MTF と同様に標的とすることが可能であった。以上の結果から、*phyllogen* は広範な植物の A クラス、E クラス MTF を標的とし、それらの分解を介して、広く植物に花器官の形態異常を誘導可能であることが示唆された。

以上を要するに、本研究では、コスモスに生じた葉枯症状が *Pseudomonas cichorii* による細菌病であると同定した。また、ファイトプラズマの病原性因子 *phyllogen* が、様々な植物の A ク

ラス、EクラスのMTFを標的とし、その分解を誘導することで植物の花器官に形態異常を誘導することを示した。以上の解析は、細菌の病原性機構を理解し、病害の防除戦略を構築する上で基盤となる知見であると考えられる。

謝辞

本研究は、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、植物病理学研究室において行ったものであり、指導教員の難波成任教授には懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました。この場を借りて、心より御礼申し上げます。また、学部学生の時から 6 年
の間、時に厳しく、時に優しく、そして常に親身に指導していただいたことにも、重ねて感謝
と尊敬の念を申し上げます。本研究の遂行に用いた apple latent spherical virus 由来のウイル
スベクターを提供していただいた、岩手大学農学部農業生命科学科 植物病理研究室内の吉川信幸
教授に衷心より感謝の意を表します。また、研究の遂行、および本博士論文の編集にあたり非
常に有益なご助言をいただいた、大島研郎教授（法政大学生命科学部応用植物科学科植物医科
学専修 植物医科学ゲノム研究室、元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）、橋本光司教授（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 植物医科学研究室）、前島健作助教（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）に、深く御礼申し上げます。さらに、日頃より丁寧かつ貴重なご指導・
ご助言をしていただいた山次康幸准教授（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 植物病理学研究室）、根津修研究員（同上）、煉谷裕太郎研究員（同上）、姫野未紗子
研究員（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）に心よ
り御礼申し上げます。また、日々ともに研究生活を過ごし、貴重な議論、助言をしていただ
くとともに実験の遂行に多大なる貢献をしていただきました両研究室所属の皆様、厚く感謝の
意を申し上げます。特に同時期に研究室に所属した桂馬拓也・二條貴通両氏には、研究を含め
た様々な場面で貴重な助言をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。最後に、研
究生活を過ごすに当たり様々な面から応援していただいた両親・祖父母および大学内外の友人
に、深く感謝申し上げます。

引用文献

Acri-Nunes-Miranda, R., & Mondragón-Palomino, M. (2014). Expression of paralogous *SEP*, *FUL*, *AG*-and *STK*-like MADS-box genes in wild-type and peloric *Phalaenopsis* flowers. *Frontiers in Plant Science*, 5, doi: 10.3389/fpls.2014.00076.

Adam, H., Jouannic, S., Orieux, Y., Morcillo, F., Richaud, F., Duval, Y., & Tregear, J. W. (2007). Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1245-1259.

Akhtar, K. P., Sarwar, G., Dickinson, M., Ahmad, M., Haq, M. A., Hameed, S., & Iqbal, M. J. (2009). Sesame phyllody disease: its symptomatology, etiology, and transmission in Pakistan. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33, 477-486.

Angenent, G. C., Franken, J., Busscher, M., Weiss, D., & Tunen, A. J. (1994). Co-suppression of the petunia homeotic gene *fbp2* affects the identity of the generative meristem. *The Plant Journal*, 5, 33-44.

Arashida, R., Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H. Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S. (2008). 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.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188, 3682-3696.

Bazzi, C., Piazza, C., & Mazzucchi, U. (1984). Survival in the field of *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, causal agent of lettuce varnish spot. *Journal of Phytopathology*, 111, 251-258.

Bertaccini, A., & Duduk, B. (2010). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of

recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 355-378.

Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M., & Smyth, D. R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*, 119, 721-743.

Bull, C. T., de Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le, Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., & Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 92, 551-592

Bull, C. T., de Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le, Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., & Takikawa, Y. (2012). List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *Journal of Plant Pathology* 94, 21-27.

Cettul, E., & Firrao, G. (2011). Development of phytoplasma-induced flower symptoms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76, 204-211.

Chaturvedi, Y., Rao, G., Tiwari, A., Duduk, B., & Bertaccini, A. (2010). Phytoplasma on ornamentals: detection, diversity and management. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 45, 31-69.

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10, 526-535.

Coen, E. S., & Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353, 31-37.

