

1. *tengu* 遺伝子の保存性の解析

1.1. 序文

ファイトプラズマ属は、約 30 の種を含む多様な細菌群である。ファイトプラズマ属細菌は、植物に葉化や緑化、てんぐ巢症状など、形態異常を伴う病徴を引き起こすことが知られており、その病徴の詳細は病原となるファイトプラズマの種類によって異なることがある。たとえば Saccardo らは、*Ca. P. pruni* の 4 系統 (JR1p, MA1p, MW1p, VACp) がニチニチソウにおいて、それぞれ緑化、葉化、植物の衰弱、萎縮叢生および葉の小型化を最も顕著に引き起こすことを報告しているが (Saccardo et al. 2012)、このようなファイトプラズマの病原性の違いが、どのような要因によるものであるのかは未だ不明である。

近年、一部のファイトプラズマ系統において、ゲノム配列の解読が進んだことをきっかけに病原性機構の解明が進み、TENGU や SAP11, SAP54 などのファイトプラズマの「分泌タンパク質」群が、病徴の誘導などの病原性に関与することが示されている (Hoshi et al. 2009; MacLean et al. 2011; Sugio et al. 2011a)。このように一部のファイトプラズマ系統において病徴誘導機構の一端が明らかにされたことで、病徴誘導機構がファイトプラズマ系統間でどの程度保存されているのかを解析する事が可能になりつつある。

そこで、本章では植物にてんぐ巢症状を誘導する分泌タンパク質 TENGU がファイトプラズマ系統間で保存された病徴誘導因子であるかを解析した。まず、多数のファイトプラズマ系統を収集し、*tengu* 相同遺伝子の単離を試みた。また、単離された *tengu* 相同遺伝子が形態異常誘導活性をもつタンパク質をコードするかを、ウイルスベクターを用いた一過的発現系で確認することで、TENGU がファイトプラズマにおいて保存された病原性因子であるかを調べた。さらに、*tengu* 相同遺伝子の配列を比較し、ファイトプラズマ属における *tengu* 遺伝子の進化について考察した。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 供試ファイトプラズマ系統

本研究で使用したファイトプラズマ系統は表 2.1 の通りである。

表2.1 本研究で用いたファイトプラズマ系統

系統名	略号	GenBank Acc.
Onion yellows phytoplasma line M	OY-M	AP006628, PAM_r001
Onion yellows phytoplasma line W	OY-W	D12569
Paulownia witches' broom phytoplasma	PaWB	AF279271
Sumac witches' broom phytoplasma	SWB	AB693125
Bamboo witches' broom phytoplasma	BWB	AY792328
Garlic yellows phytoplasma	GY	AB750363
Water dropwort witches' broom phytoplasma	WDWB	AB078436
Mulberry dwarf phytoplasma	MD	FJ844442
Porcelain vine witches' broom phytoplasma	PvWB	AB693126
Clover phyllody phytoplasma	KV	X83870
Potato purple top phytoplasma	PPT	AF217247
Apricot chlorotic leafroll phytoplasma	ACLR	X68338
Aster yellows phytoplasma strainwitches' broom	AY-WB	CP000061, AYWB_r01
Australian grape-vine yellows phytoplasma	PAa	AM422018
Apple proliferation phytoplasma	AP	CU469464

本研究で用いたファイトプラズマ系統と、その16SrDNA配列のGenBank Accession を示す。

1.2.2. 植物の育成方法

OY ファイトプラズマは宿主植物にシュンギク (*Chrysanthemum coronarium*) および媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) を用いて維持した。これらの植物および昆虫はいずれも 23°C に保たれた温室において育成した。

tengu 相同遺伝子の機能解析には、*N. benthamiana* を用いた。*N. benthamiana* は実験期間を通じて 25°C・明条件 15 時間、20°C・暗条件 9 時間に設定した人工気象室において育成した。

1.2.3. TENGU 相同遺伝子の単離

各ファイトプラズマ系統からの *tengu* 相同遺伝子の単離は、感染植物から抽出した全 DNA を鋳型とする、PCR 反応により行った。PCR プライマーは 485F、486R を用いた (表 2.2)。これらは OY-M ファイトプラズマのゲノムにおいて *tengu* 遺伝子上流 (PAM485) および下流 (PAM486) の遺伝子と相補的なプライマーである。PCR 反応産物は、0.7%アガロースゲル上で電気泳動したのち UV ライト照射下で増幅の有無を確認した。遺伝子増幅が認められた場合には、ダイレクトシーケンスを行い、増幅産物の配列をシーケンサーにより解析した。

表2.2 第2章で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'-3')
ACLR-F	ACGC GTC GAC ATG GAC CAA GAT GAT GAT ATT GAA AAC GTG ATA ACT C
ACLR-R	TGA CCC GGG TTA GGC ATC TTT CTC GCC CTT TTG CAA TAA ATC TTC ACA
AY-F	ACGC GTC GAC ATG GAC CAA GAT GAT GAT ATT GAA AAC GTG ATA ACT CTA ACA GAA ACC AAA GAG AAT CAA ACA GAA G
AY-R	TGA CCC GGG TTA GGC ATC TTT CTC GCC CTT TTG CAA TAA ATC TTG ACA TTG CAT TTT TAT TTC TTC TGT TTG ATT CTC TTT GG
PPT-F	ACGC GTC GAC ATG GAC CAA GAT GAT GAT ATT GAA AAC ATG ATA ACT C
PPT-R	TGA CCC GGG TTA GGC ATC TTT CTC GCC CTT TTG CAA TAA ATC TTG ACA
PAM485F	GAA CCG GAA CCA CCT GAA GGA G
PAM486R	CAG CAT TTA TTC CAA GTG CTT TTG C

本章で用いたプライマーの名称とその配列を示した。太字は制限酵素認識配列を示す。

1.2.4. 遺伝子の系統解析

ファイトプラズマの 16S ribosomal DNA 遺伝子の系統樹は、*Acholeplasma laidlawii* の 16S ribosomal DNA 遺伝子を外群とし、近隣結合法に基づき作成した。系統樹の作成には MEGA version3.1 ソフトウェアを用いた。ORF の相同性検索は BLAST を用いて行い、配列のアライメントは Clustal W ソフトウェアを用いた。膜貫通ドメインの予測は SOSUI プログラム ver. 1.11 を、シグナル配列の予測には SignalP プログラム ver 3.0 を用いた。

1.2.5. ウイルスベクターを用いた一過的発現

Nicotiana benthamiana における外来遺伝子の一過的発現は、ジャガイモ X ウイルス (potato virus X: PVX) を利用したウイルスベクターを用いて行った (図 2.1)。PVX は約 6kb のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つ植物ウイルスであり、ゲノム RNA 上に 5' 末端側から順に複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase: RdRp)、移行タンパク質であるトリプルジーンブロックタンパク質 (triple gene block protein 1, 2, 3: TGBp1, 2, 3)、外皮タンパク質 (coat protein: CP) をコードしている。本研究で用いたウイルスベクターは、University of Cambridge の D. C. Baulcombe 博士より分譲いただいたベクター pPVX201 をもとに作成されたものである。pPVX201 ベクターは、イギリスにおいて単離された PVX (UK3 分離株) を基に作成された感染性 cDNA クローンであり、ウイルスゲノム上の TGBp3 をコードする ORF と CP をコードする ORF との間に、プロモーター配列とマルチクロニングサイトが挿入されている。このため、pPVX201 のマルチクロニングサイトに外来遺伝子を導入して植物に接種すると、ウイルスの感染・増殖に伴って外来遺伝子を発現させる事ができる。

本研究では、pPVX201 の CaMV35S プロモーター及び PVX ゲノム cDNA 配列を、バイナリーベクター pCAMBIA1301 の T-DNA 領域に挿入して得られたウイルスベクター pCAMV を用いた (図 2.2)。



図2.1 ジャガイモXウイルス(potato virus X: PVX)ゲノムの模式図

RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
 TGB1, -2, -3: Triple gene block 1, -2, -3
 CP: Coat protein

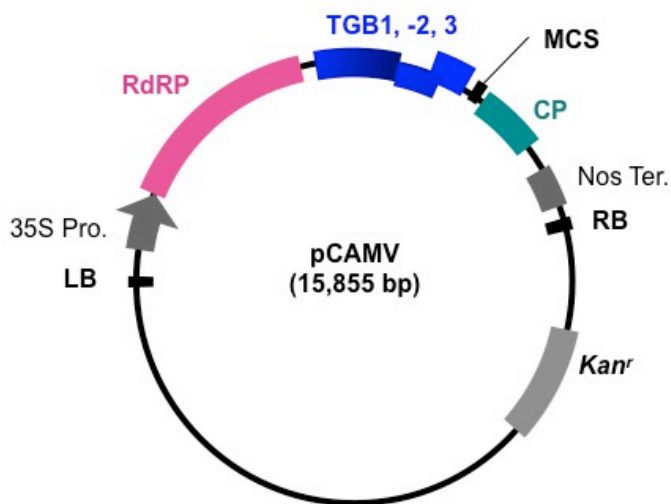


図2.2 pCAMVベクターの模式図

LB: T-DNA領域 Left border
 35S Pro.: CaMV 35Sプロモーター
 RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
 TGB: Triple gene block
 MCS: マルチクローニングサイト
 CP: Coat protein
 Nos Ter.: Nosターミネーター
 RB: T-DNA領域 Right border
 Kan: カナマイシン耐性遺伝子

1.2.6. ベクター構築

ACLR, PPT, AYWB の各系統のゲノムにコードされる TENGU 相同遺伝子産物の分泌領域を植物内で一過的に発現するベクター、pCAMV-ACLRtengu, pCAMV-PPTtengu, pCAMV-AYWBtengu は以下のように作出した。まず、ACLR 系統および PPT 系統の、感染植物の全 DNA を鋳型にし、TENGU 成熟タンパク質をコードする配列を PCR 反応によって増幅した。プライマーは ACLR-F, ACLR-R, PPT-F, PPT-R を用いた (表 2.2)。PCR 増幅断片を pCAMV ベクターの *Sa*I, *Sma*I サイト間に挿入し、pCAMV-ACLRtengu, pCAMV-PPTtengu を得た。AY-WB 系統の TENGU 相同遺伝子については、AY-WB 系統ファイトプラズマのゲノム DNA の入手が困難だったことから、公開されている配列情報を基にプライマー AYP, AYR を設計し、PCR 反応によって *tengu* 分泌領域をコードする遺伝子断片を作出した。得られた遺伝子断片を pCAMV ベクターの *Sa*I, *Sma*I サイト間に挿入して pCAMV-AYWBtengu を得た (図 2.3)

