

博士論文

ファイトプラズマのシグマ因子を介した
転写制御機構に関する研究

二條 貴通

目次

第 1 章 緒論	5
1.1. ファイトプラズマ	5
1.1.1. ファイトプラズマによる病害	5
1.1.2. ファイトプラズマの分類	9
1.1.3. ファイトプラズマのゲノム解析	13
1.2. 細菌の遺伝子発現調節機構	17
1.2.1. 細菌の遺伝子転写機構	17
1.2.2. 細菌の遺伝子発現制御因子	18
1.2.3. ファイトプラズマの遺伝子発現	23
第 2 章 <i>in vitro</i> 転写系を用いたファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD の機能解析	25
2.1. 序文	25
2.1.1. ファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD	25
2.1.2. <i>in vitro</i> 転写系	28
2.2. 材料と方法	30
2.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫	30
2.2.2. RNA 抽出	30
2.2.3. DNase 処理	31
2.2.4. 5' RACE 解析	31
2.2.5. DNA 抽出	35
2.2.6. RpoD 発現ベクターの構築	35

2.2.7. RpoD の大量発現および精製	37
2.2.8. <i>in vitro</i> 転写の鋳型 DNA 作製	38
2.2.9. <i>in vitro</i> 転写系	42
2.2.10. プロモーター配列の予測	42
2.3. 結果	44
2.3.1. <i>rrnB</i> オペロンの転写開始点決定	44
2.3.2. <i>rrnB</i> 推定プロモーター領域を用いた <i>in vitro</i> 転写解析	46
2.3.3. RpoD が認識する <i>rrnB</i> プロモーター配列の特定	49
2.3.4. RpoD により転写制御されるハウスキーピング遺伝子の解析	52
2.3.5. RpoD により転写制御される宿主相互作用因子の解析	54
2.3.6. RpoD 共通プロモーター配列の特定	56
2.3.7. RpoD により転写制御される OY-M 遺伝子の予測	59
2.3.8. 他種ファイトプラズマにおける RpoD 認識プロモーターの予測	66
2.4. 考察	71
2.4.1. RpoD が認識するプロモーター配列	71
2.4.2. RpoD が転写制御を担うファイトプラズマ遺伝子	74
2.4.3. ファイトプラズマ種間における RpoD 認識プロモーターの保存性	75
第 3 章 ファイトプラズマの転写開始点の網羅的解析	77
3.1. 序文	77
3.1.1. 細菌における転写開始点の網羅的解析	77
3.2. 材料と方法	81

3.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物	81
3.2.2. RNA 抽出、DNase 処理	81
3.2.3. cDNA ライブラリーの構築	81
3.2.4. 次世代シーケンス解析	82
3.2.5. 転写開始点の分類	83
3.2.6. オペロンの予測	84
3.2.7. プロモーター配列の予測	84
3.2.8. 配列比較解析	84
3.3. 結果	86
3.3.1. RNA-Seq リードの OY-M ゲノムへのマッピング	86
3.3.2. 転写開始点の特定および分類	89
3.3.3. mTSS に関する解析	90
3.3.4. iTSS に関する解析	97
3.3.5. asTSS に関する解析	104
3.3.6. oTSS に関する解析	107
3.3.7. 転写開始点上流配列を用いた <i>de novo</i> モチーフ解析	112
3.4. 考察	119
3.4.1. ファイトプラズマの網羅的転写開始点決定	119
3.4.2. ファイトプラズマ遺伝子の再アノテーション	120
3.4.3. ファイトプラズマにおける非コード RNA	121
3.4.4. RpoD により転写制御されるファイトプラズマ遺伝子	122

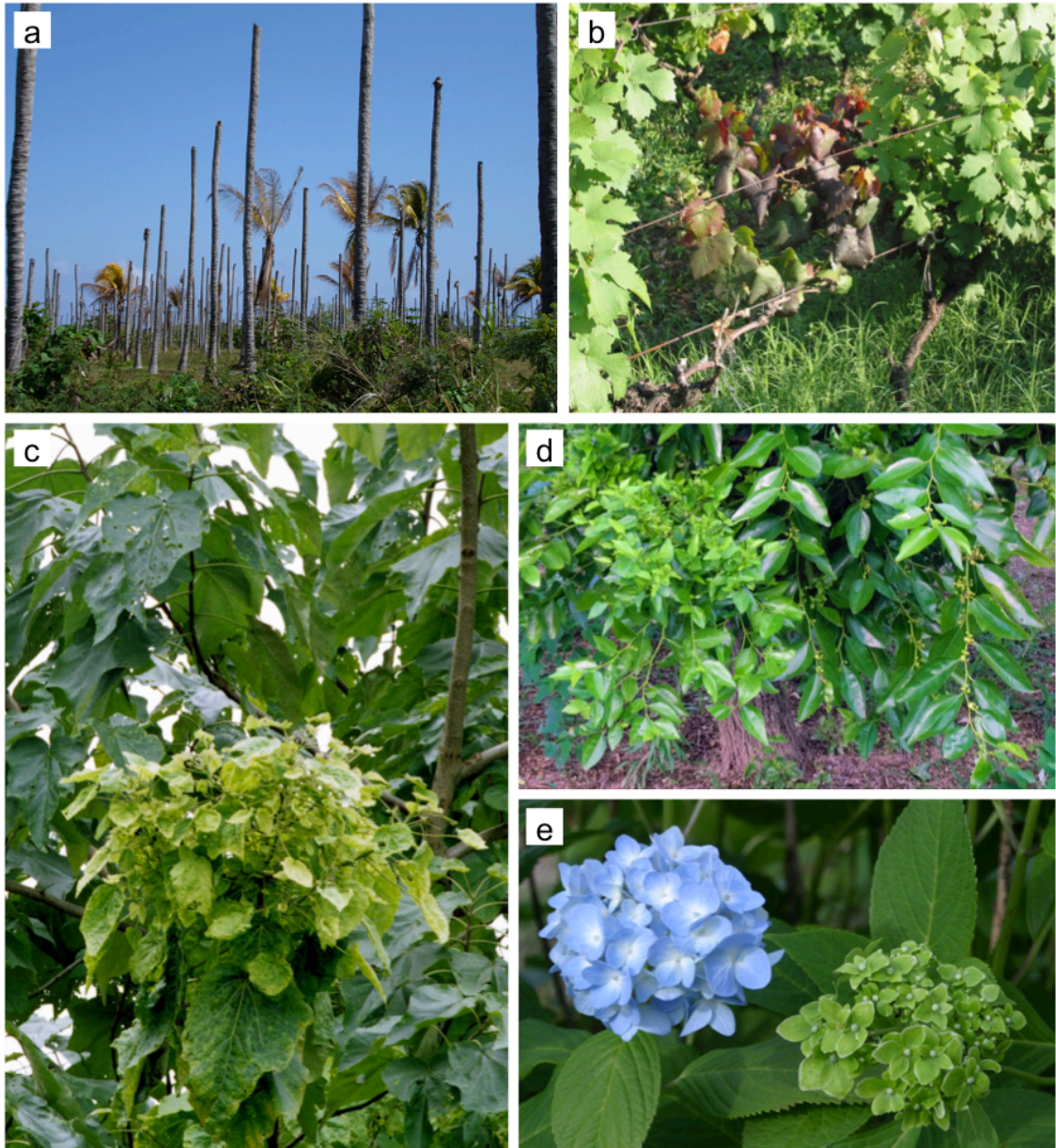
第4章 総合考察	124
4.1. ファイトプラズマにおける RpoD による転写制御機構	124
4.2. ファイトプラズマのホストスイッチングと遺伝子発現調節機構	125
摘要	128
謝辞	132
引用文献	133

第1章 緒論

1.1. ファイトプラズマ

1.1.1. ファイトプラズマによる病害

ファイトプラズマは 700 種以上の多様な植物に感染する昆虫媒介性植物病原細菌の一群である (Bertaccini, 2007; Oshima *et al.*, 2013; Maejima *et al.*, 2014)。ファイトプラズマの感染により、植物には様々な病徴が生じる。植物体の萎縮・黄化や、紫色に変色するパープルトップ、枯死などの激しい全身病徴に加えて、小振りな枝葉が密集して発生する天狗巣症状、花器官の葉化や緑化、花器官から再び栄養成長器官が生じる突き抜けなどのユニークな局部病徴が知られている (図 1.1)。ファイトプラズマは農作物にも広く感染するため、農業生産上、大きな被害を及ぼしている。国内では、1960 年代にファイトプラズマによる黄萎病が国内のイネ栽培面積の 10-50%で発生し、深刻な減収をもたらした (小森、1966; 下山・柴本、1966; 鮫島、1967)。また、1950 年代から 1960 年代にかけて、天狗巣病が琉球諸島のサツマイモ栽培で問題となり、食糧難の原因となった (仲盛・真栄里、1968; 新海、1964)。海外では、ヨーロッパのリンゴ生産において、2001 年にドイツで 3,100 万ユーロ (約 28 億円)、イタリアで 1 億ユーロ (約 110 億円) の損失をもたらした (Strauss, 2009)。また、ココヤシ生産においては、ファイトプラズマによる *lethal yellowing* 病がアフリカ、中米、東南アジアを中心に問題となっており (Gurr *et al.*, 2016)、タンザニア南部では 1965 年以降の 30 年間で、栽培されているココヤシの約 56%が枯死したと報告されている (Mpunami *et al.*, 1999)。

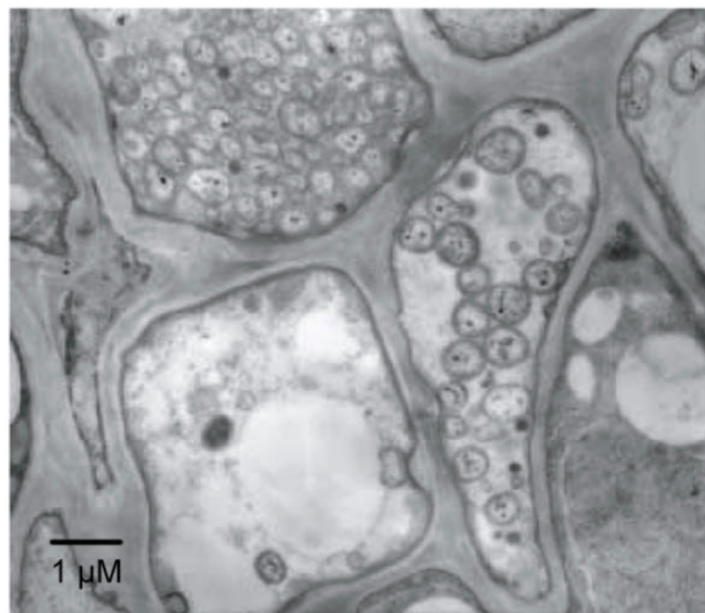


(a. Harrison & Elliott, 2008; b. Bertaccini & Duduk, 2009; c-e. Maejima *et al.*, 2014)

図 1.1 ファイトプラズマ感染により誘導される様々な病徴

a. 黄化、枯死症状を呈するココヤシ。b. 萎縮、パープルトップ症状を呈するブドウ。c. 萎縮、叢生症状を呈するキリ。d. 萎縮、叢生症状を呈するナツメ (左)。e. 葉化症状を呈するアジサイ (右)。

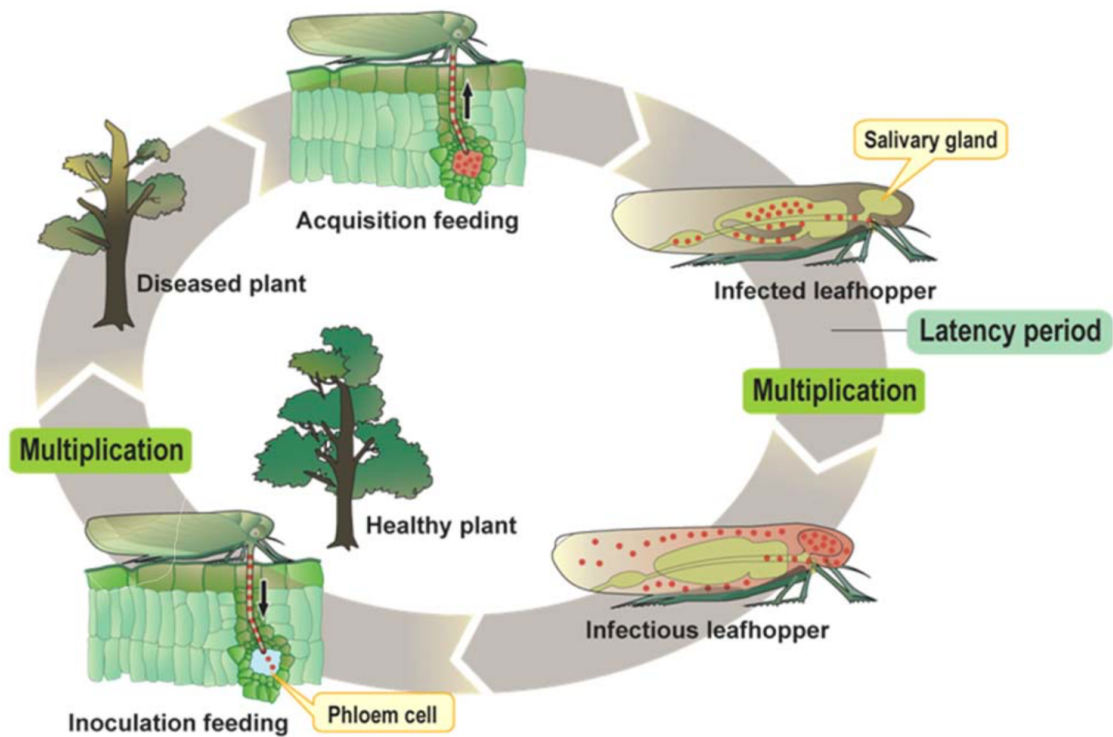
ファイトプラズマの細胞は、細胞壁を持たず細胞膜のみに包まれた 0.08-0.8 μm の不定形である。植物では篩管細胞、篩部伴細胞、篩部柔細胞内に局在する (土居ら、1967; Oshima *et al.*, 2013; 図 1.2)。ヨコバイ、ウンカ、キジラミ等のカメムシ目昆虫により伝搬され、植物への感染を拡大させる (Weintraub & Beanland, 2006)。ファイトプラズマは昆虫の体内でも増殖することが可能であり、これによってファイトプラズマ感染昆虫は永続的にファイトプラズマを伝搬する (Christensen *et al.*, 2005; 図 1.3)。昆虫を介さないファイトプラズマの伝搬様式としては、ファイトプラズマに感染した寄生植物ネナシカズラ (*Cascuta* spp.; ヒルガオ科ネナシカズラ属) 植物が健全植物に寄生することによる伝搬や、接ぎ木等の栄養繁殖による伝搬が知られている (Kaminska & Korbin, 1999)。



(Oshima *et al.*, 2013)

図 1.2 ファイトプラズマの電子顕微鏡写真

ファイトプラズマ感染植物の篩部組織から作製した切片の電子顕微鏡写真。篩部細胞内にファイトプラズマの細胞が観察されている。



(Oshima *et al.*, 2011)

図 1.3 ファイトプラズマの生活環

ファイトプラズマ感染植物を媒介昆虫が吸汁すると、ファイトプラズマは虫体内に侵入、増殖する。ファイトプラズマは媒介昆虫の唾腺細胞に達し、媒介昆虫が健全な宿主植物を吸汁するとファイトプラズマは唾液とともに植物の篩部細胞内に侵入し、植物に感染する。

ファイトプラズマに対しては、これまでにテトラサイクリン系抗生物質を処理することで、その症状を軽減できることが報告されている (石家ら、1967)。しかしながら、処理を止めると再発病する。これまでにファイトプラズマ病の治療薬剤は実用化されておらず、防除は媒介昆虫の駆除に大きく頼っているが、生態系への負荷が大きい上に駆除範囲外から飛来する昆虫による媒介を防ぐことは困難であるため、より特異的な防除法の構築が求められている (Bertaccini & Duduk, 2009)。

1.1.2. ファイトプラズマの分類

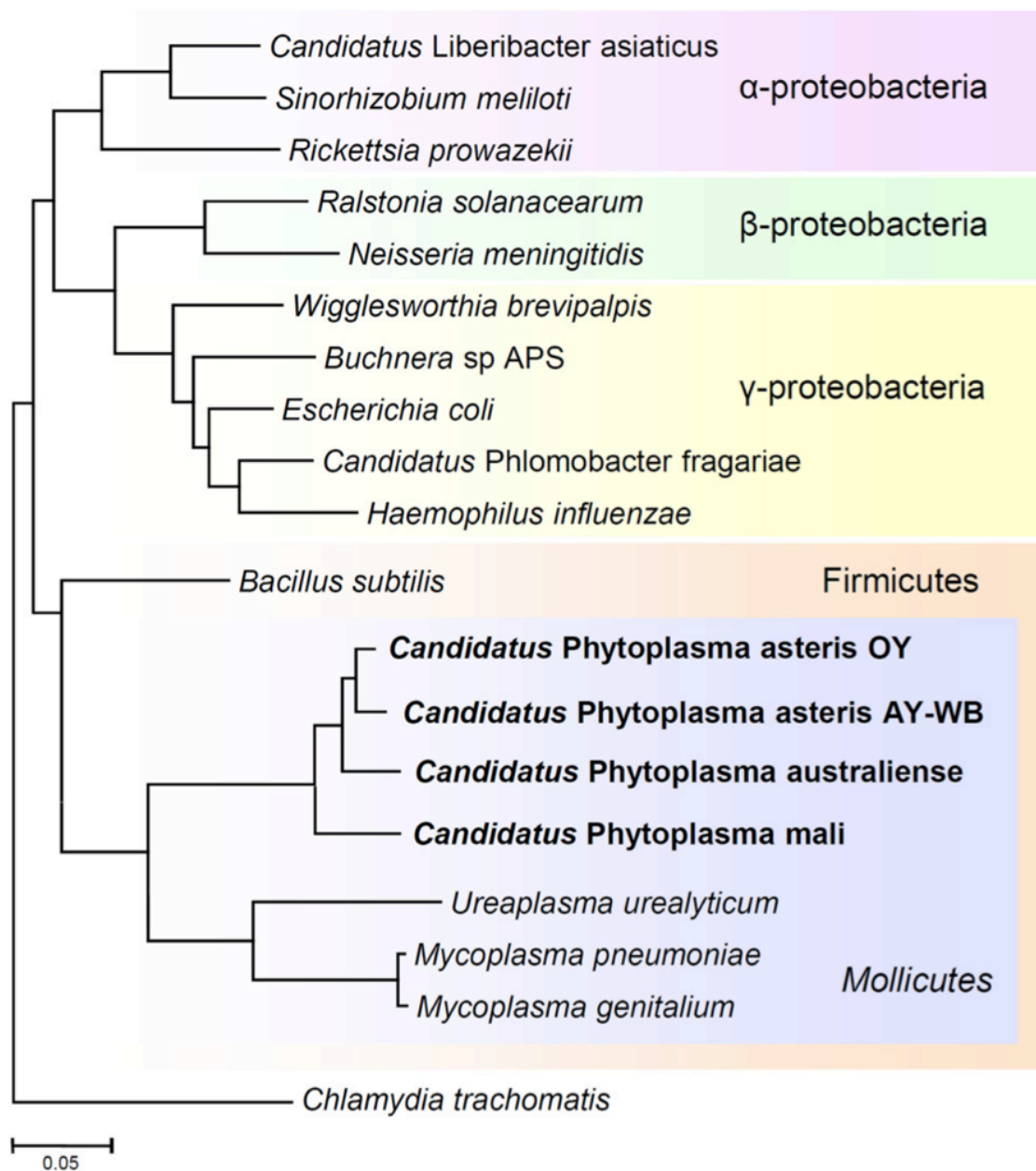
ファイトプラズマによるものと考えられる病害報告は古くから存在し、日本では江戸時代にクワ萎縮病が発生していた (奥田、1972)が、その病原は長らく不明であり、ウイルス病であると考えられていた。1967年に土居らは電子顕微鏡観察によって、萎縮症状を呈するクワや天狗巢症状を呈するジャガイモ、ペチュニア、キリの篩部組織に、人や動物などの病原であるマイコプラズマと類似した粒子を見出し、マイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organisms; MLO; 現在のファイトプラズマ) として報告した (土居ら、1967)。その後、世界各地で同様の実験が行われ、それまで原因不明のウイルス病とされてきた病徴を呈する植物の篩部組織において MLO の粒子が観察されたため、新たな植物病原体として MLO の存在が世界的に認知されるようになった。

ファイトプラズマは培養が困難であることから、MLO として発見されて以降近年に至るまで、病徴や宿主範囲に基づいて分類が行われていた (奥田、1972)。その結果、1980年代後半までに MLO は世界で数百系統が報告され、日本国内に限っても 63 系統の MLO が報告された (岸、1987)。1990年代になると、16S rRNA 遺伝子の PCR による特異的増幅技術と、その塩基配列解析技術が確立され、MLO の分子系統学的解析が可能となった (Namba

et al., 1993a)。その結果、MLO はマイコプラズマ属細菌に近縁であるものの、独立した単系統群を形成することが明らかとなり (Namba *et al.*, 1993b; Tully *et al.*, 1993)、MLO は「ファイトプラズマ (phytoplasma)」と呼ばれることになり (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Mollicutes*, 1993)、その後、暫定的な分類群「ファイトプラズマ属」 [‘*Candidatus* (Ca.) *Phytoplasma*’] として分類された (The IRPCM *Phytoplasma/Spiroplasma* Working Team – *Phytoplasma* Taxonomy Group, 2004)。

ファイトプラズマ属は真正細菌の中で *Firmicutes* 門 *Mollicutes* 綱に分類されている (図 1.4)。ファイトプラズマ属では、これまでに約 40 の暫定種が報告されており (Kube *et al.*, 2012)、日本国内では 9 種が確認されている (Maejima *et al.*, 2014; 図 1.5)。各暫定種は *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) への掲載により認められ、その際には参考株 (reference strain) が定められる。新たな暫定種として認められる基準は、16S rRNA 遺伝子の 1,200 塩基以上の配列が、既存のいずれの参考株の配列とも配列同一性が 97.5%未満である場合や、宿主範囲、媒介昆虫、病原性などが大きく異なる場合である (The IRPCM *Phytoplasma/Spiroplasma* Working Team – *Phytoplasma* Taxonomy Group, 2004)。

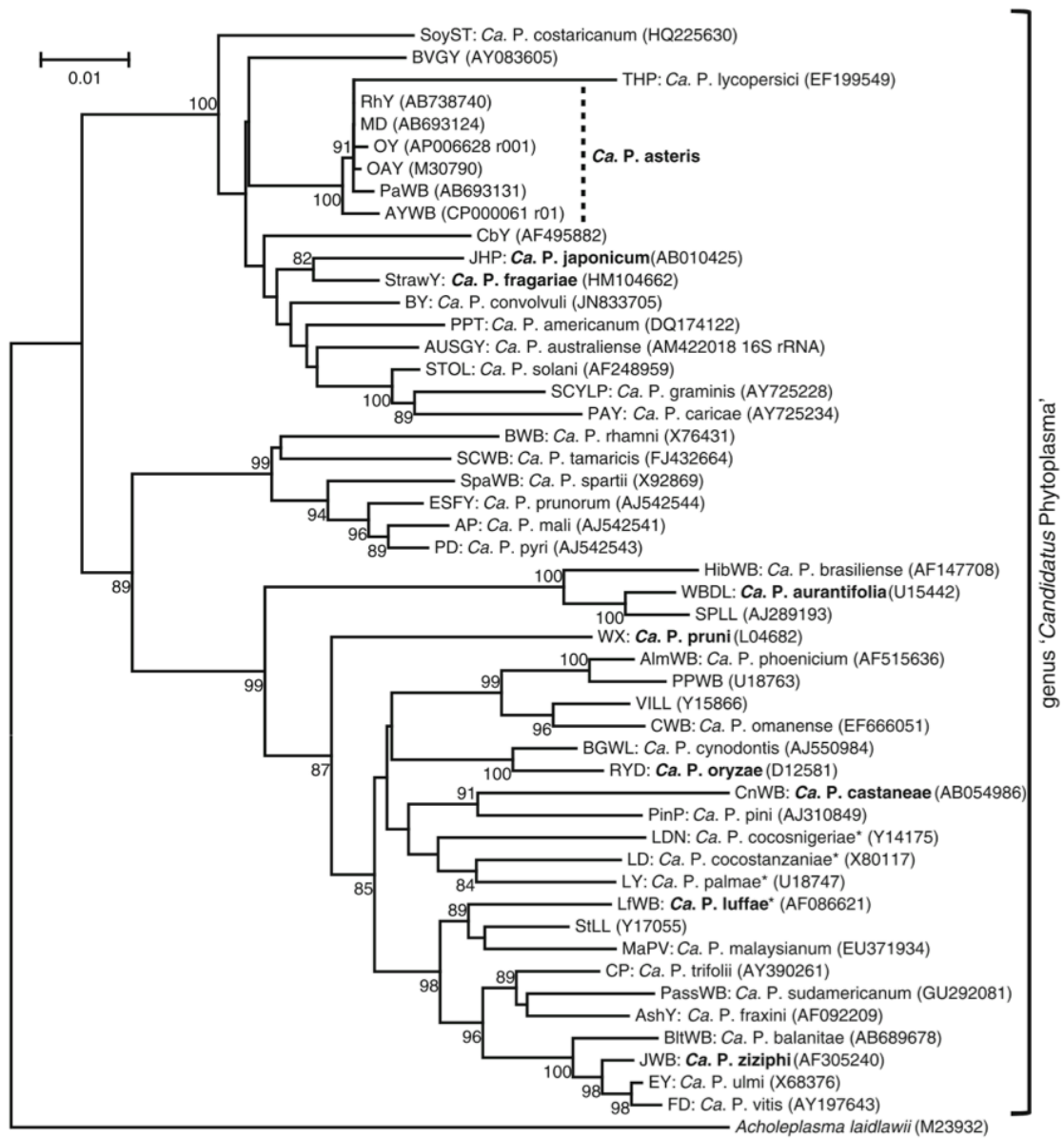
ファイトプラズマの分類では、上記 16S rRNA 遺伝子の配列に基づく分類体系の他に、16S rRNA 遺伝子の制限酵素切断断片多形 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) に基づく分類方法 (Lee *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2009; Dickinson *et al.*, 2013) や、他のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を用いた分類方法 (Kamla *et al.*, 1996; Falah & Gupta, 1997; Martini *et al.*, 2007; Hodgetts *et al.*, 2008) が報告されているが、それぞれファイトプラズマを大まかにあるいは詳細に判別するための方法であり、いずれも正式に認められた分類基準ではない。



(Oshima *et al.*, 2013)

図 1.4 ファイトプラズマの分子系統学的な位置

GenBank データベースに登録された細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づき、近隣結合法を用いて作成された系統樹。アウトグループとして *Chlamydia trachomatis* が用いられている。ファイトプラズマはマイコプラズマと近縁で Firmicutes 門 Mollicutes 綱に属する。



(Maejima *et al.*, 2014)

図 1.5 ファイトプラズマの分子系統樹

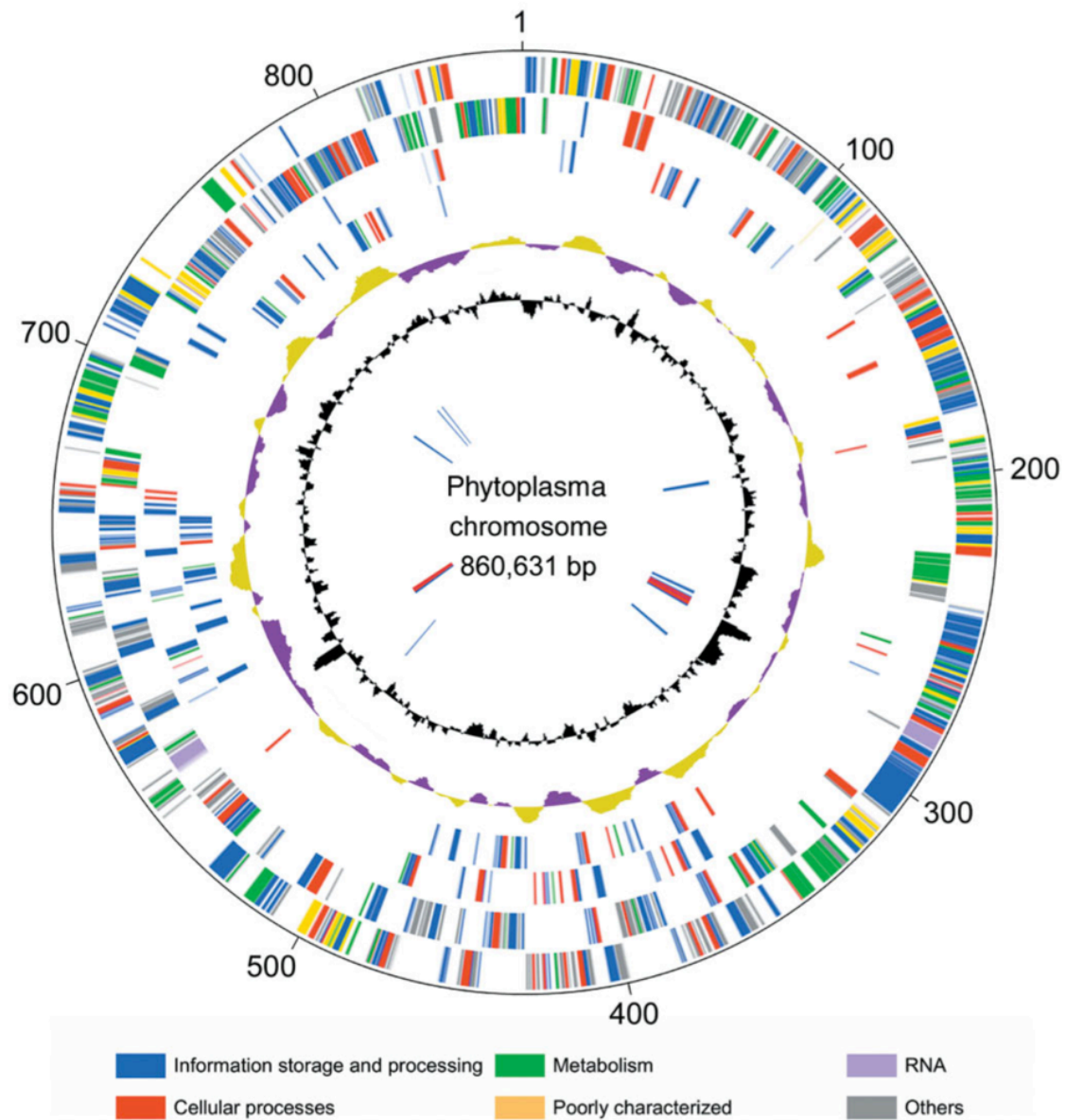
16S rRNA 遺伝子配列に基づき、近隣結合法を用いて作成された系統樹。アウトグループには *Acholeplasma laidlawii* が用いられている。用いた 16S rRNA の GenBank データベースにおけるアクセッション番号は種名の後の括弧内に示されている。系統樹の枝上に書かれた数値はブートストラップ値を示し、80%以上のブートストラップ値が示されている。太字で示されたファイトプラズマは日本国内で発生が報告されているファイトプラズマを示す。

1.1.3. ファイトプラズマのゲノム解析

ファイトプラズマでは、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma; ‘*Ca. P. asteris*’ OY 系統; OY ファイトプラズマ; 塩見ら、1998) の弱毒株 OY-M (Oshima *et al.*, 2001) で初めて全ゲノム解読が行われた (Oshima *et al.*, 2004; 表 1.1; 図 1.6)。OY-M は全長約 860 kbp の環状染色体に加え、2 つのプラスミドを有している (Nishigawa *et al.*, 2001, 2002a, 2002b)。染色体の GC 含量は 28% であり、他の *Mollicutes* 綱細菌同様に低い (Oshima *et al.*, 2004)。染色体上には 754 個の open reading frame (ORF) が存在し、257 個は他の生物で既知の遺伝子と相同性が認められない機能未知の遺伝子である (Oshima *et al.*, 2004; 表 1.1)。

表 1.1 OY-M のゲノム構成 (Oshima *et al.*, 2004 を参考に作成)

	染色体	プラスミド	
		EcOYM	pOYM
塩基長 (bp)	860,631	5,025	3,932
GC 含量 (%)	28	25	24
タンパク質コード領域 (%)	73	71	75
タンパク質コード遺伝子数	754	6	5
既知遺伝子と相同性がある遺伝子数	446	2	2
ファイトプラズマで保存されている機能未知遺伝子数	51	0	0
機能未知遺伝子数	257	4	3
タンパク質コード遺伝子の平均長 (bp)	785	597	588
tRNA 数	32	0	0
rRNA オペロン数	2	0	0



(Oshima *et al.*, 2004)

図 1.6 OY-M の染色体地図

外周の数字は OY-M ゲノムの起点を基準にした塩基の位置 (kbp) を示す。外側より、4 つの円周はタンパク質コード遺伝子を示し、外周から+方向、-方向、+方向の重複遺伝子、-方向の重複遺伝子を示す。遺伝子の色は図の下部に示された遺伝子の予測機能ごとの分類に対応する。5 つ目の円周は GC-skew $[(G-C)/(G+C)]$ を示す。6 つ目の円周は GC 含量を示す。7 および 8 つ目の円周は tRNA (青色) および rRNA (赤色) を示し、6 つ目の円周が+方向、7 つ目の円周が-方向にコードされていることを示す。

ファイトプラズマでは OY-M の他に、‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統 (Bai *et al.*, 2006)、‘*Ca. P. australiense*’ PAa 系統 (Tran-Nguyen *et al.*, 2008) および SLY 系統 (Andersen *et al.*, 2013)、‘*Ca. P. mali*’ AT 系統 (Kube *et al.*, 2008) で全ゲノムが報告されている (表 1.2)。また、これらの他にも近年では次世代シーケンサーを利用してドラフトゲノム配列が複数報告されている (Carle *et al.*, 2011; Saccardo *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013; Mitrović *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Kakizawa *et al.*, 2014; Pacifico *et al.*, 2015; Quaglino *et al.*, 2015; Lee, *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2015; Fischer *et al.*, 2016; Zamorano & Fiore, 2016; 表 1.3)。

表 1.2 全ゲノムが解読されたファイトプラズマ (Andersen *et al.*, 2013 を参考に作成)

種 系統	‘ <i>Ca. P. asteris</i> ’		‘ <i>Ca. P. australiense</i> ’		‘ <i>Ca. P. mali</i> ’
	OY-M	AYWB	PAa	SLY	AT
染色体の構成	環状	環状	環状	環状	線形
塩基長 (bp)	860,631	706,569	879,324	959,779	601,943
GC 含量 (%)	27.8	26.9	27.4	27	21.4
遺伝子数	754	671	686	1126	481
tRNA 数	32	31	35	35	32
rRNA オペロン数	2	2	2	2	2