Cui, R., Han, J., Zhao, S., Su, K., Wu, F., Du, X., Xu, Q., Chong, K., Theossen, G., & Meng, Z. (2010). Functional conservation and diversification of class E floral homeotic genes in rice (*Oryza sativa*). *The Plant Journal*, 61, 767-781.

Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R., & Udvardi, M. K. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity

reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, 38, 366-379.

Davies, B., Cartolano, M., & Schwarz-Sommer, Z. (2006). Flower development: the *Antirrhinum* perspective. *Advances in Botanical Research*, 44, 279-321.

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, 14, 1935-1940.

Dreni, L., & Kater, M. M. (2014). MADS reloaded: evolution of the *AGAMOUS* subfamily genes. *New Phytologist*, 201, 717-732.

Dye, D. W., Bradbury, J., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., & Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59, 153-168.

Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45, 616-629.

Ember, I., Acs, Z., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., & Kolber, M. (2011). Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 367-377.

Ferrario, S., Busscher, J., Franken, J., Gerats, T., Vandenbussche, M., Angenent, G. C., & Immink, R. G. (2004). Ectopic expression of the petunia MADS box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a dominant-negative manner. *The Plant Cell*, 16, 1490-1505.

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

Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 240, 1149-1165.

Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends in Plant Science*, 10, 251-256.

後藤正夫 (1990) 植物細菌病学概論 pp. 153-187 養賢堂 東京.

後藤正夫、岡部徳夫 (1954) *Pseud. cichorii* (SWINGLE) STAPP によるヒマワリの葉枯性細菌病について 静岡大学農学部研究報告 4:7

後藤正夫、瀧川雄一 (1984a) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (1) 植物防疫 38:339-344

後藤正夫、瀧川雄一 (1984b) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (2) 植物防疫 38:385-389

後藤正夫、瀧川雄一 (1984c) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (3) 植物防疫 38:432-478

後藤正夫、瀧川雄一 (1984d) 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べかた (4) 植物防疫 38:479-484

Govan, J. R., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*, 60, 539-574.

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

Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., & Kater, M. M. (2008). *AGAMOUS-LIKE24* and *SHORT VEGETATIVE PHASE* determine floral meristem identity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 56, 891-902.

Grogan, R. G., Misaghi, I. J., Kimble, K. A., Greathead, A. S., Ririe, D., & Bardin, R. (1977). Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. *Phytopathology*, 67, 957-960.

Guzmán, F., Giolitti, F., Fernández, F., Nome, C., Lenardon, S., & Conci, L. (2014). Identification and molecular characterization of a phytoplasma associated with sunflower in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 679-683.

He, S. Y., Nomura, K., & Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1694, 181-206.

Heijmans, K., Ament, K., Rijpkema, A. S., Zethof, J., Wolters-Arts, M., Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2012a). Redefining C and D in the petunia ABC. *The Plant Cell*, 24, 2305-2317.

Heijmans, K., Morel, P., & Vandenbussche, M. (2012b). MADS-box genes and floral development: the dark side. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/ers233.

Hikichi, Y., Saito, A., & Suzuki, K. (1996). Infection sites of *Pseudomonas cichorii* into head leaf of lettuce. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62:125-129

Hikichi, Y., Wali, U. M., Ohnishi, K., & Kiba, A. (2013). Mechanism of disease development caused by a multihost plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. *Journal of General Plant Pathology*, 79, 379-389.

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. *The Plant Journal*, 67, 971-979.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 403-423.

Hojo, H., Koyanagi, M., Tanaka, M., Kajihara, S., Ohnishi, K., Kiba, A., & Hikichi, Y. (2008). The *hrp* genes of *Pseudomonas cichorii* are essential for pathogenicity on eggplant but not on lettuce. *Microbiology*, 154, 2920-2928.

Honma, T., & Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 409, 525-529.

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S., & Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2, 208-218.

堀江博道、合田健二（1996）関東東山地域における花き類の薬害事例 関東東山病害虫研究会報 43:273-277

堀江博道、萩谷俊一、中澤靖彦、宗和弘（2000）関東東山地域における花き類の薬害事例（Ⅱ） 関東東山病害虫研究会報 47:173-178

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 6416-6421.

堀田光生、土屋健一（2012）青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 微生物遺伝資源利用マニュアル（12）改訂第2版 pp. 1-32 農業生物資源研究所 茨城.

Hu, C. D., Chinenov, Y., & Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9, 789-798.