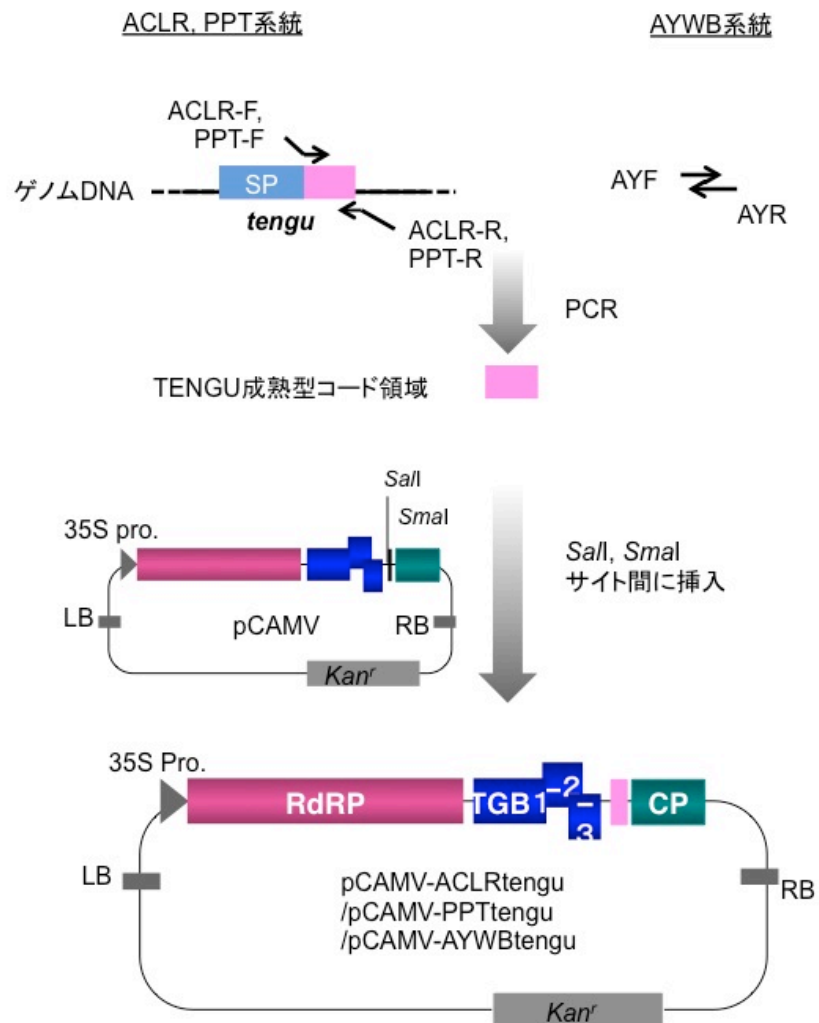


図2.3 TENGU相同遺伝子産物発現ウイルスベクターの構築
 ACLR系統、PPT系統ファイトプラズマの*tengu*遺伝子断片は、感染植物のDNAを鋳型としたPCR反応によって、AYWB系統ファイトプラズマの*tengu*遺伝子断片は末端が相補的なプライマーセットを用いたPCR反応によってそれぞれ増幅した。この遺伝子断片末端ををSalI, SmaIで処理し、それぞれをSalI, SmaI処理によって線形化したpCAMVベクター(図2.2)に導入してpCAMV-ACLR*tengu*, pCAMV-PPT*tengu*あるいはpCAMV-AYWB*tengu*を得た。

1.2.7. アグロインフィルトレーション法

アグロインフィルトレーション法(Johansen & Carrington, 2001)は植物細胞内で一過的に遺伝子を発現させる方法である。アグロインフィルトレーション法では、Ti プラスミドに由来するバイナリーベクターの T-DNA 領域に外来遺伝子をクローニングし、これを導入したアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)の培養液を植物組織の細胞間隙に注入する。これによりバイナリーベクター上の外来遺伝子は植物細胞核へと移行し、一過的に発現する。外来遺伝子としてウイルスの感染性 cDNA クローンを導入すると、ウイルスの cDNA がアグロバクテリウムの働きで植物のゲノム中に組み込まれてウイルス感染性 RNA が転写されるため、宿主植物においては高い確率でウイルス感染がおこる。本研究では、アグロインフィルトレーション法をウイルスベクター-pCAMV の接種に用いた。

1.2.7.1. アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウムのコンピテントセルは以下の手順に従って作成した。アグロバクテリウム (EHA105 菌株) のグリセロールストックを 28°C、2xYT 液体培地中で OD₆₀₀=0.5 になるまで培養し、集菌した。沈殿に 5 mL 20mM CaCl₂を加え激しく攪拌した後、再び 3000×g で 5 分間遠心分離した。沈殿した菌体を 500 μL 20mM CaCl₂に溶解し、コンピテントセルストックとした。

アグロバクテリウムの形質転換は、freeze-thaw 法で行った。アグロバクテリウムコンピテントセル 10 μl に形質転換するベクターを少量 (1 μl 程度) 混合し、液体窒素により 1 分間急冷した後 100 μl SOC 培地を加えて 28°C で 3 時間振盪培養した。培養液を、カナマイシンを加えた LB 固形培地に塗布し、28°C で 48 時間静置培養した。

1.2.7.2. アグロインフィルトレーション法

LB 固形培地から抗生物質耐性を示したアグロバクテリウムのシングルコロニーを選抜し、5 ml の 2×YT 液体培地中で 16 時間振盪培養した。3,000 ×g、5 分間遠心分離によりアグロバクテリウムを集菌し、インフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH5.7), 150 μM アセトシリルゴン)に OD₆₀₀=1.0 となるよう懸濁した。懸濁液を遮光して室温において 3 時間静置したのち、針のついていない 1 ml シリンジを用いて *N. benthamiana* の展開葉の背軸側から注入した。

1.3. 結果

1.3.1. *tengu* 相同遺伝子の単離

tengu 遺伝子がファイトプラズマ系統間で保存されているか、相同性遺伝子の探索を行った。まずは *Ca. Phytoplasma* のうち、OY-M 系統以外のゲノム情報が解読されている AYWB 系統、PAa 系統、AT 系統の 3 系統について BLASTX による相同性検索を行った (Bai et al. 2006; Kube et al. 2008; Tran-Nguyen et al. 2008)。OY-M 系統における *tengu* 遺伝子の全長をクエリー配列とし、BLASTx による相同性検索を行ったところ、AYWB 系統の ORF (AYWB_168) が相同性を示した。AT 系統および PAa 系統のゲノム上には *tengu* 遺伝子と類似の配列は存在しなかった (図 2.4)。また、近年ゲノムのドラフト配列が報告されたファイトプラズマ 5 系統においても、*tengu* の相同遺伝子は確認されなかった。

ゲノム解読が終了していない系統については、各系統の感染植物から抽出した DNA を鋳型とし、*tengu* 遺伝子の前後の遺伝子を認識するプライマーを用いた PCR 反応によって *tengu* 遺伝子の単離を試みた。供試したファイトプラズマ系統で *tengu* 周辺の遺伝子構造が保存されている場合には、この PCR 反応によって、*tengu* 遺伝子を含む DNA 断片が増幅される。多様なファイトプラズマ系統について PCR 反応を行った結果、OY, AYWB 系統と同じ AY グループに属する 11 系統において、増幅が認められた (図 2.5)。各増幅断片のシーケンス解析を行って、各 *tengu* 相同遺伝子の配列を解読し、その遺伝子産物のアミノ酸配列のアラインメント作成した (図 2.6)。Signal P および SOSUI プログラムによる予測を行った結果、全ての TENGU 相同遺伝子産物は N 末端に一つの膜貫通領域を含む、32 アミノ酸からなるシグナル配列をもち、38 アミノ酸からなる領域が分泌されると考えられた。

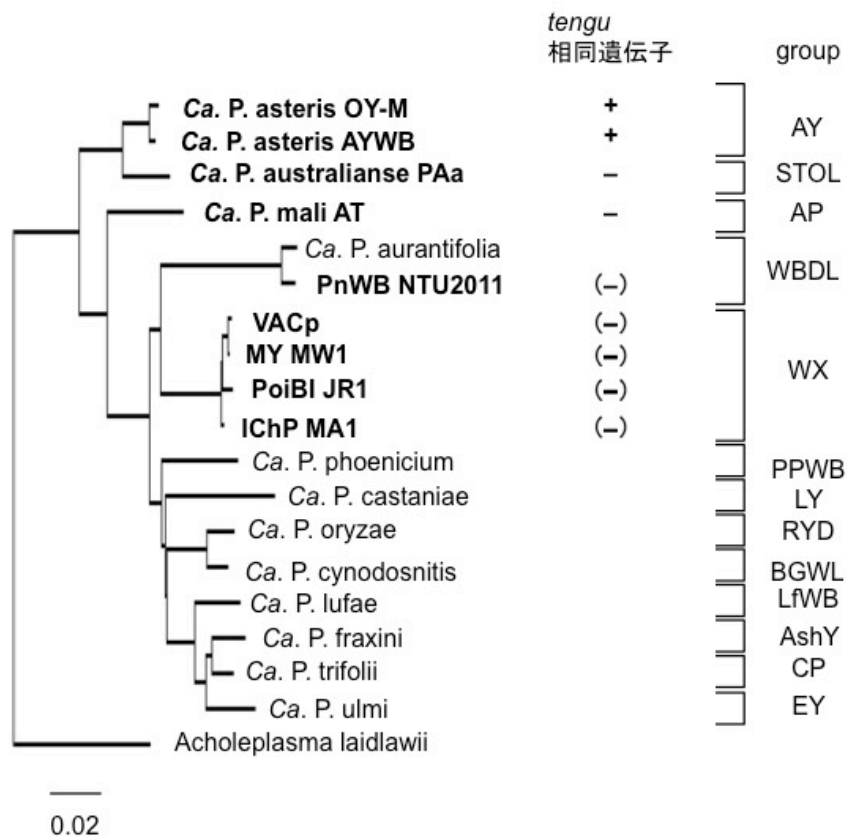


図2.4 *tengu*相同遺伝子の有無

ゲノムの全配列あるいはドラフト配列情報が公開されているファイトプラズマ系統における*tengu*相同遺伝子の有無を＋で示した。全ゲノム解読が終了しておらず、遺伝子を保持しない事が明確でない場合には、(－)で示した。左には、ファイトプラズマの各グループに代表的な暫定種と、ゲノム解読が行われている9つのファイトプラズマ系統の系統関係を、16SrDNA配列に基づく系統樹で示した。

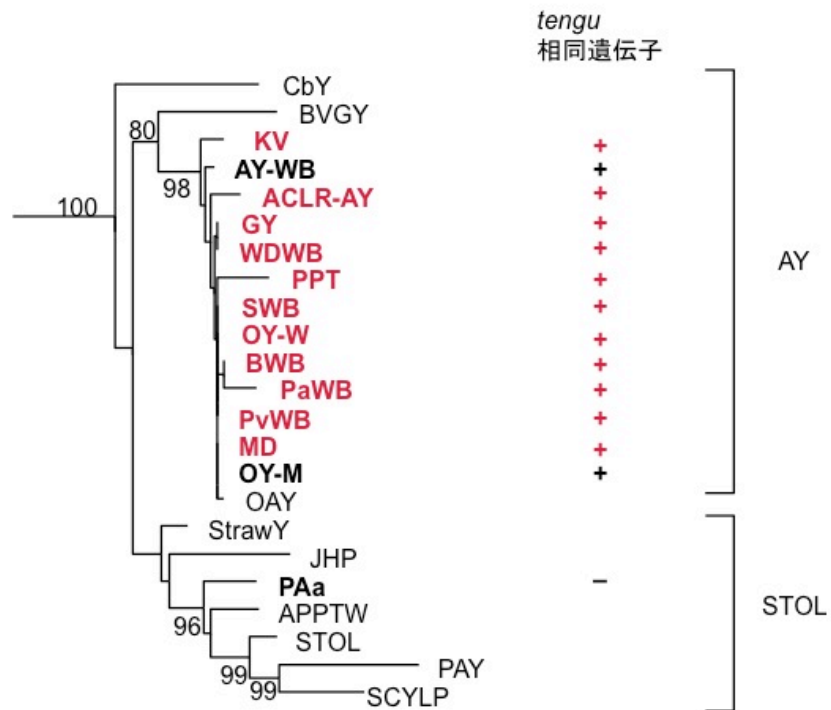


図2.5 AYグループのファイトプラズマにおけるtengu相同遺伝子の有無
 AYグループのファイトプラズマ系統11系統におけるtengu相同遺伝子の有無。PCRによりtengu相同遺伝子を含む断片が増幅された系統は+で示した。赤字は供試系統を示す。黒太字はゲノム配列からtengu相同遺伝子の有無が明らかになっている系統を示す。
 左には、各ファイトプラズマの系統関係を、16Sリボソーム遺伝子配列に基づく系統樹で示した。