表 1.3 ドラフトゲノム配列が報告されているファイトプラズマ

種	' <i>Ca. P. asteris</i> '			' <i>Ca. P. solani</i> '			' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '			' <i>Ca. P. phoenicium</i> '
	WBD	OY-V	CY	STOL284/09	STOL231/09	PnWB	EPWB	AlmWB		
系統										
塩基長 (bp)	611,462	739,609	659,699	570,238	545,458	562,473	545,427	345,965		
GC 含量 (%)	27	28	28	29	30	24	24	25		
遺伝子数	562	920	711	520	573	450	433	287		
文献	Chen <i>et al.</i> , 2014	Kakizawa <i>et al.</i> , <i>al.</i> , 2014	Pacifico <i>et al.</i> , 2015	Mitrović <i>et al.</i> , <i>al.</i> , 2014	Mitrović <i>et al.</i> , <i>al.</i> , 2014	Chung <i>et al.</i> , 2013	Chang <i>et al.</i> , 2015	Quaglino <i>et al.</i> , 2015		

種	' <i>Ca. P. pruni</i> '					' <i>Ca. P. oryzae</i> '			' <i>Ca. P. vitis</i> '
	VAC	ICP	PoiBI	MY	CX	Ve33	NGSD	FD	
系統									
塩基長 (bp)	647,754	597,245	631,440	583,806	598,508	687,253	533,195	629 kbp ^a	
GC 含量 (%)	27	27	27	28	27	28	19	21	
遺伝子数	677	650	654	565	602	696	465	464	
文献	Saccardo <i>et al.</i> , 2012	Saccardo <i>et al.</i> , 2012	Saccardo <i>et al.</i> , 2012	Saccardo <i>et al.</i> , 2012	Lee <i>et al.</i> , 2015	Zamorano & Fiore, 2016	Fischer <i>et al.</i> , 2016	Carle <i>et al.</i> , 2011	

^a '*Ca. P. vitis*' FD 系統は配列データがデータベース等で公開されておらず、文献中でも詳細な塩基長が記載されていないため、文献中の記載に従い、おおよその塩基長を記載した。

1.2. 細菌の遺伝子発現調節機構

1.2.1. 細菌の遺伝子転写機構

細菌の遺伝子転写は、5つのタンパク質（2つの α サブユニット、 β サブユニット、 β' サブユニット、 ω サブユニット）からなるRNAポリメラーゼ（RNA polymerase; RNAP）コア酵素と、シグマ因子からなるRNAPホロ酵素により行われる（Ishihama, 2000）。RNAPホロ酵素がゲノム上の特定のプロモーター配列と結合し、その下流の転写開始点より、mRNAの合成が行われる（図1.7）。細菌のゲノムには、RNAPコア酵素を構成する各因子が1種類、シグマ因子が複数種類コードされている（Ghosh *et al.*, 2010）。シグマ因子が認識するプロモーター配列はシグマ因子によって異なり、細菌はシグマ因子を使い分けることで様々な遺伝子の転写を行っている（Jishage *et al.*, 1996; Aramaki & Fujita, 1999）。

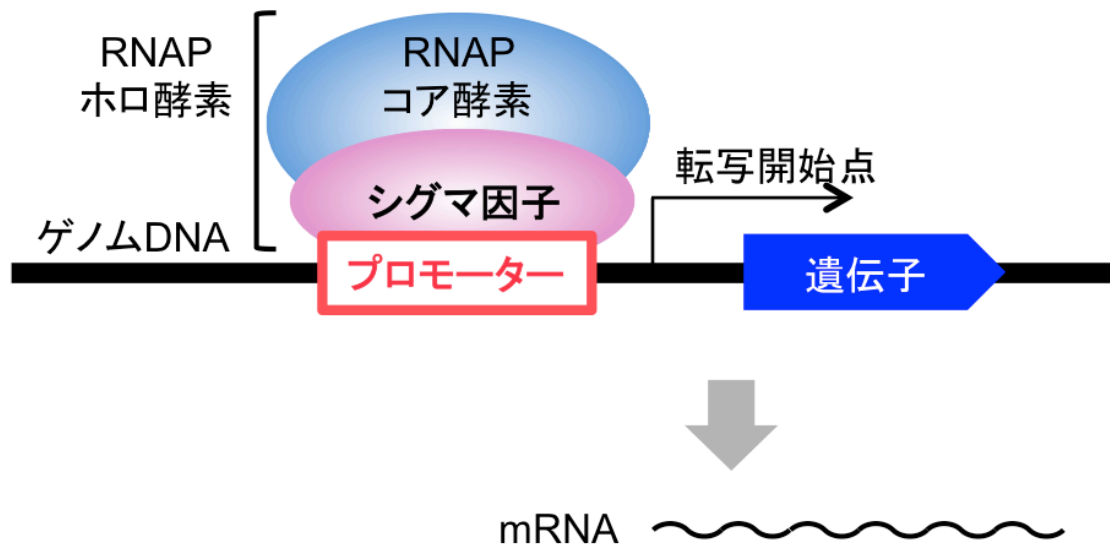


図 1.7 細菌の遺伝子転写機構

RNAP コア酵素とシグマ因子からなる RNAP ホロ酵素がゲノム上の特定のプロモーター配列と結合すると、その下流の転写開始点から mRNA が合成される。

1.2.2. 細菌の遺伝子発現制御因子

細菌は周囲の環境変動に適応するために、様々な遺伝子発現制御因子により遺伝子発現を変動させている (Kazmierczak *et al.*, 2005)。細菌の遺伝子発現制御因子の一つとして、シグマ因子が挙げられる。多くの細菌は複数のシグマ因子を有しており、環境に応じてシグマ因子を使い分けることで、遺伝子発現を変動させている (Jishage *et al.*, 1996; Aramaki & Fujita, 1999; Mittenhuber, 2002)。シグマ因子はアミノ酸配列の類似性により、シグマ 70 ファミリーとシグマ 54 ファミリーに大別される (Wösten, 1998)。シグマ 70 ファミリーに属するシグマ因子は配列と機能によってさらに 3 つに大別され、細菌の生命維持に必要なハウスキーピング遺伝子の発現制御に関与する「主要シグマ因子」 (primary sigma factor)、細菌の生存に必須ではないものの、主要シグマ因子と配列同一性の高い「非必須主要シグマ因子様シグマ因子」 (nonessential primary-like sigma factor)、環境変動に応じた遺伝子発現変動を担う「代替シグマ因子」 (alternative sigma factor) が存在する (Wösten, 1998; 表 1.4)。一方で、シグマ 54 ファミリーに属するシグマ因子はすべて代替シグマ因子として機能する (Wösten, 1998; 表 1.5)。

表 1.4 シグマ70ファミリーに属するシグマ因子の分類とその共通プロモーター配列 (Wösten, 1998 を参考に作成)

シグマ因子の分類	シグマ因子名	タンパク質	プロモーター配列	
			-35	-35 と -10 の間の距離 -10
主要シグマ因子		RpoD, SigA	TTGACA	16-18 TATAAT
非必須主要シグマ因子様 シグマ因子	定常状態シグマ因子	RpoS	-	- CTATACT
代替シグマ因子	鞭毛シグマ因子	FliA, SigD	TAAA	15 GCCGATAA
	ECF シグマ因子	SigE	GAACCTT	16-17 TCTRA
	熱ショックシグマ因子	RpoH	CTTGAAA	11-16 CCCATNT
	芽胞形成シグマ因子	SigB	GTTTAA	12-14 GGGTAT
		SpoOH	AGGAWWT	12-14 RGAAT
		SpoIIAC	WGCATA	14-15 GGNRAYAMTW
		SpoIIGB	GKCATATT	13-15 CATACAMT
		SpoIIIG	TGAATA	17-18 CATACTA
		SpoIIIC	AC	16-17 CATANANTA

表 1.5 シグマ54ファミリーに属するシグマ因子の分類とその共通プロモーター配列 (Wösten, 1998 を参考に作成)

シグマ因子の分類	シグマ因子名	タンパク質	プロモーター配列	
			-24	-24 と -12 の間の距離 -12
代替シグマ因子	窒素飢餓シグマ因子	RpoN, SigL	TGGCAC	5 TTGCW

シグマ 70 ファミリーに属する主要シグマ因子には領域 1~4 の保存された領域が存在する (Gruber & Gross, 2003; 図 1.8)。領域 1 はシグマ因子が単独で DNA に結合することを防ぎ、RNAP と結合したホロ酵素として DNA に結合して転写を行うことを促進する (Wilson & Dombroski, 1997)。領域 2 は転写開始点の約 10 塩基上流付近 (-10 領域) の、領域 4 は転写開始点の約 35 塩基上流付近 (-35 領域) のプロモーター配列をそれぞれ認識することが明らかとなっている (Harley & Reynolds, 1987; 図 1.8)。領域 3 は転写開始点の 14~17 塩基上流付近 (拡張-10 領域) の配列を認識することが知られている (Barne *et al.*, 1997; Voskuil *et al.*, 1995)。主要シグマ因子 RpoD は多くの細菌に保存されたシグマ因子であり、大腸菌や枯草菌 (SigA) を中心によく解析が進められている (Ogasawara *et al.*, 1983; Voskuil *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2003)。これまでに解析されている RpoD の多くは、-35 領域の 5'-TTGACA-3' と -10 領域の 5'-TATAAT-3' の 2 つの典型的なプロモーター配列を認識する (Helmann & Chamberlin, 1988; 表 1.4)。非必須主要シグマ因子様シグマ因子は「定常状態シグマ因子」とも呼ばれ、このグループに属する RpoS は定常状態における DNA 修復関連遺伝子や浸透圧ストレス耐性遺伝子などの多様な遺伝子の発現制御に関与する (Loewen & Hengge-Aronis, 1994)。シグマ 70 ファミリーに属する代替シグマ因子では、鞭毛合成に関与する FliA (Helmann, 1991) や熱応答性の RpoH (Wösten, 1998)、枯草菌において芽胞形成に関与するシグマ因子群 (Wösten, 1998) などが知られる (表 1.4)。同様にシグマ 70 ファミリーに属する extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子は、通常は細胞膜上の抗シグマ因子により不活性化されているが、環境シグナルにより抗シグマ因子が不活性化し、ECF シグマ因子が活性化することで機能する (Wösten, 1998)。

シグマ 54 ファミリーに属するシグマ因子は、シグマ 70 ファミリーに属するシグマ因子とは配列類似性を示さない (Merrick *et al.*, 1987)。また、シグマ 70 ファミリーに属するシ

グマ因子の認識プロモーター配列が、転写開始点の-10 および-35 領域であるのに対して、シグマ 54 ファミリーに属するシグマ因子の認識プロモーター配列は、-12 および-24 領域に存在する (Merrick, 1993; 表 1.4)。シグマ 54 ファミリーに属するシグマ因子 RpoN は、窒素飢餓環境において機能することが知られている (Merrick, 1993; 表 1.5)。

細菌の遺伝子発現制御には、シグマ因子以外の転写調節因子が関与する例も知られており (Browning & Busby, 2004)、近年では非コード RNA が遺伝子発現制御に関与する例も報告されつつある (Waters & Storz, 2009)。非コード RNA を介した遺伝子発現制御機構としては、非コード RNA が相補的配列を有する mRNA と結合することで、転写や翻訳を促進または抑制する例などが知られている (Waters & Storz, 2009; 図 1.9)。

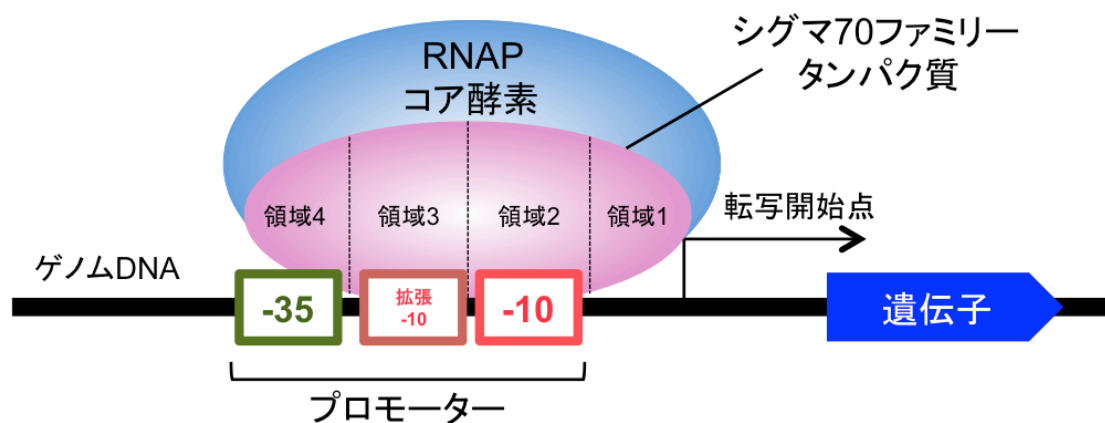
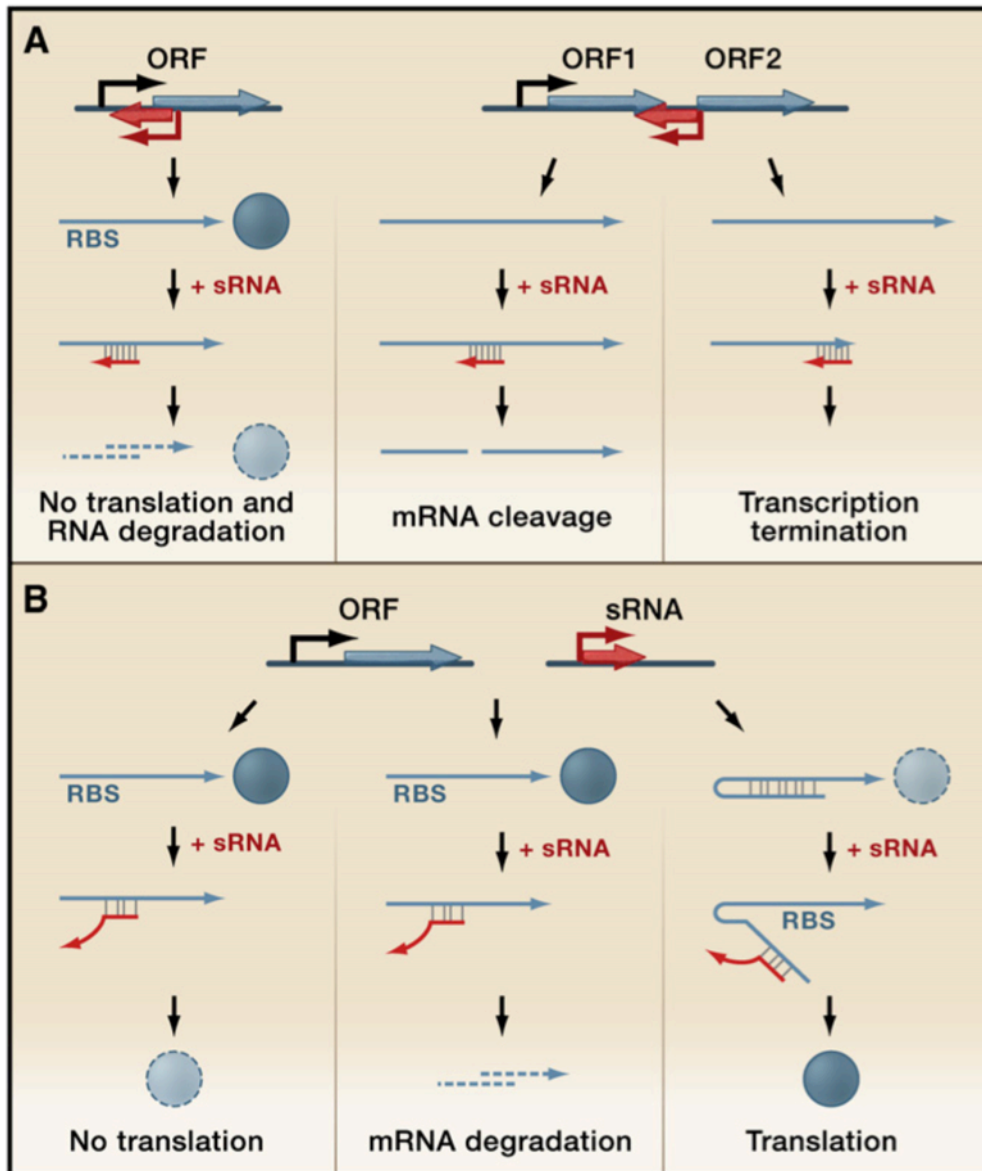


図 1.8 シグマ 70 ファミリーに属する転写因子の構造

シグマ 70 ファミリーに属する転写因子は領域 1~4 の保存された領域を有する。領域 2 は転写開始点上流の-10 プロモーター配列を、領域 4 は-35 プロモーター配列をそれぞれ認識する。



(Waters & Storz, 2009)

図 1.9 細菌の非コード RNA を介した遺伝子発現制御

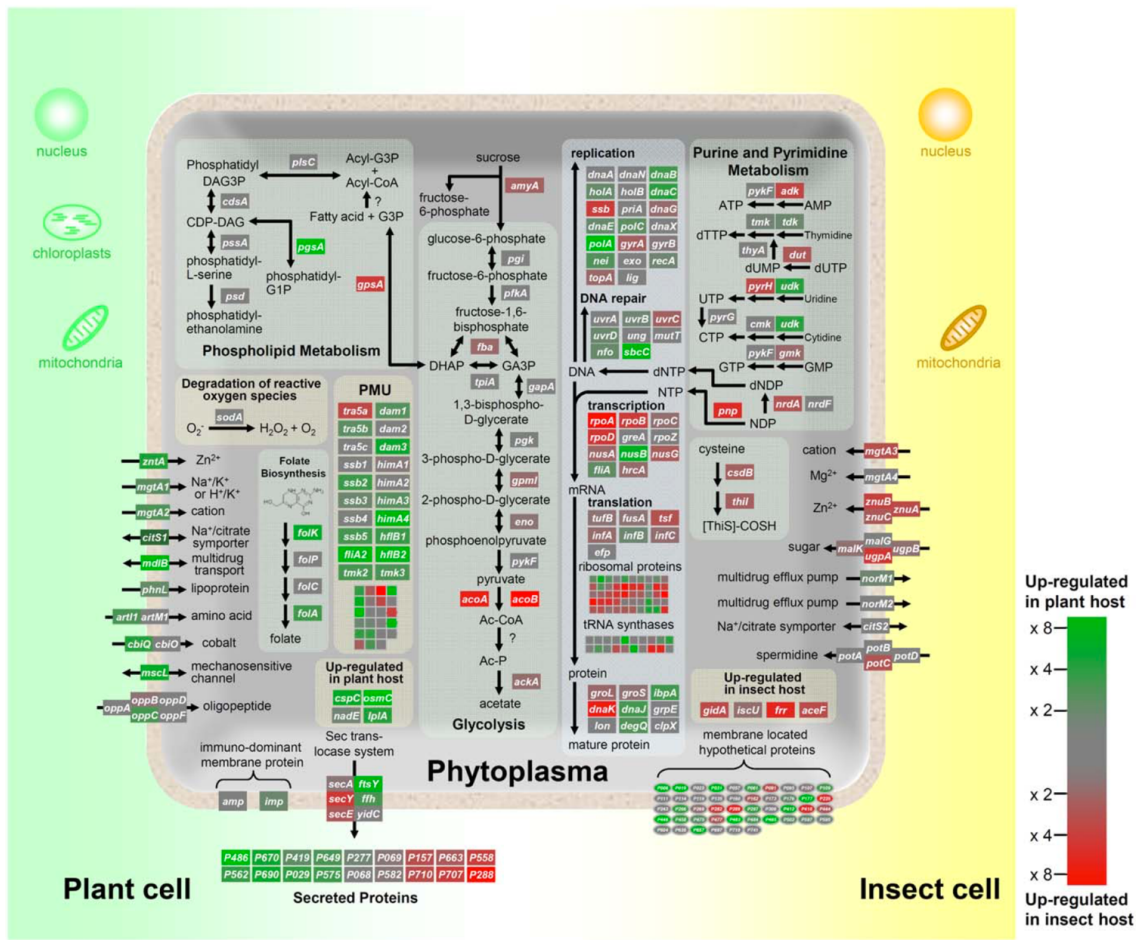
A. ORF とシスにコードされた非コード RNA による遺伝子発現制御。非コード RNA が mRNA のリボソーム結合配列 (RBS) と相補的に結合し、翻訳が抑制される (左)。非コード RNA が mRNA の相補配列と結合し、mRNA の切断が生じる (中央)。非コード RNA が mRNA の相補配列と結合し、転写を終結させる (右)。B. トランスにコードされた非コード RNA による遺伝子発現制御。非コード RNA が mRNA のリボソーム結合配列 (RBS) と相補的に結合し、翻訳の抑制 (左) や、mRNA の分解 (中央) が生じる。非コード RNA が mRNA の相補配列と結合することで mRNA の二次構造が変化し、RBS にリボソームが結合できるようになり翻訳が促進される (右)。

1.2.3. ファイトプラズマの遺伝子発現

ファイトプラズマは植物と昆虫という全く異なる 2 種類の宿主間でホストスイッチングを行う (Christensen *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008)。OY-M ではこれまでに、マイクロアレイ解析によってホストスイッチングに伴う遺伝子発現の変動が解析されている (Oshima *et al.*, 2011)。その結果、ファイトプラズマはホストスイッチングに伴って全遺伝子の約 1/3 に相当する遺伝子の発現を変動させることで、植物と昆虫それぞれの宿主細胞内の環境に適応していることが明らかとなった (Oshima *et al.*, 2011; 図 1.10)。また、‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統においては、宿主との相互作用に関連すると考えられる 179 遺伝子について、植物と昆虫それぞれの宿主における遺伝子発現量の定量 RT-PCR による解析が行われている (Makarova *et al.*, 2015)。ファイトプラズマの遺伝子発現に関してはこの他に、定量次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (Siewert *et al.*, 2014; Abbà *et al.*, 2014)や、プロテオーム解析 (Ji *et al.*, 2010)の報告があるものの、これらの研究はいずれも感染植物のみを用いた解析である。また、宿主体内におけるファイトプラズマの遺伝子発現量が感染ステージにより変動するという報告もあるが (Pacífico *et al.*, 2015)、ファイトプラズマにおける遺伝子発現制御機構の詳細は未だ不明な点が多い。

これまでにゲノム解読が行われているいずれのファイトプラズマにおいても、シグマ因子として RpoD と FliA の 2 種類のみがゲノム上から見出されている (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013)。しかしながら、その機能に関する解析は少なく (Ishii *et al.*, 2013)、ファイトプラズマにおける転写制御機構に関する知見は乏しい。また、ファイトプラズマではこれまでに、Flavescence dorée ファイトプラズマで非コード RNA が見出されている (Abbà *et al.*, 2014) もの、発見された非コ

ードRNAは1つだけであり、また、非コードRNAがファイトプラズマの遺伝子発現制御への関与については未だ解析が行われておらず、不明である。



(Oshima *et al.*, 2011)

図 1.10 OY-M 遺伝子の植物-昆虫間における発現変動

マイクロアレイ解析による OY-M の植物-昆虫間での遺伝子発現変動を示す。緑色で示された遺伝子は植物で発現が上昇した遺伝子を、赤色で示された昆虫で発現が上昇した遺伝子をそれぞれ示す。

第2章 *in vitro* 転写系を用いたファイトプラズマの共通シグマ因子

RpoD の機能解析

2.1. 序文

2.1.1. ファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD

これまでに全ゲノム解読が行われているいずれのファイトプラズマにおいても、RpoD および FliA の 2 種類のシグマ因子がゲノム上にコードされている (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013)。FliA はファイトプラズマ種間での配列保存性が低く、種によってゲノム上でのコピー数が大きく異なるのに対して、RpoD はいずれのファイトプラズマゲノムにおいても単一コピー遺伝子としてコードされており、アミノ酸レベルで高い配列同一性を示す (図 2.1)。ファイトプラズマの RpoD はシグマ 70 ファミリータンパク質に典型的な 4 つの領域 (領域 1~4; Gruber & Gross, 2003) をすべて有しており、領域 2~4 を含む C 末端側は特に配列同一性が高い一方、領域 1 を含む N 末端側の配列保存性はやや低い (図 2.1)。一般にシグマ 70 ファミリーに属するシグマ因子の領域 2 および 4 はそれぞれプロモーターの -10 領域、-35 領域をそれぞれ認識することから (Wösten, 1998)、ファイトプラズマの RpoD も他の細菌と同様のプロモーター認識機構を持つと考えられるが、その詳細は不明である。また、一般に RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写制御を担う主要シグマ因子であり (Wösten, 1998)、細菌の細胞内でその発現量は一定に保たれているが (Jishage *et al.*, 1996; Aramaki & Fujita, 1999)、OY-M では RpoD は植物体内と比較して昆虫体内で高発現であることが知られている (Oshima *et al.*, 2011; Ishii *et*

al., 2013)。したがって、ファイトプラズマにおいて RpoD が他の細菌と同様に主要シグマ因子として機能しているかは不明である。

ファイトプラズマのシグマ因子についてはこれまでに、ファイトプラズマのプロモーターとシグマ因子の相互作用を大腸菌細胞内でルシフェラーゼレポーター活性により評価する、*Escherichia coli*-based *ex vivo* reporter assay (EcERA) と呼ばれる系を用いた解析が行われている (Ishii *et al.*, 2013)。しかしながらこの系では、ファイトプラズマのプロモーターとシグマ因子の間に直接的な相互作用があるか判別できないうえ、大腸菌のシグマ因子による影響があると考えられ、偽陽性もしくは偽陰性を排除することが困難である。また、大腸菌の RpoD 認識プロモーター配列を用いることで、ファイトプラズマにおける RpoD の認識配列を予測することも行われているが (Jung *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 2009)、ファイトプラズマゲノムは AT リッチであることから、この手法では正確なプロモーターの予測は困難であると考えられる。したがって、ファイトプラズマにおいてシグマ因子およびその認識プロモーターをより詳細に研究する上では、新規の手法が必要である。

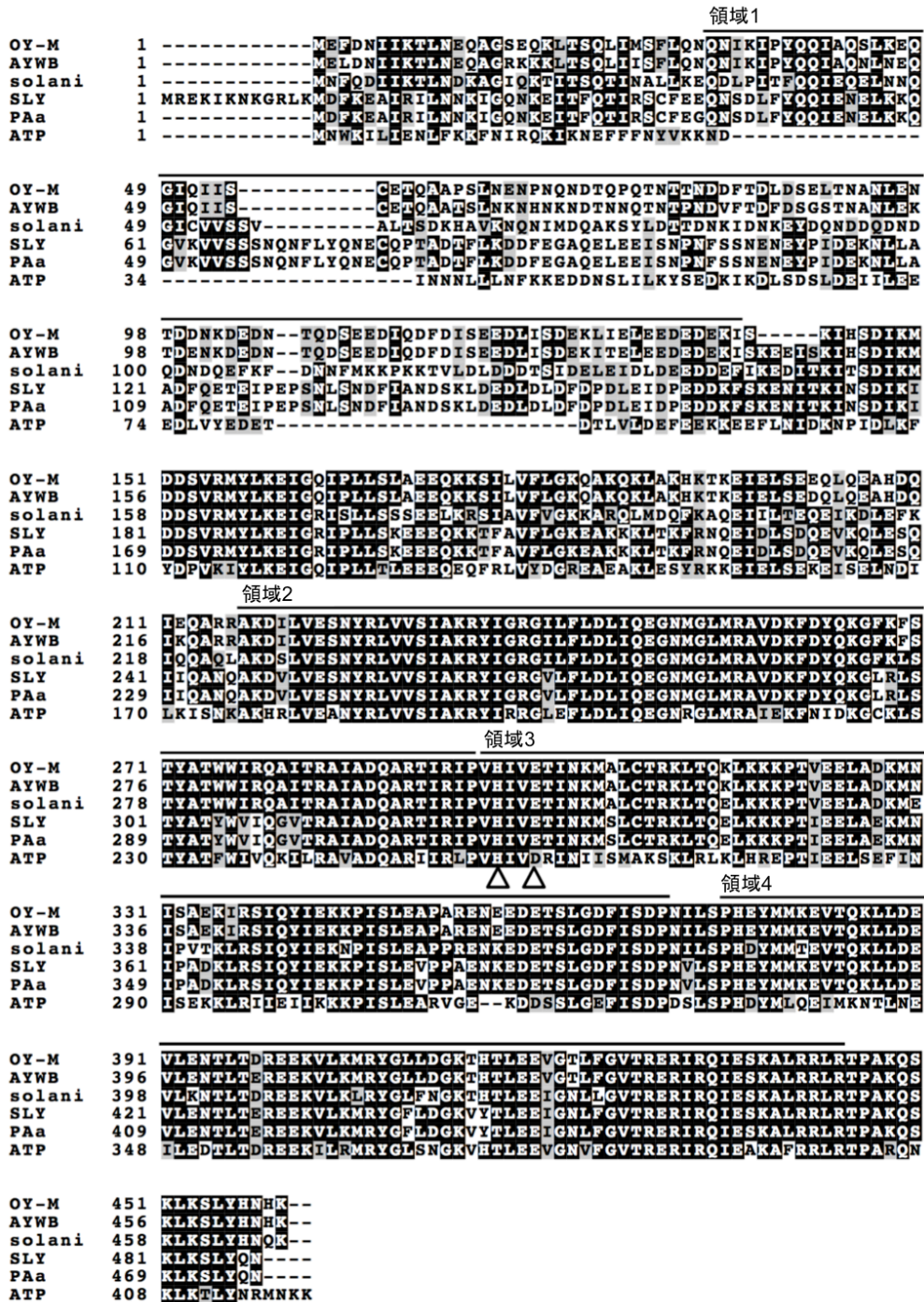


図 2.1 ファイトプラズマ RpoD のアミノ酸配列アラインメント

アラインメントは Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いて行った。50%以上一致したアミノ酸は黒色で、類似したアミノ酸は灰色で示した。白矢頭は細菌のシグマ因子に保存されたアミノ酸を示した。OY-M: ‘*Ca. P. asteris*’ OY-M 系統、AYWB: ‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統、solani: ‘*Ca. P. solani*’ 284/09 系統、SLY: ‘*Ca. P. australiense*’ NZSb11 系統、PAA: ‘*Ca. P. australiense*’ *rp-A* 系統、ATP: ‘*Ca. P. mali*’ AT 系統

2.1.2. *in vitro* 転写系

シグマ因子とその認識プロモーターを解析する系として、いくつかの細菌では *in vitro* 転写系が用いられている (Tan *et al.*, 1998; Aramaki & Fujita, 1999; Rosenthal *et al.*, 2008; Graves & Rabinowitz, 1986)。 *in vitro* 転写系は、細菌における転写反応に必要な最小セットである RNAP コア酵素、シグマ因子、鋳型 DNA、NTP を試験管内で反応させ、人工的に転写反応を誘導する手法である (図 2.2)。転写産物の検出には、放射性同位体ラベルした NTP を混合し、転写産物を精製・泳動したのちにオートラジオグラフィーで検出する手法がよく用いられている。

本手法では、対象のシグマ因子および鋳型 DNA のみを試験管内で反応させることから、他のシグマ因子や DNA 配列の影響は排除され、対象間の直接的な相互作用およびそれに伴う転写反応を解析することが可能である。また、本手法では培養や遺伝子操作が困難な細菌のシグマ因子とその認識プロモーターについて解析することが可能であると考えられる。そこで本章では、*in vitro* 転写系を用いることで OY-M の RpoD が認識するプロモーター配列、および RpoD によって転写制御される OY-M の遺伝子について解析を試みた。

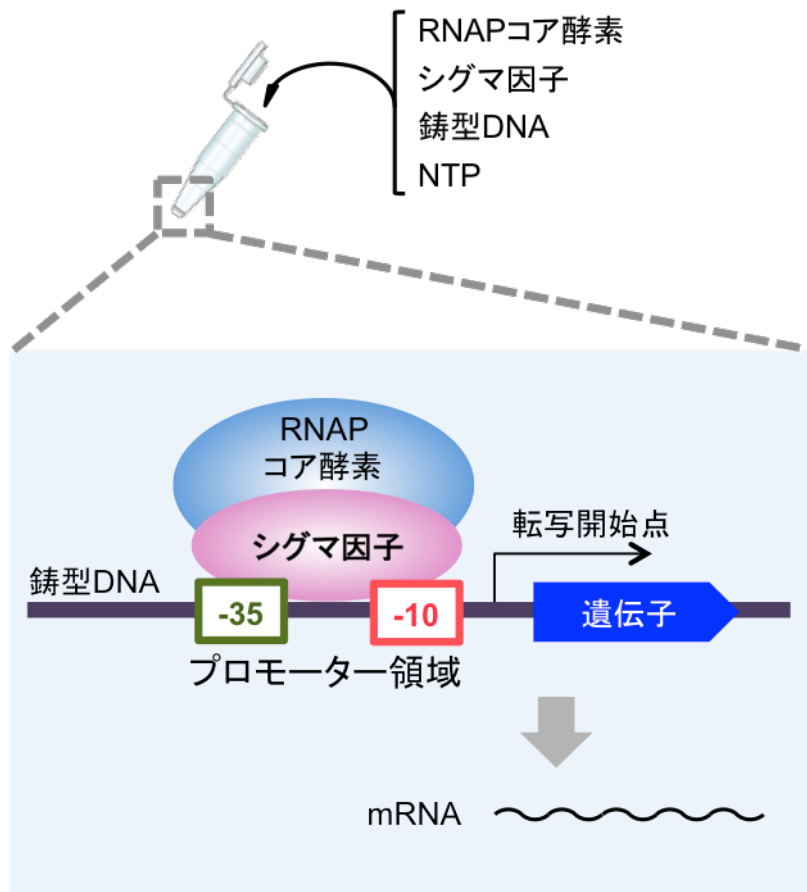


図 2.2 *in vitro* 転写系の概要

試験管内で RNAP コア酵素、シグマ因子、鋳型 DNA、NTP を反応させることで、鋳型 DNA 上にシグマ因子の認識プロモーター配列が存在する場合には、転写産物が合成される。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫

本研究では、佐賀県のタマネギより分離されたタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma; ‘*Ca. P. asteris*’ OY 系統; OY ファイトプラズマ; 塩見ら、1998) の弱毒株 OY-M (Oshima *et al.*, 2001) を実験に供試した。OY-M ファイトプラズマの維持はシュンギク (*Glebionis coronaria*) および媒介昆虫であるヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) を用いて以下のように行った。播種後 3 週間のシュンギク 1 株に、天面および側面にネットを張ったプラスチック製の円筒を被せ、筒内に OY-M 保毒虫 15 頭を入れた。これを明期 16 時間、暗期 8 時間、25°C の温室内で維持した。

2.2.2. RNA 抽出

OY-M 感染植物および昆虫からの RNA 抽出は、吸汁接種後 40 日間維持した植物および昆虫を用いて以下のように行った。約 0.1 g の試料植物および昆虫を液体窒素で凍結し、乳鉢を用いて磨砕した。ISOGEN (ニッポンジーン) 1 ml を加え、磨砕液を 1.5 ml チューブに回収したのち、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を 1.5 ml チューブに回収し、200 μ l のクロロホルムを加えてよく攪拌したのち、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。500 μ l の上清を 1.5 ml チューブに回収し、500 μ l の 2-プロパノールを加えて転倒混和したのち、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心した。上清を廃棄し、1 ml の 70%エタノールを加え、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を廃棄し沈殿を風乾したのち、沈殿を滅菌水に溶解し、NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) により吸光度を測定することで RNA 濃度および純度を確認した。抽出した RNA は-80°C で保存した。