市川和規 (2006) 花き病害の生物防除の現状と展望 植物防疫 60:272-275

市村一雄 (2013) 花き流通最新の動向 花き研究所研究報告 13:1-15

Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H., & Yoshikawa, N. (2009). *Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology*, 386, 407-416.

今西秀雄 (2012) 花卉園芸学 -新訂版- pp. 1-30 川島書店 東京

Immink, R. G., Ferrario, S., Busscher-Lange, J., Kooiker, M., Busscher, M., & Angenent, G. C. (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Molecular Genetics and Genomics*, 268, 598-606.

Immink, R. G., Hannapel, D. J., Ferrario, S., Busscher, M., Franken, J., Campagne, M. L., & Angenent, G. C. (1999). A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development*, 126, 5117-5126.

Immink, R. G., Gadella, T. W., Ferrario, S., Busscher, M., & Angenent, G. C. (2002). Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 2416-2421.

Immink, R. G., Tonaco, I. A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., Borst, J. W., & Angenent, G. C. (2009). SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology*, 10, R24.

Immink, R. G., Posé, D., Ferrario, S., Ott, F., Kaufmann, K., Valentim, F. L., de Folter, S.,

van del Wal, F., van Dijk, A. D. J., Schmid, M., & Angenent, G. C. (2012). Characterization of SOC1's central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiology*, 160, 433-449.

Ingvarsdén, C., & Veierskov, B. (2001). Ubiquitin- and proteasome- dependent proteolysis in plants. *Physiologia Plantarum*, 112, 451-459.

井上興、鍛冶原寛、村本和之、吉岡陸人、澤田宏之 (2013) オクラ葉枯細菌病菌 (*Pseudomonas cichorii*) によって白オクラに発生した果実腐敗症状 日本植物病理学会報 79:99-104

IRPCM (2004). '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1243-1255.

Janik, K., Mithöfer, A., Raffener, M., Stellmach, H., Hause, B., & Schlink, K. (2016). An effector of apple proliferation phytoplasma targets TCP transcription factors -a generalized virulence strategy of phytoplasma?. *Molecular Plant Pathology*, doi: 10.1111/mpp.12409.

Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387-405.

Johansen, L. K., & Carrington, J. C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology*, 126, 930-938.

Jomantiene, R., Zhao, Y., & Davis, R. E. (2007). Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA and Cell Biology*, 26, 557-564.

Kahana, C. (2009). Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2479-2488.

Kamińska, M., & Dziekanowska, D. (2002). Molecular evidence for the presence of aster

yellows-related phytoplasmas in lilies with leaf scorch and flower virescence. *Journal of Phytopathology*, 150, 90-93.

兼平勉、堀越紀夫、山北祐子、篠原 正行 (1996) アジサイ葉化病(新称)の発生と phytoplasma の検出 *日本植物病理学会報* 62:537-540

Kater, M. M., Colombo, L., Franken, J., Busscher, M., Masiero, S., Campagne, M. M. V. L., & Angenent, G. C. (1998). Multiple *AGAMOUS* homologs from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *The Plant Cell*, 10, 171-182.

菊地郁、金浜耕基 (2013) 総論. 鑑賞園芸学 pp. 1-17 文永堂出版 東京

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*, 9, 306.

久保花、中山沙奈恵、篠原弘亮、根岸寛光、陶山一雄 (2009) オオキンケイギク斑点細菌病 (新称) *日本植物病理学会報* 50:421

Kubota, S., & Kanno, A. (2015). Analysis of the floral MADS-box genes from monocotyledonous Trilliaceae species indicates the involvement of *SEPALLATA3*-like genes in sepal-petal differentiation. *Plant Science* 241, 266-276.

川久保幸雄、後藤正雄 (1987) キク斑点細菌病 (新称) の発生について *日本植物病理学会報* 53:404

河原林主一、陶山一雄、井上喜雄、藤井溥 (1984) *Pseudomonas cichorii* によるガーベラの斑点細菌病 (新称) *日本植物病理学会報* 50:421

Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470-489.

Li, C., Sasaki, N., Isogai, M., & Yoshikawa, N. (2004). Stable expression of foreign proteins

in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Archives of Virology*, 149, 1541-1558.

Li, C., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K., & Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family *Comoviridae*. *Journal of General Virology*, 81, 541-547.

Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C., & Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell*, 16, 711-722.

Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T., & Yu, H. (2007). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, 134, 1901-1910.