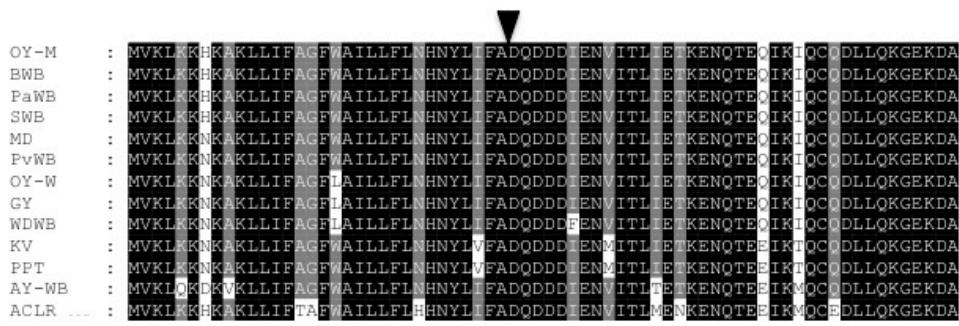


図2.6 TENGU相同遺伝子産物のアミノ酸配列のアラインメント
 AYグループの各ファイトプラズマ系統がコードするTENGU相同遺伝子産物のアミノ酸配列を示す。下部の黒線は膜貫通領域を、上部の矢頭はシグナル配列の切断部位をそれぞれ示す。

1.3.2. *tengu* 相同遺伝子における機能の保存性

tengu 相同遺伝子が単離された系統のうち、AYWB, PPT, ACLR, KV の 4 系統においては分泌される機能領域部分にアミノ酸配列の多型が認められた事から (図 2.7A)、これらの相同遺伝子の産物が保存された機能を有しているかどうかを、ウイルスベクターを用いた一過的発現により解析した。なお、PPT 系統と KV 系統のコードする TENGU 相同遺伝子産物は、成熟型タンパク質部分のアミノ酸配列が同一である事から、以降の実験は PPT 系統のみについて行った。AYWB, PPT, ACLR 系統における TENGU 相同遺伝子産物の成熟型タンパク質を発現するウイルスベクターを構築し、*N. benthamiana* に接種したところ、いずれの場合も TENGU 成熟型タンパク質を発現させた場合と同様の萎縮・叢生症状を誘導した (図 2.7B)。このことから TENGU 相同遺伝子産物は、いずれも形態異常誘導の機能を持つことが示された。

A.

```
OY-M  DQDDDIENVITLIETKENQTEQIKIQCDLLQKGEKDA
AYWB  .....T.....E..M.....
ACLR  .....M.N.....E..M..E.....
PPT, KV .....M.....E..T.....
```

B.

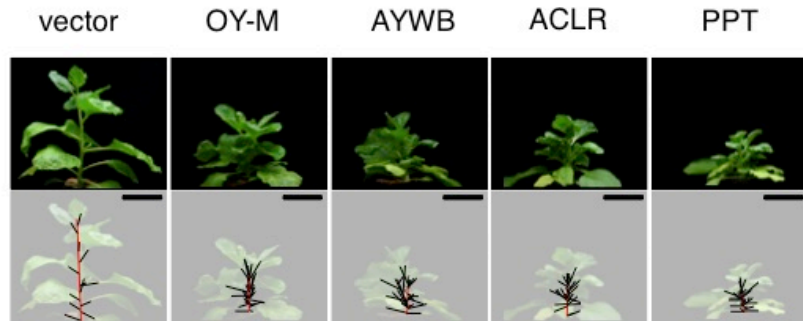


図2.7 TENGU相同遺伝子産物の形態異常誘導能

- A. TENGU相同遺伝子産物の成熟型タンパク質に認められるアミノ酸多型。OY-MのTENGUと同じアミノ酸をドットで示した。
- B. 各相同遺伝子産物を発現するウイルスベクターを接種した*N. benthamiana*。写真は全て接種21日後に撮影した。下のパネルは赤で主茎と腋芽を、黒で葉柄を示している。

1.4. 考察

1.4.1. ファイトプラズマにおける病徴誘導機構の保存性

本章では、*tengu* 相同遺伝子の単離を試み、その結果、AY グループのファイトプラズマについては、供試した 11 系統のすべてから *tengu* 相同遺伝子が単離された。ウイルスベクターを用いた一過的発現実験により AY グループのファイトプラズマの *tengu* 相同遺伝子は、全て形態異常誘導能を有する機能的なオーソログであることが示された。一方、AY グループに属さないファイトプラズマ系統については、全塩基配列が解読された *Ca. P. mali* AT 系統および *Ca. P. australiense* PAa 系統のゲノム上には *tengu* 相同遺伝子は存在せず、近年ゲノムのドラフトシーケンスが解読された 5 系統のファイトプラズマにおいても *tengu* 相同遺伝子は見いだされなかった。また、その他のゲノム配列が明らかでない系統についても、*tengu* 相同遺伝子の単離は成功しなかった。すなわち TENGU は AY グループのファイトプラズマにおいては保存された病原性因子であると考えられたものの、ファイトプラズマ属全般に必須のものではないことが明らかになった。

また TENGU を保持しない、AT, Vacp, JR1p 系統のファイトプラズマは、それぞれリンゴ、ニチニチソウ、ポインセチアにてんぐ巣症状を誘導することが知られている(Jarausch et al. 1996; Neriya et al. 2011; Saccardo et al. 2012)。これらのファイトプラズマ系統は TENGU によらないメカニズムで、てんぐ巣症状を引き起こしていると考えられる。これまでに実験的に機能が解析されたファイトプラズマの分泌タンパク質のうち、SAP11 はシロイヌナズナにおいて萎縮叢生症状を引き起こすことが報告されている(図 1.10)。上記の 3 つのファイトプラズマは、配列類似性は高くないものの SAP11 の相同遺伝子を保持しており AT, Vacp, JR1p 系統ファイトプラズマによるてんぐ巣症状には、SAP11 が関与している可能性が考えられる。

1.4.2. TENGU の由来

これまでに 9 つのファイトプラズマ系統について、ゲノム配列の概要が明らかにされており、ファイトプラズマ属全体で、350 を超える分泌タンパク質遺伝子を持っている事が明らかになっている。Saccard らは、ゲノムが解析されたファイトプラズマの各系統について、形態異常誘導能を持つ 3 つの分泌タンパク質の有無を比較している(Saccardo et al. 2012)(図 2.8)。

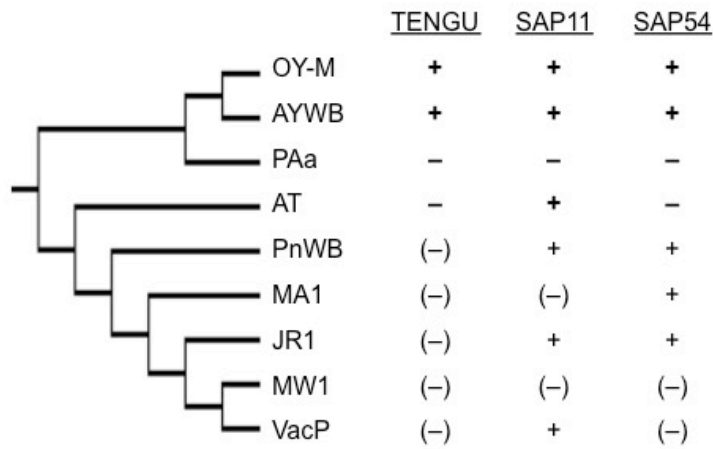
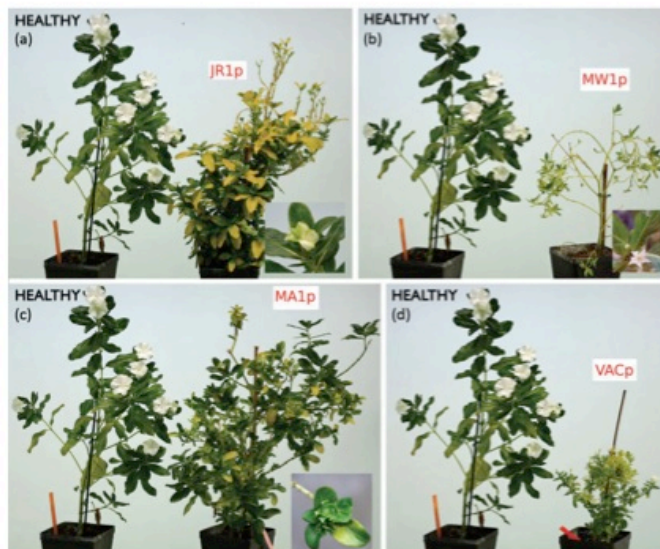


図2.8 ファイトプラズマ属における病原性因子の保存性

ゲノムの全配列あるいはドラフト配列が公開されている9つのファイトプラズマ系統について、既報の病原性因子を保持しているかどうかを+,-で示した。全配列決定が終了しおらず、遺伝子を保持していないことが明確でない場合には(-)で示した。表の左には、各ファイトプラズマの系統関係をトポロジーのみで示した系統樹を記した。Saccardo et al.,2012, Chung et al., 2013 を基に自作



Saccardo et al. 2012より転載

図2.9 近縁な4つのファイトプラズマ系統がニチニチソウに引き起こす病徴

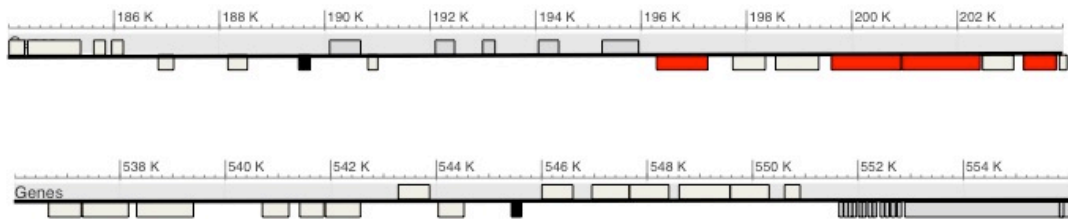
- a) Poinsettia branch inducing phytoplasma JR1系統
 - b) Milkweed witches'-broom phytoplasma MW1系統
 - c) Italian clover phyllody phytoplasma MA1系統
 - d) Vaccinium witches'-broom phytoplasma VAC系統
- いずれも左に健全ニチニチソウ、右に感染ニチニチソウの病徴を示す

その結果、形態異常を誘導する分泌タンパク質はいずれもファイトプラズマ属において完全に保存されていないこと、ファイトプラズマ系統により病原性因子の組み合わせが異なることが明らかになっている。Saccardo らは、特に緑化や葉化を引き起こす系統においてのみ葉化因子として知られている SAP54 の相同遺伝子が存在することを報告しており、このことはファイトプラズマ系統間の病原性因子の違いが、病徴の違いを説明しうる例として興味深い(図 2.9)。