2.2.3. DNase 処理

2.2.2.項で抽出した RNA サンプル中に残存する DNA を除去するために、以下のように DNase 処理を行った。5 µg の RNA サンプルに 1 µl (5 U/µl) の Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa)、2.5 µl の 10×DNase I Buffer (TaKaRa)、0.2 µl (40 U/µl) の Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa) を加え、滅菌水により合計容量を 25 µl として、37°C で 30 分間反応させた。反応後、100 µl の滅菌水、100 µl の酸性フェノール、100 µl のクロロホルムを加えてよく攪拌し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。200 µl の上清を 1.5 ml チューブに回収し、200 µl のクロロホルム・イソアミルアルコール溶液 (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) を加えてよく攪拌したのち、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。200 µl の上清を 1.5 ml チューブに回収し、20 µl の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液、500 µl のエタノールを加えて転倒混和したのち、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心した。上清を廃棄し、1 ml の 70%エタノールを加え、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を廃棄し沈殿を風乾したのち、沈殿を滅菌水に溶解し、NanoDrop 2000c により吸光度を測定することで RNA 濃度および純度を確認した。DNase 処理済みの RNA は-80°C で保存した。

2.2.4. 5' RACE 解析

OY-M の RNA 転写産物 5' 末端配列を決定するために、5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 解析を行った。5' RACE 解析には、OY-M 感染植物および昆虫それぞれ由来の全 RNA を、2.2.3.項に従って DNase 処理した RNA を鋳型として供試した。5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従って逆転写反応を行ったのち、得られた cDNA を鋳型としてキット付属のプライマーとファイトプラズマ塩基配列に相補的なプライマー (表 2.1)のセットを用いて、nested PCR を

含めた 2 段階の PCR を行った。PCR は TaKaRa Taq (TaKaRa) を用いて行い、反応溶液の組成および反応時間は添付のプロトコールに従った。反応終了後、アガロースゲル電気泳動により目的の DNA 断片が増幅されているかを確認したのち、目的の DNA 断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories) を用いて、添付のプロトコールに従って精製した。

精製した DNA 断片は TOPO TA Cloning Kit with pCR2.1-TOPO (Invitrogen) を用いて、添付のプロトコールに従って pCR2.1-TOPO にクローニングした。クローニングしたプラスミドに 50 μ l の *E. coli* DH5 α 株コンピテントセル (TaKaRa) を加え混合したのち、氷上で 5 分間静置した。その後、溶液を 42°C で 1 分間熱ショックを与え、氷上で 5 分間静置したのち、SOC 培地 [2% Tryptone (BD)、0.5 % Yeast Extract (BD)、0.05% 塩化ナトリウム、2.5 mM 塩化カリウム、10 mM 塩化マグネシウム、10 mM 硫酸マグネシウム、20 mM グルコース、pH7.0] を 500 ml 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、大腸菌培養液を LB/カナマイシン寒天培地 (1% Tryptone、0.5% Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、1.5%寒天、50 ppm カナマイシン) に塗布し、37°C で 1 日培養した。生育したコロニーを単離し、1.6 ml の 2 \times YT/カナマイシン液体培地 (1.6% Tryptone、1% Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、50 ppm カナマイシン) で 37°C、16 時間培養し、DNA 自動分離装置 GENE PREP STAR PI-80X (クラボウ) でプラスミドを回収した。

回収したプラスミドについて各 8 クローンをシーケンスし、塩基配列を決定した。プラスミドを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて以下のようにシーケンス反応を行った。50-200 ng のプラスミドに 0.32 μ l の M13F または M13R プライマー (表 2.1)、1.75 μ l の 5 \times Sequencing Buffer、0.5 μ l の Ready Reaction Mix を加え、滅菌水により合計容量を 10 μ l とした。この溶液を、96°C 3 分、(96°C 15 秒、48°C

30 秒、60°C 4 分) を 1 サイクルとして 25 サイクル反応させた。シーケンス反応産物は、Sephadex G-50 SuperFine (GE Healthcare) を用いて以下のように精製した。Sephadex G-50 SuperFine 適量を MultiScreen-HV Filter Plate, 0.45 μm (Merck Millipore)に入れ、330 μl の滅菌水を加えて室温で 2 時間静置してカラムを水和させた。2,600 rpm で 5 分間遠心し、カラムから余分な滅菌水を除いたのち、シーケンス反応産物をカラムに添加し、2,600 rpm で 5 分間遠心し、溶出液を回収した。溶出液を減圧乾燥したのち、15 μl のホルムアミドに溶解し、95°C で 5 分間の反応後ただちに氷水中で急冷した。塩基配列は Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により決定した。塩基配列の解析には ATGC ver. 4.3.5 (ゼネティックス) を用いた。

表 2.1 5' RACE 解析に用いたプライマー

プライマー	配列 (5'→3')	ターゲット
<i>rrnB</i> _RACE1	TCATAGTCTTGGTAGGCC	<i>rrnB</i>
<i>rrnB</i> _RACE2	CGTTACTCACCCGTTTCGCC	<i>rrnB</i> (nested PCR)
<i>ibpA</i> _RACE1	CAAGATAATCAATACTTTATTACTATTGAAT TACCAG	<i>ibpA</i>
<i>ibpA</i> _RACE2	CTGGTAATTCAATAGTAATAAAGTATTGATT ATCTTG	<i>ibpA</i> (nested PCR)
<i>infC</i> _RACE1	CTTTTAAAACAATAATTTGGGTTTTCTTTTTG GC	<i>infC</i>
<i>infC</i> _RACE2	CTAATGAATTATCAAAAACATCGTTATAACC AA	<i>infC</i> (nested PCR)
<i>rplM</i> _RACE1	ACAACAATAACATAATCGCCATTGTCTACG	<i>rplM</i>
<i>rplM</i> _RACE2	GTGTTTTCTTTTAAAATGGAAGCCACTTTG G	<i>rplM</i> (nested PCR)
<i>rpsD</i> _RACE1	CCGTGATTAGCTAATTGTCTTGCTTGAGCTC	<i>rpsD</i>
<i>rpsD</i> _RACE2	CCTAAACGATAAACTACATTATCAAGACGAG ATTC	<i>rpsD</i> (nested PCR)
<i>pam157</i> _RACE1	AAATATTTGTTGCTGTTTGTTGCC	<i>pam157</i>
<i>pam157</i> _RACE2	TTTGGGTTTGGTGTGATTTTC	<i>pam157</i> (nested PCR)
<i>amp</i> _RACE1	TGAACTTTCCATTGTTTAAACAACCTTTTCTGC	<i>amp</i>
<i>amp</i> _RACE2	AGCAGCAGTAAGTTCAAGAGCGTC	<i>amp</i> (nested PCR)
<i>pam289</i> _RACE1	AAATCGTCTCCAATAGAAAGACC	<i>pam289</i>
<i>pam289</i> _RACE2	AAGTAATAATGCACTTAAACAATAAATAAA CC	<i>pam289</i> (nested PCR)
<i>pam486</i> _RACE1	CCCAATAATCAACTCCTAGAACGCT	<i>pam486</i>
<i>pam486</i> _RACE2	ATTTTGTAAGCCACGCAAGAACATG	<i>pam486</i> (nested PCR)
<i>tengu</i> _RACE1	AAATTAGGCATCTTTCTCGCC	<i>tengu</i>
<i>tengu</i> _RACE2	AAATTAGGCATCTTTCTCGCC	<i>tengu</i> (nested PCR)

2.2.5. DNA 抽出

OY-M 感染植物からの DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。約 0.1 g の試料植物を液体窒素で凍結し、乳鉢を用いて磨砕したのち、キットに添付のプロトコールに従って DNA 抽出を行った。DNA の濃度および純度は、NanoDrop 2000c により吸光度を測定することで確認した。

2.2.6. RpoD 発現ベクターの構築

OY-M の *rpoD* 全長を PCR により増幅し、大腸菌発現ベクターへのクローニングを行った。発現ベクターには pCold I (TaKaRa) を使い、RpoD の N 末端側に 6 個のヒスチジンタグ (His-tag) が付加されるようクローニングした (pCold_His-RpoD)。

2.2.5.項で抽出した DNA を鋳型として、*rpoD_kpnF* および *rpoD_salR* のプライマーセット (表 2.2) を用いて OY-M の *rpoD* 全長を PCR により増幅した。PCR は TaKaRa Taq を用いて行い、反応溶液の組成および反応時間は添付のプロトコールに従った。目的の断片は UltraClean 15 DNA Purification Kit を用いて、添付のプロトコールに従って精製した。

精製した PCR 産物および pCold I ベクターを *KpnI* および *SalI* の両制限酵素により切断したのち、UltraClean 15 DNA Purification Kit を用いて、添付のプロトコールに従って精製した。精製したインサートおよびベクターは Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン)を用いて、16°C で 5 分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物に 50 µl の *E. coli* DH5α 株 コンピテントセル (TaKaRa) を加え混合したのち、氷上で 5 分間静置した。その後、溶液を 42°C で 1 分間熱ショックを与え、氷上で 5 分間静置したのち、SOC 培地を 500 ml 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、大腸菌培養液を LB/アンピシリン寒天培地 (1% Tryptone、0.5% Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、1.5%寒天、100 ppm アンピシリン) に

塗布し、37°Cで1日培養した。生育したコロニーを単離し、1.6 mlの2×YT/アンピシリン液体培地 (1.6% Tryptone、1% Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、100 ppm アンピシリン) で37°C、16時間培養し、DNA自動分離装置 GENE PREP STAR PI-80X (クラボウ) でプラスミドを回収した。回収したプラスミドについて、pCold-F および pCold-R プライマー (表 2.2) を用いたシーケンスにより配列を確認した。シーケンスは 2.2.4.項の手順に従った。

目的の配列が挿入されていたクローンを *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株コンピテントセル (Stratagene) に形質転換した。LB/アンピシリン寒天培地に生育したコロニーを 5 ml の2×YT/アンピシリン液体培地で 37°C、16時間振盪培養し、培養菌液と 50%グリセロールを等量ずつ混合したものをグリセロールストックとして-80°Cで保存し、以降の実験に用いた。

表 2.2 pCold_His-RpoD 構築に用いたプライマー

プライマー	配列 (5'→3') ^a
<i>rpoD</i> _kpnF	<u>GGGGTACCAT</u> GGGAATTCGATAACATAATCAAAA
<i>rpoD</i> _salR	<u>CGACGTCGACTT</u> ATTTGTGGTTGTGGTACAAACTTTTT
pCold-F	ACGCCATATCGCCGAAAGG
pCold-R	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

^a 下線は制限酵素配列の付加配列を示す。

2.2.7. RpoD の大量発現および精製

2.2.6.項で作製した pCold_His-RpoD を導入した大腸菌株を用いて、RpoD の大量発現および His-tag 精製を行った。

pCold_His-RpoD を導入した大腸菌株のグリセロールストック適量を 2 ml の LB/アンピシリン液体培地 (1% Tryptone、0.5% Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、1.5%寒天、50 ppm アンピシリン) に加え、37°C で一晩振盪培養した。培養菌液を 100 ml の LB/アンピシリン液体培地に移植し、37°C で OD₆₀₀=0.4 付近に達するまで振盪培養したのち、15°C で 30 分間静置し、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (isopropyl-β-thiogalactopyranoside, IPTG) を終濃度 0.1 mM になるよう添加し、15°C で 1 日振盪培養した。培養液を 50 ml チューブに回収し、3,000×g、4°C で 15 分間遠心し、上清を廃棄して菌体を回収した。培養液 50 ml の菌体あたり、4 ml の Binding buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.9)、500 mM 塩化ナトリウム、5 mM イミダゾール] に菌体を懸濁し、超音波ホモジナイザー Sonifier 250DA (Branson) を用いて菌体を破碎した。超音波ホモジナイザーは出力 30%に設定し、氷上で 2 分間破碎を行った。破碎液を 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清 (可溶性画分) を回収し、His-tag 精製に用いた。

His-tag 精製は以下のように行った。PD-10 カラム (GE Healthcare) に 2 ml の Ni-NTA Agarose (Qiagen) を加えた。カラム担体を 3 ml の滅菌水で洗浄し、5 ml の 50 mM 硫酸ニッケル水溶液を加えて担体にニッケルイオンを結合させたのち、3 ml の Binding buffer を加えてカラムを平衡化した。可用性画分のタンパク質溶液をカラムに通し、溶出した溶液を再度カラムに通す作業を 2 回繰り返した。10 ml の Binding buffer および 6 ml の Wash buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.9)、500 mM 塩化ナトリウム、60 mM イミダゾール] の順にカラムを洗浄

したのち、3 ml の Elution buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.9)、500 mM 塩化ナトリウム、1 M イミダゾール] を加えて His-tag が付加された RpoD を溶出した。

2.2.8. *in vitro* 転写の鋳型 DNA 作製

2.2.5.項で抽出した DNA を用いて、*in vitro* 転写に用いる鋳型 DNA を PCR により作製した。表 2.3 に示した各プライマーセットを用いて、OY-M の各遺伝子上流配列を PCR により増幅した。PCR は TaKaRa Taq を用いて行いた。目的の断片は UltraClean 15 DNA Purification Kit を用いて精製した。

rnnB の推定プロモーター配列に変異を導入した鋳型 DNA は、表 2.4 に示したプライマーセットを用いたリコンビナント PCR により作製した。以下では *PrrnB_mt1* を例にその手順を示す。2.2.5.項で抽出した DNA を鋳型として、*PrrnB_P2_F* および *PrrnB_mt1R*、*PrrnBmt1F* および *PrrnB_P2_R* の各プライマーセットを用いて PCR を行い、目的の断片を精製した。精製した 2 つの断片を等量ずつ混合した溶液を鋳型として、*PrrnB_P2_F* および *PrrnB_P2_R* のプライマーセットを用いて PCR を行い、目的の断片を生成することにより、*PrrnB_mt1* を得た。他の変異型の鋳型 DNA も同様にして、表 2.4 に示した各プライマーセットを用いて作製した。

表 2.3 *in vitro* 転写の鋳型 DNA 作製に用いたプライマー

プライマー	配列 (5'→3')	ターゲット
<i>PrrnB</i> _F	TTGCCGGAATTCAATCTTAAAAC	<i>rrnB</i>
<i>PrrnB</i> _R	TTACAAAATTGATGCATCAAAAATTGC	<i>rrnB</i>
<i>PibpA</i> _F	GTTTGGTTATTTTCATGTAATTTATCAAAAATATAAGG	<i>ibpA</i>
<i>PibpA</i> _R	CTGGTAATTCAATAGTAATAAAGTATTGATTATCTTG	<i>ibpA</i>
<i>PinfC</i> _F	AGTTTTGCAAAAAAAAAATAACCTCTTAATTGCC	<i>infC</i>
<i>PinfC</i> _R	CTTTTAAAACAATAATTTGGGTTTTCTTTTTGGC	<i>infC</i>
<i>PrplM</i> _F	TATTTGCCAGACCAAAAAGCTGTTATTAGTG	<i>rplM</i>
<i>PrplM</i> _R	GTGTTTTCTTTTAAAATGGAAGCCACTTTGG	<i>rplM</i>
<i>PrpsD</i> _F	AATTACAACCTCAAACCTATTACTTAGTTTGGGG	<i>rpsD</i>
<i>PrpsD</i> _R	CCGTGATTAGCTAATTGTCTTGCTTGAGCTC	<i>rpsD</i>
<i>PrpoD</i> _F	AGTTGTTCCTAAGACTTCACTTC	<i>rpoD</i>
<i>PrpoD</i> _R	CCTTTCTAAAATATTTTTAGAAAAGATAGGAA	<i>rpoD</i>
<i>P157</i> _F	TGCTTGGAATATGTAGCAATTACTGAGATTATAAAAAG	<i>pam157</i>
<i>P157</i> _R	AAATAATGTTCAATAATGTTTGTCTTGGTATCGGG	<i>pam157</i>
<i>P289</i> _F	CACAAACACAAAATAAAAATGTAAGCGTAGA	<i>pam289</i>
<i>P289</i> _R	AAGTAATAATGCACTTAAACAATAAATAAACC	<i>pam289</i>
<i>P486</i> _F	TAGAAAATAAATAAATTTTTAAAAAT	<i>pam486</i>
<i>P486</i> _R	ATTTTGTAAAGCCACGCAAGAACATG	<i>pam486</i>
<i>Ptengu</i> _F	AAACCGTTTTAAAATGACCTGAATT	<i>tengu</i>
<i>Ptengu</i> _R	TTTAGTTTCAATTAGAGTTATCACG	<i>tengu</i>
<i>Pamp</i> _F	AGAAAATAAAGATAATAACTTTGATTAGGAACACAAG	<i>amp</i>
<i>Pamp</i> _R	AGCAGCAGTAAGTTCAAGAGCGTC	<i>amp</i>

表 2.4 *rrnB* の推定プロモーター配列への変異導入に用いたプライマー

プライマー	配列 (5'→3') ^a
<i>PrrnB</i> _P2_F	TTAACAAAAGTATTTTTTTTACTTGCCAAATCCT
<i>PrrnB</i> _P2_R	TCATAGTCTTGGTAGGCC
<i>PrrnB</i> _mt1F	GCAACAAAACggTTGCTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt1R	CACATAAAAAACAAATAGCAAaccGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt2F	GCAACAAAACATggGCTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt2R	CACATAAAAAACAAATAGCccATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt3F	GCAACAAAACATTTggTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt3R	CACATAAAAAACAAATAccAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt4F	GCAACAAAACATTTGCggTTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt4R	CACATAAAAAACAAAaccGCAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt5F	GCAACAAAACATTTGCTAaggTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt5R	CACATAAAAAACAccTAGCAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt6F	GCAACAAAACaaTTGCTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt6R	CACATAAAAAACAAATAGCAAattGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt7F	GCAACAAAACATaaGCTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt7R	CACATAAAAAACAAATAGCttATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt8F	GCAACAAAACATTTaaTATTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt8R	CACATAAAAAACAAATAttAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt9F	GCAACAAAACATTTGCaaTTTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt9R	CACATAAAAAACAAAattGCAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt10F	GCAACAAAACATTTGCTAaaTGTTTTTTTATGTG
<i>PrrnB</i> _mt10R	CACATAAAAAACAttTAGCAAATGTTTTGTTGC
<i>PrrnB</i> _mt11F	GTTTTTTTATGTggTATAATAAAAAAGGTATTGCG
<i>PrrnB</i> _mt11R	CGCAATACCTTTTTTATTATAccACATAAAAAAAC
<i>PrrnB</i> _mt12F	GTTTTTTTATGTGAggTAATAAAAAAGGTATTGCG
<i>PrrnB</i> _mt12R	CGCAATACCTTTTTTATTAaccTCACATAAAAAAAC
<i>PrrnB</i> _mt13F	GTTTTTTTATGTGATAaggATAAAAAAGGTATTGCG
<i>PrrnB</i> _mt13R	CGCAATACCTTTTTTATccTATCACATAAAAAAAC
<i>PrrnB</i> _mt14F	GTTTTTTTATGTGATATAaggAAAAAAGGTATTGCG
<i>PrrnB</i> _mt14R	CGCAATACCTTTTTTccTATATCACATAAAAAAAC

表 2.4 続き

プライマー	配列 (5'→3') ^a
<i>PrrnB_mt15F</i>	GTTTTTTTATGTGATATAATggAAAAGGTATTGCG
<i>PrrnB_mt15R</i>	CGCAATACCTTTTccATTATATCACATAAAAAAAC

^a 小文字の塩基は導入した変異配列を示す。

2.2.9. *in vitro* 転写系

2.2.7.項で精製した RpoD を用いて、以下の手順で *in vitro* 転写解析を行った。1 U の大腸菌 RNAP コア酵素 (Epicentre) と 20 ng の RpoD をバッファー [50 mM Tris-HCl、100 mM 塩化カリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオトレイトール、0.1 mM EDTA、5% (v/v) グリセロール、pH 8.0] 中で混合し、4°C で一晩転倒混和することで、大腸菌 RNAP コア酵素 (RNAP_{Ec}) と RpoD を結合させた (RNAP_{Ec}-RpoD)。結合の確認は、NativePAGE ゲル (Life Technologies) を用いた native ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native poly-acrylamide gel electrophoresis; native PAGE) ののち、2D-銀染色試薬・II (コスモ・バイオ) を用いた銀染色により行った。

RNAP_{Ec}-RpoD に 22 μ l の NTP ミックス (500 μ M ATP、500 μ M UTP、500 μ M GTP、40 μ M CTP; TaKaRa)、2 μ l の α -³²P 標識した CTP (800 Ci/mmol; PerkinElmer)、800 ng の鋳型 DNA を添加し、37°C で 15 分間インキュベートすることで *in vitro* 転写反応を行った。転写産物は DNase I により 15 分間処理を行ったのち、2.2.3.項と同様にフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、沈殿を 15 μ l の 7.5 M 尿素入り泳動バッファーに溶解した。サンプルは 7 M 尿素入り 6% (w/v) ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったのち、FLA-5000 イメージリーダー (GE Healthcare) によりシグナルを検出した。各バンドのシグナル強度の相対値化には、Image J version 1.47 (Abràmoff *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2012) を用いた。

2.2.10. プロモーター配列の予測

2.2.9.項の *in vitro* 転写系を用いた解析により、RpoD による転写制御が確認された遺伝子の転写開始点上流配列より、BioProspector (Liu *et al.*, 2001) を用いて共通プロモーター配列の推定を行った。BioProspector のパラメーターは以下のように設定した: -W6 -w -G 20 -g 17

-d 1 -a 1。得られた共通プロモーター配列のシーケンスロゴ (Schneider & Stephens, 1990) は WebLogo (Crooks *et al.*, 2004) を用いて作成した。

OY-M および他種ファイトプラズマゲノム上のプロモーター配列予測は、Regulatory Sequence Analysis Tools (van Helden, 2003) の dna-pattern を用いて行った。検索配列には、BioProspector を用いた解析により得られた [TC][AT][GC][AC][TC][AT]N₁₇₋₁₉TA[AT]AA[AT] (括弧内の塩基はそのいずれかの塩基であることを、N₁₇₋₁₉ は任意の塩基が 17-19 塩基存在することを示す) を用いた。本章の解析に用いたファイトプラズマおよびその全ゲノム配列の National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank データベースアクセス番号は表 2.5 に示した。

表 2.5 本章で解析に用いたファイトプラズマ

種名	系統名	NCBI GenBank アクセス番号
' <i>Ca. P. asteris</i> '	OY-M	AP006628
' <i>Ca. P. asteris</i> '	AYWB	CP000061
' <i>Ca. P. australiense</i> '	PAa	AM422018
' <i>Ca. P. mali</i> '	AT	CU469464

2.3. 結果

2.3.1. *rrnB* オペロンの転写開始点決定

本章では、OY-M ファイトプラズマにおいてシグマ因子 RpoD が認識するプロモーター配列の特定を試みた。多くの細菌において、RpoD は 16S rRNA 遺伝子の転写制御に関わることが知られている (Young & Steitz, 1979; Ogasawara *et al.*, 1983; Gourse *et al.*, 1986; Tan *et al.*, 1998)。OY-M ファイトプラズマゲノム上には、2つの rRNA オペロン (*rrnA*、*rrnB*) が存在することが報告されているが、これらのうち *rrnA* は 5'末端側にチロシン tRNA 遺伝子を、*rrnB* は 16S rRNA 遺伝子をそれぞれコードしている (Jung *et al.*, 2003)。そこで本研究ではまず、OY-M ゲノム上にコードされる *rrnB* の転写開始点を特定することで、その上流に存在するプロモーター配列の探索を試みた。

OY-M 感染植物および昆虫から抽出した RNA を用いて 5' RACE 解析を行った結果、感染植物および昆虫のいずれにおいても *rrnB* 上流に 3つの転写開始点が確認された (図 2.3)。3つの転写開始点はそれぞれ、*rrnB* の上流 91、254、444 塩基上流に存在しており、以降では各転写開始点を P1、P2、P3 とする。P1、P2、P3 それぞれの 35、および 10 塩基上流には図 2.3 に示した推定プロモーター配列が存在し、P2 および P3 の推定プロモーター配列は互いによく類似していた (図 2.3)。

2.3.2. *rrnB* 推定プロモーター領域を用いた *in vitro* 転写解析

2.3.1.項で特定した P1、P2、P3 の各上流に存在する推定プロモーター配列を RpoD が認識し、転写制御を行っているか検証するために、RpoD を用いた *in vitro* 転写系の構築を試みた。RNAP コア酵素は複数のタンパク質からなる巨大複合体であり、ファイトプラズマの RNAP コア酵素構成因子をそれぞれ大腸菌発現したのち精製し、RNAP コア酵素を再構成させることは困難であると考えられたことから、本研究では RNAP コア酵素として市販の大腸菌 RNAP コア酵素 (RNAP_{Ec}; Epicentre) を用いることとした。

まず、RNAP_{Ec} と大腸菌で発現・精製した OY-M の RpoD が RNAP ホロ酵素複合体 (RNAP_{Ec}-RpoD) を形成するか検証を行った。RNAP_{Ec} と RpoD をバッファー中で混合し 4°C でインキュベートしたのち、native PAGE により複合体の形成を確認した。その結果、RpoD 添加時には RNAP_{Ec} のみの場合と比較して高分子量のバンドが確認された (図 2.4)。このバンドは RNAP_{Ec}-RpoD 複合体の推定分子量 [RNAP_{Ec}: 378 kDa、RpoD (His-Tag を含む): 56 kDa、RNAP_{Ec}-RpoD: 約 434 kDa] と一致したことから、RNAP_{Ec}-RpoD 複合体が形成していると推定された。

そこで次に、*rrnB* 上流の P1、P2、P3 の各上流に存在する推定プロモーター配列すべてを含む領域 (*PrrnB*; *rrnB* の -500~+284 に相当) を鋳型 DNA として、RNAP_{Ec}-RpoD による *in vitro* 転写解析を行った。その結果、RpoD を添加した場合にのみ特異的な RNA の転写が確認された (図 2.5)。転写された RNA の長さは約 700 および 500 塩基であり、これらはそれぞれ P3 (*rrnB* の 444 塩基上流) および P2 (*rrnB* の 254 塩基上流) からの転写産物に相当する長さであった (図 2.5)。一方で、P1 (*rrnB* の 91 塩基上流) からの転写産物に相当する 375 塩基の転写産物は確認されなかった (図 2.5)。以上の結果から、RpoD は RNAP_{Ec} と RNAP ホ

ロ酵素を形成し、*rrnB* の P2 および P3 上流に存在するプロモーター配列を認識して転写反応を行うことが示唆された。

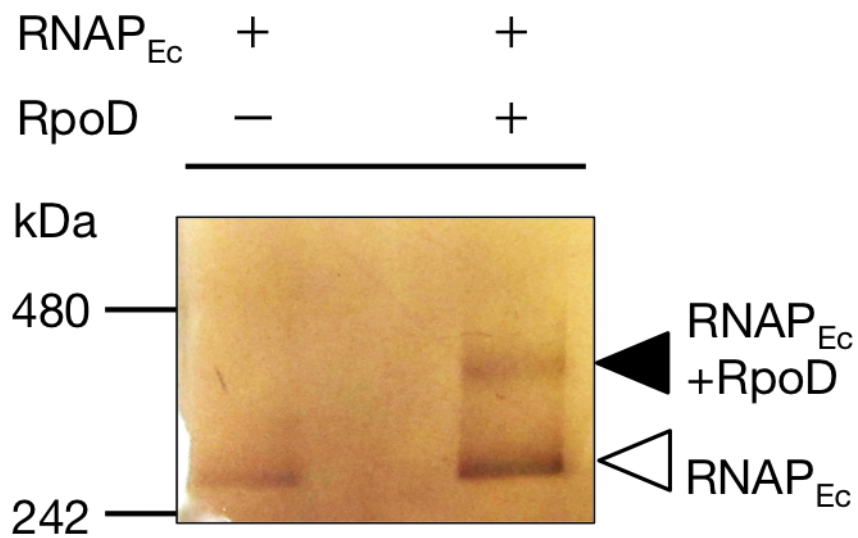


図 2.4 RNAP_{Ec} と RpoD の複合体形成の確認

RNAP_{Ec} と RpoD をバッファー中で混合したのち、native PAGE を行った。黒矢頭は RNAP_{Ec} と RpoD の複合体の推定分子量 (約 434 kDa) を、白矢頭は RNAP_{Ec} の分子量 (378 kDa) を、それぞれ示す。

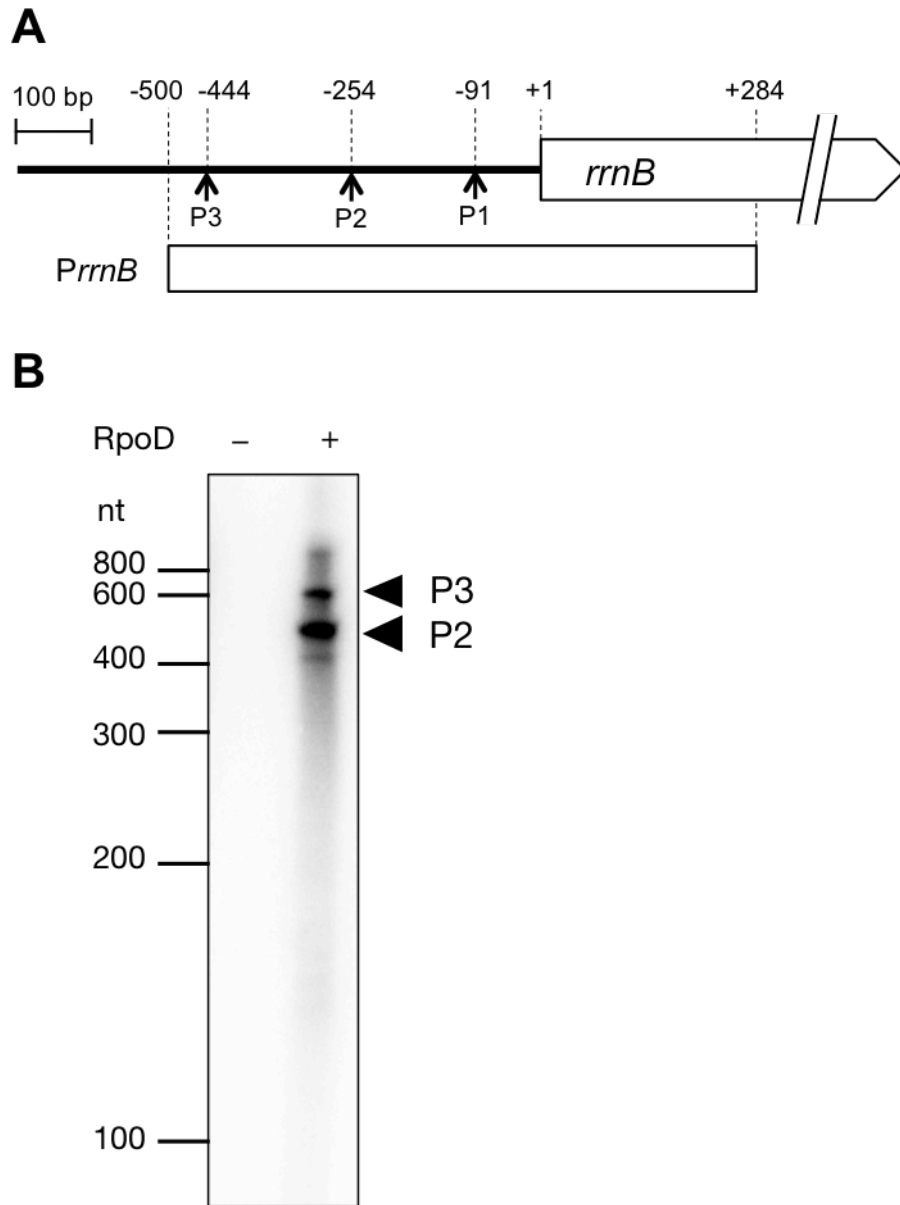


図 2.5 *rrnB* の *in vitro* 転写解析

A. *in vitro* 転写解析に用いた鋳型 DNA (*PrmB*) の模式図。B. *PrmB* を用いた *in vitro* 転写解析。転写産物を電気泳動したのち、オートラジオグラフィにより検出を行った。黒矢頭は P2 および P3 から転写が行われた場合に生成すると推定される転写産物の位置を示す。

2.3.3. RpoD が認識する *rrnB* プロモーター配列の特定

2.3.2.項で RpoD は *rrnB* の転写制御に関与する可能性が示されたことから、本項ではさらに、RpoD が認識する *rrnB* のプロモーター配列特定を試みた。RpoD により転写が行われると考えられた P2 の推定プロモーター配列 (-35 領域: 5'-TTGCTA-3'; -10 領域: 5'-TATAAT-3') および P3 の推定プロモーター配列 (-35 領域: 5'-TTGCCA-3'; -10 領域: 5'-TATAAT-3') は互いに類似していたことから (図 2.3)、P2 の推定プロモーター配列を含む領域 (*PrrnB_P2*) を鋳型 DNA とし、-35 および-10 の各推定プロモーター配列に変異を導入し、*in vitro* 転写における転写活性を比較した。

まず、P2 の推定-35 プロモーター配列近傍に 2 塩基ずつ GG への変異導入を行い (mt1~mt5)、*in vitro* 転写解析を行った。その結果、-35 および-34 に TT から GG への変異を導入 (mt2) した場合には、転写活性が *PrrnB_P2* と比較して 16%まで低下することが示された (図 2.6)。一方で、-37 と-36 (mt1)、-33~-28 (mt3~5) への変異導入では転写活性に大きな変化は見られなかった。同様に、推定-35 プロモーター配列近傍に 2 塩基ずつ AA への変異を導入 (mt6~mt10) した場合にも、-35 および-34 の TT を AA に変異させた (mt7) 場合にのみ、大幅な転写活性の低下が確認された (図 2.6)。以上の結果から、RpoD による *rrnB* の P2 からの転写には、-35 および-34 に存在する TT が重要であると考えられた。

次に、推定-10 プロモーター配列について解析を行った。推定-10 プロモーター配列近傍に 2 塩基ずつ GG への変異導入を行い (mt11~mt15)、*in vitro* 転写解析を行った。その結果、-12 から-7 に変異を導入 (mt12~mt14) した場合には、*PrrnB_P2* と比較して 6-22%まで転写活性が低下した (図 2.6)。-14 と-13 (mt11)、-6 と-5 (mt15) への変異ではわずかに転写活性の低下が確認された (図 2.6)。従って、RpoD による *rrnB* の P2 からの転写には、-12 および-7 に存在する 5'-TATAAT-3'が重要であると考えられた。

-35 および-10 における結果を併せると、RpoD による *rrnB* の P2 からの転写には、P2 上流に存在する 5'-TT-21 bp-TATAAT-3'の配列が、RpoD による認識において重要な役割を果たすと推定された。同様の配列は *in vitro* 転写で転写が確認された P3 の上流に存在する一方、*in vitro* 転写で転写が確認された P1 の上流には存在していなかった (図 2.3)。