MacLean, A. M., Orlovskis, Z., Kowitwanich, K., Zdziarska, A. M., Angenent, G. C., Immink, R. G., & Hogenhout, S. A. (2014). Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biology*, 12, e1001835.

MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M., & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 157, 831-841.

Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D'Hauw, M., Mares, G., van Montagu, M., & Gerats, T. (2001). *Petunia* *Ap2*-like genes and their role in flower and seed development. *The Plant Cell*, 13, 229-244.

前島健作、岩井 涼、藤田尚子、姫野未紗子、山次 康幸、大島研郎、難波成任 (2013) 葉化症状を引き起こすファイトプラズマのエフェクターについて 日本植物病理学会報 79:36

Maejima, K., Oshima, K., & Namba, S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 210-221.

松崎正文、畔上耕児、大畑貫一（1981）レタスを侵す病原細菌におけるストレプトマイシン耐性菌の存在と分布 日本植物病理学会報 47:297-300

眞山滋志（2010）植物病理学とは. 植物病理学 pp. 1-9 文永堂出版 東京.

Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, K., Kamiya, Y., & Namba, S. (2014). The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports*, 4, doi: 10.1038/srep07399.

三宅律幸（2008）関西病虫害研究会報に見る花き病害研究の変遷 関西病虫害研究会報 50:129-131

難波成任（2008）[第1章 植物病と植物医科学 (pp. 1-30) , 第3章 臨床診断技術 (pp. 95-213)] 植物医科学（上）養賢堂 東京.

Ng, M., & Yanofsky, M. F. (2001). Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*. *The Plant Cell*, 13, 739-753.

日本植物病理学会、農業生物資源研究所（2012）日本植物病名目録（第2版）日本植物防疫協会 東京.

Nikel, P. I., Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 368-379.

西山幸司（1978）植物病原細菌簡易同定法の試案 植物防疫 32:283-288

大畑貫一、芹沢拙夫、白田昭（1982）レタス腐敗病菌 *Pseudomonas cichorii* の伝染源 農業技術研究所報告. C, 病理・昆蟲 36:75-80

小木曾秀樹、清水時哉（1999）長野県におけるレタス腐敗病菌の銅耐性およびストレプトマイシン耐性 日本植物病理学会報 65:369-370

Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, 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. *The Plant Cell*, 26, 2168-2183.

奥田誠一、小池賢治、織田真吾 (1976) 新潟県のリンドウてんぐ巢病発生地一帯で見出される各種植物の萎黄叢生病類 第2報 日本植物病理学会報 42:389

Orlovskis, Z., & Hogenhout, S. A. (2016). A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Frontiers in Plant Science*, 7, 885.

Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y., & Namba, S. (2011). Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS One*, 6, e23242.

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. *Nature Genetics*, 36, 27-29.

Oshima, K., Maejima, K., & Namba, S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology* 4:230.

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 405, 200-203.

Pernezny, K., Datnoff, L., & Sommerfeld, M., L. (1994). Brown stem of celery caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Disease*, 78, 917-919.

Pogue, G. P., Lindbo, J. A., Garger, S. J., & Fitzmaurice, W. P. (2002). Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40,

45-74.

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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 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, C. S., Parcy, F., Dumas, R., Nanao, M. & Zubieta, C. (2014). Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26, 3603-3615.

Raj, S. K., Khan, M. S., & Kumar, S. (2007). Molecular identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' associated with little leaf disease of *Chrysanthemum morifolium*. *Australasian Plant Disease Notes*, 2, 21-22.

Raasi, S., & Wolf, D. H. (2007). Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18, 6: 780-791.

Rijkema, A., Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2006a). Genetics of floral development in *Petunia*. *Advances in Botanical Research*, 44, 237-278.

Rijkema, A. S., Royaert, S., Zethof, J., van der Weerden, G., Gerats, T., & Vandenbussche, M. (2006b). Analysis of the *Petunia TM6* MADS box gene reveals functional divergence within the *DEF/AP3* lineage. *The Plant Cell*, 18, 1819-1832.

Robles, P., & Pelaz, S. (2004). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*, 49, 633-643.

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

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.

澤柳利実、鄭熙英、小松健、田中穰、陶山一雄、宇垣正志、難波成任 (2002) キバナコスモス萎黄症状株より見いだされたファイトプラズマ(*Candidatus Phytoplasma* sp. 16S-group I, AY-sg. (yellow cosmos))について 日本植物病理学会報 68:258

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18, 1121-1133.