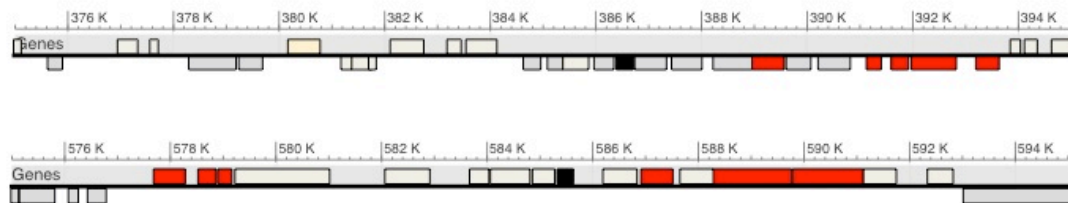
また、SAP11 と SAP54 の有無は、ファイトプラズマ系統の進化と一致していない。この原因として、ファイトプラズマ系統の共通祖先が SAP11 や SAP54 を保持していたものの、その後系統の分化に伴って一部のファイトプラズマ系統においてこれらの因子が失われた可能性、あるいは複数の系統が独立に SAP11 や SAP54 を獲得した可能性が考えられる。IChP 系統の SAP54 相同遺伝子は、近縁な JR1p 系統の SAP54 相同遺伝子よりも、遠縁な OY-M 系統や AYWB 系統のもつ SAP54 (相同) 遺伝子と高い配列一致性(それぞれ順に 79%, 93%, 86%)を示している。さらに、SAP54、SAP11、および OY-M 系統におけるそれぞれの相同遺伝子 (PAM049, PAM519) はいずれも重複遺伝子が集中している領域に存在している(Sugio et al. 2011b) (図 2.10)。これらの分泌タンパク質遺伝子は可塑的な周辺遺伝子領域に座乗していたために、ファイトプラズマ系統間で水平伝搬獲得したのかもしれない。

対照的に、*tengu* 遺伝子が存在する周辺領域には、重複遺伝子はコードされていない。*tengu* 遺伝子がゲノム上の安定的な領域に座乗していることは、*tengu* 遺伝子が AY グループの系統のみに存在する事と関係しているかもしれない。

A. TENGU



B. SAP11



C. SAP54

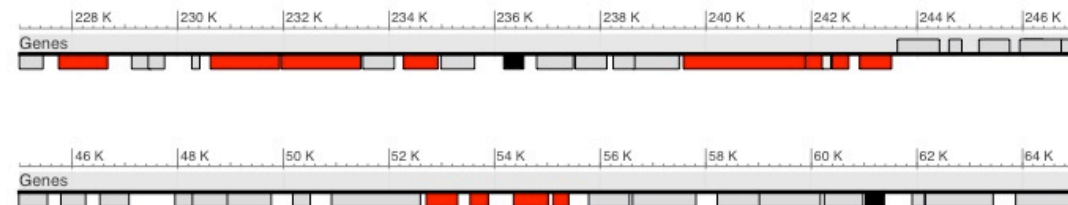


図2.10 以下の既知の病原性因子をコードする遺伝子周辺の遺伝子構成
 TENGU(A), SAP11(B), SAP54(C)をコードする遺伝子の、AYWB(上)における遺伝子構成とOY-M(下)における遺伝子構成を示す。
 黒線はゲノムDNAを示し、線の上側の四角はセンス鎖のORFを、下側の四角はアンチセンス鎖のORFをしめす。黒は病原性因子のORFを、赤は重複遺伝子のORFを示す。

2. TENGU の形態異常誘導能に関わる部分配列

2.1. 序文

ファイトプラズマの分泌タンパク質である TENGU は、植物に萎縮叢生症状を誘導する機能を持つ病原性因子であり、そのホモログタンパク質は、AY グループのファイトプラズマに保存されている。TENGU にはアミノ酸配列の類似性を示す既知のタンパク質はなく、モチーフなども見いだされないことから、その分子レベルでの機能や性状は明らかではない。

そこで、本章では TENGU の性状について知見を得ることを目的として解析を行った。まず TENGU 成熟型タンパク質を構成する 38 アミノ酸のうち、どの部分が機能に重要であるか、TENGU の部分配列を *N. benthamiana* 内で過剰発現させ、形態異常を誘導する部分を探索した。続いて TENGU が植物内でプロセッシングを受けるかどうか検証した。その結果、TENGU が植物側の因子によるプロセッシングを受けることが示唆されたため、そのプロセッシング機構の解析を行った。最後に、TENGU のアミノ酸置換体を作成し、プロセッシングの有無と、病徴誘導機効率の関連について解析を行った。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 植物の育成方法

シロイヌナズナ (*A. thaliana* エコタイプ Col-0) の栽培は明条件 16 時間、暗条件 8 時間、23 度恒温に保たれた人工気象室で行った。種子をバーミキュライト上に直播し、ハイポネックスを添加した水を与える方法で育成し、播種後 35 日の植物を実験に用いた。*N. benthamiana* の育成は第 2 章で述べた手法で行った。

2.2.2. ベクター構築

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase: GST) 融合タンパク質発現ベクター

TENGU 成熟型タンパク質の N 末端側に GST を融合した組換えタンパク質 GST-TENGU 作出のための大腸菌内発現ベクター pGEX-TENGU は、以下のように作出した (図 3.1)。まず、pCAMV-TENGU(Hoshi et al. 2009)を鋳型とし、プライマー pGEXtengu-F、pETtenguR(表 3.1)を用いた PCR により TENGU の成熟型タンパク質をコードする領域を増幅した。増幅した断片を、T7 プロモーター下流で N 末端に GST タンパク質を付加した融合タンパク質を発現する大腸菌発現ベクター、pGEX-4T-1 (GE Healthcare)の *Bam*HI, *Xho*I サイト間に挿入した。

続いて、TENGU 成熟型タンパク質遺伝子の C 末端側に GST 遺伝子を融合した DNA 断片を、リコンビナント PCR 法により作出した。まず TENGU 成熟型タンパク質をコードする DNA 断片および *gst* 遺伝子を、pCAMV-*tengu* および pGEX-4T-1 ベクターから PCR 反応によりそれぞれ増幅した。用いたプライマーはそれぞれ、pETTENGU-F, TENGU*gst*-R と *tengu*GST-F, GST*ecI*-R である。増幅した TENGU 遺伝子断片と GST 遺伝子断片を混合して鋳型とし、プライマーに pETTENGU-F, GST*ecI*-R を用いた PCR 反応を行って、融合タンパク質をコードする DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を大腸菌発現ベクター pET30a の *Nde*I, *Eco*RI サイト間に挿入し、発現ベクター pET-TENGU-GST を得た (図 3.2)。

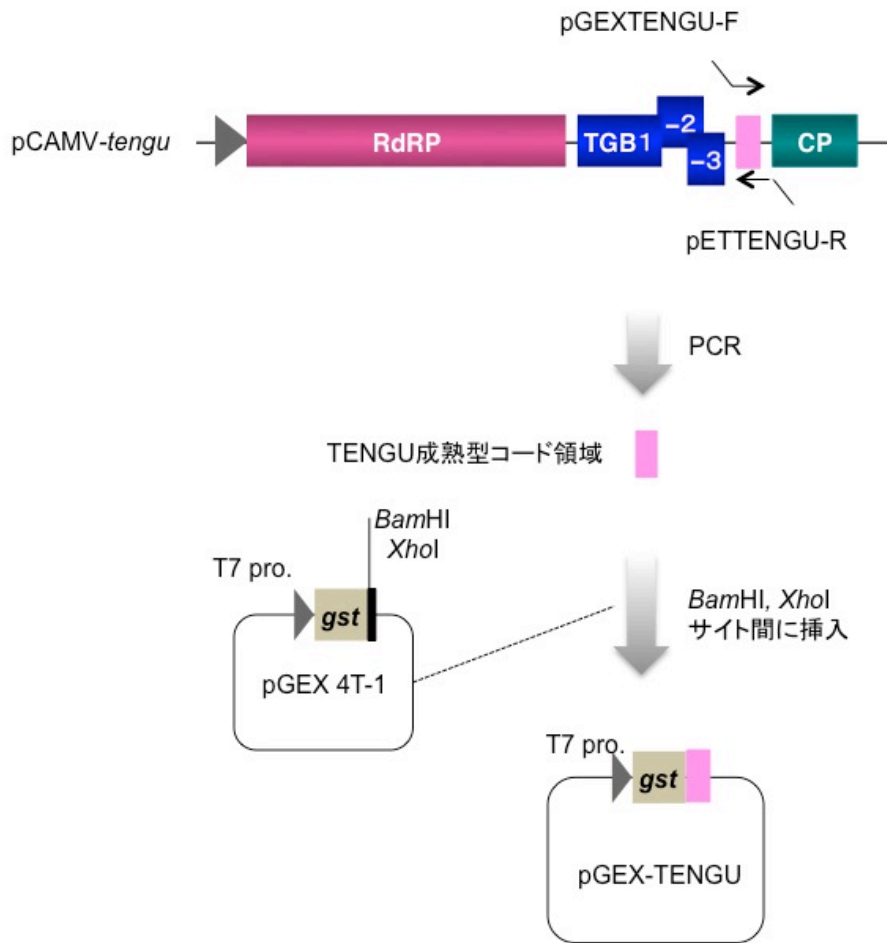


図3.1 GST-TENGU発現ベクターの構築

pCAMV-tenguベクターを鋳型とし、TENGU成熟型タンパク質をコードする遺伝子配列をPCR増幅し、pGEX-4T-1ベクターのGst遺伝子下流BamHI, XhoIサイト間に挿入してpGEX-TENGUベクターを得た。

表3.1 本章で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'-3')
N19-R	TGA CCC GGG TTA TTG ATT CTC TTT AGT TTC AAT TAG AGT TAT CAC GTT TTC AA
C19-F	ACG CGT CGA CAT GAC AGA ACA AAT AAA AAT ACA ATG TCA AGA TTT ATT GCA AAA GGG
N10-F	TCG CGT CGA CAT GGA CCA AGA TGA TGA TAT TGA AAA CGT
N10-R	TGA CCC GGG TTA TAT CAC GTT TTC AAT ATC ATC ATC TTG G
N8-F	ACG CGT CGA CAT GGA CCA AGA TGA TGA TAT TG
N8-R	TGA CCC GGG TTA GTT TTC AAT ATC ATC ATC TTG G
N1211-F	ACG CGT CGA CAT GGA CCA AGA TGA TGA TAT TGA AAA CGT GA
N12-R	TGA CCC GGG TTA TAG AGT TAT CAC GTT TTC AAT ATC ATC A
N11-R	TGA CCC GGG TTA TCA ATA GTG CAA AAG TTA TAG TAG TAG A
1213A-F	GGC ATA TGG ACC AAG ATG ATG ATA TTG AAA ACG TGA TAA CTG <i>CTG CTG</i> AAA C
pETart-F	AGA AGG AGA TAT ACA TAT <u>GGA CCA AGA TGA TGA TAT T</u>
pETart-R	TGT CGA CGG AGC TCG <u>CTA ATC CGA TTT TGG AGG ATG G</u>
tenguGST-F	<u>AAG GGC GAG AAG ATG CCA TGT CCC CTA TAC TAG GTT AT</u>
TENGUgst-R	ATA ACC TAG TAT AGG GGA CAT <u>GGC ATC TTC TCG CCC TT</u>
GSTecI-R	CGG AAT TCC TAA TCC GAT TTT GGA GGA TGG
PAM765-F	ACG CGT CGA CAT GGA CCA AGA TGA TGA TAT TGA AAA CGT GAT AAC TC
PAM765-R	TGA CCC GGG TTA GGC ATC TTT CTC GCC CTT TTG CAA TAA ATC TTG ACA
pGEXTENGU-	CGG GAT CCG ACC AAG ATG ATG ATA TTG AAA ACG
pETTENGU-R	TGAG CTCGAG GGCATCTTTCTCGCCCTTTTGCAATAAATCTTGACA
GST-F	ACG CGT CGA CAT GTC CCC TAT ACT AGG TTA TTG GAA
GST-R	GGA ATT CTT AGG ATC CAC GCG GAA CCA GA
GSTTENGU-R	GGA ATT CTT AGG CAT CTT TCT CGC CCT TTT GCA ATA AAT CTT GAC A