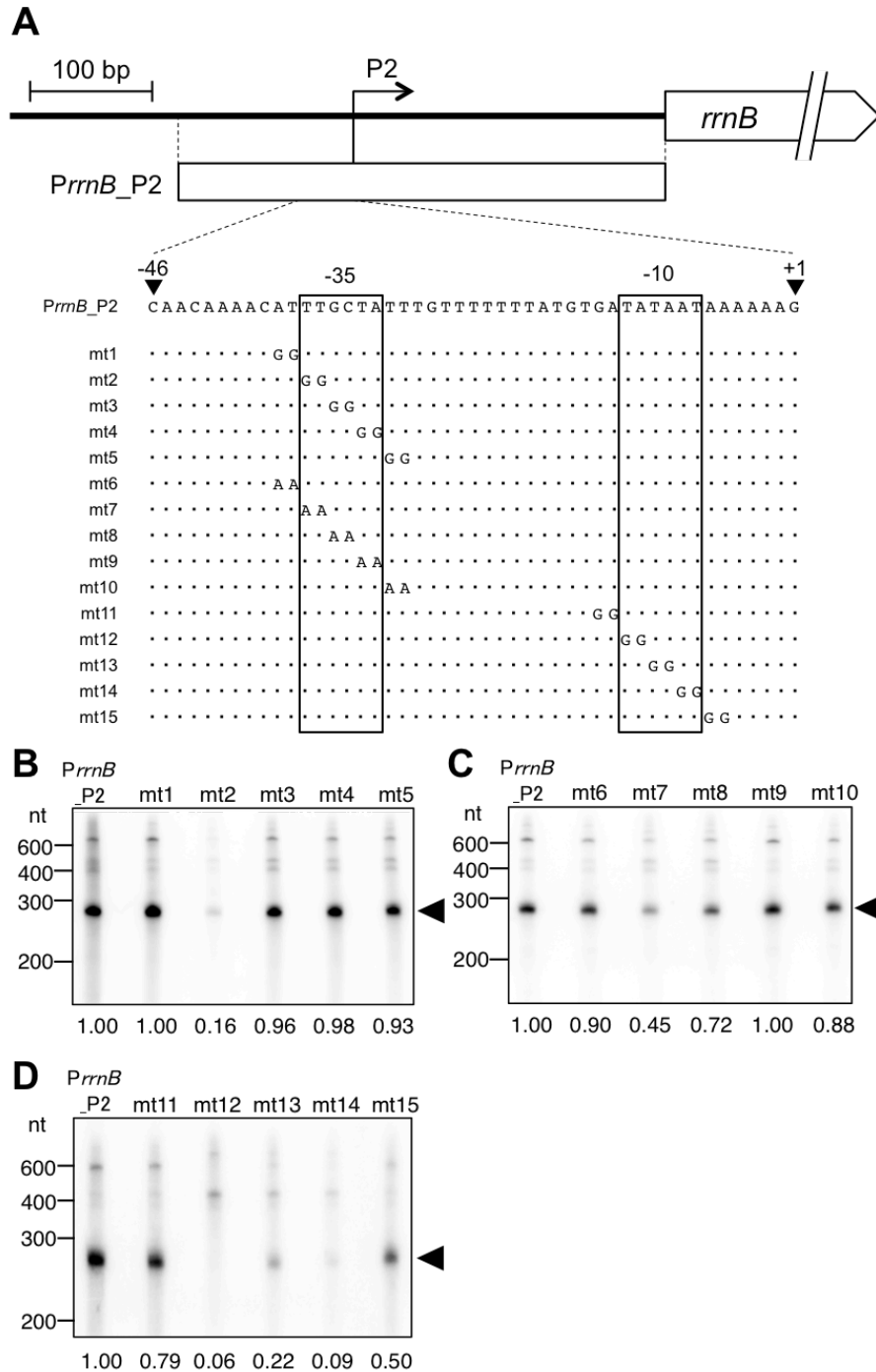


図 2.6 *rrnB* のプロモーター配列解析

A. *rrnB* のプロモーター配列解析に用いた鋳型 DNA (*PrrnB*_P2, mt1~mt15) の模式図。mt1~mt15 では、*PrrnB*_P2 と同じ塩基の箇所は点で示した。B. mt1~mt5 を用いた *in vitro* 転写解析。C. mt6~10 を用いた *in vitro* 転写解析。D. mt11~mt15 を用いた *in vitro* 転写解析。黒矢頭は転写産物の位置を示す。各レーンの下の数値は、*PrrnB*_P2 のシグナル強度を 1 としたときの相対値を示す。シグナル強度は ImageJ より算出した。

2.3.4. RpoD により転写制御されるハウスキーピング遺伝子の解析

2.3.3.項で RpoD は *rrnB* の転写制御に関与することが示された。そこで本項では、RpoD により転写制御される *rrnB* 以外の OY-M 遺伝子の探索を行った。多くの細菌において、RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写制御を担うことが報告されている (Aramaki & Fujita, 1999; Liu & Zuber, 2000; Choonee *et al.*, 2007; Rosenthal *et al.*, 2008)。そこで本研究では、OY-M のハウスキーピング遺伝子が RpoD により転写制御されるか解析を行った。対象として、翻訳開始因子 IF-3 遺伝子 (*infC*)、50S リボソームサブユニットタンパク質 L13 遺伝子 (*rplM*)、30S リボソームサブユニットタンパク質 S4 遺伝子 (*rpsD*)、*rpoD* の 4 遺伝子について解析を行った。加えて、ファイトプラズマと同様に AT リッチなゲノムを持つ '*Ca. Blochmannia floridanus*' において RpoD が転写制御を担うことが報告されている、分子シャペロン遺伝子 *ibpA* (Stoll *et al.*, 2009) についても解析を行った。

各遺伝子上流領域を鋳型 DNA として *in vitro* 転写解析を行った結果、*infC*、*rplM*、*rpsD*、*ibpA* のそれぞれの上流領域 (*PinfC*、*PrplM*、*PrpsD*、*PibpA*) を鋳型 DNA として添加した場合には、RpoD 添加時特異的に転写 RNA が確認された (図 2.7)。一方で、*rpoD* の上流領域 (*PrpoD*) を鋳型 DNA として添加した場合には、RNA の転写は確認されなかった。以上の結果から、RpoD は *rpoD* 自身の転写には関与しないものの、複数のハウスキーピング遺伝子の転写に関与することが示唆された。

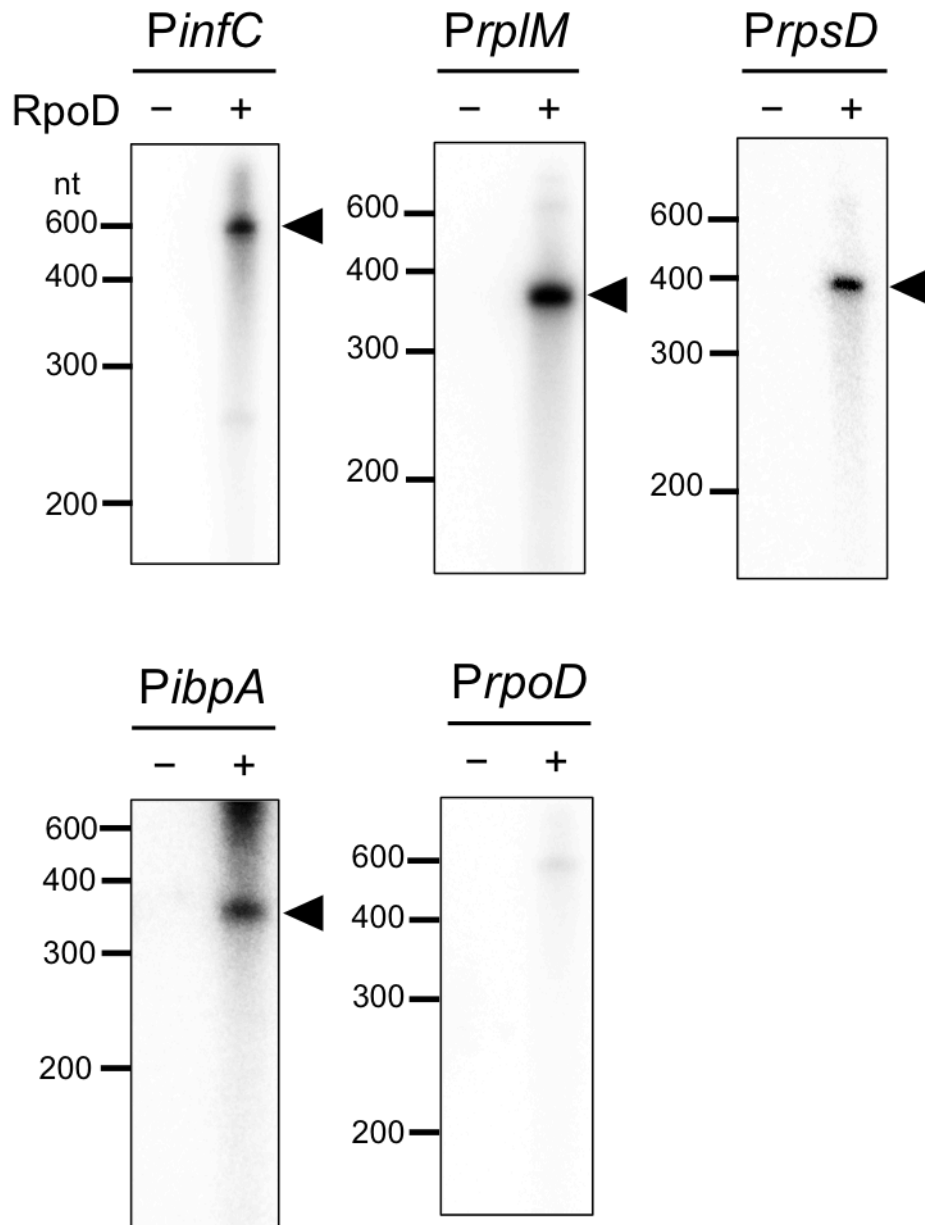


図 2.7 ハウスキーピング遺伝子の *in vitro* 転写解析

各ハウスキーピング遺伝子上流配列を鋳型 DNA として用いた *in vitro* 転写解析。転写産物を電気泳動したのち、オートラジオグラフィーにより検出を行った。黒矢頭は各鋳型 DNA の長さから想定される転写産物の位置を示す。

2.3.5. RpoD により転写制御される宿主相互作用因子の解析

2.3.4.項で RpoD は複数のハウスキーピング遺伝子の転写制御に関与することが示された。本項では、RpoD がハウスキーピング遺伝子以外の OY-M 遺伝子の発現制御を担うか検証するために、ファイトプラズマと宿主との相互作用に関与すると考えられる、5 つの遺伝子について *in vitro* 転写解析を行った。対象として、昆虫媒介関連遺伝子 *amp* (Suzuki *et al.*, 2006)、宿主接着因子遺伝子 *pam289* (Neriya *et al.*, 2014)、天狗巣症状誘導遺伝子 *tengu* (Hoshi *et al.*, 2009)、植物で高発現である分泌タンパク質遺伝子 *pam486* (Oshima *et al.*, 2011)、昆虫で高発現である分泌タンパク質遺伝子 *pam157* (Oshima *et al.*, 2011)、について解析を行った。

各遺伝子上流領域 (*Pamp*、*Ppam289*、*Ptengu*、*Ppam486*、*Ppam157*) を鋳型 DNA として *in vitro* 転写解析を行ったところ、5 つすべての鋳型 DNA から RpoD の添加時特異的に RNA の転写が確認された (図 2.8)。従って、RpoD はハウスキーピング遺伝子以外にもファイトプラズマ-宿主相互作用に関与する様々な遺伝子の転写制御に関与することが示唆された。

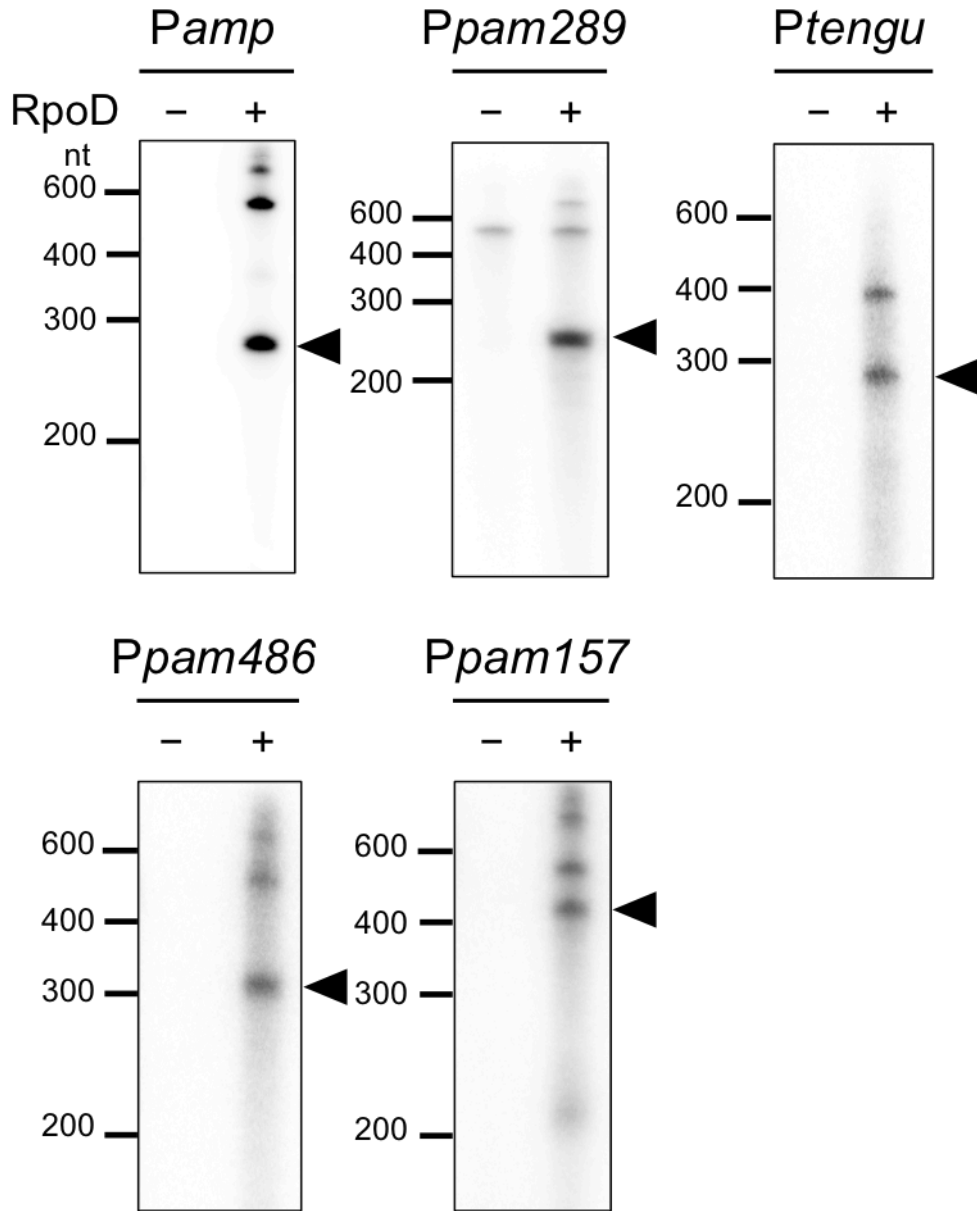


図 2.8 宿主相互作用因子の *in vitro* 転写解析

各宿主相互作用因子遺伝子の上流配列を鋳型 DNA として用いた *in vitro* 転写解析。転写産物を電気泳動したのち、オートラジオグラフィーにより検出を行った。黒矢頭は各鋳型 DNA の長さから想定される転写産物の位置を示す。

2.3.6. RpoD 共通プロモーター配列の特定

2.3.3.項では、RpoD が認識する *rrnB* のプロモーター配列を特定した。また、2.3.4.項および 2.3.5.項により、RpoD によって転写制御される 9 遺伝子を特定した。本項では、RpoD が認識するプロモーター配列についてより詳細に解析するために、2.3.4.項および 2.3.5.項で *in vitro* 転写解析を行った 9 遺伝子について転写開始点を特定し、その上流に存在するプロモーター配列の特定を試みた。

2.3.4.項および 2.3.5.項で *in vitro* 転写解析を行った 9 遺伝子について 5' RACE 解析を行い、各遺伝子の転写開始点を特定した (図 2.9)。5' RACE 解析は OY-M 感染植物および昆虫それぞれ由来の RNA を用いて行ったが、いずれの遺伝子の転写開始点についても、植物および昆虫それぞれで同じ位置であった。転写開始点の塩基は A または G であり (図 2.9、図 3.0)、これはファイトプラズマと近縁なマイコプラズマにおける報告と一致していた (Weber *et al.*, 2012)。各転写開始点から、2.3.4.項および 2.3.5.項で *in vitro* 転写に用いた鋳型 DNA の 3' 末端までの距離は、*in vitro* 転写において確認された転写産物の長さとはほぼ一致していた。

次に、特定した転写開始点上流に存在するプロモーター配列を特定するために、モチーフ探索ツール BioProspector (Liu *et al.*, 2001) を用いて共通プロモーター配列の特定を試みた。その結果、転写開始点上流-35 および-10 それぞれにおいて 6 塩基の保存配列の存在が推定された (図 2.9)。共通-10 プロモーター配列 (5'-TAtAAT-3'; 小文字の塩基はやや保存性が低いことを表す) は 9 遺伝子すべての転写開始点上流に見出された (図 2.9)。共通-35 プロモーター配列 (5'-TTgaca-3') の存在も推定されたが、共通-10 プロモーター配列と比較して保存性は低かった (図 2.9)。-35 および-10 プロモーター配列間の距離は、17~19 塩基の差異が確認された (図 2.9)。

各転写開始点上流 50 塩基について、塩基の保存性を解析した。その結果、-35 および-10 プロモーター配列に加えて、-42~-39 付近の A リッチな領域および-17~-14 付近の保存配列 (5'-TnTG-3') の存在が確認された (図 2.10)。これらの配列は他の細菌における RpoD が認識するプロモーター領域に普遍的に見られる (Graves & Rabinowitz, 1986; Helmann, 1995) ことから、本項で見出された保存配列は OY-M の RpoD が認識するプロモーター配列であることが示唆された。

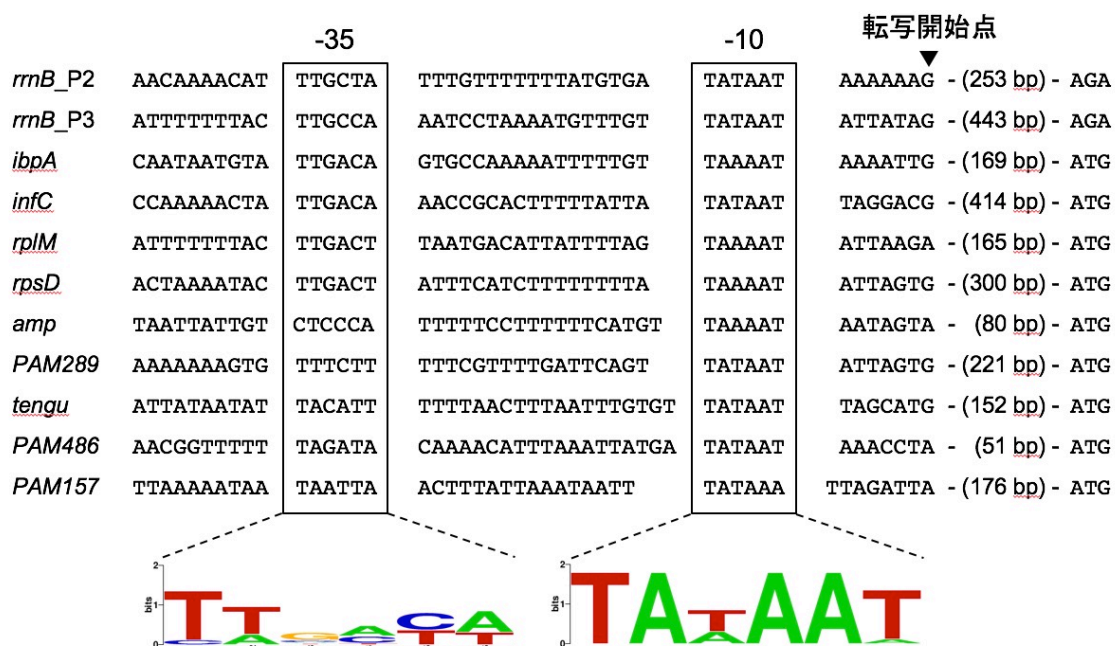


図 2.9 RpoD により転写制御される遺伝子の転写開始点およびプロモーター配列の特定
 黒矢頭の塩基は 5' RACE 解析により決定された転写開始点を示す。右端の 3 塩基は rRNA の 5'末端または遺伝子の開始コドンを示す。BioProspector により-35 領域および-10 領域に見出された保存配列について、WebLogo を用いてシーケンスログを作成した。シーケンスログの各塩基の高さは、その塩基の保存性を示す。

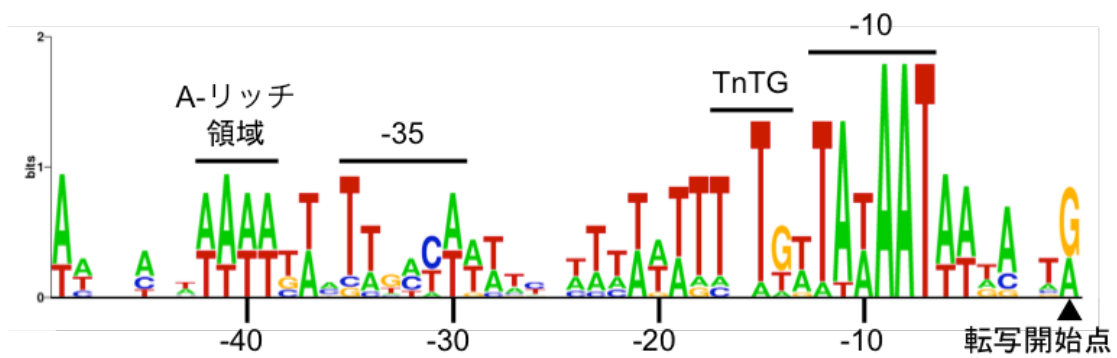


図 2.10 RpoD により転写制御される遺伝子上流配列の保存性

in vitro 転写解析により RpoD により転写制御されることが示された遺伝子の上流 50 塩基の配列より、WebLogo を用いてシーケンスロゴを作成した。シーケンスロゴの各塩基の高さは、その塩基の保存性を示す。

2.3.7. RpoD により転写制御される OY-M 遺伝子の予測

2.3.6.項で特定した OY-M の RpoD が認識するプロモーター配列 [5'-TTgaca-(17-19 bp)-TAtAAT-3'; 小文字の塩基はやや保存性が低いことを表す] について、OY-M ゲノム上でこのプロモーター配列を上流に有する遺伝子を探索し、RpoD により転写制御される OY-M 遺伝子の推定を試みた。

2.3.6.項で特定したプロモーター配列を、DNA モチーフ探索ツール RSA-tools (van Helden, 2003) を用いて OY-M ゲノム上から探索したところ、540 ヶ所にプロモーター配列の存在が推定された。これらのうち、開始コドン、もしくは rRNA または tRNA の 5'末端から 500 塩基以内にプロモーター配列が存在した箇所は 103 ヶ所であり、その下流にある遺伝子数は 88 個であった (表 2.6)。

これら 88 遺伝子を、その機能に基づいて Cluster of Orthologous Groups (COGs; Tatusov *et al.*, 2001) に分類を行った。その結果、25 遺伝子 (29%) はゲノム複製・翻訳・転写 (翻訳、複製)、11 遺伝子 (12%) は代謝 (トランスポーターなど)、8 遺伝子 (9%) は細胞形成・分裂・運動 (シャペロンなど) に分類され、その機能はハウスキーピング遺伝子を含めた多様なものであった (表 2.6, 表 2.7, 図 2.11)。

RpoD は昆虫宿主において高発現であることが報告されている (Oshima *et al.*, 2011) が、これら 88 遺伝子のホストスイッチに伴う発現パターンは、昆虫で 2 倍以上高発現である遺伝子は 10 遺伝子のみであった (Oshima *et al.*, 2011; 表 2.6, 図 2.12)。

表 2.6 OY-M ゲノム中における RpoD 認識プロモーターの予測

ORF	遺伝子	COG	発現比 (植物/昆虫) ^a	-35	-10
<i>pam008</i>	<i>rfaG</i>	M	0.270	TTGCTT	TATAAA
<i>pam011</i>	<i>rpsR</i>	J	2.610	CTGATA	TAAAAT
<i>pam022</i>	<i>dppB</i>	E	1.534	CAGATT	TAAAAT
<i>pam023</i>	機能未知	X	0.000	CTGATA	TAAAAT
<i>pam028</i>	<i>ibpA</i>	O	1.501	TTGACA	TAAAAT
<i>pam033</i>	機能未知	X	-3.000	TTGCTA	TATAAA
<i>pam046</i>	機能未知	X	1.601	CTCATT	TAAAAA
<i>pam059</i>	<i>mdlB</i>	Q	3.070	TTCCTT	TAAAAT
<i>pam060</i>	機能未知	X	3.418	TTCATA	TATAAT
<i>pam060</i>	機能未知	X	3.418	TACCCT	TATAAT
<i>pam063</i>	<i>himA</i>	L	-0.422	TAGATT	TATAAT
<i>pam070</i>	機能未知	X	6.719	TAGATA	TATAAT
<i>pam078</i>	<i>artM</i>	E	-0.062	TAGATT	TAAAAT
<i>pam081</i>	<i>rpsT</i>	J	1.131	TTGCTT	TATAAT
<i>pam083</i>	<i>serS</i>	J	-0.062	TACATT	TAAAAT
<i>pam085</i>	機能未知	R	-2.729	TTCCTA	TAAAAT
<i>pam092</i>	<i>znuA</i>	P	-1.574	TTCATA	TATAAT
<i>pam106</i>	<i>rpmB</i>	J	0.689	CACCCA	TATAAT
<i>pam109</i>	機能未知	X	1.510	TTGACA	TAAAAT
<i>pam109</i>	機能未知	X	1.510	TAGCTA	TATAAA
<i>pam109</i>	機能未知	X	1.510	TTGCTT	TATAAA
<i>pam120</i>	<i>groES</i>	O	-0.601	TTGCCA	TATAAT
<i>pam122</i>	<i>amp</i>	X	0.340	CTCCCA	TAAAAT
<i>pam128</i>	<i>aspS</i>	J	0.339	CTCATA	TATAAT
<i>pam130</i>	<i>hflB</i>	O	-	CTCCTT	TATAAT
<i>pam138</i>	<i>rplM</i>	J	-0.598	TTGACT	TAAAAT
<i>pam138</i>	<i>rplM</i>	J	-0.598	TACACA	TAAAAA
<i>pam152</i>	<i>pth</i>	J	-0.607	TAGCTA	TAAAAT

表 2.6 続き

ORF	遺伝子	COG	発現比 (植物/昆虫) ^a	-35	-10
<i>pam153</i>	機能未知	R	0.521	TTGACA	TAAAAT
<i>pam153</i>	機能未知	R	0.521	TTGCTA	TATAAA
<i>pam153</i>	機能未知	R	0.521	TTGCTA	TAAAAT
<i>pam164</i>	<i>dut</i>	F	-1.211	TTGATT	TATAAT
<i>pam198</i>	<i>rpmF</i>	J	1.112	TTGACA	TAAAAT
<i>pam199</i>	<i>rpsJ</i>	J	-0.602	TTCATT	TATAAA
<i>pam247</i>	<i>rpmH</i>	J	-0.470	TTGACA	TATAAT
<i>pam271</i>	機能未知	X	-0.376	TACCTA	TAAAAT
<i>pam274</i>	機能未知	X	-0.729	CACCCA	TAAAAT
<i>pam274</i>	機能未知	X	-0.729	CTGATA	TAAAAT
<i>pam284</i>	<i>eno</i>	G	-0.559	TACATT	TATAAT
<i>pam288</i>	機能未知	X	-2.987	TAGCCT	TATAAA
<i>pam305</i>	<i>alaS</i>	J	0.781	TTCACT	TATAAT
<i>pam309</i>	<i>lplA</i>	H	1.868	TTGATT	TATAAA
<i>pam312</i>	機能未知	X	-1.072	CTGCTT	TATAAT
<i>pam326</i>	<i>hflB</i>	O	n.d.	TTCCTA	TAAAAT
<i>pam331</i>	機能未知	X	n.d.	CAGATT	TAAAAT
<i>pam338</i>	機能未知	X	n.d.	TTCCTA	TAAAAT
<i>pam355</i>	<i>uvrD</i>	L	n.d.	TTCATT	TATAAA
<i>pam366</i>	<i>hflB</i>	O	n.d.	TTCCTA	TAAAAT
<i>pam371</i>	機能未知	X	n.d.	CAGATT	TAAAAT
<i>pam382</i>	機能未知	X	-3.000	TTGATA	TAAAAT
<i>pam398</i>	機能未知	L	n.d.	TTCCCT	TAAAAT
<i>pam404</i>	機能未知	X	n.d.	TTGATA	TAAAAT
<i>pam406</i>	<i>tra5</i>	L	n.d.	TTGATA	TATAAT
<i>pam406</i>	<i>tra5</i>	L	n.d.	TTGCCT	TATAAA
<i>pam413</i>	<i>uvrD</i>	L	n.d.	TTGCTT	TATAAT
<i>pam413</i>	<i>uvrD</i>	L	n.d.	CTGATT	TAAAAT
<i>pam433</i>	<i>uvrC</i>	L	-1.023	TTGATT	TATAAT

表 2.6 続き

ORF	遺伝子	COG	発現比 (植物/昆虫) ^a	-35	-10
<i>pam446</i>	機能未知	X	3.786	TTGATA	TAAAAT
<i>pam447</i>	<i>tldD</i>	R	2.678	TTGCCT	TATAAT
<i>pam453</i>	<i>srmB</i>	L	0.280	TTCCTT	TATAAT
<i>pam453</i>	<i>srmB</i>	L	0.280	TTCCCA	TATAAA
<i>pam476</i>	<i>mutT</i>	L	0.058	TAGCCA	TATAAT
<i>pam479</i>	機能未知	X	n.d.	TTGCTT	TATAAT
<i>pam486</i>	機能未知	X	6.643	TAGATA	TATAAT
<i>pam492</i>	機能未知	X	n.d.	TACCTA	TAAAAT
<i>pam509</i>	機能未知	X	n.d.	CTGCTTG	TATAAT
<i>pam526</i>	機能未知	X	n.d.	TAGACT	TATAAT
<i>pam542</i>	機能未知	X	n.d.	TAGATA	TATAAT
<i>pam556</i>	機能未知	X	n.d.	CTGCTT	TATAAT
<i>pam577</i>	機能未知	X	2.199	CAGATT	TAAAAT
<i>pam586</i>	<i>rpsD</i>	J	1.900	TTGACT	TAAAAT
<i>pam599</i>	<i>phnL</i>	R	-0.624	TTGCCT	TATAAA
<i>pam599</i>	<i>phnL</i>	R	-0.624	TTGCTT	TATAAT
<i>pam600</i>	<i>acoA</i>	C	-2.631	TACATT	TATAAA
<i>pam607</i>	<i>plsX</i>	I	0.215	TTCCTT	TAAAAT
<i>pam607</i>	<i>plsX</i>	I	0.215	TTCATT	TATAAA
<i>pam612</i>	<i>psd</i>	I	-0.339	CAGCCT	TATAAT
<i>pam618</i>	<i>hsdR</i>	L	0.343	TTGCTA	TATAAA
<i>pam632</i>	機能未知	X	0.441	TACATT	TATAAT
<i>pam632</i>	機能未知	X	0.441	TTGCCT	TATAAA
<i>pam634</i>	機能未知	R	1.490	TTGATA	TATAAA
<i>pam635</i>	機能未知	X	n.d.	TTGACT	TATAAT
<i>pam653</i>	機能未知	X	n.d.	TTCCTA	TAAAAT
<i>pam663</i>	機能未知	X	-1.176	CACCCA	TAAAAT
<i>pam664</i>	<i>rptI</i>	O	2.312	TTCATT	TATAAA
<i>pam670</i>	機能未知	X	2.181	TTGATA	TAAAAT

表 2.6 続き

ORF	遺伝子	COG	発現比 (植物/昆虫) ^a	-35	-10
<i>pam676</i>	<i>exo</i>	L	0.052	TTCATT	TAAAAT
<i>pam682</i>	機能未知	X	n.d.	TACCTA	TAAAAT
<i>pam690</i>	機能未知	X	2.197	TACACA	TAAAAT
<i>pam712</i>	機能未知	X	0.000	TAGACA	TATAAA
<i>pam719</i>	機能未知	X	0.000	TAGCTA	TATAAA
<i>pam727</i>	<i>hflB</i>	O	n.d.	TAGATT	TATAAT
<i>pam728</i>	機能未知	X	n.d.	CAGCTT	TATAAA
<i>pam728</i>	機能未知	X	n.d.	CAGCTT	TAAAAT
<i>pam734</i>	<i>norM</i>	Q	0.291	CTCCCA	TAAAAT
<i>pam741</i>	機能未知	X	-0.320	TTCATT	TAAAAT
<i>pam743</i>	<i>rpmI</i>	J	0.495	CACCCA	TAAAAT
<i>pam744</i>	<i>infC</i>	J	-0.706	TTGACA	TATAAT
<i>pam763</i>	<i>uvrB</i>	L	n.d.	TAGATT	TATAAA
<i>pam765</i>	<i>tengu</i>	X	n.d.	TACATT	TATAAT
<i>pam_r006</i>	<i>16S rRNA</i>	RNA	n.d.	TTGCTA	TATAAT
<i>pam_r006</i>	<i>16S rRNA</i>	RNA	n.d.	TTGCCA	TATAAT
<i>pam_t029</i>	<i>tRNA-Glu</i>	RNA	n.d.	TTGACT	TATAAT

^a 発現比のデータは Oshima *et al.*, 2011 より引用した。数値は \log_2 (植物におけるシグナル/昆虫におけるシグナル) を示し、正の値であれば植物で高発現、負の値であれば昆虫で高発現であることを示す。n.d. (not detected) はシグナルが検出されず、発現比が不明であった遺伝子を示す。

表 2.7 RpoD 認識プロモーターの存在が予測された遺伝子の分類

機能	COG	遺伝子数
ゲノム複製・転写・翻訳		
翻訳	J	14
複製	L	11
代謝		
エネルギーの生産、蓄積	C	1
アミノ酸の輸送、代謝	E	2
核酸の輸送、代謝	F	1
炭化水素の輸送、代謝	G	1
補酵素の輸送、代謝	H	1
脂質の輸送、代謝	I	2
無機イオンの輸送、代謝	P	1
二次代謝産物の合成、輸送、異化	Q	2
細胞形成・分裂・運動		
細胞膜の合成	M	1
翻訳後の修飾、シャペロン	O	7
rRNA・tRNA	RNA	2
機能未知		
機能未知 (モチーフ等の予測のみ)	R	5
機能未知	X	37
合計		88