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. *Journal of General Virology*, 90, 1014-1024.

Shan, H., Zhang, N., Liu, C., Xu, G., Zhang, J., Chen, Z., & Kong, H. (2007). Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the *API/SQUA* subfamily of plant MADS-box genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 26-41.

Sharma, M., & Pandey, G. K. (2015). DUBs: regulation by reversible ubiquitination. *Journal of Molecular Biology & Molecular Imaging*, 2, id1014.

Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & He, S. Y. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468, 400-405.

塩見敏樹、田中穰、柳澤利実、山本伸一、土崎常男、難波成任 (1998) 継代保存中に生じたタマネギ萎黄病ファイトプラズマの病徴変異株 日本植物病理学会報 64:501-505

Silhavy, D., Molnár, A., Luciola, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., & Burgyán, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to

25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal*, 21, 3070-3080.

Sinha, R. C., & Paliwal, Y. C. (1969). Association, development, and growth cycle of mycoplasma-like organisms in plants affected with clover phyllody. *Virology*, 39, 759-767.

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

Soltis, D. E., Chanderbali, A. S., Kim, S., Buzgo, M., & Soltis, P. S. (2007). The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Annals of Botany*, 100, 155-163.

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

Su, Y. T., Chen, J. C., & Lin, C. P. (2011). Phytoplasma-induced floral abnormalities in *Catharanthus roseus* are associated with phytoplasma accumulation and transcript repression of floral organ identity genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 1502-1512.

末永寛子、川口章、佐々木静江、井上幸次、那須英夫 (2007) *Pseudomonas cichorii* によるエンダイブ腐敗病 (新称) の発生 日本植物病理学会報 72:77

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 Physiology*, 162, 2005-2014.

Sugio, A., MacLean, A. M., Grieve, V. M., & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, E1254-E1263.

Sugio, A., MacLean, A. M., & Hogenhout, S. A. (2014). The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP

binding and destabilization. *New Phytologist*, 202, 838-848.

Suzuki, A., Kusumoto, S., Horie, H., & Takikawa, Y. (2002). Bacterial leaf spot of ivy caused by *Xanthomonas campestris* pv. *hederae*. *Journal of General Plant Pathology*, 68, 398-400.

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., & Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 4252-4257.

高橋幸吉 (1991) 細菌病の防除. 作物の細菌病 -診断と防除- pp.67-82 日本植物病疫協会 東京.

瀧川雄一 (2001) 植物病原細菌分類の体系と現状 日本植物病理学会報 67:76-86

竹内純、堀江博道 (2006) 東京都における花き病害の発生実態と対策 植物防疫 60:255-259

Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Bastaki, M. N., Panagiotis F, S., Charova, S. N., Kokkinidis, M., & Panopoulos, N. J. (2010). Playing the “harp”: evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes 1. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 347-370.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Tan, C. M., Li, C. H., Tsao, N. W., Su, L. W., Lu, Y. T., Chang, S. H., Lin, Y. Y., Liou, J. C., Hsieh, L. C., Yu, J. Z., Sheue, C. R., Wang, S. Y., Lee, C. F., & Sheue, C. R. (2016). Phytoplasma SAP11 alters 3-isobutyl-2-methoxypyrazine biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* by suppressing NbOMT1. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erw225.

Tanaka, M., Wali, U. M., Nakayashiki, H., Fukuda, T., Mizumoto, H., Ohnishi, K., Kiba, A., & Hikichi, Y. (2011). Implication of an aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinothricin N-acetyltransferase gene in the diversity of *Pseudomonas cichorii* virulence. *Genes*, 3, 62-80.

Teper-Bamnolker, P., & Samach, A. (2005). The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*, 17, 2661–2675.

Theißen, G., Melzer, R., & Rümpler, F. (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development*, 143, 3259-3271.

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

Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. (2008). Comparative genome analysis of “*Candidatus* Phytoplasma australiense” (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and “*Ca. Phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190, 3979-3991.

Tsuchimoto, S., van der Krol, A. R., & Chua, N. H. (1993). Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic petunia phenocopies the petunia *blind* mutant. *The Plant Cell*, 5, 843-853.