本章で用いたプライマー名称とその配列を示す。制限酵素サイトを太字で、pETart-F, pETart-R, tenguGST-F, TENGUgst-RではTENGU相補的な配列を下線で示した。1213A-Fでは変異を導入したコドンをイタリックで示した。

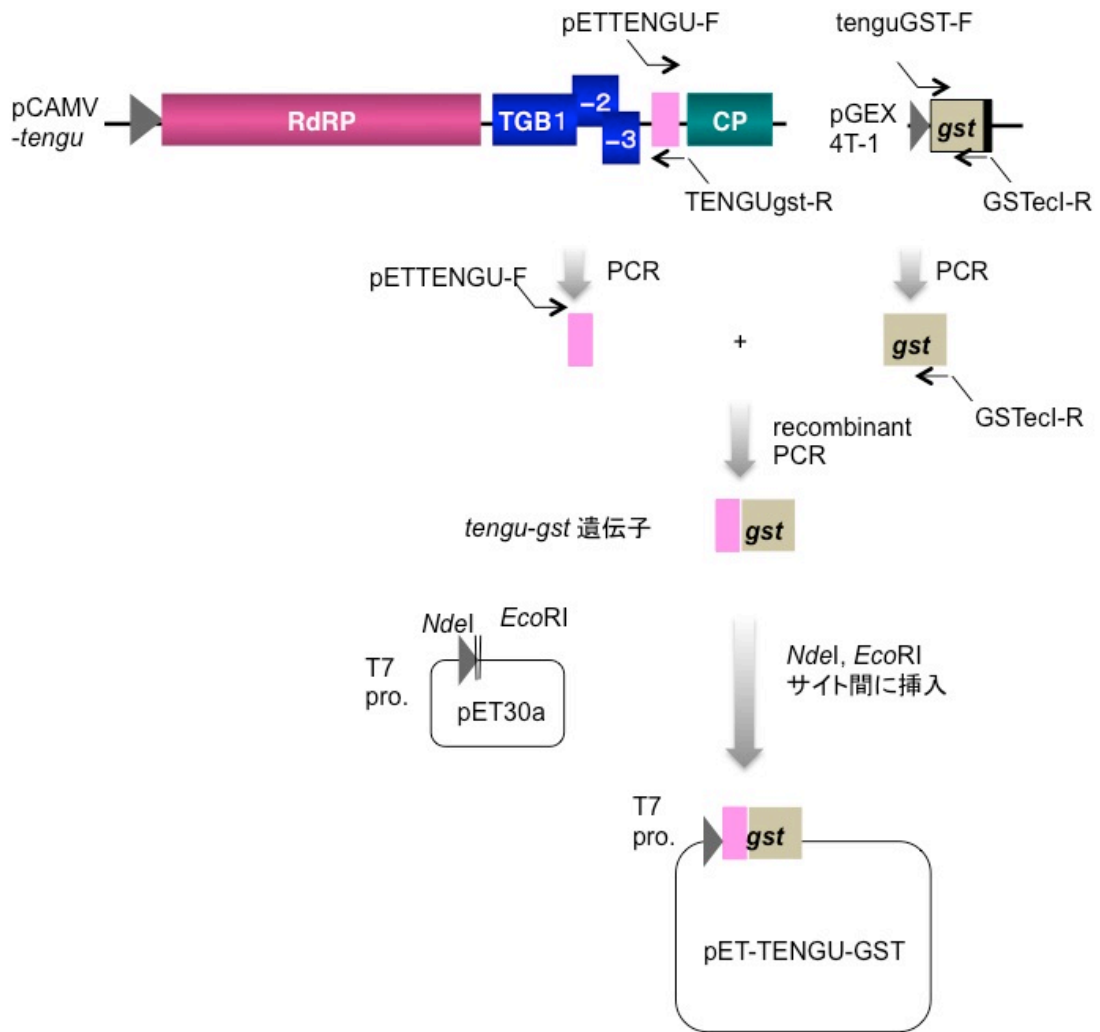


図3.2.TENGU-GST発現ベクターの構築

pCAMV-tenguベクターを鋳型としてTENGU成熟型コード配列を、pGEX4T-1ベクターを鋳型としてGST遺伝子をそれぞれPCR増幅し、リコンビナントPCR反応により両断片を融合してtengu-gst遺伝子断片を作出した。作出した断片をpET30aベクターのNdeIサイト・EcoRIサイト間に挿入してpET-TENGU-GSTベクターを得た。

TENGU 成熟型タンパク質の推定プロセッシング部位周辺（12、13 番目のアミノ酸）に変異を導入したタンパク質を発現するベクターを、以下の手法で構築した。pET-TENGU-GST を鋳型とし、フォワードプライマーに 12、13 番目のコドンのアラニン指定するコドンに置換した変異をもつプライマー、12AA13-F リバースプライマーに GSTec1-R を用いた PCR 反応を行って、目的の変異を導入した TENGU-GST 融合遺伝子断片を増幅した。増幅された遺伝子断片を精製し、pET30a ベクターの *Nde*I, *Eco*RI サイト間に挿入し、pET-12AA13GST を得た。

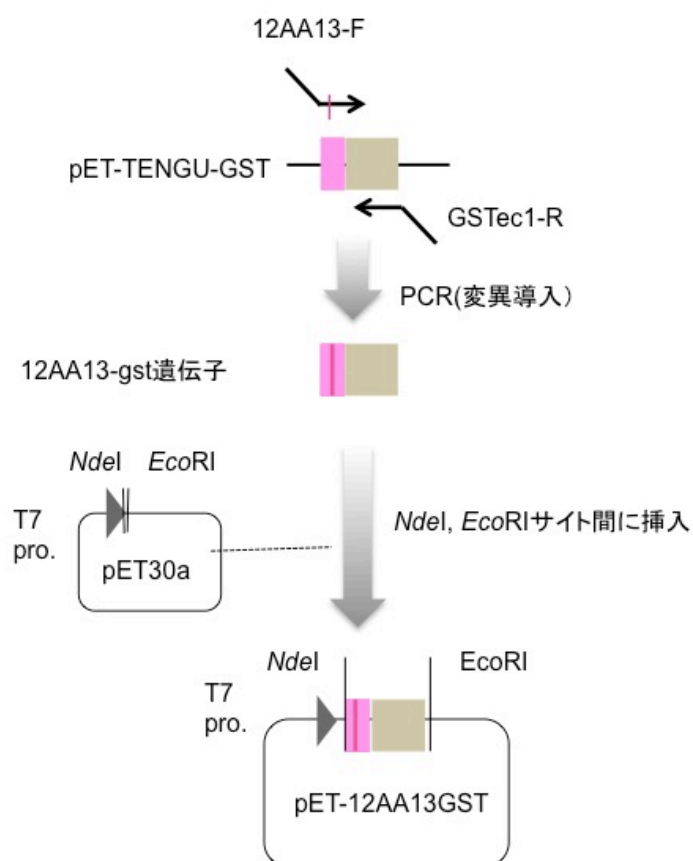


図3.3 GST融合TENGUアミノ酸置換変異体発現ベクターの構築

pET-TENGU-GST(図3.2)ベクターを鋳型とし、12AA13-F, GSTec1-RプライマーによるPCR反応により、変異を導入したtengu-gst(12AA13-gst)遺伝子断片を作成した。pET30aベクター*Nde*I, *Eco*RIサイトに挿入し、pET-12AA13GSTを得た。

ACLR 系統、AYWB 系統、PPT 系統のファイトプラズマがコードする TENGU 相同遺伝子産物を発現するベクターは、以下のように作出した (pET-ACLRGST, pET-AYWBGST, pET-PPTGST; 図 3.4)。まず、各ホモログタンパク質をコードするウイルスベクター (pCAMV-ACLRtengu, pCAMV-AYWBtengu, pCAMV-PPTtengu; 図 2.3) から、プライマー pETARTF, TENGUgst-R を用いて TENGU ホモログ断片を PCR 増幅し、tenguGST-F, pETART-R を用いて PCR 増幅した GST 遺伝子断片と混合して、リコンビナント PCR 反応により融合した。このとき、pETART-F, pETART-R プライマーには pET30a に相補的な配列を付加しておくことで、末端が pET30a ベクターと相補的な増幅産物を得た。この増幅産物を *NdeI* と *EcoRI* で切断・線状化した pET30a ベクターと混合し、GENEART (Life Technologies) 反応によるクローニングを行った。GENEART 反応は、メーカー推奨の条件で行った。