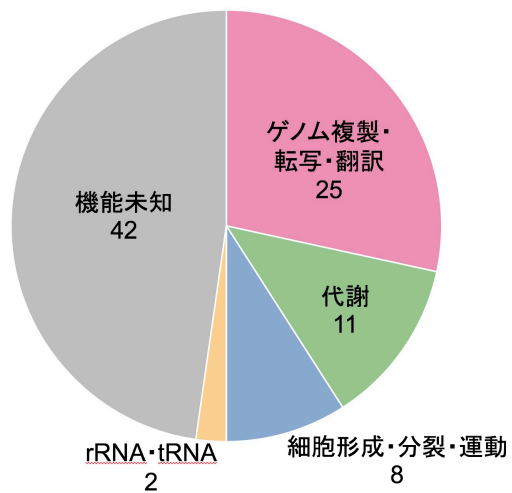


図 2.11 RpoD 認識プロモーターの存在が予測された遺伝子の分類
表 2.6 および表 2.7 をもとに円グラフにまとめた。

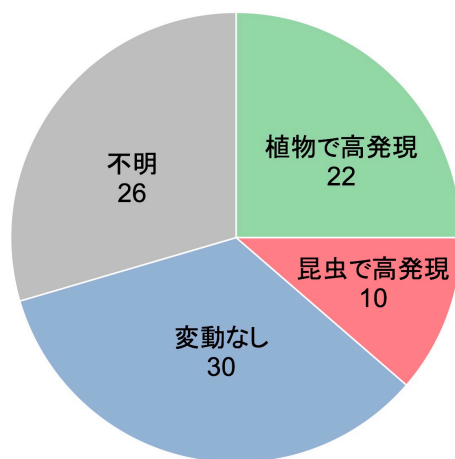


図 2.12 RpoD 認識プロモーターの存在が予測された遺伝子の植物-昆虫間発現変動
表 2.6 および Oshima *et al.*, 2011 をもとに円グラフにまとめた。

2.3.8. 他種ファイトプラズマにおける RpoD 認識プロモーターの予測

これまでに詳細なゲノム解析が行われている OY-M 以外の 3 種のファイトプラズマにおいても、RpoD の保存性は高い (図 2.1; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)。そこで本項では、2.3.6.項で特定した OY-M の RpoD が認識するプロモーター配列が、他種ファイトプラズマにおいても保存されているか解析を行った。

3 種のファイトプラズマゲノム上から、DNA モチーフ探索ツール RSA-tools (van Helden, 2003) を用いて 2.3.6.項で特定したプロモーター配列を探索したところ、‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統 (AYWB) では 65 遺伝子、‘*Ca. P. australiense*’ PAa 系統 (PAa) では 64 遺伝子、‘*Ca. P. mali*’ AT 系統 (AT) では 91 遺伝子の上流に、RpoD 認識プロモーターの存在が推定された (表 2.8)。RpoD 認識プロモーターの存在が推定された遺伝子の機能は、OY-M と同様に、ハウスキーピング遺伝子を含めた多様なものであった (表 2.8; 図 2.13)。また、2.3.7.項で OY-M において推定された 88 遺伝子のうち 34 遺伝子 (39%) のホモログが、他種ファイトプラズマ 3 種のうち少なくとも 1 種においても RpoD 認識プロモーターを有すると推定された (表 2.9)。

表 2.8 RpoD 認識プロモーターの存在が予測された他種ファイトプラズマ遺伝子の分類

機能	COG	ファイトプラズマ		
		AYWB	PAa	AT
ゲノム複製・転写・翻訳				
翻訳	J	10	14	17
転写	K	0	2	2
複製	L	6	3	8
代謝				
エネルギーの生産、蓄積	C	1	0	4
アミノ酸の輸送、代謝	E	1	2	3
核酸の輸送、代謝	F	3	1	6
炭化水素の輸送、代謝	G	1	2	1
補酵素の輸送、代謝	H	1	0	2
脂質の輸送、代謝	I	1	0	1
無機イオンの輸送、代謝	P	2	1	4
二次代謝産物の合成、輸送、異化	Q	1	0	0
細胞形成・分裂・運動				
細胞周期の制御、細胞分裂	D	0	0	1
細胞膜の合成	M	1	0	2
細胞の運動性	N	0	2	1
翻訳後の修飾、シャペロン	O	3	2	5
rRNA・tRNA	RNA	5	4	3
機能未知				
機能未知 (モチーフ等の予測のみ)	R	4	2	2
機能未知	X	25	29	29
合計		65	64	91

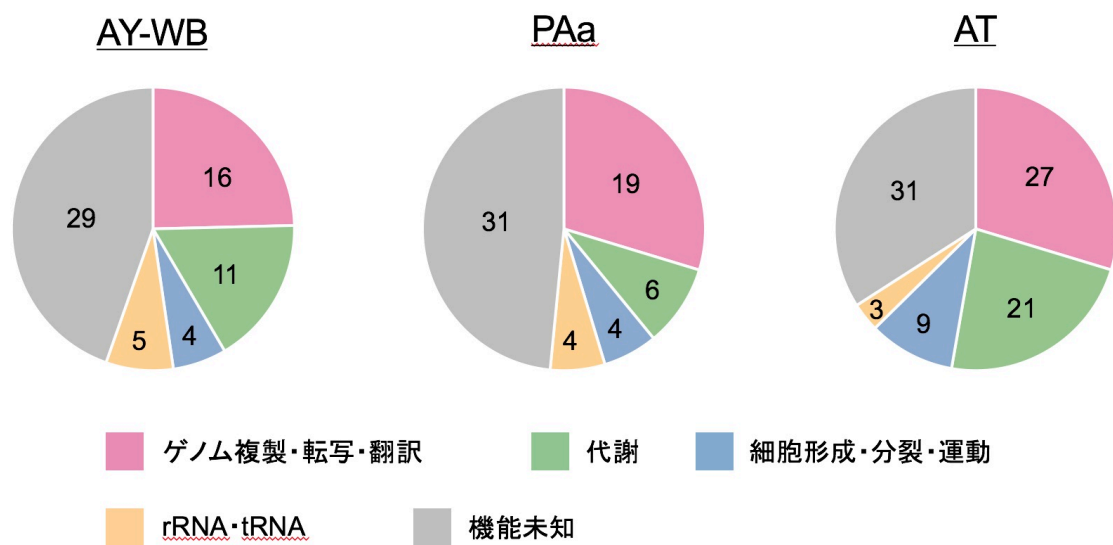


図 2.13 RpoD 認識プロモーターの存在が予測された他種ファイトプラズマ遺伝子の分類
表 2.8 をもとに円グラフにまとめた。

表 2.9 他種ファイトプラズマゲノムにおける RpoD 認識プロモーターの予測

ORF	遺伝子	他種ファイトプラズマにおけるホモログ遺伝子
<i>pam008</i>	<i>rfaG</i>	<i>atp_00083</i>
<i>pam028</i>	<i>ibpA</i>	<i>paa_0717, aywb_017</i>
<i>pam081</i>	<i>rpsT</i>	<i>aywb_633</i>
<i>pam085</i>	機能未知	<i>aywb_630</i>
<i>pam092</i>	<i>znuA</i>	<i>atp_00492, paa_0481, aywb_624</i>
<i>pam106</i>	<i>rpmB</i>	<i>atp_00278</i>
<i>pam120</i>	<i>groES</i>	<i>atp_00184, paa_0760</i>
<i>pam130</i>	<i>hflB</i>	<i>atp_00146, atp_00460, aywb_187</i>
<i>pam138</i>	<i>rplM</i>	<i>atp_00332, paa_0496, aywb_582</i>
<i>pam152</i>	<i>pth</i>	<i>paa_0610</i>
<i>pam153</i>	機能未知	<i>aywb_566</i>
<i>pam164</i>	<i>dut</i>	<i>aywb_555</i>
<i>pam198</i>	<i>rpmF</i>	<i>paa_0589, aywb_525</i>
<i>pam247</i>	<i>rpmH</i>	<i>atp_00378, aywb_474</i>
<i>pam284</i>	<i>eno</i>	<i>aywb_437</i>
<i>pam288</i>	機能未知	<i>atp_00462, aywb_433</i>
<i>pam305</i>	<i>alaS</i>	<i>atp_00248</i>
<i>pam326</i>	<i>hflB</i>	<i>atp_00146, atp_00460, aywb_187</i>
<i>pam355</i>	<i>uvrD</i>	<i>paa_0693, aywb_085</i>
<i>pam366</i>	<i>hflB</i>	<i>atp_00146, atp_00460, aywb_187</i>
<i>pam413</i>	<i>uvrD</i>	<i>paa_0693, aywb_085</i>
<i>pam447</i>	<i>tldD</i>	<i>paa_0703</i>
<i>pam453</i>	<i>srmB</i>	<i>aywb_318</i>
<i>pam586</i>	<i>rpsD</i>	<i>paa_0088, aywb_241</i>
<i>pam599</i>	<i>phnL</i>	<i>atp_00101, paa_0530</i>
<i>pam600</i>	<i>acoA</i>	<i>atp_00156, aywb_136</i>
<i>pam607</i>	<i>plsX</i>	<i>aywb_142</i>
<i>pam634</i>	機能未知	<i>aywb_100</i>
<i>pam663</i>	機能未知	<i>aywb_091</i>
<i>pam727</i>	<i>hflB</i>	<i>atp_00146, atp_00460, aywb_187</i>

表 2.9 続き

ORF	遺伝子	他種ファイトプラズマにおけるホモログ遺伝子 ^a
<i>pam728</i>	機能未知	<i>aywb_085</i>
<i>pam734</i>	<i>norM</i>	<i>aywb_651</i>
<i>pam_r006</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>atp_r0001, paa_r02, aywb_r01, aywb_r04</i>
<i>pam_t029</i>	<i>tRNA-Glu</i>	<i>paa_t17, aywb_t04</i>

^a *aywb* で始まるものは‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統の遺伝子を、*paa* で始まるものは‘*Ca. P. australiense*’ PAa 系統の遺伝子を、*atp* で始まるものは‘*Ca. P. mali*’ AT 系統の遺伝子をそれぞれ示す。

2.4. 考察

2.4.1. RpoD が認識するプロモーター配列

本章では OY-M のシグマ因子 RpoD を用いた *in vitro* 転写系により、RpoD が認識するプロモーター領域について解析を行った。RNAP コア酵素は複数のサブユニットからなる巨大複合体であり、OY-M の RNAP コア酵素を大腸菌で発現、精製して用いることは困難と考えられたため、大腸菌の RNAP コア酵素 (RNAP_{Ec}) を用いた。OY-M の RpoD を用いた *in vitro* 転写系を構築する上で、RNAP_{Ec} と RpoD がホロ酵素複合体 RNAP_{Ec}-RpoD を形成し得るか検証を行ったところ、*in vitro* での複合体形成が確認された (図 2.4)。*in vitro* 転写系に用いる鋳型 DNA には、他の細菌で RpoD が発現制御を担うことが知られている *rrn* (Young & Steitz, 1979; Ogasawara *et al.*, 1983; Gourse *et al.*, 1986; Tan *et al.*, 1998) を用いた。5' RACE 解析により見出された *rrnB* の 3 つの転写開始点 (P1、P2、P3; 図 2.3) のうち、P2 および P3 に相当する長さの転写産物が *in vitro* 転写反応により確認された。転写産物は RpoD 添加時にのみ確認されたことから、OY-M の RpoD が *in vitro* で RNAP_{Ec} とホロ酵素複合体を形成し、転写反応が行われたと考えられた。また、他の細菌と同様に (Young & Steitz, 1979; Ogasawara *et al.*, 1983; Gourse *et al.*, 1986; Tan *et al.*, 1998)、ファイトプラズマにおいても RpoD が *rrn* の発現制御を担っていることが示唆された。

P2 および P3 の上流配列より見出された推定プロモーター配列について、RpoD が認識する配列を特定するために、P2 上流の推定-35 プロモーター配列および推定-10 プロモーター配列に変異を導入し、*in vitro* 転写反応における転写活性を比較した。その結果、推定-35 プロモーター配列では-35 および-34 の TT が、-10 推定プロモーター配列では 5'-TATAAT-3'がそれぞれ RpoD による認識において重要であることが明らかとなった (図 2.6)。この 5'-TT-

21 bp-TATAAT-3'という配列は、P2 と同じく *in vitro* 転写解析で転写が確認された P3 の上流にも存在しており、多くの細菌の RpoD が認識する典型的なプロモーター配列 (-35: 5'-TTGACA-3'、-10: 5'-TATAAT-3') と一致していた (Helmann & Chamberlin, 1988)。rrnB は P2 および P3 それぞれの上流に存在するプロモーターを RpoD が認識し、転写制御を担うと考えられたが、これは大腸菌や枯草菌においても 16S rRNA 遺伝子上流に RpoD により認識されるプロモーターが 2 ヶ所存在するという知見と一致する (Young & Steitz, 1979; Ogasawara *et al.*, 1983)。したがって、ファイトプラズマにおける rrnB の転写は他の細菌と同様の機構で行われている可能性が示唆された。

in vitro 転写により、RpoD により転写制御されることが示された rrnB 以外の 9 遺伝子について 5' RACE により転写開始点を決定し、その上流から共通プロモーター配列の予測を行った。その結果、-35 領域 (5'-TTgaca-3') および-10 領域 (5'-TatAAT-3') に保存配列が見出され (図 2.9)、これらは典型的な RpoD の認識プロモーター配列 (-35: 5'-TTGACA-3'、-10: 5'-TATAAT-3') と類似していた (Helmann & Chamberlin, 1988)。-10 領域と比較して、-35 領域は配列保存性が低く (図 2.9)、P2 の-35 領域に変異を導入した場合にも、-35 と-34 の TT 以外への変異導入時には顕著な転写活性の低下は確認されなかった (図 2.6)。他種細菌においても、RpoD 認識プロモーター配列の種間保存性は-10 領域と比較して-35 領域では低いことが知られている (Helmann & Chamberlin, 1988; Weber *et al.*, 2012; Wösten *et al.*, 1988)。また、絶対寄生性細菌 *Chlamydia trachomatis* では、RpoD 認識プロモーター配列に変異を導入した場合、-10 領域と比較して-35 領域では、変異による転写活性への影響が低いことが報告されている (Tan *et al.*, 1998)。さらに、ファイトプラズマ同様 AT リッチでゲノムサイズの小さい *M. hyopneumoniae* では、RpoD 認識プロモーターにおいて保存された-35 領域が見出されないことが明らかとなっている (Weber *et al.*, 2012)。したがって、OY-M の RpoD 認識プ

ロモーターにおいて、-35 領域の保存性が低いことは他の細菌における知見と一致していると考えられた。

RpoD 認識プロモーターの近傍には、-17~-14 付近の 5'-TnTG-3' (拡張-10 領域)や、-42~-39 付近の A リッチ領域の存在が確認されたが (図 2.10)、これらは細菌の RpoD 認識プロモーター配列に普遍的に存在することが知られている (Graves & Rabinowitz, 1986; Helmann, 1995)。他の細菌では、拡張-10 領域は RpoD の領域 3 と相互作用することが示唆されており (Barne *et al.*, 1997)、枯草菌と大腸菌では拡張-10 領域に変異を導入すると転写活性が低下することが報告されている (Mitchell *et al.*, 2003; Voskuil *et al.*, 1995)。領域 3 の中で、細菌のシグマ因子に保存されているヒスチジンおよびグルタミン酸残基は拡張-10 領域との相互作用に関与することが報告されているが (Barne *et al.*, 1997)、これらのアミノ酸残基はファイトプラズマの RpoD においても保存されていた (図 2.1)。したがって、ファイトプラズマにおいても拡張-10 領域が、RpoD の認識するプロモーター活性に影響を与えている可能性が高いと考えられる。A リッチ領域は他の細菌では、RNAP のアルファサブユニットと相互作用することが示唆されている (Hook-Barnard & Hinton, 2007)。これまでにゲノム解読が行われているいずれのファイトプラズマにおいても、RNAP アルファサブユニット遺伝子 (*rpoA*) は保存されているが (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)、A リッチ領域が RNAP のアルファサブユニットと相互作用するかは検証の余地がある。

上記のような保存配列以外では、*C. trachomatis* において配列保存性の低い転写開始点上流-4~-5 への塩基置換により転写活性が低下することが知られている (Tan *et al.*, 1998)。本研究においても、配列保存性の低い-14~-13 (mt11)や-6~-5 (mt15) への変異導入により、転写活性がわずかに低下することが明らかとなっている (図 2.6)。したがって、本研究で見出さ

れた保存性の高いプロモーター配列の近傍にある塩基配列が転写活性に与える影響について詳細に検証することで、より詳細なプロモーター配列の特定ができると考えられる。

2.4.2. RpoD が転写制御を担うファイトプラズマ遺伝子

多くの細菌において、RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写制御を担うことが報告されており (Aramaki & Fujita, 1999; Liu & Zuber, 2000; Choonee *et al.*, 2007; Rosenthal *et al.*, 2008)、本研究では OY-M のハウスキーピング遺伝子 5 遺伝子 (*infC*、*rplM*、*rpsD*、*rpoD*、*ibpA*) について *in vitro* 転写解析を行った。その結果、*rpoD* を除く 4 つのハウスキーピング遺伝子について RpoD の添加時に特異的な転写が確認された (図 2.7)。また、RpoD 認識プロモーター配列は OY-M ゲノム上で 88 遺伝子の上流に見出されたが、これらのうち 46 遺伝子 (52.3%) はハウスキーピング遺伝子であった (表 2.6、表 2.7、)。従って、ファイトプラズマにおいても RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写制御を担う主要シグマ因子である可能性が示唆された。多くの最近において主要シグマ因子遺伝子は、自身により転写制御されることが報告されている (Wang & Doi, 1987; Fujita *et al.*, 1995; Rodrigue *et al.*, 2007)。一方で、*Streptomyces griseus* では主要シグマ因子 *hrdB* は自身による転写制御を受けず、代替シグマ因子 ShbA により転写制御される (Otani *et al.*, 2013)。本研究では、*rpoD* は自身により転写制御を受けないことが示唆された (図 2.6)。*rpoD* が複数の ORF から構成されるオペロンとして転写される可能性もあるが、OY-M ゲノム上から RpoD 認識プロモーター配列を探索した結果、*rpoD* (*pam628*) 近傍の上流遺伝子に RpoD 認識プロモーター配列は予測されなかった (表 2.6)。したがって、RpoD はファイトプラズマにおけるもう一つのシグマ因子 FliA により転写制御されている可能性が示唆された。

本研究では、ハウスキーピング遺伝子以外の OY-M 遺伝子についても *in vitro* 転写解析を行った。対象として、宿主との相互作用に関与すると考えられる 5 遺伝子 (*pam157*、*pam289*、*pam486*、*tengu*、*amp*) について解析を行った。その結果、5 つの遺伝子全てについて *in vitro* で RpoD 添加時特異的に転写が確認された (図 2.7)。したがって、RpoD はハウスキーピング遺伝子以外にも、ファイトプラズマ-宿主相互作用に関与する遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された。

in silico 解析の結果、OY-M ゲノム中で RpoD 認識プロモーターは 88 遺伝子の上流に確認された (表 2.6)。これは、ファイトプラズマの全 754 遺伝子のうち 11.7%に過ぎないが、実際には複数の遺伝子がオペロンとして転写されていると考えられる。したがって、RpoD により転写制御される遺伝子は 88 遺伝子より多いと考えられる。

2.4.3. ファイトプラズマ種間における RpoD 認識プロモーターの保存性

ファイトプラズマの RpoD は、種間で広く保存されていることが明らかとなっている (図 2.1; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)。-10 および-35 プロモーター領域の認識に関わるとされる RpoD の領域 2 および 4 の保存性が高いことから、OY-M で特定された RpoD 認識プロモーターはファイトプラズマ種間で保存されている可能性が高いと考え、詳細な全ゲノム解析が行われている 3 種のファイトプラズマ (AYWB、PAa、AT; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008) について、ゲノム上から RpoD 認識プロモーターの探索を行った。その結果、AYWB では 65 遺伝子、PAa では 64 遺伝子、AT では 91 遺伝子の上流に、RpoD 認識プロモーターの存在が推定された (表 2.8)。OY-M において RpoD 認識プロモーターの存在が予測された 88 遺伝子のうち 34 遺伝子 (39%) のホモログが、他種ファイトプラズマ 3 種のうち少なくとも 1 種においても RpoD 認識プロモーター

一を有すると推定され、これらの中には rRNA や tRNA といったハウスキーピング遺伝子も多く含まれていた (表 2.8、表 2.9)。したがって、ファイトプラズマ属内において RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写制御を担う主要シグマ因子として、その機能が広く保存されている可能性が示唆された。

第3章 ファイトプラズマの転写開始点の網羅的解析

3.1. 序文

3.1.1. 細菌における転写開始点の網羅的解析

近年、次世代シーケンス技術の発展によりハイスループットな RNA シーケンス (RNA-Sequencing; RNA-Seq) を行うことが可能となった。そこで、次世代シーケンサーを用いることで細菌の転写開始点を網羅的に決定する解析が、いくつかの細菌では行われている (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Filiatrault *et al.*, 2011; Schlüter *et al.*, 2013; Sass *et al.*, 2015; Čuklina *et al.*, 2016)。これまでは転写開始点を決定するためには、個別の遺伝子について 5' RACE 解析を行う必要があり、細菌の転写開始点を網羅的に決定するのは困難であったが、次世代シーケンサーを用いることで簡易かつ迅速に、転写開始点を網羅的に解析することが可能となった。また、次世代シーケンサーにより転写産物を網羅的に解析することで、それまで予測されていなかった新規 ORF や、非コード RNA が見出された例も報告されている (Sharma *et al.*, 2010; Filiatrault *et al.*, 2011; Schlüter *et al.*, 2013; Sass *et al.*, 2015; Čuklina *et al.*, 2016)。

次世代シーケンサーにより転写開始点を網羅的に解析する手法について、その原理を図 3.1 に示した。サンプルから抽出した全 RNA は rRNA や tRNA を多く含むため、全 RNA をそのまま解析に供試すると得られるシーケンスリードはそのほとんどが rRNA や tRNA 由来になってしまう。したがって、rRNA や tRNA を極力取り除く処理を行う必要がある。この処理には、rRNA と相補的なプローブを利用したキット [RiboMinus kit (Thermo Fisher Scientific)、Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina)など] や、5'末端に一リン酸基を有する RNA

(rRNA、tRNA、RNA 分解産物) を特異的に分解する酵素などが用いられている。rRNA や tRNA を除去した RNA サンプルに対して、mRNA の 5'末端にある三リン酸基を切断し一リン酸化する酵素処理を行ったのち、5'末端にアダプター配列の付加を行う。このサンプルを鋳型にランダムプライマーによる逆転写を行い、PCR による増幅を行った cDNA ライブラリーを次世代シーケンサーにより解析することで、転写産物の 5'末端を網羅的に決定することが可能となる。

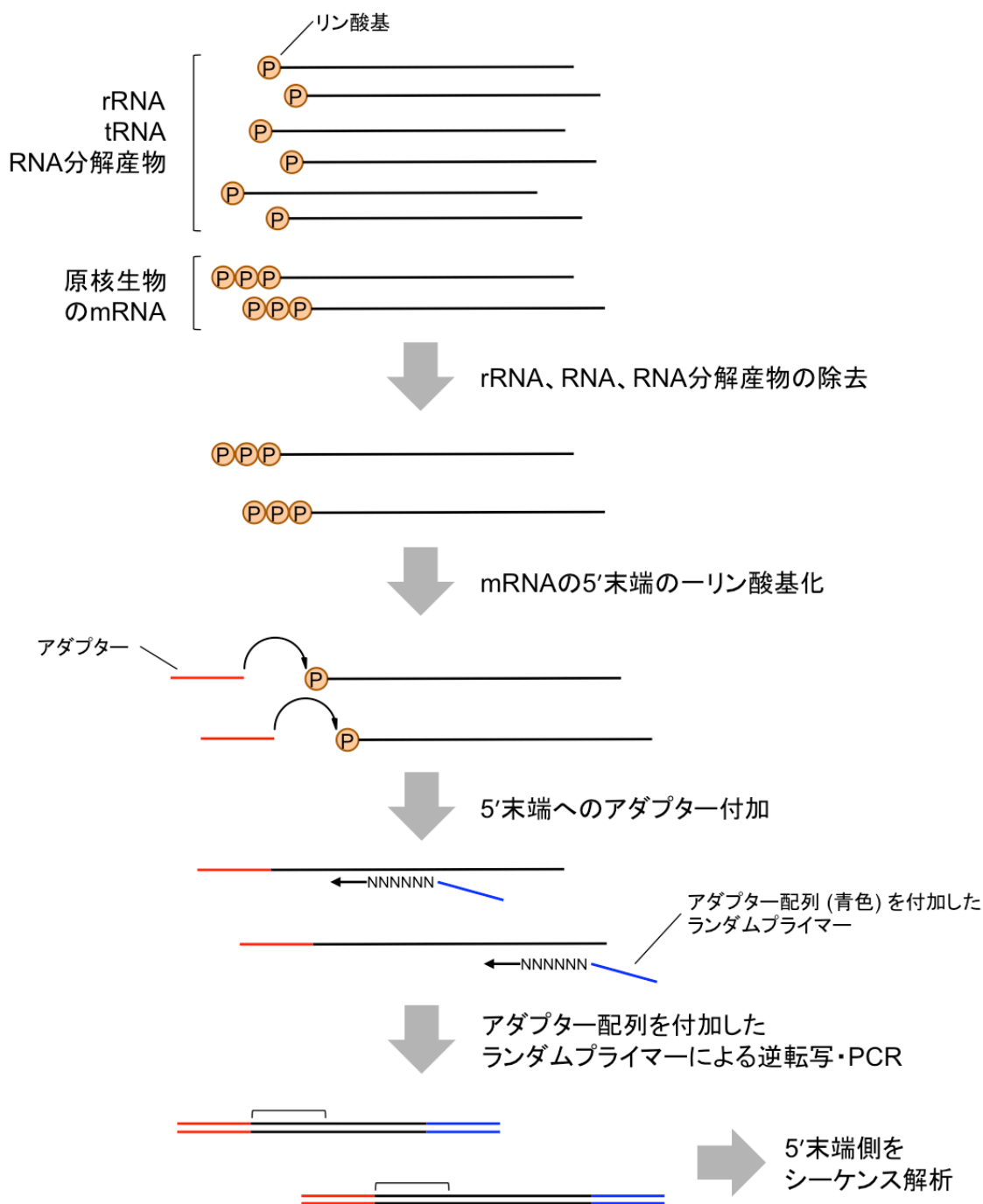


図 3.1 細菌の転写開始点の網羅的な解析手法

細菌から抽出した全 RNA より、rRNA、tRNA、RNA 分解産物の除去を行ったのち、mRNA の 5'末端を一リン酸化し、アダプター (赤色) を付加する。アダプター配列 (青色) を付加したランダムプライマーを用いて逆転写を行ったのち、PCR による増幅を行いライブラリーを製作する。この cDNA ライブラリーの 5'末端側の塩基配列を決定することで、転写開始点を決定する。

上記の手法はこれまでに、いくつかの培養可能な細菌で使用されている (Sharma *et al.*, 2010; Filiatrault *et al.*, 2011; Schlüter *et al.*, 2013; Sass *et al.*, 2015; Čuklina *et al.*, 2016)。培養可能な細菌では培地上の細菌から RNA を抽出することで解析が行われている。しかし、難培養性細菌では感染宿主や環境中から RNA を抽出するため、宿主や環境由来の多量の RNA 中から、標的細菌の十分な量の RNA をシーケンスすることが困難である。したがって、難培養性細菌では転写開始点の網羅的な解析は行われていない。これまでに、難培養性細菌では遺伝子発現解析を目的とした一般的なトランスクリプトーム解析が行われた例がいくつか存在するものの、いずれの研究においても得られた RNA-Seq リードの大半は宿主や環境由来のものである (Mastronunzio *et al.*, 2012; Darby *et al.*, 2012; Vannucci *et al.*, 2013; Siewert *et al.*, 2014; Ibanez *et al.*, 2014; Abbà *et al.*, 2014)。ファイトプラズマにおいても、トランスクリプトーム解析を行った研究例が存在するものの、いずれの研究においてもファイトプラズマ由来の RNA-Seq リードは、全リードのうち 0.1%に満たず (Siewert *et al.*, 2014; Abbà *et al.*, 2014)、ゲノムワイドな解析とは言えなかった。したがって、難培養性細菌において次世代シーケンサーを用いて転写開始点を網羅的に解析する上では、手法の改良が必要であった。

第 2 章では *in vitro* 転写系を用いることで、OY-M の RpoD が認識するプロモーター配列および RpoD により転写制御される遺伝子の解析を行った。しかしながら、実際に *in vitro* 転写系で RpoD による転写制御が確認された遺伝子は 10 遺伝子のみであり、RpoD により転写制御される遺伝子の全容は明らかではない。そこで本章では、次世代シーケンサーを用いた解析で OY-M の RNA 由来の RNA-Seq リードをより多く得るために、その手法の一部について改良を試みた。次世代シーケンサーを用いた解析により OY-M の転写開始点を網羅的に決定し、RpoD により転写制御される遺伝子候補の探索を行った。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物

本章では、2.2.1.項と同様に維持した OY-M 感染シュンギクを解析に用いた。

3.2.2. RNA 抽出、DNase 処理

本章では、2.2.2.項と同様に RNA 抽出を行い、抽出した RNA サンプルについて 2.2.3.項と同様に DNase 処理を行った RNA サンプルを解析に用いた。

3.2.3. cDNA ライブラリーの構築

次世代シーケンスに供試する cDNA ライブラリーは、3.2.2.項で抽出および DNase 処理を行った、OY-M 感染シュンギク由来の RNA を用いて構築した。ファイトプラズマおよび植物由来の rRNA を除去するために、Terminator 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (TPE; Epicentre) による処理を、添付のプロトコールに従って行い、2.2.3.項と同様の手順でフェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出、エタノール沈殿を行ったのちに滅菌水に溶解した。TPE 処理を行った RNA サンプルは、ファイトプラズマの転写産物の 5'末端の三リン酸基を分解して一リン酸化状態にするために、RNA 5' Polyphosphatase (RPP; Epicentre) により処理した。RPP 処理は添付のプロトコールに従って行い、2.2.3.項と同様の手順でフェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出、エタノール沈殿を行ったのちに滅菌水に溶解した。

cDNA ライブラリーの構築には、TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて以下のように行った。添付のプロトコールに従って RNA の 5'末端にアダプターを付加したの

ち、アダプター配列を付加したランダムヘキサマープライマー (N₆プライマー; 5'-CCT TGG CAC AGA ATT CCA NNN NNN -3'; 下線はアダプター配列を示す) またはランダム A/T ヘキサマープライマー (W₆プライマー; 5'-CCT TGG CAC AGA ATT CCA WWW WWW -3') を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応の反応組成および反応時間は添付のプロトコールに従った。得られた cDNA は添付のプロトコールに従って PCR を行ったのち、ゲル精製により 200-500 塩基の断片を切り出し、回収した。回収した DNA は Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) を用いて濃度を測定した。cDNA ライブラリーの構築は N₆プライマー、W₆プライマーそれぞれについて、同一の RNA サンプルより 2 回ずつ反復を行った。また、TPE 処理の効果を検証するために、TPE 処理を行わずに RPP 処理を行った RNA を用いて、W₆プライマーにより逆転写を行ったライブラリーを同様に作製した。

3.2.4. 次世代シーケンス解析

3.2.3.項で構築した cDNA の塩基配列を次世代シーケンサーMiSeq (Illumina) により解読した。シーケンスは Miseq Reagent Kit v2 (50 Cycle) (Illumina) を用いて、シングルエンドで 50 塩基解読した。得られたシーケンスリードは、cutadapt version 1.8.3 (Martin, 2011) を用いてアダプター配列および 20 塩基未満のリードの除去を行ったのち、Bowtie2 version 2.2.6 (Langmead & Salzberg, 2012) を用いて OY-M ゲノム配列 (GenBank アクセッション番号 AP006628) へのマッピングを行った。Bowtie 2 により得られたマッピングデータの SAM ファイルは SAMtools version 1.3.1 (Li *et al.*, 2009) により BAM 形式に変換したのち、Integrative Genomics Viewer version 2.3.80 (Robinson *et al.*, 2011) により可視化した。以降の転写開始点に関する解析では、N₆プライマーライブラリー2 反復および W₆プライマーライブラリー2 反復の計 4 反復から得られたリードを合わせて解析を行った。OY-M ゲノム上で 5'末端が 3

リード以上共通している箇所を転写開始点候補として以降の解析に用いた。ファイトプラズマゲノム上で rRNA または tRNA 領域にマッピングされたシーケンスリードのカウントは、HTSeq version 0.6.1p2 (Anders *et al.*, 2015) を用いて行った。

3.2.5. 転写開始点の分類

3.2.4.項の解析により得られた転写開始点 (transcriptional start site; TSS) を、以下の4つに分類した (図 3.2)。

mRNA TSS (mTSS): ORF の上流 500 塩基以内に、ORF と同じ向きに存在する転写開始点

internal TSS (iTSS): ORF 内部に、ORF と同じ向きに存在する転写開始点

antisense TSS (asTSS): ORF 内部に、ORF と逆向きに存在する転写開始点

orphan TSS (oTSS): mTSS、iTSS、asTSS のいずれにも分類されない転写開始点

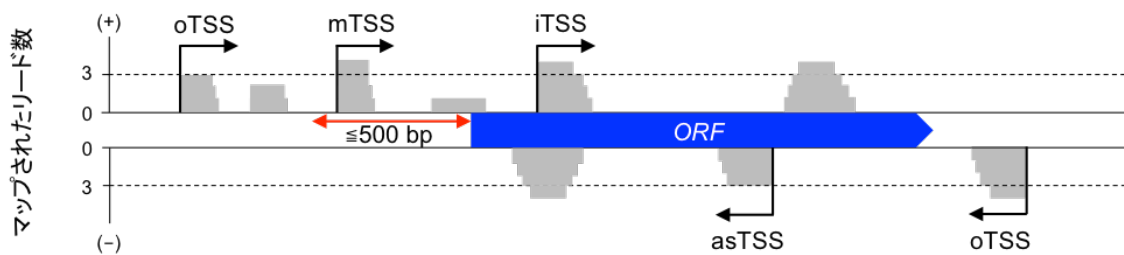


図 3.2 転写開始点の分類

図は RNA-Seq リードのマッピング結果の模式図を示す。+は OY-M ゲノムと同じ向きにマッピングされたリードを、-は OY-M ゲノムと逆向きにマッピングされたリードを示す。5'末端が3リード以上揃った箇所を転写開始点とした。mTSS (mRNA TSS): ORF 上流 500 塩基以内に ORF と同じ向きに存在する転写開始点。iTSS (internal TSS): ORF 内部に ORF と同じ向きで存在する転写開始点。asTSS (antisense TSS): ORF 内部に ORF と逆向きで存在する転写開始点。oTSS (orphan TSS): mTSS、iTSS、asTSS のいずれにも分類されない転写開始点。