土屋行夫、藤井溥、家村浩海 (1976) *Pseudomonas* spp. によるレタスの病害について 日本植物病理学会報 42:365

津田新哉、佐野輝男 (2014) 近年の日本農業の脅威となる外来侵入植物ウイルス・ウイロイド 日本植物病理学会報 80:134-142

鶴巻直耕、小島綾子、兼橋和央、澤柳利実、海老原克介、渡邊照和、植松清次、根岸寛光、松山宣明、陶山一雄 (2005) キンセンカ腐敗症の発生 日本植物病理学会報 71:289-290

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327-338.

植松清次 (2006) 我が国の花き施設栽培における環境保全型病害防除技術の開発 植物防疫 60:268-271

植松清次 (2011) 花き生産における農薬低減に向けた病害防除技術 関東東山病害虫研究会報
58:1-7

植松清次 (2012) 花き類,野菜の病害の分類・同定と防除に関する研究 日本植物病理学会報
78:149-151

Vandenbussche, M., Zethof, J., Souer, E., Koes, R., Tornielli, G. B., Pezzotti, M., Ferrario, S., Angenent, G., C. & Gerats, T. (2003). Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require *SEPALLATA*-like MADS box genes in petunia. *The Plant Cell*, 15, 2680-2693.

Vandenbussche, M., Zethof, J., Royaert, S., Weterings, K., & Gerats, T. (2004). The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *The Plant Cell*, 16, 741-754.

van der Krol, A. R., Brunelle, A., Tsuchimoto, S., & Chua, N. H. (1993). Functional analysis of petunia floral homeotic MADS box gene *pMADS1*. *Genes and Development*, 7, 1214-1228.

Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., & Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*, 40, 428-438.

Walsh, C. K., & Sadanandom, A. (2014). Ubiquitin chain topology in plant cell signaling: a new facet to an evergreen story. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2014.00122

Wang, F., & Deng, X. W. (2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Research*, 21, 1286-1294.

Wang, M. Q., & Maramorosch, K. (1988). Earliest historical record of a tree mycoplasma disease: Beneficial effect of mycoplasma-like organisms on peonies. In: Maramorosch K,

Raychaudhuri SP, eds. *Mycoplasma diseases of crops*. Heidelberg: Springer, 349-356.

Wang, P., Liao, H., Zhang, W., Yu, X., Zhang, R., Shan, H., Duan, X., Yao, X., & Kong, H. (2015). Flexibility in the structure of spiral flowers and its underlying mechanisms. *Nature Plants*, 2, 15188.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., & Truper, H., G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 463-464.

Wu, M. F., Sang, Y., Bezhani, S., Yamaguchi, N., Han, S. K., Li, Z., Su, Y., Slewinski, T. L., & Wagner, D. (2012). SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 3576-3581.

Yang, C. Y., Huang, Y. H., Lin, C. P., Lin, Y. Y., Hsu, H. C., Wang, C. N., Liu, L. Y., Shen B. N., & Lin, S. S. (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 Physiology*, 168, 1702-1716.

Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T., & Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Molecular Biology*, 75, 193-204.

Yamaji Y., Maejima, K., Komatsu, K., Shiraishi, T., Okano, Y., Himeno, M., Sugawara, K., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Hashimoto, M., & Namba, S. (2012). Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *The Plant Cell*, 24, 778–793.

八代田英樹、村田茂穂 (2012) 酵母からヒトまでのプロテアソームの構造と機能 *生化学* 84:409-415.

Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 755-764.

Young, J. M., Bradbury, J. F., Davis, R. E., Dickey, R. S., Ercolani, G. L., Hayward, A. C., & Vidaver, A. K. (1991). Nomenclatural revisions of plant pathogenic bacteria and list of names 1980-1988. *Review of Plant Pathology*, 70, 211-221.

Yu, H., & Goh, C. J. (2000). Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. *Plant Physiology*, 123, 1325-1336.

Zahn, L. M., Kong, H., Leebens-Mack, J. H., Kim, S., Soltis, P. S., Landherr, L. L., Soltis, D. E., de Pamphilis, C. W., & Ma, H. (2005a). The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes. *Genetics*, 169, 2209-2223.

Zahn, L. M., Leebens-Mack, J., Ma, H., & Theissen, G., (2005b). To B or not to B a flower: the role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms. *Journal of Heredity*, 96, 225-240.

全国農村教育協会 (2002) [第 1 章 作物の細菌病 -診断と病原体の同定- (pp. 21-28) , 第 4 章 レタス腐敗病 (pp. 61-67)] 野菜・果樹の細菌性病害 武田薬品工業 東京.