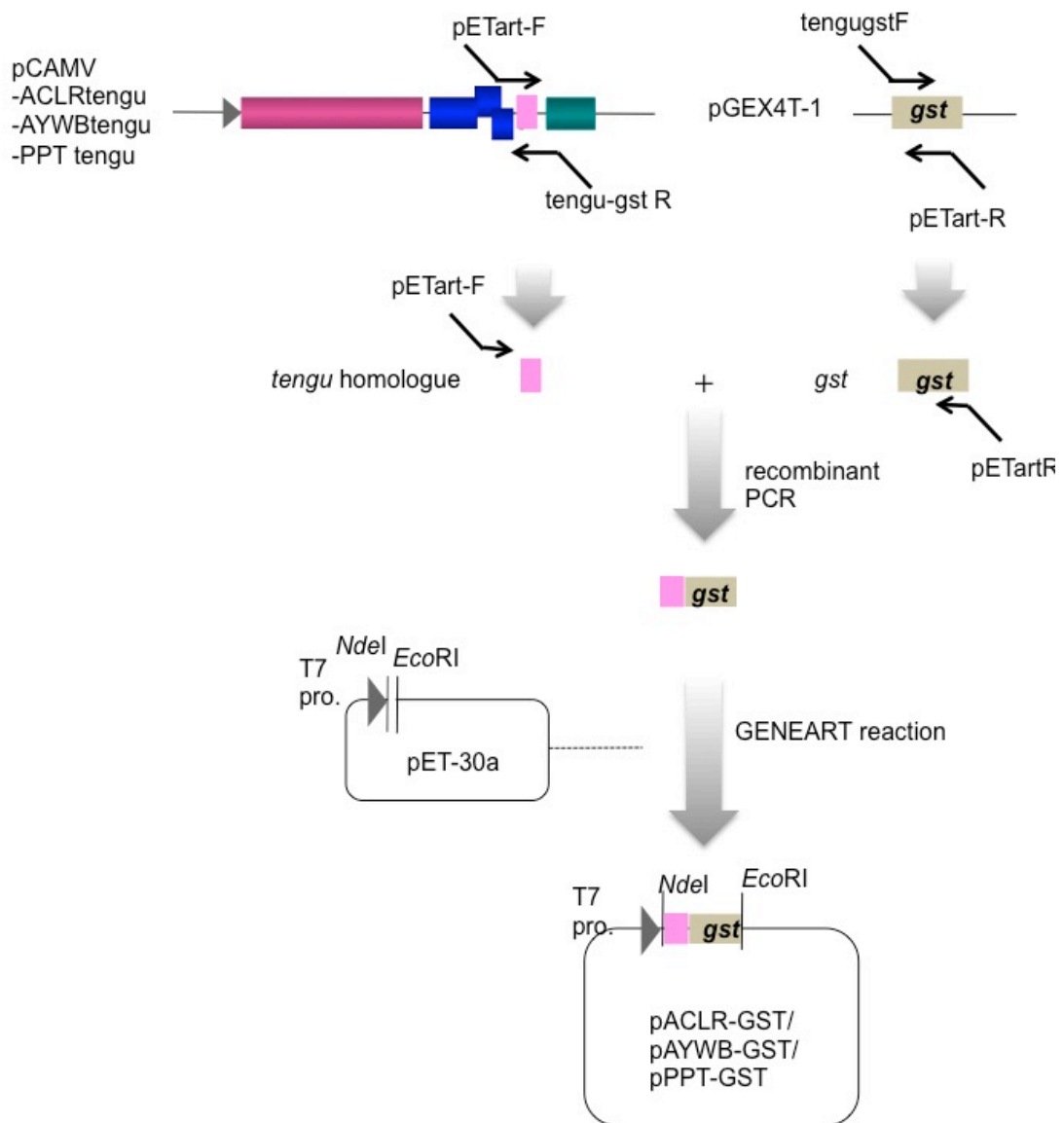


図3.4 GST融合TENGU相同遺伝子産物発現ベクターの構築

tengu相同遺伝子を、相同遺伝子発現ウイルスベクター(図2.3)を鋳型として増幅し、pGEX4T-1から増幅したgst遺伝子と融合した。得られた融合遺伝子をpET30-aベクターに挿入しpET-ACLRGST, pET-AYWBGST pET-PPTGSTを得た。

植物内発現ベクター

TENGU タンパク質が植物体内でプロセッシング可能性を検証するため、myc-GST-TENGU および対照として myc-GST を植物内で発現するベクターを構築した。まず GST 遺伝子あるいは GST-TENGU 融合タンパク質遺伝子を pGEX-4T-1 あるいは pGEX-TENGU から、それぞれプライマー GST-F と GST-R、あるいは GST-F と GSTTENGU-R を用いて PCR 増幅した。増幅産物を GATEWAY システムのドナーベクターである pENTR (Life Technologies) の *Sa*II, *Eco*RI サイト間に挿入した。得られたドナーベクターと、目的タンパク質の N-末端に myc 配列を付加するデスチネーションベクターである pEarleygate 203(Earley et al. 2006) の間で LR Clonase II Enzyme mix (Life Technologies) による LR 反応を行い、pEarleygate203-GST, pEarleygate203-GST-TENGU を作出した。

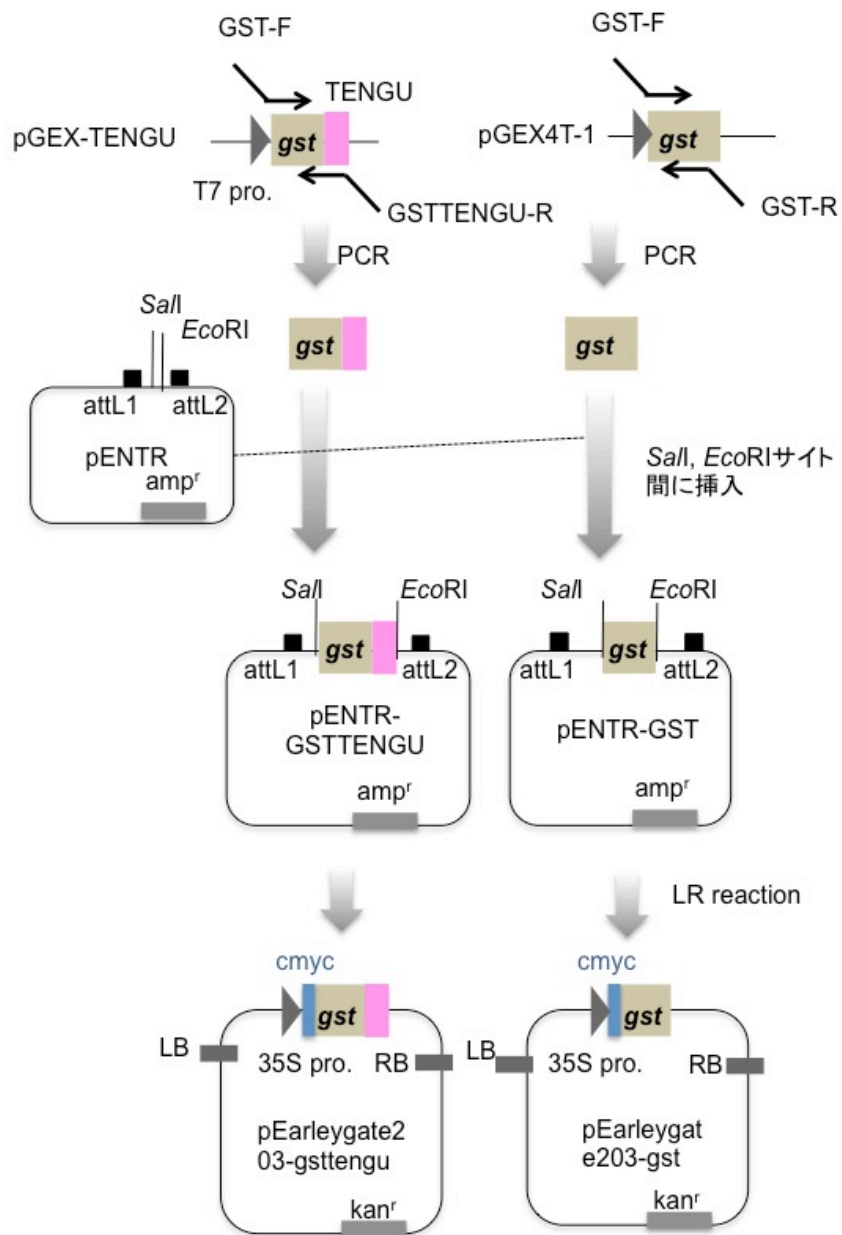


図3.5 TENGU植物内発現ベクターの構築

pGEX-TENGU, pGEX4T-1ベクターからGST-TENGU遺伝子, GST遺伝子をPCR増幅し、gatewayエントリーベクターであるpENTRのSalI, EcoRIサイトに挿入した。得られたエントリーベクターから、LR反応を行って、目的遺伝子のN末端にmycエピトープタグを付加し、35Sプロモーター下流で発現するDESTINATIONベクターpEarleygate203に導入し、発現ベクターpEarleygate203-GSTTENGU, pEarleygate203-TENGUを得た。

ウイルスベクター

TENGU タンパク質の機能に関わる部分を探索するため、TENGU 成熟タンパク質の一部を発見する一連のコンストラクト pCAMV-N19, pCAMV-N12, pCAMV-N11, pCAMV-N10, pCAMV-N8 および pCAMV-C19 を作成した (図 3.7)。まず TENGU 成熟タンパク質の N 末端側 19、12、11、10、8 アミノ酸、あるいは C 末端側 19 アミノ酸部分に、翻訳開始のためのメチオニン残基を付加したタンパク質(以下それぞれを N19, N12, N11, N10 および N8 とする)をコードする配列を、pCAMV-*tengu* を鋳型とした PCR 反応により増幅した。増幅した遺伝子断片を pCAMV ベクターの *Sma*I、*Sa*II サイト間に挿入することで、pCAMV-N19, pCAMV-N12, pCAMV-N11, pCAMV-N10, pCAMV-N8 および pCAMV-C19 を得た。

TENGU アミノ酸置換変異体を発見するウイルスベクターは以下のように構築した。TENGU アミノ酸置換変異体をコードする pET-12AA13GST を鋳型にして PAM765-F, PAM765-R を用いて PCR 増幅し、得られた変異 *tengu* 遺伝子断片を pCAMV ベクターの *Sa*II, *Sma*I サイト間に挿入し、pCAMV-12AA13 を得た。

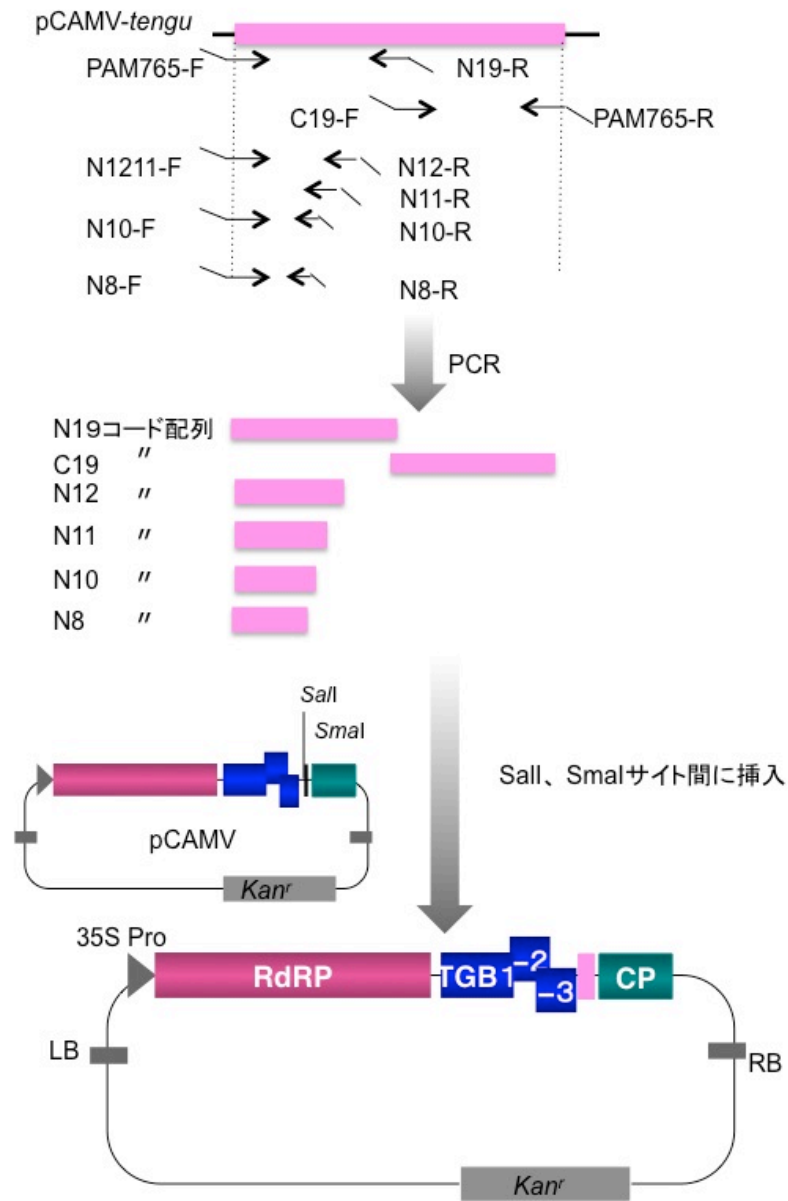


図3.6 TENGU部分配列を発現するウイルスベクターの構築
 TENGUの部分配列(N19, C19, N12, N11, N10, N8)をコードする領域を、
 pCAMV-tenguを鋳型としたPCR反応によって増幅した。増幅産物をpCAMV
 のSalI, SmaIサイトに挿入し、ウイルスベクターpCAMV-N19, -C19, -N12,
 -N11, -N10, -N8を得た。