3.2.6. オペロンの予測

OY-M ゲノム中に存在するオペロンの予測は、Prokaryotic Operon DataBase (ProOpDB; Taboada *et al.*, 2012; <http://operons.ibt.unam.mx/OperonPredictor/>) を用いて行った。

3.2.7. プロモーター配列の予測

共通プロモーター配列の予測は、MEME version 4.11.1 (Bailey *et al.*, 2006) を用いて行った。解析には各転写開始点上流の 21 塩基 (転写開始点の配列を含む) を用い、以下のパラメーターを設定した: `-dna -maxsize 100000 -mod zoops -nmotifs -minsites 5 -maxsites -minw 6 -maxw 6-21`。-maxw パラメーター (モチーフの最大長を指定) は 6 から 21 の範囲で数値を変更してそれぞれ解析を行った。得られたモチーフのシーケンスロゴ (Schneider & Stephens, 1990) は WebLogo (Crooks *et al.*, 2004) を用いて作成した。

3.2.8. 配列比較解析

本章で OY-M との配列比較解析に用いた細菌およびその全ゲノム配列の NCBI GenBank データベースアクセス番号は表 3.1 に示した。

表 3.1 本章で解析に用いた細菌

種名	系統名	NCBI GenBank アクセション番号
‘ <i>Ca. P. asteris</i> ’	OY-M	AP006628
‘ <i>Ca. P. asteris</i> ’	AYWB	CP000061
‘ <i>Ca. P. australiense</i> ’	PAa	AM422018
‘ <i>Ca. P. australiense</i> ’	SLY	CP002548
‘ <i>Ca. P. mali</i> ’	AT	CU469464
‘ <i>Ca. P. solani</i> ’	STOL231/09	FO393428
‘ <i>Ca. P. solani</i> ’	STOL284/09	FO393427
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	PG-8A	CP000896
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	168	AL009126

3.3. 結果

3.3.1. RNA-Seq リードの OY-M ゲノムへのマッピング

OY-M ファイトプラズマのゲノム全体での転写開始点を特定するために、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行った。OY-M ゲノムは AT リッチであることから (Oshima *et al.*, 2004)、RNA-Seq に供試する cDNA ライブラリーの作製には、一般によく利用されているランダム N₆プライマー (Sharma *et al.*, 2010; Filiautraut *et al.*, 2011; Schlüter *et al.*, 2013) に加えて、A もしくは T のみからなるランダム W₆プライマーを用いることで、ファイトプラズマ RNA 由来の cDNA を効率的に得ることを試みた。

RNA-Seq により N₆プライマーライブラリーからは 3,052,036 リード、W₆プライマーライブラリーからは 5,299,788 リードが得られた (表 3.2)。OY-M ゲノムへのマッピングの結果、N₆プライマーライブラリー由来のリードの 4.52%および W₆プライマーライブラリー由来のリードの 11.67%が OY-M ゲノムにマッピングされた (表 3.2)。OY-M ゲノムへマッピングされたリードのうち、rRNA または tRNA 領域にマッピングされたリードの割合は、N₆プライマーライブラリーでは 96.5% (132,912 リード)、W₆プライマーライブラリーでは 96.2% (595,143 リード) であった。すなわち、rRNA および tRNA 以外の領域にマッピングされたリードの割合は、N₆プライマーライブラリーでは 3.5% (4,892 リード)、W₆プライマーライブラリーでは 3.8% (23,467 リード) であった。

これまでに報告されている、細菌の転写開始点の網羅的な解析では、rRNA、tRNA および mRNA 分解産物等を TPE 処理により除去し、mRNA 転写開始点由来の cDNA を効率的にシーケンスする手法が用いられている (Sharma *et al.*, 2010; Filiautraut *et al.*, 2011; Schlüter *et al.*, 2013; Sass *et al.*, 2015; Čuklina *et al.*, 2016)。そこで、本研究でも TPE 処理によりファイトプ

ラズマの mRNA 転写開始点由来の cDNA を効率的にシーケンス出来ているか検証するために、TPE 処理を行っていない RNA を用いて、W₆プライマーにより逆転写してライブラリーを構築し、シーケンス解析を行った。

TPE 処理を行っていないライブラリーをシーケンスした結果、4,696,335 リードが得られ、1,186,705 リード (25.3%) が OY-M ゲノムにマッピングされた。OY-M ゲノムにマッピングされたリードのうち、97.7% (1,159,179 リード) が rRNA または tRNA 領域にマッピングされ、2.3% (27,166 リード) が rRNA および tRNA 以外の領域にマッピングされた (表 3.3)。rRNA および tRNA 以外の領域にマッピングされたリードのうち、53.3% (14,684 リード) が遺伝子領域に、46.7% (12,482 リード) が遺伝子間領域にマッピングされた (表 3.3)。一方で、TPE 処理を行った場合には、rRNA および tRNA 以外の領域にマッピングされたリードのうち 35.0% (8,205 リード) が遺伝子領域に、65.0% (15,262 リード)が遺伝子間領域にマッピングされた (表 3.3)。TPE 処理により、遺伝子領域にマッピングされたリードの割合は 53.3% から 35.0%に減少しており、mRNA 分解産物が TPE 処理により除去された結果であると考えられた。一方で、TPE 処理により遺伝子間領域にマッピングされたリードの割合は 46.7% から 65.0%に上昇しており、mRNA 転写開始点に由来するリードの割合が増加したと考えられた。以上の結果より、TPE 処理により mRNA 転写開始点に由来する cDNA を効率的にシーケンス出来ていると考え、以降の解析を行った。

表 3.2 RNA-Seq リードのマッピング結果

反復	N ₆ プライマーライブラリー	W ₆ プライマーライブラリー
1	103,055 / 1,803,169 (5.72%)	119,568 / 1,161,100 (10.30%)
2	34,749 / 1,248,867 (2.78%)	499,042 / 4,138,688 (12.06%)
合計	137,804 / 3,052,036 (4.52%)	618,610 / 5,299,788 (11.67%)

数値はそれぞれ、OY-M ゲノムにマッピングされたリード数 / 全リード数を示し、括弧内の数値はその百分率を示す

表 3.3 TPE 処理の有無による RNA-Seq リードの内訳の比較

OY-M ゲノムにマッピングされたリード	TPE 処理なし	TPE 処理あり ^a
rRNA/tRNA 領域にマッピング ^b	97.7% (1,159,179 リード)	96.2% (595,143 リード)
rRNA/tRNA 以外の領域にマッピング ^c	2.29% (27,166 リード)	3.79% (23,467 リード)
遺伝子領域にマッピング ^d	53.3% (14,684 リード)	35.0% (8,205 リード)
遺伝子間領域にマッピング ^e	46.7% (12,482 リード)	65.0% (15,262 リード)
合計	100% (1,186,345 リード)	100% (618,610 リード)

^a 表 3.2 における W₆プライマーライブラリー2 反復分のリード数を示す。

^b OY-M ゲノムにマッピングされた全リード数に対する rRNA/tRNA にマッピングされたリード数の割合を示す。

^c OY-M ゲノムにマッピングされた全リード数に対する rRNA/tRNA にマッピングされたリード数の割合を示す。

^d rRNA/tRNA にマッピングされたリード数に対する遺伝子領域にマッピングされたリード数の割合を示す。

^e rRNA/tRNA にマッピングされたリード数に対する遺伝子間領域にマッピングされたリード数の割合を示す。

3.3.2. 転写開始点の特定および分類

OY-M ゲノムにマッピングされた RNA-Seq のリード情報をもとに、転写開始点の特定を行った。OY-M ゲノムにマッピングされたリードのうち、5'末端が揃ったリードが 3 リード以上存在した箇所を転写開始点候補とした (図 3.1)。その結果、OY-M ゲノム全体で 231 箇所が転写開始点候補として特定された。この中には、第 2 章で転写開始点を特定した *amp* や *pam486* の転写開始点を確認されたが (図 3.3)、残り 229 箇所については新規のものであった。

特定された転写開始点について、4 種類に分類 (図 3.2) を行い、それぞれの分類の転写開始点について次項以降で解析を行った。

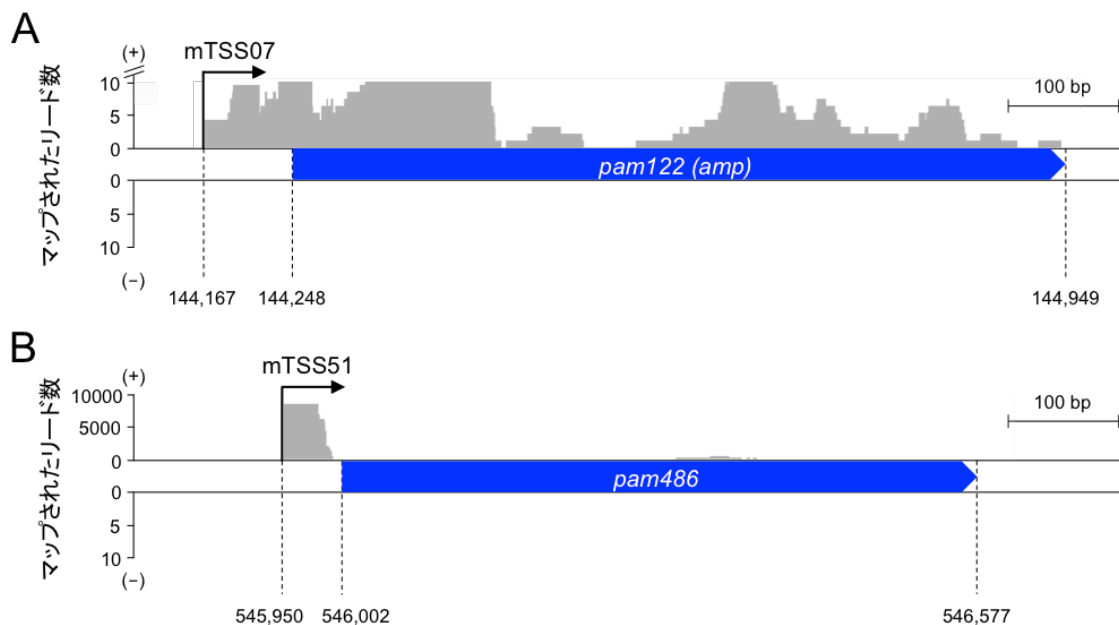


図 3.3 RNA-Seq 解析で見出された転写開始点

A. *amp* の転写開始点 (mTSS07)。B. *pam486* の転写開始点 (mTSS51)。+は OY-M ゲノムと同じ向きにマッピングされたリードを、-は OY-M ゲノムと逆向きにマッピングされたリードを示す。黒矢印は転写開始点を示す。横軸の下の数字は OY-M ゲノム上の塩基の位置を示す。

3.3.3. mTSS に関する解析

OY-M ゲノム全体で、mTSS と分類された転写開始点は 82 箇所であった (表 3.4)。これらの転写開始点は下流に存在する ORF の mRNA 転写開始点として機能すると考えられ、第 2 章で解析を行った *amp* (mTSS07) および *pam486* (mTSS51) の転写開始点も確認された (図 3.3)。34 個の転写開始点下流にはオペロンの存在が予測され、オペロンを構成すると予測される ORF を含めると、82 個の mTSS により計 131 個の ORF が転写されていると予測された (表 3.4)。転写開始点から各 ORF の開始コドンまでの距離の平均は 187 塩基であり、82 個の mTSS のうち 52 個 (63.4%) は開始コドン上流 200 塩基以内に存在した (表 3.5)。

表 3.4 mTSS の一覧

TSS No.	mTSS の位置 ^a	mTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ	オペロンと推定される ORF
mTSS01	37,612	+	<i>pam028</i>	<i>ibpA</i>	37,635	23	
mTSS02	89,321	+	<i>pam069</i>	機能未知	89,402	81	
mTSS03	107,574	+	<i>pam084</i>	機能未知	107,898	324	
mTSS04	120,512	+	<i>pam095</i>	機能未知	120,521	9	
mTSS05	128,808	-	<i>pam102</i>	<i>pcnB</i>	128,312	496	
mTSS06	129,182	-	<i>pam103</i>	機能未知	129,157	25	<i>pam104</i>
mTSS07	144,167	+	<i>pam122</i>	<i>amp</i>	144,248	81	
mTSS08	162,298	+	<i>pam137</i>	機能未知	162,349	51	
mTSS09	178,371	+	<i>pam151</i>	<i>rbfA</i>	178,391	20	
mTSS10	181,164	-	<i>pam153</i>	機能未知	181,000	164	
mTSS11	186,482	-	<i>pam156</i>	機能未知	186,349	133	
mTSS12	191,918	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	214	
mTSS13	192,017	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	115	
mTSS14	243,200	+	<i>pam200</i>	<i>rplC</i>	243,429	229	<i>pam201-210</i>
mTSS15	245,566	+	<i>pam204</i>	<i>rpsS</i>	245,705	139	<i>pam205-210</i>
mTSS16	245,901	+	<i>pam205</i>	<i>rplV</i>	246,003	102	<i>pam206-210</i>
mTSS17	246,680	+	<i>pam207</i>	<i>rplP</i>	247,112	432	<i>pam208-210</i>
mTSS18	246,928	+	<i>pam207</i>	<i>rplP</i>	247,112	184	<i>pam208-210</i>
mTSS19	247,517	+	<i>pam208</i>	<i>rpmC</i>	247,531	14	<i>pam209,210</i>

表 3.4 続き

TSS No.	mTSS の位置 ^a	mTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ	オペロンと推定される ORF
mTSS20	247,871	+	<i>pam210</i>	<i>rplN</i>	248,127	256	
mTSS21	270,717	+	<i>pam242</i>	<i>himA</i>	270,744	27	
mTSS22	272,577	+	<i>pam245</i>	<i>pepP</i>	272,915	338	<i>pam_t006</i>
mTSS23	276,499	+	<i>pam247</i>	<i>rpmH</i>	276,574	75	
mTSS24	279,302	+	<i>pam_r001</i>	<i>16S rRNA</i>	279,394	92	<i>pam_r002, t009, r003, t010, t011</i>
mTSS25	292,536	+	<i>pam258</i>	<i>rplU</i>	292,157	379	<i>pam259</i>
mTSS26	302,716	+	<i>pam264</i>	<i>fusA</i>	302,934	218	
mTSS27	302,884	+	<i>pam264</i>	<i>fusA</i>	302,934	50	
mTSS28	308,253	-	<i>pam267</i>	<i>gidB</i>	308,241	12	<i>pam268,269</i>
mTSS29	308,316	-	<i>pam267</i>	<i>gidB</i>	308,241	75	<i>pam268,269</i>
mTSS30	311,072	-	<i>pam269</i>	機能未知	310,833	239	
mTSS31	314,001	+	<i>pam272</i>	機能未知	314,047	46	<i>pam273,274</i>
mTSS32	316,153	+	<i>pam275</i>	機能未知	316,651	498	<i>pam276</i>
mTSS33	325,821	+	<i>pam282</i>	機能未知	325,982	161	
mTSS34	336,657	-	<i>pam288</i>	機能未知	336,308	349	
mTSS35	337,669	+	<i>pam290</i>	<i>argE</i>	337,963	294	<i>pam291</i>
mTSS36	347,106	-	<i>pam304</i>	機能未知	347,034	72	<i>pam303-297</i>
mTSS37	357,405	+	<i>pam311</i>	機能未知	357,507	102	
mTSS38	357,772	+	<i>pam312</i>	機能未知	358,034	262	<i>pam313,314</i>

表 3.4 続き

TSS No.	mTSS の位置 ^a	mTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ	オペロンと推定される ORF
mTSS39	357,891	+	<i>pam312</i>	機能未知	358,034	143	<i>pam313,314</i>
mTSS40	398,069	+	<i>pam351</i>	機能未知	398,554	485	
mTSS41	398,599	+	<i>pam352</i>	機能未知	399,066	467	<i>pam353,354</i>
mTSS42	413,685	+	<i>pam357</i>	機能未知	414,099	414	<i>pam356</i>
mTSS43	458,683	-	<i>pam412</i>	機能未知	458,352	331	<i>pam411</i>
mTSS44	464,426	-	<i>pam416</i>	機能未知	464,291	135	
mTSS45	481,599	+	<i>pam440</i>	<i>acpS</i>	481,644	45	<i>pam439</i>
mTSS46	483,214	+	<i>pam442</i>	<i>sodA</i>	483,706	492	<i>pam443</i>
mTSS47	494,865	-	<i>pam448</i>	<i>lon</i>	494,478	387	
mTSS48	515,804	-	<i>pam462</i>	機能未知	515,715	89	
mTSS49	544,918	-	<i>pam485</i>	機能未知	544,533	385	
mTSS50	545,723	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	279	
mTSS51	545,950	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	52	
mTSS52	546,947	+	<i>pam487</i>	<i>artM</i>	546,971	24	<i>pam488</i>
mTSS53	557,609	-	<i>pam_r006</i>	<i>16S rRNA</i>	557,518	91	<i>pam_t025, r005, r004, t024-014</i>
mTSS54	560,665	-	<i>pam495</i>	<i>artI</i>	560,544	121	
mTSS55	576,390	-	<i>pam509</i>	機能未知	576,248	142	
mTSS56	576,877	-	<i>pam510</i>	機能未知	576,775	102	
mTSS57	596,442	-	<i>pam527</i>	<i>uvrD</i>	596,129	313	

表 3.4 続き

TSS No.	mTSS の位置 ^a	mTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ	オペロンと推定される ORF
mTSS58	598,227	-	<i>pam530</i>	機能未知	598,042	185	<i>pam529-528</i>
mTSS59	598,363	-	<i>pam530</i>	機能未知	598,042	321	<i>pam529-528</i>
mTSS60	599,117	-	<i>pam531</i>	機能未知	599,015	102	
mTSS61	621,899	+	<i>pam555</i>	機能未知	622,001	102	
mTSS62	622,788	+	<i>pam557</i>	機能未知	622,961	173	<i>pam558</i>
mTSS63	665,272	+	<i>pam591</i>	<i>dnaE</i>	665,511	239	
mTSS64	680,237	+	<i>pam602</i>	<i>aceF</i>	680,390	153	<i>pam603</i>
mTSS65	680,324	+	<i>pam602</i>	<i>aceF</i>	680,390	66	<i>pam603</i>
mTSS66	685,379	-	<i>pam606</i>	機能未知	685,229	150	
mTSS67	707,141	+	<i>pam623</i>	<i>rpsU</i>	707,185	44	
mTSS68	708,749	+	<i>pam626</i>	<i>GRS1</i>	709,131	382	<i>pam627</i>
mTSS69	713,707	+	<i>pam629</i>	機能未知	713,780	73	
mTSS70	757,800	-	<i>pam666</i>	<i>tra5</i>	757,625	175	
mTSS71	758,151	+	<i>pam667</i>	<i>clpX</i>	758,197	46	<i>pam668</i>
mTSS72	761,920	+	<i>pam671</i>	<i>cspC</i>	761,965	45	
mTSS73	782,294	-	<i>pam688</i>	<i>tmk</i>	782,120	174	
mTSS74	784,036	-	<i>pam691</i>	機能未知	784,008	28	<i>pam690</i>
mTSS75	799,210	-	<i>pam706</i>	<i>hrcA</i>	799,183	27	
mTSS76	801,754	+	<i>pam708</i>	機能未知	801,872	118	

表 3.4 続き

TSS No.	mTSS の位置 ^a	mTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ	オペロンと推定される ORF
mTSS77	810,169	-	<i>pam717</i>	機能未知	809,729	440	
mTSS78	812,814	-	<i>pam720</i>	<i>citS</i>	812,376	438	
mTSS79	823,546	+	<i>pam730</i>	機能未知	823,978	432	
mTSS80	830,671	-	<i>pam734</i>	<i>norM</i>	830,638	33	
mTSS81	838,407	-	<i>pam742</i>	<i>rpIT</i>	838,373	34	<i>pam743</i>
mTSS82	852,499	-	<i>pam754</i>	<i>asmS</i>	852,062	437	

^a OY-M ゲノム上における mTSS または ORF の位置を示す。

^b OY-M のゲノムに対する mTSS の向きを示す。

表 3.5 各 mTSS の 5' UTR の長さ

5' UTR の長さ	mTSS の個数	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> における mTSS の個数 (Weber <i>et al.</i> , 2012)	
1-50		18	86
51-100		12	50
101-150		14	25
151-200		8	15
201-250		5	10
251-300		4	n.t. ^a
301-350		6	n.t.
351-400		4	n.t.
401-450		6	n.t.
451-500		5	n.t.

^aWeber *et al.*, 2012 では 5' UTR の長さが 250 塩基以内の mTSS のみを解析しているため、5' UTR の長さ 251 塩基以上の mTSS の個数は不明である。

3.3.4. iTSS に関する解析

OY-M ゲノム全体で、iTSS と分類された転写開始点は 88 箇所であった (表 3.6)。これらのうち、iTSS07 は *pam135* の開始コドン GTG の 1 塩基目に存在していた (図 3.4)。この開始コドンは OY-M ゲノム解読時にアノテーションされたものであるが (Oshima *et al.*, 2004)、近年、NCBI の原核生物ゲノムアノテーションパイプライン (NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline; NCBI PGAP; Tatusova *et al.*, 2016) により元来の開始コドン GTG より 9 塩基下流に新たな開始コドン ATG がアノテーションされている (NCBI GenBank アクセション番号 NC005303.2)。ファイトプラズマおよびファイトプラズマに近縁な細菌における、*pam135* ホモログの開始コドン近傍配列の保存性を検証した結果、PAM135 のアミノ酸配列は新たに推定された ATG コドンより下流においてよく保存されていた (図 3.4)。これらの結果より、PAM135 およびそのホモログ遺伝子は下流に存在する ATG コドンから翻訳されている可能性が示唆された。

iTSS が内部に存在した ORF のうち、*pam135* 以外では NCBI PGAP により新たなアノテーションがされた ORF は存在しなかったものの、全 88 個の iTSS のうち、iTSS07 を含め 86 個の iTSS において、その下流に少なくとも 1 箇所の代替開始コドン (ATG、TTG、GTG) 候補が存在した (表 3.6)。

表 3.6 iTSS の一覧

TSS No.	iTSS の位置 ^a	iTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから iTSS までの距離	代替開始コドンの有無 ^c
iTSS01	20,669	+	<i>pam017</i>	機能未知	20,275	394	+
iTSS02	37,900	+	<i>pam028</i>	<i>ibpA</i>	37,635	265	+
iTSS03	78,116	+	<i>pam059</i>	<i>mdlB</i>	76,501	1,615	+
iTSS04	105,442	+	<i>pam081</i>	<i>rpsT</i>	105,231	211	-
iTSS05	106,798	+	<i>pam083</i>	<i>serS</i>	106,430	368	+
iTSS06	111,103	+	<i>pam089</i>	<i>obg</i>	110,486	617	+
iTSS07	161,563	+	<i>pam135</i>	機能未知	161,563	0	+
iTSS08	162,553	+	<i>pam137</i>	機能未知	162,349	204	+
iTSS09	169,697	+	<i>pam143</i>	<i>thiI</i>	169,118	579	+
iTSS10	171,581	+	<i>pam145</i>	<i>ppa</i>	171,465	116	+
iTSS11	179,268	+	<i>pam152</i>	<i>pth</i>	179,034	234	+
iTSS12	192,295	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	163	+
iTSS13	192,400	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	268	+
iTSS14	192,519	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	387	+
iTSS15	192,622	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	490	+
iTSS16	192,655	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	523	+
iTSS17	197,686	+	<i>pam166</i>	<i>tsf</i>	197,515	171	+
iTSS18	199,563	+	<i>pam168</i>	<i>frt</i>	199,169	394	+

表 3.6 続き

TSS No.	iTSS の位置 ^a	iTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから iTSS までの距離	代替開始コドンの有無 ^c
iTSS19	206,540	+	<i>pam175</i>	<i>gapA</i>	205,969	571	+
iTSS20	227,992	-	<i>pam190</i>	<i>dppB</i>	228,054	62	+
iTSS21	306,143	+	<i>pam265</i>	<i>tufB</i>	305,131	1,012	+
iTSS22	307,314	+	<i>pam266</i>	機能未知	306,887	427	+
iTSS23	307,856	-	<i>pam267</i>	<i>gidB</i>	308,241	385	+
iTSS24	310,658	-	<i>pam269</i>	機能未知	310,833	175	+
iTSS25	323,304	-	<i>pam280</i>	<i>norM</i>	323,790	486	+
iTSS26	324,891	+	<i>pam281</i>	<i>pfkA</i>	324,839	52	+
iTSS27	326,370	+	<i>pam282</i>	機能未知	325,982	388	+
iTSS28	328,328	+	<i>pam283</i>	<i>pgi</i>	327,589	739	+
iTSS29	329,123	+	<i>pam284</i>	<i>eno</i>	329,038	85	+
iTSS30	329,899	+	<i>pam284</i>	<i>eno</i>	329,038	861	+
iTSS31	330,980	+	<i>pam285</i>	<i>gpmI</i>	330,452	528	+
iTSS32	331,210	+	<i>pam285</i>	<i>gpmI</i>	330,452	758	+
iTSS33	331,776	+	<i>pam285</i>	<i>gpmI</i>	330,452	1,324	+
iTSS34	333,029	+	<i>pam286</i>	<i>citS</i>	332,415	614	+
iTSS35	335,981	-	<i>pam288</i>	機能未知	336,308	327	+
iTSS36	351,350	+	<i>pam306</i>	<i>ksGA</i>	350,438	912	+

表 3.6 続き

TSS No.	iTSS の位置 ^a	iTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから iTSS までの距離	代替開始コドンの有無 ^c
iTSS37	357,588	+	<i>pam311</i>	機能未知	357,507	81	+
iTSS38	359,252	+	<i>pam314</i>	機能未知	359,173	79	+
iTSS39	359,441	+	<i>pam314</i>	機能未知	359,173	268	+
iTSS40	359,606	+	<i>pam314</i>	機能未知	359,173	433	+
iTSS41	400,333	+	<i>pam354</i>	機能未知	400,208	125	+
iTSS42	400,461	+	<i>pam354</i>	機能未知	400,208	253	+
iTSS43	400,560	+	<i>pam354</i>	機能未知	400,208	352	+
iTSS44	460,319	-	<i>pam413</i>	<i>uvrD</i>	461,282	963	+
iTSS45	463,105	-	<i>pam414</i>	機能未知	463,150	45	+
iTSS46	464,788	-	<i>pam417</i>	機能未知	464,833	45	+
iTSS47	482,344	+	<i>pam441</i>	<i>hcaD</i>	482,172	172	+
iTSS48	486,615	+	<i>pam445</i>	<i>lepA</i>	486,559	56	+
iTSS49	491,894	+	<i>pam764</i>	<i>pmbA</i>	490,572	1,322	-
iTSS50	492,602	-	<i>pam448</i>	<i>lon</i>	494,478	1,876	+
iTSS51	493,811	-	<i>pam448</i>	<i>lon</i>	494,478	667	+
iTSS52	513,460	-	<i>pam459</i>	機能未知	513,976	516	+
iTSS53	513,749	-	<i>pam459</i>	機能未知	513,976	227	+
iTSS54	515,616	-	<i>pam462</i>	機能未知	515,715	99	+

表 3.6 続き

TSS No.	iTSS の位置 ^a	iTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから iTSS までの距離	代替開始コドンの有無 ^c
iTSS55	522,991	+	<i>pam466</i>	<i>trpS</i>	522,922	69	+
iTSS56	531,422	-	<i>pam474</i>	<i>secA</i>	532,699	1,277	+
iTSS57	532,337	-	<i>pam474</i>	<i>secA</i>	532,699	362	+
iTSS58	546,066	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	64	+
iTSS59	546,301	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	299	+
iTSS60	546,452	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	450	+
iTSS61	548,676	+	<i>pam489</i>	<i>artI</i>	548,612	64	+
iTSS62	549,938	+	<i>pam490</i>	<i>artM</i>	549,577	361	+
iTSS63	558,556	-	<i>pam493</i>	機能未知	558,833	277	+
iTSS64	574,395	-	<i>pam506</i>	機能未知	574,626	231	+
iTSS65	574,509	-	<i>pam506</i>	機能未知	574,626	117	+
iTSS66	575,063	-	<i>pam507</i>	機能未知	575,107	44	+
iTSS67	576,726	-	<i>pam510</i>	機能未知	576,775	49	+
iTSS68	596,792	-	<i>pam528</i>	機能未知	597,343	551	+
iTSS69	597,098	-	<i>pam528</i>	機能未知	597,343	245	+
iTSS70	597,229	-	<i>pam528</i>	機能未知	597,343	114	+
iTSS71	598,881	-	<i>pam531</i>	機能未知	599,015	134	+
iTSS72	598,965	-	<i>pam531</i>	機能未知	599,015	50	+

表 3.6 続き

TSS No.	iTSS の位置 ^a	iTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから iTSS までの距離	代替開始コドンの有無 ^c
iTSS73	623,737	+	<i>pam558</i>	機能未知	623,667	70	+
iTSS74	623,997	+	<i>pam558</i>	機能未知	623,667	330	+
iTSS75	624,173	+	<i>pam558</i>	機能未知	623,667	506	+
iTSS76	652,530	-	<i>pam582</i>	機能未知	652,699	169	+
iTSS77	659,794	-	<i>pam588</i>	<i>artM</i>	661,450	1,656	+
iTSS78	659,955	-	<i>pam588</i>	<i>artM</i>	661,450	1,495	+
iTSS79	677,169	+	<i>pam599</i>	<i>phnL</i>	676,146	1,023	+
iTSS80	681,724	+	<i>pam603</i>	<i>lpd</i>	681,596	128	+
iTSS81	694,842	-	<i>pam617</i>	<i>dnaX</i>	695,425	583	+
iTSS82	704,552	+	<i>pam621</i>	<i>ivrD</i>	703,793	759	+
iTSS83	745,820	-	<i>pam658</i>	<i>hflB</i>	746,226	406	+
iTSS84	761,977	+	<i>pam671</i>	<i>cspC</i>	761,965	12	+
iTSS85	794,560	-	<i>pam703</i>	<i>dnaJ</i>	795,207	647	+
iTSS86	801,338	+	<i>pam707</i>	機能未知	800,947	391	+
iTSS87	807,323	+	<i>pam714</i>	<i>srmB</i>	806,944	379	+
iTSS88	813,807	-	<i>pam721</i>	<i>sfcA</i>	813,967	160	+

^aOY-M ゲノム上における iTSS または ORF の位置を示す

^bOY-M のゲノムに対する iTSS の向きを示す。

^cORF 内部で iTSS より下流に開始コドンとなりうるコドン (ATG, TTG, GTG) が存在するものを+, 存在しないものを-で示した。

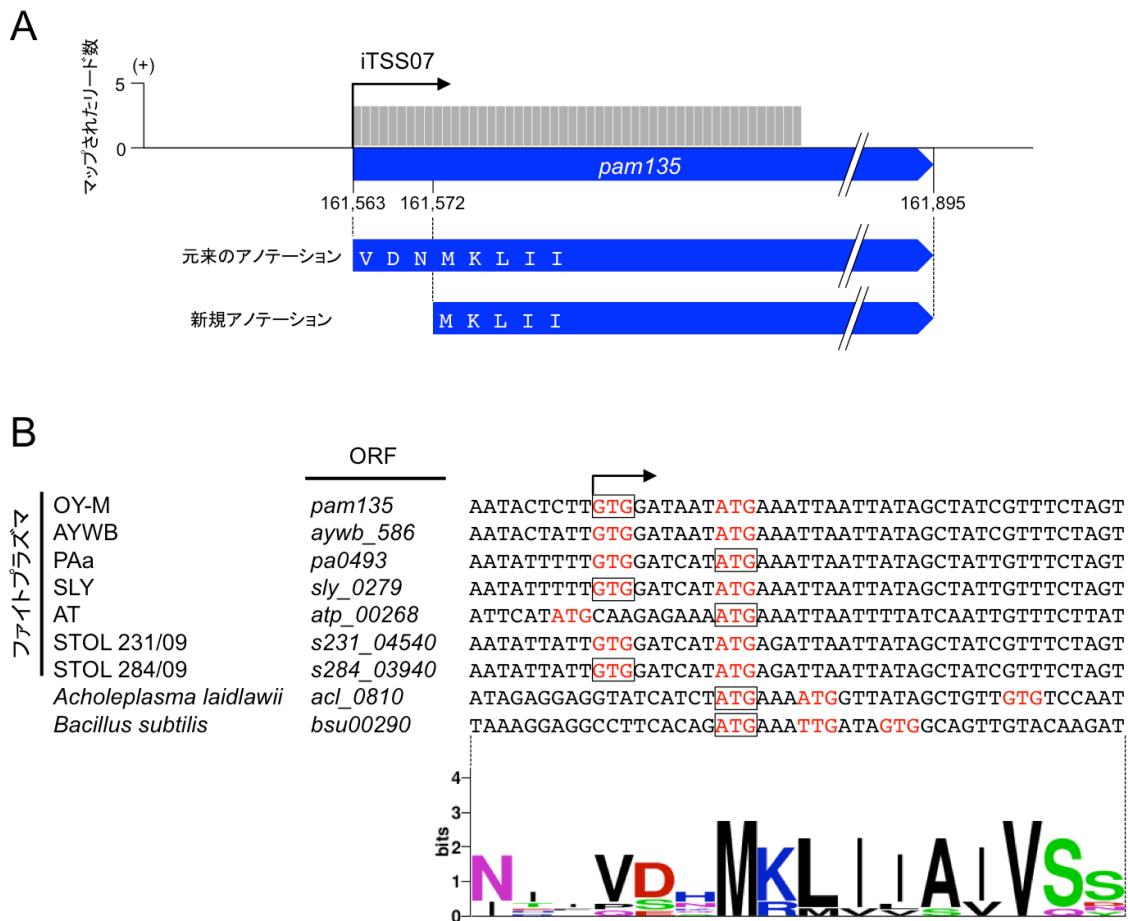


図 3.4 *pam135* の開始コドン上に見出された iTSS

A. *pam135* の開始コドン上に見出された iTSS (iTSS07)。+は OY-M ゲノムと同じ向きにマップされたリードを示す。黒矢印は iTSS07 の位置を示す。横軸の下の数字は OY-M ゲノム上の塩基の位置を示す。B. *pam135* ホモログ遺伝子の比較。赤字の塩基は *pam135* ホモログ遺伝子と同じフレームで、開始コドンとして認識され得るコドンを示す。黒矢印は *pam135* で見出された iTSS を示す。シーケンスロゴは WebLogo を用いて作成した。各アミノ酸の高さは、そのアミノ酸の保存性を示す。

3.3.5. asTSS に関する解析

OY-M ゲノム全体で、asTSS と分類された転写開始点は 31 箇所であった (表 3.7)。asTSS の例として、*pam667 (clpX)* 内に存在した asTSS22 を図 3.5 に示した。asTSS 下流には ORF の存在が推定されないことから、asTSS から転写される RNA は非コード RNA であると考えられた。asTSS は OY-M ゲノム全体に存在しており、ファイトプラズマにおいてゲノム全体で非コード RNA が転写されていることが明らかとなった。