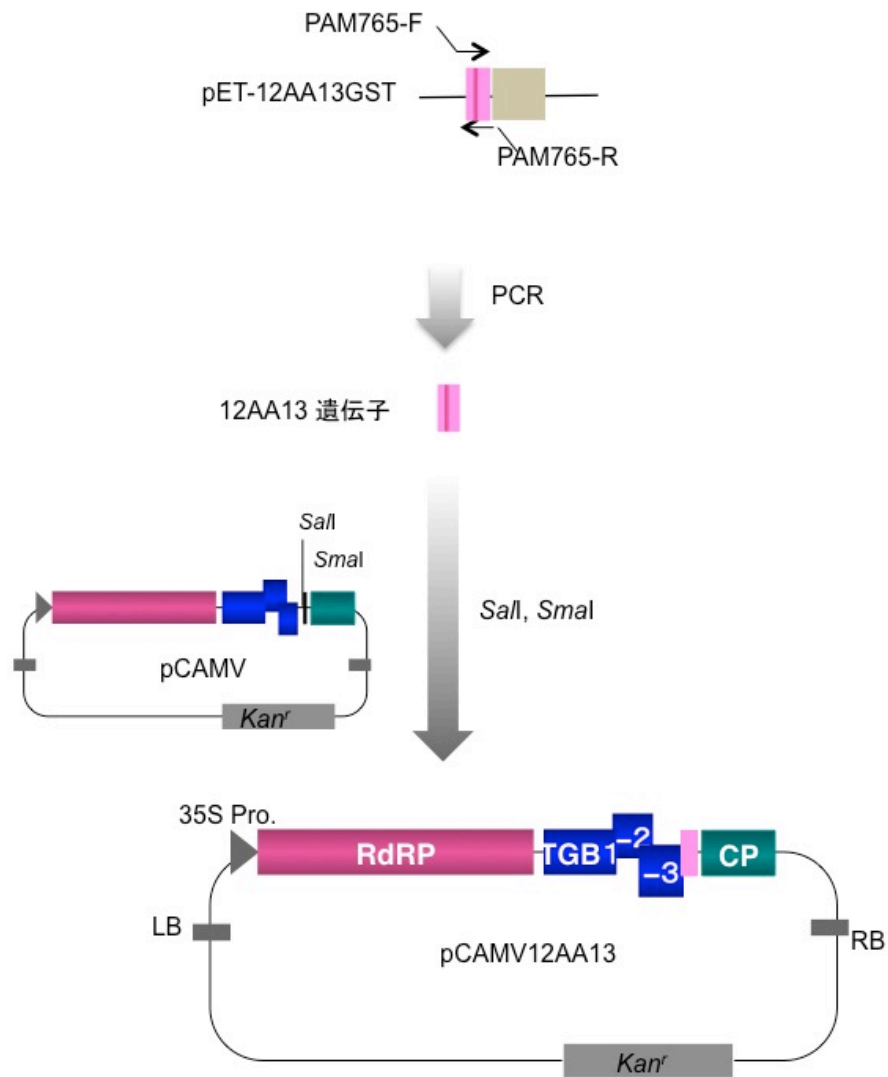


図 3.7 TENGUアミノ酸置換変異体を発現するウイルスベクターの構築
 TENGUのアミノ酸置換体(12AA13)をコードする遺伝子をpET-12AA13GST
 ベクターを鋳型としたPCR反応によって増幅し、pCAMVベクターのSalI, SmaI
 サイト間に挿入し、ウイルスベクターpCAMV-12AA13を得た。

2.2.3. 大腸菌でのタンパク質発現・精製

GST 融合組換えタンパク質の発現精製は以下のように行った。各種組換えタンパク質発現ベクターを導入した大腸菌 (BL21 株) を、カナマイシン入りの液体培地中で培養した。大腸菌が $OD_{600} = 0.7$ に増殖した時点で培地中にイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (isopropyl-beta-thiogalactopyranoside: IPTG) を終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるよう添加し、GST タンパク質あるいは TENGU, TENGU 相同遺伝子産物および TENGU アミノ酸置換変異体の GST 融合タンパク質の発現を誘導した。発現誘導後 2 時間の時点で、遠心分離により大腸菌を沈殿として回収した。菌体からの GST 融合タンパク質の精製は発現ベクター pGEX-4T-1 に添付のプロトコルに従って行った。菌体を PBS (phosphate buffered saline: 137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.8 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) 中に懸濁し、5 分間の超音波処理により破碎した。大腸菌由来のタンパク質分解酵素による組換えタンパク質の分解を防ぐため、破碎液にプロテアーゼインヒビターフッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethanesulfonyl fluoride: PMSF) を終濃度 $1 \mu\text{M}$ 添加し、さらに終濃度 1% TritonX を添加して、30 分室温でインキュベートした。インキュベートした破碎液を 4 度、 $10,000 \times g$ の条件で 15 分間遠心分離し、可溶性タンパク質を含む上清画分と不溶性タンパク質を含む沈殿とに分離した。目的とする GST 融合タンパク質を含む上清画分を回収し、glutathione-sepharose 4B (Fast Flow) (GE Healthcare) ビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した。glutathione-sepharose 4B ビーズ (ベッドボリューム 1 ml) を充填した PD-10 (GE Healthcare) カラムに、回収した上清画分を通し、ビーズに目的タンパク質を吸着させた。50ml 以上の Tween-PBS (0.05% (v/v) Tween 20, PBS)、さらに 50ml 以上の PBS によりカラム上の非特異的な吸着物を洗浄したのち、溶出バッファー (100 mM Tris , $20 \text{ mM glutathione}$, 200 mM NaCl , pH 9.5) 5 ml を、カラムに通して、ビーズに吸着した GST 融合タンパク質を溶出した。精製したタンパク質は SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) で単一バンドが得られることにより夾雑物がないことを確認し、実験に用いた。

2.2.4. in vitro processing assay

TENGU および TENGU 相同遺伝子産物、TENGU アラニン置換変異体の in vitro processing assay は以下のように行った。

播種後 35 日のシロイヌナズナの地上部 2.0 g を、液体窒素を用いて凍結磨砕し、4 ml の 20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (以下、Tris) バッファー (pH8.0) を加えて抽出液を得た。この抽出液を 10,000 \times g, 4°C の条件で 5 分間遠心分離して植物残渣を除いた上清を、20mM Tris バッファー(pH8.0) により 10 倍あるいは 100 倍希釈し、プロセッシング反応に使用した。

プロセッシング反応は、基質となる TENGU あるいはその変異体などの GST 融合タンパク質約 3.5 μ g (10 μ L) を、90 μ L の植物抽出液と混合し、室温で静置する方法で行った。12 時間毎に反応溶液の一部を回収し、等量の Laemli バッファーと混合し、99°C、5 分間の熱処理によってタンパク質を変成させた。12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によりタンパク質を分離したのち、ゲル内の全タンパク質を CBB-one (Nacalai tesque)を用いて染色した。プロセッシング反応の有無は、基質タンパク質の、バンドの移動度の変化により判断した。

2.2.5. プロテインシーケンス解析

TENGU-GST 融合タンパク質プロセッシング産物のプロテインシーケンス解析は、以下のよう調整したサンプルを用いた。解析したいタンパク質を含む溶液を、SDS-PAGE により分離した後、ゲル内のタンパク質をポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜上に転写した。その後 PVDF 膜を coomassie brilliant blue (CBB) 染色液 (0.25% (w/v) CBB、30% メタノール、10% 酢酸) に数秒間浸漬したのち脱色液 (90% メタノール) に浸漬し、膜上のタンパク質を染色した。移動度に基づいて目的タンパク質のバンドを確認し、PVDF 膜をメスで切り出した。東京大学農学生命科学研究科先端機器分析室において、切り出した PVDF 膜をエドマンシーケンス解析に供した。解析は同分析室の黒岩氏に依頼し、サンプルにつき 10 サイクルを行った。

2.2.6. イムノブロット法

植物内で発現させた myc-GST-TENGU 融合タンパク質がプロセッシングされるかどうかの確認を、myc エピトープタグを認識する抗体を用いたイムノブロットにより確認した。pEarleygate-GST-TENGU あるいは pEarleygate-GST をもつアグロバクテリウムを接種した *N. benthamiana* 葉から、接種 4 日後あるいは 5 日後に全タンパク質を抽出した。抽出にはタン

パク質分解酵素阻害剤 Complete mini (Rosche) を規定の濃度で添加した PBS を用いた。得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE により分離し、セミドライプロッターを用いて、PVDF 膜上に転写した。プロット後の PVDF 膜をブロッキングバッファー (2.5% (w/v) 脱脂粉乳 Tween-PBS) 中で 1 時間室温にてブロッキング反応を行った。その後一次抗体反応を、抗 myc 抗体 (clone 4A6, Millipore) を PBS で 5,000 倍に希釈した抗体溶液中で 50 分間、37°C にて行った。PVDF 膜を Tween-PBS 中で 10 分間、室温で振盪する洗浄工程を 3 回繰り返したのち、二次抗体反応を、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase: AP) 標識された抗ウサギ抗体を PBS で 5,000 倍に希釈した抗体溶液中に 37°C、50 分間浸漬する事で行った。PVDF 膜を PBS 中で 10 分間、2 回、室温にて洗浄した後、AP バッファー (66 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl, pH=9.5) 中で 10 分間洗浄した。AP 発色反応は 0.45 mg/mL ニトロブルーテトラゾリウム (nitro-blue tetrazolium chloride: NBT)、0.175 mg/mL ブロモクロロインドリルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase p-toluidine salt: BCIP) を含む AP バッファー中に、室温・暗所で PVDF 膜を浸漬する事により行い、適度な染色が得られた時点で、PVDF 膜を流水で洗浄し反応を停止した。

2.2.7. 質量分析

in vitro processing assay 産物の質量分析は、以下のように行った。in vitro processing assay 後の反応液に 10 分の 1 容量の 1%トリフルオロ酢酸(trifluoroacetic acid: TFA)溶液を添加し、最終濃度 0.1% TFA に調整した。チップ形状の C18 カラム (Ziptip, Millipore) を、100%アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液をピペッティングすることで前処理した後、調整した反応液をピペッティングして反応液中のペプチドをカラム上に吸着させた。同じカラムで 0.1%TFA 水溶液をピペッティングしてカラムを洗浄する作業を 3 回行った後、吸着した物質を 100%アセトニトリルにより溶出した。得られた溶出液を、東京大学農学生命科学研究科内の先端機器分析室において飛行時間型質量分析計 (Time-of-flight mass spectrometer: TOF-MS) により解析した。解析は同分析室の堀氏に行っていただいた。得られたスペクトルの解析には、Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) サイト内の MS-Fit ソフトウェアを用いた。