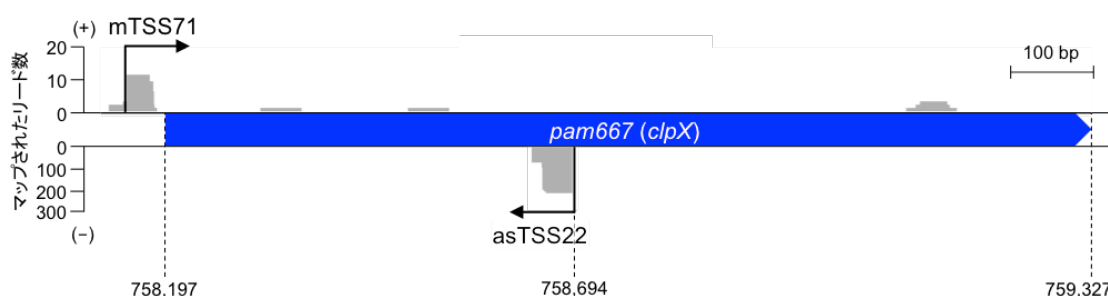


図 3.5 *pam667 (clpX)* 内に見出された asTSS (asTSS22)

+は OY-M ゲノムと同じ向きにマッピングされたリードを、-は OY-M ゲノムと逆向きにマッピングされたリードを示す。黒矢印は転写開始点を示す。横軸の下の数字は OY-M ゲノム上の塩基の位置を示す。

表 3.7 asTSS の一覧

TSS No.	asTSS の位置 ^a	asTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから asTSS までの距離
asTSS01	30,218	-	<i>pam023</i>	機能未知	29,578	640
asTSS02	129,839	+	<i>pam104</i>	<i>tdk</i>	129,845	6
asTSS03	165,779	-	<i>pam141</i>	<i>cysS</i>	167,031	1,252
asTSS04	186,235	+	<i>pam156</i>	機能未知	186,349	114
asTSS05	257,958	-	<i>pam229</i>	<i>truA</i>	257,734	224
asTSS06	260,005	-	<i>pam231</i>	<i>holB</i>	259,113	892
asTSS07	315,392	-	<i>pam272</i>	機能未知	314,047	1,345
asTSS08	352,403	+	<i>pam307</i>	<i>hflB</i>	353,144	741
asTSS09	353,662	+	<i>pam308</i>	機能未知	353,958	296
asTSS10	386,594	+	<i>pam340</i>	機能未知	386,744	150
asTSS11	405,828	+	<i>pam356</i>	<i>hflB</i>	406,211	383
asTSS12	406,097	+	<i>pam356</i>	<i>hflB</i>	406,211	114
asTSS13	429,289	-	<i>pam383</i>	機能未知	428,877	412
asTSS14	446,607	-	<i>pam403</i>	<i>hflB</i>	446,232	375
asTSS15	588,701	-	<i>pam523</i>	<i>dnaB</i>	588,275	426
asTSS16	617,292	+	<i>pam550</i>	<i>dnaB</i>	617,783	491
asTSS17	630,179	+	<i>pam562</i>	機能未知	630,261	82
asTSS18	690,703	+	<i>pam612</i>	<i>psd</i>	691,631	928
asTSS19	749,031	-	<i>pam661</i>	<i>potC</i>	748,973	58

表 3.7 asTSS の一覧

TSS No.	asTSS の位置 ^a	asTSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	開始コドンから asTSS までの距離
asTSS20	756,953	+	<i>pam666</i>	<i>tra5</i>	757,625	672
asTSS21	757,103	+	<i>pam666</i>	<i>tra5</i>	757,625	522
asTSS22	758,694	-	<i>pam667</i>	<i>clpX</i>	758,197	497
asTSS23	760,166	+	<i>pam669</i>	機能未知	760,351	185
asTSS24	762,989	+	<i>pam672</i>	<i>dnaC</i>	763,792	803
asTSS25	775,095	+	<i>pam682</i>	機能未知	775,392	297
asTSS26	775,139	+	<i>pam682</i>	機能未知	775,392	253
asTSS27	778,157	+	<i>pam685</i>	<i>dnaG</i>	779,171	1,014
asTSS28	778,785	+	<i>pam685</i>	<i>dnaG</i>	779,171	386
asTSS29	779,054	+	<i>pam685</i>	<i>dnaG</i>	779,171	117
asTSS30	780,212	+	<i>pam686</i>	<i>dnaB</i>	780,697	485
asTSS31	780,273	+	<i>pam686</i>	<i>dnaB</i>	780,697	424

^a OY-M ゲノム上における asTSS または ORF の位置を示す。

^b OY-M のゲノムに対する asTSS の向きを示す。

3.3.6. oTSS に関する解析

OY-M ゲノム全体で、oTSS と分類された転写開始点は 30 箇所であった (表 3.8)。これらのうち、11 個の oTSS は ORF の上流に ORF と同じ向きに存在し、19 個は ORF の下流に ORF とは逆向きに存在した (表 3.8)。oTSS のうち、oTSS14 および oTSS28 については、NCBI PGAP により新規の ORF が存在することが推定された (図 3.6)。これら新規 ORF の機能は未知であるが、‘*Ca. P. asteris*’ AYWB 系統においては、*rs02680* ホモログとして *aywb_319* が、*rs04245* ホモログとして *aywb_063* がそれぞれアノテーションされている (Bai *et al.*, 2006)。また、4 個の oTSS については NCBI PGAP により推定された新規 ORF 内部に ORF と逆向きに存在しており、これら 4 個の oTSS は実際には asTSS であると考えられた (表 3.9)。従って、実際には mTSS と考えられる 2 個の oTSS、asTSS と考えられる 4 個の oTSS を除いた 24 個が実際には oTSS であると推定された。これら 24 個の oTSS については、その下流に ORF の存在が推定されないことから、これら oTSS から転写される RNA は非コード RNA であると考えられた。31 個の asTSS とあわせると、231 個の TSS のうち 59 個 (25.5%) から転写される RNA が非コード RNA であると推定された。

表 3.8 oTSS の一覧

TSS No.	oTSS の位置 ^a	oTSS の向き ^b	oTSS 下流 の ORF	遺伝子	ORF の向き ^b	開始または 終了コードン の位置 ^a	開始または 終了コードンから oTSS までの距離	ORF の向きに 対する oTSS の向き
oTSS01	9,927	+	<i>pam008</i>	<i>rfaG</i>	+	10,428	501	同じ
oTSS02	41,683	+	<i>pam031</i>	機能未知	+	42,625	942	同じ
oTSS03	42,118	+	<i>pam031</i>	機能未知	+	42,625	507	同じ
oTSS04	65,520	-	<i>pam052</i>	機能未知	+	65,281	239	異なる
oTSS05	69,982	-	<i>pam054</i>	<i>nrpA</i>	+	69,651	331	異なる
oTSS06	111,996	-	<i>pam089</i>	<i>obg</i>	+	111,754	242	異なる
oTSS07	132,585	+	<i>pam109</i>	機能未知	+	133,602	1,017	同じ
oTSS08	187,144	+	<i>pam157</i>	機能未知	-	187,236	92	異なる
oTSS09	381,146	-	<i>pam333</i>	機能未知	+	379,044	2,102	異なる
oTSS10	401,453	-	<i>pam354</i>	機能未知	+	401,287	166	異なる
oTSS11	422,035	-	<i>pam374</i>	<i>tmk</i>	+	420,486	1,549	異なる
oTSS12	462,008	-	<i>pam413</i>	<i>uvrD</i>	-	461,282	726	同じ
oTSS13	462,010	+	<i>pam414</i>	機能未知	-	462,170	160	異なる
oTSS14	501,571	-	<i>pam452</i>	機能未知	+	501,172	399	異なる
oTSS15	516,559	-	<i>pam462</i>	機能未知	-	515,715	844	同じ
oTSS16	545,292	-	<i>pam485</i>	機能未知	-	544,533	759	同じ
oTSS17	573,821	+	<i>pam506</i>	機能未知	-	573,949	128	異なる

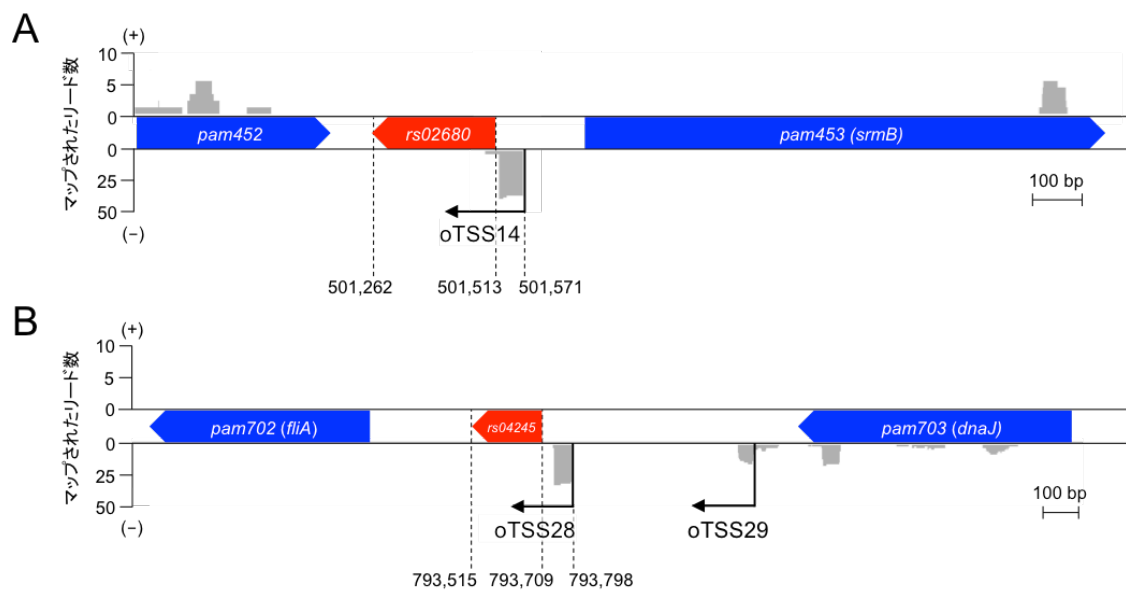


図 3.6 RNA-Seq 解析で見出された oTSS

A. *pam452* と *pam453 (srmB)* の間に存在する oTSS (oTSS14)。B. *pam702 (fliA)* と *pam703 (dnaJ)* の間に存在する oTSS (oTSS28)。+は OY-M ゲノムと同じ向きにマッピングされたリードを、-は OY-M ゲノムと逆向きにマッピングされたリードを示す。黒矢印は転写開始点を示す。横軸の下の数字は OY-M ゲノム上の塩基の位置を示す。赤色の ORF は NCBI PGAP により新規に予測された ORF を示す。

表 3.9 新規 ORF 内部に逆向きに存在した oTSS の一覧

TSS No.	oTSS の位置 ^a	oTSS の向き ^b	ORF	ORF の向き ^b	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ
oTSS02	41,683	+	<i>rs00195</i>	-	41,833	150
oTSS06	111,996	-	<i>rs00600</i>	+	112,097	101
oTSS21	628,302	+	<i>rs03370</i>	-	628,508	206
oTSS22	628,435	+	<i>rs03370</i>	-	628,508	73

^aOY-M ゲノム上における oTSS または ORF の位置を示す。

^bOY-M のゲノムに対する oTSS または ORF の向きを示す。

3.3.7. 転写開始点上流配列を用いた *de novo* モチーフ解析

3.3.2.項で特定した 231 個の転写開始点について、その上流に存在すると推定されるプロモーター配列の探索を試みた。第 2 章の解析により、RpoD のプロモーター配列は-35 領域の保存性が低いことが推定されているため、転写開始点上流-10 領域のプロモーター配列を探索するために、各転写開始点上流 21 塩基 (転写開始点を含む) より、*de novo* モチーフ探索ツール MEME (Bailey *et al.*, 2006) を用いてモチーフの探索を行った。その結果、41 個の転写開始点上流より保存モチーフの存在が推定された (表 3.10; 図 3.7)。41 個の転写開始点の中には、第 2 章で解析を行った *amp* および *pam486* の転写開始点、および第 2 章で RpoD により転写制御されると推定された *pam153* (mTSS10) および *pam734* (*norM*, mTSS80) の転写開始点が含まれていた (表 3.10; 図 3.7)。また、推定されたモチーフは第 2 章で特定された RpoD が認識する-10 プロモーター配列および拡張-10 プロモーター配列に類似した配列を含んでいた (図 3.7)。

これら 41 個の転写開始点について、その上流 51 塩基 (転写開始点を含む) の塩基保存性を解析した。その結果、保存性は低いものの第 2 章で特定した RpoD が認識する-35 プロモーター配列および A リッチ領域の存在が確認された (図 3.8)。以上の結果から、MEME により推定されたモチーフは RpoD により認識されると考えられた。

表 3.10 保存モチーフの存在が予測された TSS の一覧

TSS No.	TSS の位置 ^a	TSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ
oTSS03	42,118	+				
iTSS03	78,116	+				
oTSS07	132,585	+				
mTSS07	144,167	+	<i>pam122</i>	<i>amp</i>	144,248	81
iTSS07	161,563	+				
mTSS10	181,164	-	<i>pam153</i>	機能未知	181,000	164
mTSS12	191,918	+	<i>pam160</i>	機能未知	192,132	214
asTSS06	260,005	-				
mTSS21	270,717	+	<i>pam242</i>	<i>himA</i>	270,744	27
iTSS31	330,980	+				
mTSS35	337,669	+	<i>pam290</i>	<i>argE</i>	337,963	294
mTSS36	347,106	-	<i>pam304</i>	機能未知	347,034	72
mTSS37	357,405	+	<i>pam311</i>	機能未知	357,507	102
iTSS37	357,588	+				
asTSS11	405,828	+				
mTSS43	458,683	-	<i>pam412</i>	機能未知	458,352	331
iTSS45	463,105	-				
oTSS14	501,571	-				
mTSS49	544,918	-	<i>pam485</i>	機能未知	544,533	385
oTSS16	545,292	-				
mTSS51	545,950	+	<i>pam486</i>	機能未知	546,002	52
iTSS66	575,603	-				
mTSS56	576,877	-	<i>pam510</i>	機能未知	576,775	102
oTSS18	592,846	-				
mTSS60	599,117	-	<i>pam531</i>	機能未知	599,015	102
mTSS61	621,899	+	<i>pam555</i>	機能未知	622,011	102
mTSS63	665,272	+	<i>pam591</i>	<i>dnaE</i>	665,511	239
iTSS79	677,169	+				
mTSS66	685,379	-	<i>pam606</i>	機能未知	685,229	150

表 3.10 続き

TSS No.	TSS の位置 ^a	TSS の向き ^b	ORF	遺伝子	開始コドンの位置 ^a	5' UTR の長さ
mTSS67	707,141	+	<i>pam623</i>	<i>rpsU</i>	707,185	44
asTSS22	758,694	-				
mTSS72	761,920	+	<i>pam671</i>	<i>cspC</i>	761,965	45
oTSS25	762,465	+				
asTSS26	775,139	+				
asTSS31	780,273	+				
mTSS74	784,036	-	<i>pam691</i>	機能未知	784,008	28
oTSS28	793,798	-				
mTSS75	799,210	-	<i>pam706</i>	<i>hrcA</i>	799,183	27
mTSS76	801,754	+	<i>pam708</i>		801,872	118
mTSS80	830,671	-	<i>pam734</i>	<i>norm</i>	830,638	33
mTSS82	852,499	-	<i>pam754</i>	<i>asnS</i>	852,062	437

^aOY-M ゲノム上における TSS または ORF の位置を示す

^bOY-M のゲノムに対する TSS の向きを示す

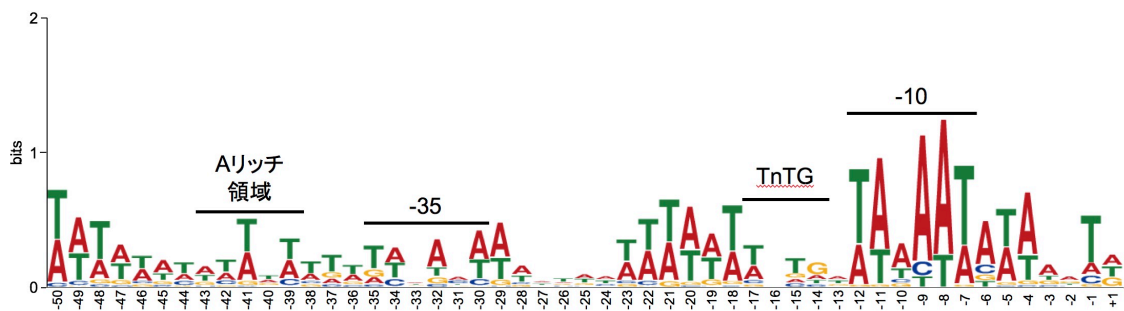


図 3.8 保存モチーフが見出された転写開始点上流の配列保存性

保存モチーフが見出された 41 個の転写開始点上流-50 から+1 までの塩基保存性を示す。シーケンスロゴは WebLogo を用いて作成した。横軸は転写開始点を+1 としたときの塩基の位置を示す。各塩基の高さは、その塩基の保存性を示す。

推定されたモチーフについてファイトプラズマ種間での保存性を検証するために、OY-Mにおいてモチーフが予測された各遺伝子のホモログ遺伝子上流配列について解析を行った。その結果、他種ファイトプラズマにおいてホモログ遺伝子が存在しない *pam412*、*pam485*、*pam510*、*pam531*、*pam555*、*pam606*、*pam708* を除いたいずれのホモログ遺伝子上流においても類似した配列が保存されていた (図 3.9)。第 2 章において RpoD により転写制御されることが示された *amp* および *pam486* については、AYWB におけるホモログ遺伝子上流から類似したモチーフが見出された。また、第 2 章で RpoD により転写制御されると推定された *pam153* および *pam734* については、他種ファイトプラズマにおいてもホモログ遺伝子上流から類似したモチーフ配列が見出された。以上の結果から、見出されたモチーフ配列はファイトプラズマ種間で共通して、転写制御に関与する可能性が示唆された。

図 3.9 OY-M で見出されたモチーフのファイトプラズマ種間における保存性

OY-M で保存モチーフが見出された遺伝子と、他種ファイトプラズマにおけるホモログ遺伝子上流配列を比較した。*pam412*、*pam485*、*pam510*、*pam531*、*pam555*、*pam606*、*pam708* は他種ファイトプラズマにホモログ遺伝子が存在しなかった。赤字の塩基は本研究で特定された転写開始点の位置を示す。開始コドンの左側の数字は、転写開始点から開始コドンまでの距離を示す。シーケンスロゴは WebLogo を用いて作成した。各塩基の高さは、その塩基の保存性を示す。

	系統	ORF	モチーフ	開始コドン	
<i>amp</i>	OY-M	<i>pam122</i>	ATGTCCTCCATTTTCCTT	TTTTCATGTTAAAAAATAGT -N81 -ATG	
	AYWB	<i>aywb_599</i>	ATTATTCTCATTTTCCTT	TTTTCATGTTAAAAAATAGT -N81 -ATG	
機能未知	OY-M	<i>pam153</i>	TATAAATTGACATTTTTTAT	TATTTATGTTAAAAATGAAATC -N164 -GTG	
	AYWB	<i>aywb_566</i>	TATAAATTGACATTTTTTAT	TATTTATGTTAAAAATGAAATC -N176 -ATG	
	AT	<i>atp_00276</i>	AAAAATAGTTTATTTATGA	ATTTATAGATTTAATAAATTT -N175 -ATG	
	PAa	<i>pa0611</i>	CAGAAATTGACATTTTTTAA	TATTTATGATAAAAATAAATTT -N131 -TTG	
	Sly	<i>sly_0417</i>	CAGAAATTGACATTTTTTAA	TATTTATGATAAAAATAAATTT -N131 -TTG	
機能未知	STOL231/09	<i>s231_03770</i>	ATAAATTGACATTTTTTATA	TTTTTATGTTAAAAATAAGTT -N144 -ATG	
	STOL284/09	<i>s284_03020</i>	ATAAATTGACATTTTTTATA	TTTTTATGTTAAAAATAAGTT -N144 -ATG	
	OY-M	<i>pam160</i>	AATCAATTGACAATTGTTTC	TTTTTTTGATTAATAAAGGT -N112 -TTG	
	AYWB	<i>aywb_559</i>	AATTAATTGACAATTGTTTC	TTTTTTTGATTAATAAAGGT -N112 -TTG	
	AT	<i>atp_00129</i>	TAAAATCATGCAATTTTATA	TAAGTATGGTACAATAAAT -N127 -ATG	
機能未知	PAa	<i>pa0817</i>	TAAAGGTTGACATTTTAAATA	TTTTTTTGATTAATAACAATTT -N136 -ATG	
	Sly	<i>sly_1058</i>	TAAAGGTTGACATTTTAAATA	TTTTTTTGATTAATAACAATTT -N78 -TTG	
	STOL284/09	<i>s284_02130</i>	TAACGATTGACAATTAACCT	TTTTTTTGATTAATAAAGGT -N71 -GTG	
	OY-M	<i>pam242</i>	GTTGCGCTTCTAATTTAT	TTTTGATGTTAATAAAGTAC -N27 -ATG	
	AYWB	<i>aywb_479</i>	TTTCGCTTGAATTTATTTT	TTTTGATGTTAATAAAGTAC -N27 -ATG	
<i>himA</i>	AT	<i>atp_00119</i>	TAATTTTGAATTTAAATAT	TTTTTATGTTAATACTAATTT -N48 -ATG	
	PAa	<i>pa0683</i>	TTTTTGCTTGAATTTTAT	TTTTGATGTTAATAAATTTAC -N26 -ATG	
	Sly	<i>sly_0498</i>	TTTTTGCTTGAATTTTAT	TTTTGATGTTAATAAATTTAC -N26 -ATG	
	STOL284/09	<i>s284_04370</i>	TTTTTACTGTAATGTTTTT	TTTTGATGTTAATAAATAC -N27 -ATG	
	機能未知	OY-M	<i>pam290</i>	AAAAAATATTTTCTCT	TTTAAATGCTAAAATAAGTT -N305 -ATG
AYWB		<i>aywb_431</i>	CTTTATGCTTTTCCCTTA	TTTTGCTGCAAAAATAAGTT -N200 -ATG	
STOL231/09		<i>s231_01370</i>	TCAAAATATATTAGATATG	ATAAATGCAATAAATAAGT -N100 -TTG	
STOL284/09		<i>s284_03490</i>	AAAAATATATTAGATATGAG	ATAAATGCAATAAATAAGT -N100 -TTG	
機能未知		OY-M	<i>pam304</i>	ATTAATAAATTTTCCCT	AAAAACACAAAAAATGATA -N82 -ATG
	AYWB	<i>aywb_417</i>	TGAAACCTTAAATTCCT	AAAAATGTTAAAAGGTGTT -N43 -GTG	
	AT	<i>atp_00247</i>	CTCAAATAGCAGAAAGTTT	GGTGGAGTAAACAATAAATTT -N68 -ATG	
	PAa	<i>pa0508</i>	TCAAACCATCAAGCAACAA	TAAAACCTTAAAATAAAT -N58 -TTG	
	Sly	<i>sly_0294</i>	TCAAACCATCAAGCAACAA	TAAAACCTTAAAATAAAT -N58 -TTG	
機能未知	STOL231/09	<i>s231_03090</i>	AAAATATTAAGAAAAAT	TAATGTTGCTTAAAAATTTAT -N100 -TTG	
	STOL284/09	<i>s284_03370</i>	AAAACATTAAGAAAAAT	TAATGTTGCTTAAAAATTTAT -N101 -TTG	
	OY-M	<i>pam311</i>	TTGTCATGTTGCGGAAGT	ATTTGGGAATCAATAAATG -N101 -ATG	
	AYWB	<i>aywb_081</i>	TTAAGGGATAATATTAAT	AAATTAAGTTAAAATAAGGA -N10 -ATG	
	機能未知	OY-M	<i>pam412</i>	AAAACCTTAAATTTATGAAA	TATTAATGCTATAATATAGGT -N331 -ATG
OY-M		<i>pam485</i>	TATTTGATAAAAGTATAAAA	GCATCTAAAATAAATTAAGT -N384 -TTG	
OY-M		<i>pam486</i>	TTTTTATGATCAAAACATTT	AAATATGATATAATAAACCCT -N52 -TTG	
AYWB		<i>aywb_169</i>	TTTTTATGATCAAAACATTT	AAATATGATATAATAAACCCT -N52 -TTG	
機能未知		OY-M	<i>pam510</i>	GCTTATAAATTTGTTTTAT	TGTTCCCGATGCAACTAAAAT -N101 -ATG
	OY-M	<i>pam531</i>	GCTTATAAATTTGTTTTAT	TGTTCCCGATGCAACTAAAAT -N101 -ATG	
	OY-M	<i>pam555</i>	GCTTATAAATTTGTTTTAT	TGTTCCCGATGCAACTAAAAT -N101 -ATG	
	機能未知	OY-M	<i>pam591</i>	GTTGCAAGCAGAACCAAAA	CAAGAGATGCAATAATAAT -N238 -ATG
		PAa	<i>pa0535</i>	TCATTTCAAAAATAAAAACA	TTATTAAGAAAAATAAATTT -N17 -ATG
Sly		<i>sly0329</i>	TCATTTCAAAAATAAAAACA	TTATTAAGAAAAATAAATTT -N17 -ATG	
機能未知		OY-M	<i>pam606</i>	ATCAAAATAAATTTATAAT	AATTTGCTATAATAGTAAATG -N149 -ATG
		OY-M	<i>pam623</i>	TTCTATTGACAAACAACAA	AAAAAGAGATACAATAAATG -N44 -ATG
	AYWB	<i>aywb_112</i>	TTATTATTGACAAAAACA	AAAAAGAGATACAATAAATG -N45 -ATG	
	AT	<i>atp_00300</i>	GATATTTTTTTAAAAAAT	TATTTGCAAAAAATAAAT -N70 -ATG	
	PAa	<i>pa0618</i>	AAATCAAACATGCATAAAGT	TTTTATAGTTTTAATGAAAA -N60 -ATG	
機能未知	Sly	<i>sly_0425</i>	AAATCAAACATGCATAAAGT	TTTTATAGTTTTAATGAAAA -N60 -ATG	
	STOL231/09	<i>s231_04790</i>	CAAAAGTTGACAAAAGAAAT	AAAAAAGATATAATGTAAT -N75 -ATG	
	STOL284/09	<i>s284_01930</i>	CAAAAGTTGACAAAAGAAAT	AAAAAAGATATAATGTAAT -N75 -ATG	
	機能未知	OY-M	<i>pam671</i>	AATGTTGACTCTAAAAATA	AATGAGTTATAATAGATAAT -N44 -ATG
		AYWB	<i>aywb_070</i>	ATGTTGACTCTAAAAATA	AATGAGTTATAATAGATAAT -N44 -ATG
AT		<i>atp_00295</i>	AAATATCTTGAATTTTAAA	TAAATAGTTATAATATATTT -N50 -ATG	
PAa		<i>pa0820</i>	AATATCAAAAAAGCAATTC	TTCTTTTGATAAAAAGATTGCT -N445 -ATG	
Sly		<i>sly_1061</i>	AATATCAAAAAAGCAATTC	TTCTTTTGATAAAAAGATTGCT -N445 -ATG	
機能未知	STOL231/09	<i>s231_00730</i>	ACGAATTTTATTATTATCA	AACCTTTGATAAAAAAATAT -N152 -ATG	
	STOL284/09	<i>s284_00760</i>	ACGAATTTTATTATTATCA	AACCTTTGATAAAAAAATAT -N152 -ATG	
	OY-M	<i>pam691</i>	TTTTTTGCAATTTGTTCT	ATTTATGTTAAAAATAAAGT -N27 -ATG	
	AYWB	<i>aywb_279</i>	ATTTTTGCAATTTGTTCT	TATTTATGTTAAAAATAAAGT -N28 -ATG	
	Sly	<i>sly_0764</i>	TTTTTTGCAATTTACCAGTT	GGATTATGATAAATGATGAT -N35 -ATG	
機能未知	OY-M	<i>pam706</i>	ATAGGGTTGACATTCACAAA	AAAAAGTAATACAATATAT -N36 -ATG	
	AYWB	<i>aywb_059</i>	AAAAATAAATAAATAATA	AAAAAATGAAAATATAGGTT -N60 -CTG	
	AT	<i>atp_00204</i>	TTTTATAACTTGACATTTTAT	ATATAAATAAACAATAATTT -N40 -ATG	
	PAa	<i>pa0557</i>	AAATGGTTGACATTTGAATC	AAAAAAGCATATAATATAT -N35 -ATG	
	Sly	<i>sly_0357</i>	AAATGGTTGACATTTGAATC	AAAAAAGCATATAATATAT -N17 -GTG	
機能未知	STOL231/09	<i>s231_00650</i>	AAATAGTTGACATATAGTTG	ACATTATGATTAAAAAAGAA -N47 -ATG	
	STOL284/09	<i>s284_02510</i>	AAATAGTTGACATATAGTTG	ACATTATGATTAAAAAAGAA -N47 -ATG	
	OY-M	<i>pam708</i>	TTTTAACTGTTTTGAGCGA	TTTTTACGCAAAAAAAGAT -N129 -TTG	
	機能未知	OY-M	<i>pam734</i>	TGCCCTCCAAAACCCCTCTA	ATTTTGATAAATAATAATG -N32 -TTG
		AYWB	<i>aywb_651</i>	TTTGCTCTCAAAACCCCTC	TAATTTTGATAAATAATAAT -N72 -GTG
PAa		<i>pa0110</i>	TTTGCTTTCAAAATGCTTGC	ATTTTTTGATAAATAATTTAT -N63 -ATG	
Sly		<i>sly_0802</i>	TTTGCTTTCAAAATGCTTGC	ATTTTTTGATAAATAATTTAT -N63 -ATG	
機能未知		OY-M	<i>pam754</i>	AAAAATATCAAAATATAACT	TAAAAATGATAAATAAATTT -N437 -ATG
	AYWB	<i>aywb_671</i>	AAAAATATCAAAATATAACT	TAAAAATGATAAATAAATTT -N317 -ATG	
	AT	<i>atp_00158</i>	AAAACATAAATTAATAAAT	TATATCTGTTTAAAAAATTT -N456 -ATG	
	PAa	<i>pa0026</i>	ATATTTTAAAAAATTTGGCT	TAAAAATGTTAAAAATGCTT -N141 -ATG	
	Sly	<i>sly_0031</i>	ATATTTTAAAAAATTTGGCT	TAAAAATGTTAAAAATGCTT -N141 -ATG	



3.4. 考察

3.4.1. ファイトプラズマの網羅的転写開始点決定

本研究では、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq により OY-M の網羅的な転写開始点決定を試みた。既報の手法 (図 3.1; Sharma *et al.*, 2010; Schlüter *et al.*, 2013) を参考に cDNA ライブラリー構築を行う一方で、OY-M のゲノムは AT リッチであることから (Oshima *et al.*, 2004)、逆転写反応に用いるプライマーとしてランダム N₆ プライマーに加えて、A または T のみから成るランダム W₆ プライマーを用いた。その結果、通常のランダム N₆ プライマーを用いた場合と比較して、ランダム W₆ プライマーを使用した場合にはより多くの RNA-Seq リードが OY-M ゲノムにマッピングされた (表 3.2)。既報のファイトプラズマにおけるトランスクリプトーム解析ではファイトプラズマゲノムにマッピングされたリードは 0.1% に満たないことが報告されており (Siewert *et al.*, 2014; Abbà *et al.*, 2014)、OY-M の rRNA または tRNA にマッピングされたリードが多かったものの、本研究ではランダム W₆ プライマーの利用によってより多くのファイトプラズマ RNA 由来の RNA-Seq リードを得ることができたと考えられる。

RNA-Seq リードの 5'末端が少なくとも 3 リード以上揃った箇所を転写開始点としてアノテーションした結果、OY-M ゲノム上で 231 箇所の転写開始点を特定した。転写開始点を 4 つに分類し、mTSS が 82 箇所 (表 3.4)、iTSS が 88 箇所 (表 3.6)、asTSS が 31 箇所 (表 3.7)、oTSS が 30 箇所 (表 3.8) 特定された。mRNA として遺伝子の発現に関わると考えられる mTSS は 82 箇所であり、mTSS 下流でオペロンとして転写されると予測された遺伝子を含めると 131 遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。これは OY-M の全 754 遺伝子のう

ら 17.4%に相当するが、本研究で転写開始点が見出されなかった遺伝子については、植物での発現量が低い可能性が考えられる。したがって今後は OY-M 感染昆虫由来の RNA についても解析を行うことで、mTSS のみならず他の TSS についても、より多くの箇所特定できる可能性が考えられる。

本研究で特定された mTSS から開始コドンまでの距離、すなわち 5' UTR の長さは平均 187 塩基であり、60%以上の mTSS が開始コドンから 200 塩基以内に存在していた (表 3.5)。この結果は、ファイトプラズマに近縁な *M. hyopneumoniae* における知見と一致していた (Weber *et al.*, 2012)。したがって、ファイトプラズマやマイコプラズマが属する *Mollicutes* 綱において、転写制御機構が保存されている可能性が示唆された。

3.4.2. ファイトプラズマ遺伝子の再アノテーション

近年、遺伝子アノテーションアルゴリズムの改良により、新規 ORF の予測が進められている (Tatusova *et al.*, 2016)。OY-M ゲノムにおいても近年、NCBI PGAP により新規 ORF の予測が行われているが、それらが実際に発現しているかは検証の余地があった。一方で、細菌における遺伝子の再アノテーションについては、RNA-Seq を用いて転写開始点を特定することで、これまで ORF の存在が予測されていなかった領域に新規 ORF を見出している例が報告されている (Sharma *et al.*, 2010; Schlüter *et al.*, 2013)。本研究では、iTSS が見出された *pam135* が、iTSS 下流の代替開始コドンから翻訳されると NCBI PGAP によって再アノテーションされており、他種ファイトプラズマや近縁な細菌の *pam135* ホモログ遺伝子においてこの代替開始コドンが保存されていることを見出した (図 3.4)。ファイトプラズマおよびファイトプラズマに近縁な細菌では、PAM135 ホモログタンパク質の機能は明らかになっていないが、*Staphylococcus aureus* においては PAM135 ホモログタンパク質が細胞内におけ

るシグナル伝達の 2 次伝達物質である cyclic-di-AMP (Kolb *et al.*, 1993) の認識に関わることが報告されている (Müller *et al.*, 2015)。以上の結果から、PAM135 は下流の代替開始コドンから翻訳されており、PAM135 の機能は近縁な細菌で広く保存されている可能性が示唆された。

pam135 以外では、NCBI PGAP により再アノテーションされた遺伝子内に存在した iTSS は存在しなかったが、多くの iTSS の下流には代替開始コドンとなりうるコドンが存在した (表 3.6)。また、oTSS と分類された TSS のうち、2 つの下流には新規 ORF が予測され、4 つについては新たに存在が予測された ORF の内部に ORF とは逆向きに存在しており、これらの oTSS は実際には mTSS や asTSS であると考えられた (表 3.9)。したがって、網羅的な転写開始点の特定は、より正確な遺伝子アノテーションを行う上でも重要であると考えられた。

3.4.3. ファイトプラズマにおける非コード RNA

細菌においては、非コード RNA は遺伝子発現の調節因子として機能する例が報告されている (Waters & Storz, 2009; Storz *et al.*, 2011)。ファイトプラズマにおいては Flavescence dorée ファイトプラズマのトランスクリプトーム解析において、非コード RNA が 1 種類確認されている (Abbà *et al.*, 2014)。この例で見出された非コード RNA はグループ II イントロンに分類される、リボザイム活性を有する RNA である。グループ II イントロンは自己スプライシングや転移性因子として機能することが他の細菌では知られており (Dai & Zimmerly, 2002)、OY-M においてもその存在は示唆されていた (Wei *et al.*, 2008)。ファイトプラズマにおける非コード RNA に関する報告はこの 1 例のみであり、ゲノム全体での非コード RNA の存在や、遺伝子発現調節に関わり得る非コード RNA の存在は確認されていなかった。

本研究では、ゲノムワイドに asTSS や oTSS を特定した (表 3.7、3.8)。oTSS のうちいくつかは、実際には mTSS や asTSS であると考えられたが、多くはその下流に ORF が予測されず、非コード RNA として機能すると考えられた。したがって、これらの TSS から転写された非コード RNA はゲノム上で自身と同じ箇所で相補鎖にコードされた遺伝子の転写制御を担う、シス転写制御因子として機能する関与する可能性が示唆された。一方で、OY-M ゲノム上には potential mobile units (PMUs) と呼ばれる遺伝子重複領域が存在する (Bai *et al.*, 2006; Arashida *et al.*, 2008)。したがって、非コード RNA はゲノム上で自身がコードされた位置とは異なる箇所に存在する重複遺伝子の転写制御を担う、トランス転写制御因子として機能する可能性も考えられた。本研究で OY-M ゲノム全体に見出された非コード RNA については、3' RACE により全長を決定した上で、その機能について検証することが必要であると考えられる。

3.4.4. RpoD により転写制御されるファイトプラズマ遺伝子

本研究で特定された転写開始点について、その上流配列から *de novo* モチーフ予測を行うことで、プロモーター配列の探索を試みた。その結果、41 個の転写開始点上流から保存されたモチーフ配列が見出された (表 3.10; 図 3.7)。このモチーフは、第 2 章で RpoD により転写制御されることが示された *amp* や *pam486* の上流にも存在し、また、第 2 章で特定した RpoD 認識プロモーターを上流に有することが予測されていた *pam153* および *pam734* (表 2.6) の上流にも見出された。これらのことから、見出されたモチーフ配列は RpoD により認識されると考えられた。本章における解析により、RpoD により転写制御される遺伝子候補として新たに 39 遺伝子を特定した。一方で、第 2 章で RpoD により転写制御されると予測された遺伝子 (表 2.6) の多くは、本章の解析では見出されなかった。これらの遺伝子につ

いては、植物における発現量が低い可能性もあり、今後昆虫においても同様に解析を行う必要があると考えられる。本章でモチーフが見出された遺伝子について、他種ファイトプラズマにおけるホモログ遺伝子の上流配列の解析を行った。その結果、他種ファイトプラズマのホモログ遺伝子上流においても、同様の配列が見出された (図 3.9)。したがって、これらホモログ遺伝子の転写制御には、ファイトプラズマ属内で共通して、RpoD が関与する可能性が示唆された。

また、OY-M において見出された保存モチーフは、mTSS 以外にも iTSS、asTSS、oTSS 上流において見出された (表 3.10)。3.4.3.項で述べたように、asTSS や oTSS から転写された RNA は非コード RNA であると考えられる。RpoD が非コード RNA の転写制御に関与する例は他の細菌において報告されており (Schlüter *et al.*, 2013; Dugar *et al.*, 2013; Čuklina *et al.*, 2016)、ファイトプラズマにおいても RpoD は mRNA の発現制御だけでなく、非コード RNA の転写制御にも関与している可能性が示唆された。したがって、ファイトプラズマの RpoD は直接的に遺伝子の発現制御に関与するだけでなく、非コード RNA の転写制御を介して間接的に遺伝子の発現制御に関わる可能性も考えられた。

第4章 総合考察

4.1. ファイトプラズマにおける RpoD による転写制御機構

第2章では、ファイトプラズマの RpoD がハウスキーピング遺伝子やファイトプラズマ-宿主間相互作用因子の発現制御に関与することを *in vitro* 転写解析により明らかにした。また、特定した RpoD の共通プロモーター配列はファイトプラズマのゲノム全体に渡り存在しており、ハウスキーピング遺伝子を含めた様々な遺伝子の転写制御に関与していると考えられた。第3章の解析では、RpoD の共通プロモーターに類似した配列が、mRNA の転写開始点上流以外にも非コード RNA 転写開始点上流より見出された。したがって、RpoD はファイトプラズマにおいて主要シグマ因子として機能しており、ハウスキーピング遺伝子を含めた様々な遺伝子の発現制御に直接関与するとともに、非コード RNA を介して間接的に遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された。第3章で非コード RNA の転写開始点上流より見出された保存モチーフが実際に RpoD により認識されているかという点については検証の余地があり、本研究で構築した *in vitro* 転写系を用いて今後検証する必要があると考えられる。また、非コード RNA がファイトプラズマにおいてどのような機能を有しているのかは未だ不明である。培養が可能な細菌では、ゲノム上の非コード RNA 領域を欠損させることで非コード RNA の機能解析が行われているが (Schmidtke *et al.*, 2010)、ファイトプラズマは培養や形質転換が未だ困難であり、新たな手法の構築が必要と考えられる。

難培養性細菌では、形質転換が困難であることから遺伝子発現制御機構に関する研究はほとんど行われていない。第2章で構築した *in vitro* 転写系は、他の難培養性細菌のシグマ因子とプロモーター配列に関する解析においても有用な手法になり得ると考えられる。また、第3章では、次世代シーケンサーを用いた網羅的な転写開始点の解析において、T リッ

ちなゲノムを有するファイトプラズマに対応してランダム W₆ プライマーを用いて逆転写を行うことで、RNA-Seq の効率を向上させることができた。細胞内寄生性の細菌では、その多くが AT リッチなゲノムを有することが知られており (Moran, 2002; Moran *et al.*, 2008)、本研究で用いた手法は他の難培養性細菌にも適用できる可能性がある。

4.2. ファイトプラズマのホストスイッチングと遺伝子発現調節機構

OY-M では RpoD は植物体内と比較して昆虫体内で発現量が上昇することが明らかとなっている (Oshima *et al.*, 2011; Ishii *et al.*, 2013)。これまでにゲノム解読が行われているいずれのファイトプラズマのゲノムにおいても、シグマ因子は RpoD と FliA の 2 種類がコードされていることから (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013)、ファイトプラズマは植物と昆虫という 2 つの異なる宿主間をホストスイッチングする際に、2 種類のシグマ因子を使い分けることにより、その遺伝子発現を大きく変動させている可能性が考えられていた (Oshima *et al.*, 2011; Ishii *et al.*, 2013)。しかしながら、第 2 章の解析で RpoD により転写制御される遺伝子および RpoD により転写制御されると考えられる遺伝子は、昆虫で発現が上昇するものばかりではなかった (表 2.6; Oshima *et al.*, 2011)。したがって、ファイトプラズマのホストスイッチングに伴う大幅な遺伝子発現の変動は、単にシグマ因子の発現量の変化によるものではないことが示唆された。

本研究ではファイトプラズマが有するもう 1 種類のシグマ因子 FliA に関する解析は行っておらず、今後 FliA により転写される遺伝子や、その転写制御機構に関して解析を行う必要があると考えられる。本研究と同様に FliA を用いて *in vitro* 転写解析を行うことも、今後の研究の一つとして挙げられるが、FliA はファイトプラズマゲノム上で複数コピー存在しており、解析対象とする FliA の選定を行う必要がある。また、複数コピー存在する FliA 間

で、転写制御対象の遺伝子が異なる可能性も考えられる。また、ファイトプラズマではこれまでにシグマ因子としてアノテーションされている遺伝子は RpoD と FliA の 2 種類のみであるが、新奇の転写因子が存在する可能性もある。ファイトプラズマと近縁なマイコプラズマにおいては、これまでシグマ因子は RpoD のみを有するとされてきたが、近年新奇シグマ因子の存在が報告されている (Torres-Puig *et al.*, 2015)。ファイトプラズマでは、マイコプラズマで見出されたこの新規シグマ因子のホモログ遺伝子は見出されていないが、同様の観点からの解析も重要であると考えられる。

また、細菌ではシグマ因子の他にも転写制御に関与するタンパク質の存在が知られている。一例として、DNA に結合することで転写を抑制するヒストン様タンパク質 (Atlung *et al.*, 1996; Navarre *et al.*, 2006) が挙げられるが、ファイトプラズマゲノム上にもヒストン様タンパク質 HimA がコードされている。himA 以外の遺伝子についても、機能未知の遺伝子にコードされるタンパク質が DNA 結合タンパク質として転写制御に関与している可能性があり、シグマ因子以外の転写制御因子に関する研究も今後の課題である。

さらに、第 3 章でファイトプラズマにおける存在が示唆された、非コード RNA についても、他の細菌と同様に遺伝子発現制御に関与しているのか興味を持たれる。1.2.2.項で述べたように、これまでに解析が行われている他の細菌では、非コード RNA を介した様々な遺伝子発現制御機構が知られており、非コード RNA が相補的な配列を有する mRNA と結合することで翻訳を阻害する例や、逆に翻訳を促進する例が挙げられる (Waters & Storz, 2009; 図 1.9)。また、非コード RNA が発現制御を行う対象遺伝子としては、ゲノム上で非コード RNA と同じ箇所に逆向きにコードされた遺伝子である場合 (シス発現制御因子) に加えて、ゲノム上の異なる位置にコードされる、非コード RNA と相補的な配列を有する遺伝子である場合 (トランス発現制御因子) が知られている (Waters & Storz, 2009; 図 1.9)。ファイトプ

ラズマはゲノム上に PMU と呼ばれる遺伝子重複領域が存在することが知られており (Bai *et al.*, 2006; Arashida *et al.*, 2008)、ファイトプラズマの非コード RNA はシスおよびトランス発現制御因子として遺伝子発現制御に関与する可能性が考えられる。第 3 章では RpoD が非コード RNA の転写制御に関与する可能性が示唆されたが、同様にもう一つのシグマ因子 FliA も非コード RNA の転写制御に関与する可能性がある。以上を踏まえると、ファイトプラズマの遺伝子発現制御機構は、RpoD と FliA の 2 種類のシグマ因子による直接的な転写制御と、シグマ因子により転写制御される非コード RNA を介した間接的な転写制御による複雑な遺伝子発現制御機構である可能性が考えられる。

本研究により、ファイトプラズマの RpoD がホストスイッチングに関与する Amp (Suzuki *et al.*, 2006) や PAM289 (Neriya *et al.*, 2014)、病原性因子である TENGU (Hoshi *et al.*, 2009) の発現制御に関与することが示された。ファイトプラズマの遺伝子発現制御機構について、今後も研究を進めることでファイトプラズマのホストスイッチング機構や病原性機構についても研究が前進することが期待される。

摘要

ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma spp.*) は *Mollicutes* 綱に属する篩部局在性の植物病原細菌であり、花器官の葉化や緑化、天狗巣 (萎縮・叢生)、黄化など様々な病徴を引き起こす。ファイトプラズマは 700 種以上の多くの植物に感染して病気を引き起こし、農業上重要な問題となっている。ファイトプラズマはヨコバイなどの昆虫により媒介され、昆虫体内においても増殖することが知られている。これまでの研究により、ファイトプラズマは植物-昆虫間の宿主転換に伴い、その遺伝子発現パターンを劇的に変化させることが明らかとなっているが、その機構は不明である。

細菌においては、遺伝子発現制御に関わる因子の一つとしてシグマ因子が知られている。シグマ因子は遺伝子の転写開始点上流に存在するプロモーター配列を認識し、遺伝子の転写制御に関与する。ファイトプラズマは 2 種類のシグマ因子、RpoD および FliA をゲノム上にコードするが、これらのうち RpoD はファイトプラズマ種間で広く保存されている。したがって、RpoD はファイトプラズマの転写制御において重要な役割を担うと考えられていたが、その詳細は不明であった。そこで本研究では、ファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD を用いた *in vitro* 転写系を確立し、RpoD により転写制御される遺伝子の探索と、RpoD が認識する共通プロモーター配列について解析を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いてファイトプラズマの転写開始点を網羅的に解析し、ファイトプラズマの遺伝子転写制御における RpoD の役割について考察した。

1. *in vitro* 転写系を用いたファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD の機能解析

多くの細菌において、RpoD は 16S rRNA 遺伝子の転写制御に関与することが知られている。そこで本研究ではまず、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ（‘*Ca. P. asteris*’ OY-M 系統; 以下 OY-M) の 16S rRNA B 遺伝子 (*rrnB*) の転写開始点を 5' RACE 法により特定し、その上流配列を鋳型 DNA として用いた *in vitro* 転写解析を行った。OY-M の RpoD を大腸菌で発現、精製したのち、*rrnB* の転写開始点上流配列を含む DNA、大腸菌由来の RNA ポリメラーゼ (RNAP_{Ec})、および同位体標識した NTP を混合し、*in vitro* において転写反応を行った。その結果、RpoD 依存的に転写産物が検出されたことから、RpoD は *in vitro* で RNAP_{Ec} と複合体を形成して転写活性を発揮することが示された。そこで、RpoD が認識する *rrnB* のプロモーター配列を特定するために、*rrnB* 上流配列のうちプロモーターと推定される領域 (-10 および -35 領域) に変異を導入し、*in vitro* 転写系を用いた解析を行った。その結果、-10 および -35 領域のいずれに変異を導入した場合にも転写活性が低下したことから、これらの領域が RpoD による認識に重要な *rrnB* のプロモーター領域であることが明らかとなった。

次に、RpoD により転写制御される OY-M 遺伝子の探索を試みた。多くの細菌において、RpoD は 16S rRNA 遺伝子以外にもハウスキーピング遺伝子の転写制御に関与することから、OY-M のハウスキーピング遺伝子上流配列を鋳型 DNA として *in vitro* 転写解析を行った。その結果、OY-M の RpoD はハウスキーピング遺伝子の転写に関与することが明らかとなった。また、病原性や昆虫宿主特異性に関わる様々な遺伝子についても同様に *in vitro* 転写系を用いた解析を行った結果、RpoD がこれらの遺伝子の転写制御に関与することが明らかとなった。そこで、*in vitro* 転写系による解析を行った各遺伝子の転写開始点を 5' RACE 法により解析し、RpoD により認識される共通プロモーター配列の特定を試みた。その結果、細

菌の RpoD による典型的な認識配列と類似した-10 領域の配列が得られた一方、-35 領域の配列は多様であった。この共通プロモーター配列は OY-M ゲノム上に 540 ヶ所存在し、少なくとも 88 遺伝子が RpoD により転写制御されると推定された。RpoD はファイトプラズマ間で保存性が高いことから、他の複数のファイトプラズマゲノムについても解析を行ったところ、同様にハウスキーピング遺伝子を含めた多様な遺伝子の上流に共通配列が見出された。以上のことから、RpoD はファイトプラズマにおいてハウスキーピング遺伝子の転写制御に関与するシグマ因子であり、ハウスキーピング遺伝子以外にも多様な遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。また、RpoD による転写制御機構はファイトプラズマ種間で広く保存されていると考えられた。

2. ファイトプラズマの転写開始点の網羅的解析

近年、次世代シーケンス技術の発展により、次世代シーケンサーを用いて細菌の転写開始点を網羅的に決定することが可能となった。そこで、ファイトプラズマの RpoD により転写制御される遺伝子を網羅的に探索するために、OY-M に感染したシュンギク (*Glebionis coronaria*) から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて転写開始点の網羅的解析を行った。その結果、OY-M のゲノム全体で 231 ヶ所の転写開始点が特定された。特定された転写開始点の中には、遺伝子の上流に存在する転写開始点の他にも、遺伝子内部に逆向きで存在する転写開始点や、下流に遺伝子の存在が予測されていない転写開始点も確認された。これらの転写開始点から生じる転写産物は非コード RNA であると考えられ、ファイトプラズマにおいて多くの非コード RNA が転写されていることが明らかとなった。

続いて、特定した転写開始点の上流配列より保存モチーフの探索を行ったところ、41ヶ所の転写開始点上流から保存されたモチーフの存在が推定された。このモチーフは、*in vitro* 転写系を用いた解析で RpoD により転写制御されることが示された遺伝子上流からも見出され、*in vitro* 転写系を用いて特定した RpoD が認識する共通プロモーター配列と類似していた。したがって、この保存モチーフを上流に有する 41ヶ所の転写開始点は、RpoD によって転写制御されている可能性が示唆された。また、これらの中には非コード RNA の転写に関与すると考えられる転写開始点も含まれており、RpoD はファイトプラズマの遺伝子だけでなく非コード RNA の転写制御にも関与すると考えられた。さらに、保存モチーフが見出された転写開始点下流の遺伝子について、他種ファイトプラズマのホモログ遺伝子上流配列を解析したところ、同様の配列が見出された。したがって、これらの遺伝子の転写制御にはファイトプラズマ種間で共通して RpoD が関与する可能性が示唆された。

本研究の結果、ファイトプラズマの共通シグマ因子 RpoD が認識するプロモーター配列が特定され、RpoD により転写制御される遺伝子が明らかとなった。RpoD はハウスキーピング遺伝子を含む多様な遺伝子の転写制御に関与しており、その機能はファイトプラズマ種間で広く保存されている可能性が示唆された。また、RpoD は遺伝子の転写制御だけでなく、非コード RNA の転写制御にも関与すると考えられた。非コード RNA は多くの細菌において遺伝子発現制御に関与する例が知られており、RpoD は非コード RNA を介して間接的に遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。今後、本研究で見出された非コード RNA の機能や、もう一つのシグマ因子 FliA に関する解析を進めることで、ファイトプラズマの遺伝子発現制御機構に関する理解が深まると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物医科学研究室 難波成任 特任教授ならびに植物病理学研究室 山次康幸 准教授には懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りましたことを衷心より感謝申し上げます。

法政大学 生命科学部 大島研郎 教授、東京農工大学 農学研究院 小松健 特任准教授、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 前島健作 助教、宇都宮大学 農学部 煉谷裕太郎 助教、鳥取大学 農学部 三浦千裕 博士研究員には平素の研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり、多くの有益なご助言をいただきましたことを厚く御礼申し上げます。また、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室および植物医科学研究室の博士研究員、学生、卒業生、技術補佐員、非常勤職員のみなさまには研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり、様々な面でのご支援をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

引用文献

Abbà S, Galetto L, Carle P, Carrère S, Delledonne M, Foissac X, Palmano S, Veratti F, Marzachi C. RNA-Seq profile of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *BMC Genomics*. 2014;15:1088.

Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int*. 2004;11:36-42.

Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166-169.

Andersen MT, Liefting LW, Havukkala I, Beever RE. Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ reveals genome plasticity. *BMC Genomics*. 2013;14:529.

Aramaki H, Fujita M. *In vitro* transcription analysis of *rpoD* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;180:311-316.

Arashida R, Kakizawa S, Hoshi A, Ishii Y, Jung HY, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. Heterogenic dynamics of the structure of multiple gene clusters in two pathogenically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA Cell Biol*. 2008;27:209-217.

Atlung T, Sund S, Olesen K, Brøndsted L. The histone-like protein H-NS acts as a transcriptional repressor for expression of the anaerobic and growth phase activator AppY of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1996;178:3418-3425.

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

Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic Acids Res. 2006;34:W369-W373.

Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma 70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. EMBO J. 1997;16:4034-4040.

Bertaccini A. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. Front Biosci. 2007;12:673-689.

Bertaccini A, Duduk B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. Phytopathol Mediterr. 2009;48:355-378.

Browning DF, Busby SJ. The regulation of bacterial transcription initiation. Nat Rev Microbiol. 2004;2:57-65.

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

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

Chen W, Li Y, Wang Q, Wang N, Wu Y. Comparative genome analysis of wheat blue dwarf phytoplasma, an obligate pathogen that causes wheat blue disease in China. *PLoS ONE.* 2014;9:e96436.

Choonee N, Even S, Zig L, Putzer H. Ribosomal protein L20 controls expression of the *Bacillus subtilis infC* operon via a transcription attenuation mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:1578-1588.

Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 2005;10:526-535.

Chung WC, Chen LL, Lo WS, Lin CP, Kuo CH. Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. PLoS ONE. 2013;8:e62770.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res. 2004;14:1188-1190.

Čuklina J, Hahn J, Imakaev M, Omasits U, Förstner KU, Ljubimov N, Goebel M, Pessi G, Fischer HM, Ahrens CH, Gelfand MS, Evguenieva-Hackenberg E. Genome-wide transcription start site mapping of *Bradyrhizobium japonicum* grown free-living or in symbiosis - a rich resource to identify new transcripts, proteins and to study gene regulation. BMC Genomics. 2016;17:302.

Dai L, Zimmerly S. Compilation and analysis of group II intron insertions in bacterial genomes: evidence for retroelement behavior. Nucleic Acids Res. 2002;30:1091-1102.

Darby AC, Armstrong SD, Bah GS, Kaur G, Hughes MA, Kay SM, Koldkjær P, Rainbow L, Radford AD, Blaxter ML, Tanya VN, Trees AJ, Cordaux R, Wastling JM, Makepeace BL. Analysis of gene expression from the *Wolbachia* genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. Genome Res. 2012;22:2467-2477.

Dickinson M, Tuffen M, Hodgetts J. The phytoplasmas: an introduction. Methods Mol Biol. 2013;938:1-14.

Dugar G, Herbig A, Förstner KU, Heidrich N, Reinherdt R, Nieselt K, Sharma CM. High-resolution transcriptome maps reveal strain-specific regulatory features of multiple *Campylobacter jejuni* isolates. PLoS Genet. 2013;9:e1003495.

Falah M, Gupta, RS. Phylogenetic analysis of mycoplasmas based on Hsp70 sequences: cloning of the *dnaK* (*hsp70*) gene region of *Mycoplasma capricolum*. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:38-45.

Filiatrault MJ, Stodghill PV, Myers CR, Bronstein PA, Butcher BG, Lam H, Grills G, Schweitzer P, Wang W, Schneider DJ, Cartinhour SW. Genome-wide identification of transcriptional start sites in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000. PLoS ONE. 2011;6:e29335.

Fischer A, Santana-Cruz I, Wambua L, Olds C, Midega C, Dickinson M, Kawicha P, Khan Z, Masiga D, Jores J, Schneider B. Draft genome sequence of “*Candidatus* Phytoplasma oryzae” strain Mbita1, the causative agent of napier grass stunt disease in Kenya. Genome Announc. 2016;4:e00297-16.

Fujita M, Hanaura Y, Amemura A. Analysis of *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. Gene. 1995;167:93-98.

Ghosh T, Bose D, Zhang X. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. FEMS Microbiol Rev. 2010;34:611-627.

Gourse RL, de Boer HA, Nomura M. DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell*. 1986;44:197-205.

Graves MC, Rabinowitz JC. *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. Evidence for “extended” promoter elements in gram-positive organisms. *J Biol Chem*. 1986;261:11409-11415.

Gruber TM, Gross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:441-466.

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

Harley CB, Reynolds RP. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res*. 1987;15:2343-2361.

Harrison NA, Elliott ML. Lethal yellowing of palms. *Plant Health Instructor*. 2008; doi: 10.1094/PHI-I-2008-0714-01.

Helman JD. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol.* 1991;5:2875-2882.

Helmann JD. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2351-2360.

Helmann JD, Chamberlin MJ. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:839-872.

Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N, Dickinson M. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of “*Candidatus* Phytoplasma”. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:1826-1837.

Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kingdom HN, Namba S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol.* 2008;9:403-423.

Hook-Barnard IG, Hinton DM. Transcription initiation by mix and match elements: flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. *Gene Regul Syst Bio.* 2007;1:275-293.

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

Ibanez F, Levy J, Tamborindeguy C. Transcriptome analysis of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in its psyllid vector, *Bactericera cockerelli*. *PLoS ONE*. 2014;9:e100955.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. Minutes of the interim meeting, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa. *Int J Syst Bacteriol*. 1993;43:394-397.

Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:499-518.

Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology*. 2009;155:2058-2067.

Ishii Y, Kakizawa S, Oshima K. New *ex vivo* reporter assay system reveals that σ factors of an unculturable pathogen control gene regulation involved in the host switching between insects and plants. *MicrobiologyOpen*. 2013;2:553-565.

Ji X, Gai Y, Lu B, Zheng C, Mu Z. Shotgun proteomic analysis of mulberry dwarf phytoplasma. *Proteome Sci.* 2010;8:20.

Jishage M, Iwata A, Ueda S, Ishihama A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol.* 1996;178:5447-5451.

Jung HY, Miyata S, Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, Suzuki S, Ugaki M, Hibi T, Namba S. First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasma genome. *DNA Cell Biol.* 2003;22:209-215.

Kakizawa S, Makino A, Ishii Y, Tamaki H, Kamagata Y. Draft genome sequence of “*Candidatus* Phytoplasma asteris” strain OY-V, an unculturable plant-pathogenic bacterium. *Genome Announc.* 2014;2:e00944-14.

Kaminska M, Korbin M. Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiol Plant.* 1999;21:21-26.

Kamla V, Henrich B, Hadding U. Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA. *Gene.* 1996;171:83-87.

Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69:527-543.

Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:749-795.

Kube M, Mitrovic J, Duduk B, Rubus R, Seemüller E. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *TheScientificWorldJournal.* 2012;2012:185942.

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

Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-end alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9:357-359.

Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:1153-1169.

Lee, IM, Shao J, Bottner-Parker KD, Gundersen-Rindal DE, Zhao Y, Davis RE. Draft genome sequence of "*Candidatus Phytoplasma pruni*" strain CX, a plant-pathogenic bacterium. *Genome Announc.* 2015;3:e01117-15.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25:2078-2079.

Liu J, Zuber P. The ClpX protein of *Bacillus subtilis* indirectly influences RNA polymerase holoenzyme composition and directly stimulates sigma-dependent transcription. *Mol Microbiol*. 2000;37:885-897.

Liu X, Brutlag DL, Lin JS. BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac Symp Biocomput*. 2001;6:127-138.

Loewen PC, Hengge-Aronis R. The role of σ^S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol*. 1994;21:887-893.

Maejima K, Oshima K, Namba S. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol*. 2014;80:210-221.

Makarova O, MacLean AM, Nicolaisen M. Phytoplasma adapt to the diverse environments of their plant and insect hosts by altering gene expression. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2015;91:81-87.

Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 2011;17:10-12.

Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, Osler R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57:2037-2051.

Mastrorunzio JE, Kurscheid S, Fikrig E. Post-genomic analyses reveal development of infectious *Anaplasma phagocytophilum* during transmission from ticks to mice. *J Bacteriol.* 2012;194:2238-2247.

Mendoza-Vargas A, Olvera L, Olvera M, Grande R, Vega-Alvarado L, Taboada B, Jimenez-Jacinto V, Salgado H, Juárez K, Contreras-Moreira B, Huerta AM, Collad-Vides J, Morett E. Genome-wide identification of transcription start site, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS ONE.* 2009;10:e7526.

Merrick M, Gibbins J, Toukdarian A. The nucleotide sequence of the sigma factor *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol Gen Genet.* 1987;210:323-330.

Merrick MJ. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). *Mol Microbiol.* 1993;10:903-909.

Mitchell JE, Zheng D, Busby SJ, Minchin SD. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:4689-4695.

Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Mölling K, Broecker F, Beyerlein P, Büttner C, Bertaccini A, Kube M. Generation and analysis of draft sequences of 'stolbur' phytoplasma from multiple displacement amplification templates. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2014;24:1-11.

Mittenhuber G. An inventory of gene encoding RNA polymerase sigma factor in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2002;4:77-91.

Moran NA. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell.* 2002;108:583-586.

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabashi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 2008;42:165-190.

Mpunami AA, Tymon A, Jones P, Dickinson MJ. Genetic diversity in the coconut lethal yellowing disease phytoplasmas of East Africa. *Plant Pathol.* 1999;48:109-114.

Müller M, Hopfner KP, Witte G. c-di-AMP recognition by *Staphylococcus aureus* PstA. *FEBS Lett.* 2015;589:45-51.

Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H, Tsuchizaki T. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 1993a;83:786-791.

Namba S, Oyaizu H, Kato S, Iwanami S, Tsuchizaki T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms. *Int J Syst Bacteriol*. 1993b;43:461-467.

Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*. 2006;313:236-238.

Neriya Y, Maejima K, Nijo T, Tomomitsu T, Yusa A, Himeno M, Netsu O, Hamamoto H, Oshima K, Namba S. Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;361:115-122.

Nishigawa H, Miyata S, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, Matsuda I, Tsuchizaki T, Namba S. *In planta* expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*. 2001;147:507-513.

Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M, Namba S. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology*. 2002a;148:1389-1396.

Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M, Namba S. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene*. 2002b;298:195-201.

Ogasawara N, Moriya S, Yoshikawa H. Structure and organization of rRNA operons in the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res*. 1983;11:6301-6318.

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

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jun HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet*. 2004;36:27-39.

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

Oshima K, Shiomi T, Kuboyama T, Sawayanagi T, Nishigawa H, Kakizawa S, Miyata S, Ugaki M, Namba S. Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. *Phytopathology*. 2001;17:10-12.

Otani H, Higo A, Nanamiya H, Horinouchi S, Ohnishi Y. An alternative sigma factor governs the principal sigma factor in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol*. 2013;87:1223-1236.

Pacifico D, Galetto L, Rashidi M, Abbà S, Palmano S, Firrao G, Bosco D, Marzachi C. Decreasing global transcript levels over time suggest that phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:2591-2602.

Quaglino F, Kube M, Jawhari M, Abou-Jawdah Y, Siewert C, Choueiri E, Sobh H, Casati P, Tedeschi R, Lova MM, Alma A, Bianco PA. ‘*Candidatus* Phytoplasma phoenicium’ associated with almond witches’-broom disease: from draft genome to genetic diversity among strain populations. *BMC Microbiol*. 2015;15:148.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29:24-26.

Rodrigue S, Brodeur J, Jacques PE, Gervais AL, Brzezinski R, Gaudreau L. Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays. *J Bacteriol*. 2007;189:1505-1513.

Rosenthal AZ, Kim Y, Gralla JD. Regulation of transcription by acetate in *Escherichia coli*: *in vivo* and *in vitro* comparisons. *Mol Microbiol*. 2008;68:907-917.

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

Sass AM, Van Acker H, Förstner KU, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vogel J, Coenye T. Genome-wide transcription start site profiling in biofilm-grown *Burkholderia cenocepacia* J2315. *BMC Genomics*. 2015;16:775.

Schlüter JP, Reinkensmeir J, Barnett MJ, Lang C, Krol E, Giegerich R, Long SR, Becker A. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics*. 2013;14:156.

Schmidtke C, Abendroth U, Brock J, Serrania J, Becker A, Bonas U. Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003626.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *2012;9:671-675*.

Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:6097-6100.

Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiß S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermüller J, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2010;464:250-255.

Siewert C, Luge T, Duduk B, Seemüller E, Büttner C, Sauer S, Kube M. Analysis of expressed genes of the bacterium ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ highlights key features of virulence and metabolism. *PLoS ONE*. 2014;9:e94391.

Stoll S, Feldhaar H, Gross R. Promoter characterization in the AT-rich genome of the oblique endosymbiont “*Candidatus Blochmannia floridanus*.” *J Bacteriol*. 2009;191:3747-3751.

Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*. 2011;43:880-891.

Strauss E. Phytoplasma research begins to bloom. *Science*. 2009;325:388-390.

Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M, Namba S. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:4252-4257.

Taboada B, Ciria R, Martinez-Guerrero CE, Merino E. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acid Res*. 2012;40:D627-D631.

Tan M, Gaal T, Gourse RL, Engel JN. Mutational analysis of the *Chlamydia trachomatis* rRNA P1 promoter defines four regions important for transcription *in vitro*. J Bacteriol. 1998;180:2359-2366.

Tatusov RL, Natale, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Gaplerin MY, Fedorova, ND, Koonin EV. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. Nucleic Acids Res. 2001;29:22-28.

Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acid Res. 2016;44:6614-6624.

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group. ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:1243-1255.

Torres-Puig S, Broto A, Querol E, Piñol J, Pich OQ. A novel sigma factor reveals a unique regulon controlling cell-specific recombination in *Mycoplasma genitalium*. Nucleic Acid Res. 2015;43:4923-4936.

Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb, KS. Comparative genome analysis of “*Candidatus Phytoplasma australiense*” (subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and “*Ca. Phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol.* 2008;190:3979-3991.

Tully JG, Bove JM, Laigret F, Whitcomb RF. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43:378-385.

van Helden J. Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3593-3596.

Vannucci F, Foster D, Gebhart C. Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC Genomics.* 2013;14:421.

Voskuil MI, Voepel K, Chambliss GH. The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1995;17:271-279.

Wang LF, Doi RH. Promoter switching during development and the termination site of the sigma 43 operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* 1987;207:114-119.

Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*. 2009;136:615-628.

Weber SdeS, Sant'Anna, FH, Schrank IS. Unveiling *Mycoplasma hyopneumoniae* promoters: sequence definition and genomic distribution. *DNA Res*. 2012;19:103-115.

Wei W, Davis RE, Jomantiene R, Zhao Y. Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:11827-11832.

Weintraub PG, Beanland L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol*. 2006;51:91-111.

Wilson C, Dombroski AJ. Region 1 of σ^{70} is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol*. 1997;267:60-74.

Wösten MMSM. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*. 1998;22:127-150.

Wösten MMSM, Boeve M, Koot MG, van Nuenen AC, van der Zeijst BA. Identification of *Campylobacter jejuni* promoter sequences. *J Bacteriol*. 1998;180:594-599.

Young RA, Steitz JA. Tandem promoters direct *E. coli* ribosomal RNA synthesis. *Cell*. 1979;17:225-234.

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

Zao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X, Davis RE. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59:2582-2593.

石家達爾、土居養二、與良清、明日山秀文. クワ萎縮病の病徴発現に及ぼすテトラサイクリン系抗生物質の影響. *日植病報.* 1967;33:267-275.

奥田誠一. 我が国に発生するマイコプラズマ病. *植物防疫.* 1972;26:180-183.

岸国平. 植物病理学におけるルーペの世界. *日植病報.* 1987;53:275-278.

小森昇. 茨城県におけるイネ黄萎病の発生と防除. *植物防疫.* 1966;20:285-288.

鮫島徳造. 宮崎県におけるイネ黄萎病の発生と防除. *植物防疫.* 1967;21:47-50.

塩見敏樹、田中穰、澤柳利実、山本伸一、土崎常雄、難波成任. 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. *日植病報.* 1998;64:501-505.

下山守人、柴本精. 長野県におけるイネ黄萎病の発生と防除. 植物防疫. 1966;20:289-292.

新海昭. 甘藷天狗巣病のクロマダラヨコバイによる媒介. 植物防疫. 1964;18:259-262.

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

仲盛憲一、真栄里豊一. 沖縄におけるサツマイモてんぐ巣病の防除とその効果. 植物防疫. 1968;22:19-24.