2.3. 結果

2.3.1. 機能部分配列の探索

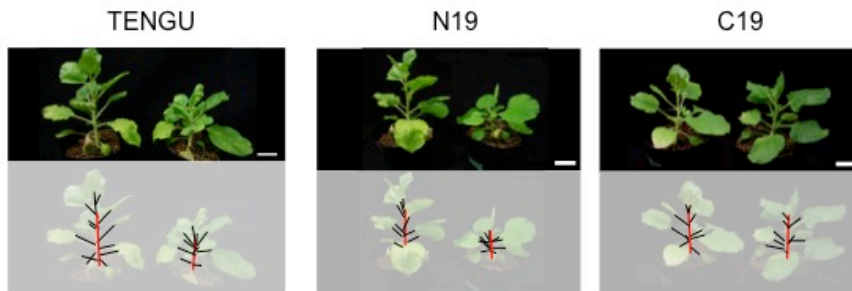
TENGU は、植物細胞質中に分泌される部分が 38 アミノ酸からなる低分子の病原性因子であり、*N. benthamiana* においては主茎の伸張の抑制と葉の増加を誘導する。本章ではこの形態異常の誘導に関わるアミノ酸配列部分を明らかにするため TENGU のアミノ酸配列の一部を発現するウイルスベクターを構築し、*N. benthamiana* に病徴を誘導する部分を探索した。まず TENGU の N 末端側の 19 アミノ酸と、C 末端側の 19 アミノ酸とに、それぞれ翻訳開始のためのメチオニン残基を付加したタンパク質を (N19, C19) を *N. benthamiana* で発現させて病徴誘導の有無を調べた (図 3.8A, B)。ポジティブコントロールとして TENGU 成熟型タンパク質を発現するベクター (pCAMV-*tengu*) を、ネガティブコントロールとして空ウイルスベクター (pCAMV) を用いた。3 週間後に各接種個体の、草丈・主茎上に着生した葉の数・葉の相枚数を記録し、接種コンストラクト間で主茎の平均節間長 (草丈/主茎の葉の数)、および葉の総数に与える影響を比較した。(図 3.8C)

図 3.8C は、供試した各コンストラクトについて、接種個体の主茎の平均節間長および葉の総数の分布を表している。ポジティブコントロール (TENGU) と N19 (N19) 接種個体では、ネガティブコントロール (vector) と比較して主茎の平均節間長が短く、葉の枚数が多い個体の割合が多かった。これに対して、C19 (C19) 接種個体では、平均節間長および葉の総数の分布はネガティブコントロール (vector) と差がなかった。すなわち、C 末端 19 アミノ酸のみでは形態異常を誘導することができず、TENGU による形態異常の誘導に成熟型タンパク質の N 末端配列のいずれかの部分が必要であること、また形態異常の誘導には N 末端 19 アミノ酸のみで十分であることが明らかになった。

A.

	amino acid sequence	symptom
TENGU	MDQDDDIENVITLIETKENQTEQIKIQCDLLQKGEKDA	+
N19	MDQDDDIENVITLIETKENQ	+
C19	MTEQIKIQCDLLQKGEKDA	-

B.



C.

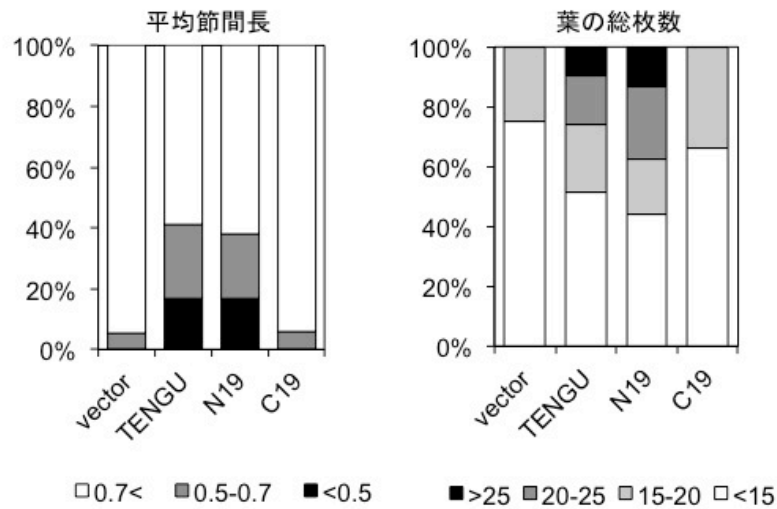


図3.8 TENGU成熟型タンパク質部分配列の形態異常誘導活性

A. 発現させたTENGU成熟型タンパク質と、そのトランケーション変異タンパク質のアミノ酸配列

B. 各タンパク質を発現するウイルスベクターを接種した*N.benthamiana* (接種後21日)

C. 接種後21日の植物の平均節間長および葉の総枚数の分布

さらに TENGU の成熟型タンパク質の N 末端側 12,11, 10, 8 アミノ酸にメチオニンを付加したタンパク質（以下、それぞれ N12、N11、N10、N8）を発現するウイルスベクターを構築し、*N. benthamiana* に形態異常を誘導するかどうかを調べた（図 3.9A）。その結果、N12、N11 を発現させた場合、ポジティブコントロールと同様に、主茎の平均節間長が短く、葉の総数が多い個体の割合が増加した。一方、N10 発現植物および N8 発現植物においては平均節間長の分布と葉の総数の分布はネガティブコントロールと同様であった（図 3.9B, C）。このことから、TENGU による形態異常の誘導には、成熟タンパク質の N 末端 11 アミノ酸のみで十分であることが明らかになった。さらに 11 番目のロイシン残基を削った N10 が形態異常を示さないことから、11 番目のロイシン残基が形態異常誘導に重要である可能性が考えられた。

表 3.2 は、上述の接種実験において、接種コンストラクトごとに形態異常を示した株の割合を示している。興味深いことに、TENGU の部分配列は、ポジティブコントロールの成熟型タンパク質域全長とほぼ同程度かそれ以上の割合で形態異常を誘導した。すなわち、TENGU の N 末端 11 アミノ酸部分は、単独でタンパク質全長の活性を再現するのに十分な機能ドメインであると考えられる。

表 3.2 TENGU 部分配列の病徴誘導活性

Parameter	Vector	TENGU	N19	C19	N12	N11	N10	N8
No.	96	260	136	68	60	60	104	104
Symptom ^a	0	84	50	0	24	20	4	0
Frequency (%)	0	32.31 ^b	36.76 ^b	0	40.00 ^b	33.33 ^b	3.85	0

各発現コンストラクトについて、接種個体数・形態異常を示した個体数を示した。

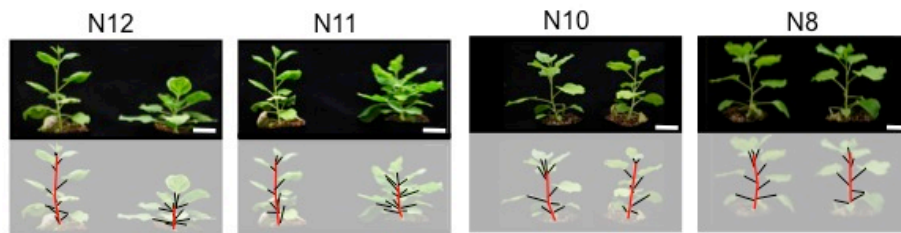
a: 平均節間長が0.7 cm以下で葉の枚数が15枚以下の植物体の数を示す

b: 危険率1%のカイ2乗検定でコントロールベクターとの間に有為差が認められたもの

A.

	amino acid sequence	symptom
TENGU	MDQDDDIENVITLIETKENQTEQIKIQCDLLQKGEKDA	+
N12	MDQDDDIENVITL	+
N11	MDQDDDIENVIT	+
N10	MDQDDDIENVI	-
N8	MDQDDDIEN	-

B.



C.

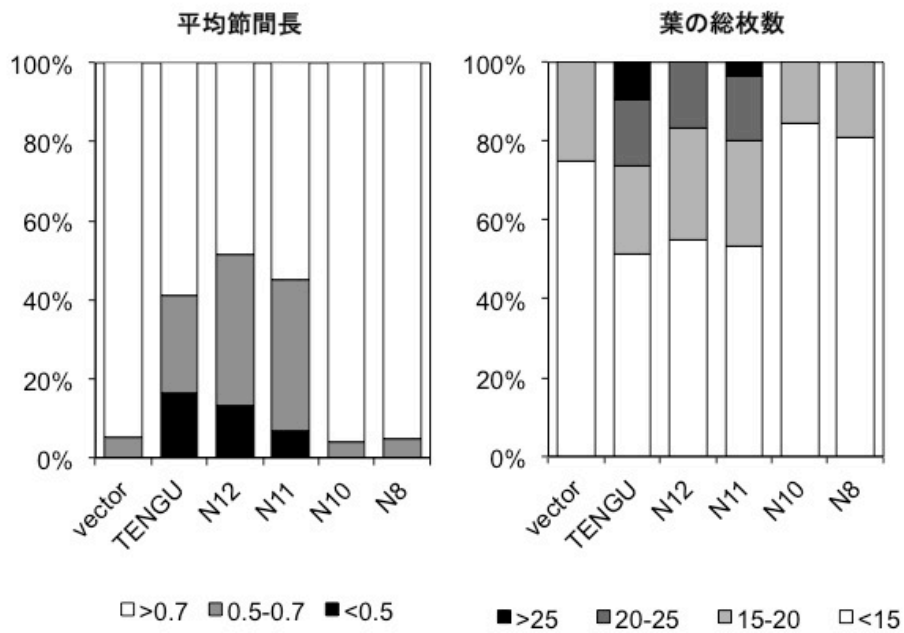


図3.9 TENGU成熟型タンパク質部分配列の形態異常誘導活性

A. 発見させたTENGU成熟型タンパク質と、そのトランケーション変異タンパク質のアミノ酸配列

B. 各タンパク質を発現するウイルスベクターを接種した*N.benthamiana* (接種後21日)

C. 接種後21日の植物の平均節間長および葉の総枚数の分布

2.3.2. in vitro プロセシングの可能性の検証

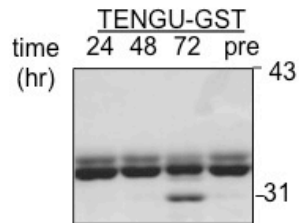
植物における生理活性ペプチドは、100 アミノ酸前後の前駆体タンパク質として転写翻訳された後、プロセシングにより機能ドメインが切り出されて働くものが多く知られている(表 1.3)。これらの生理活性ペプチドでは、機能領域部分のペプチドは、機能領域を含むより大きなサイズのタンパク質よりも高い生理活性を示すことから(Kondo, 2006)、プロセシングはペプチドの活性に関与していると考えられている。このような生理活性ペプチドのプロセシングの解析は、植物の全タンパク質を抽出した抽出液を、ペプチドの前駆体配列を含む組み換えタンパク質と混合する、in vitro processing assay によって行なわれることが多い(Guo et al. 2011; Ni & Clark 2006; Stenvik et al. 2008)。

3.3.1 節の解析により、TENGU においては成熟型タンパク質の N 末端 11 アミノ酸が形態異常誘導能をもつ機能領域であること、また機能領域のみの活性は TENGU の成熟型タンパク質全長と同程度かそれ以上に高いことが明らかになった。そこで本節では、TENGU の成熟型タンパク質がプロセシングを受けるか、in vitro processing assay により検証した。

in vitro processing assay には、TENGU の成熟型タンパク質の C 末端にグルタチオン S トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase: GST) を融合した、TENGU-GST 融合タンパク質を用いた。TENGU-GST は大腸菌内で組み替えタンパク質として発現・精製し、得られたタンパク質は、バッファーと混合した状態で、室温で 48 時間以上安定であった (図 3.10A)。この TENGU-GST 融合タンパク質をシロイヌナズナ抽出液 (以下、植物抽出液) と混合した場合には、12 時間後に TENGU-GST タンパク質の分解が確認された (図 3.10B)。一方、コントロールとして用いた組換え GST タンパク質は、バッファーと混合した場合と植物抽出液と混合した場合のいずれも、12 時間以上安定であった。このことから、TENGU の配列部分が植物抽出液によりプロセシングされる可能性が示唆された。

この in vitro processing assay における TENGU-GST 融合タンパク質のプロセシング部位を明らかにするため、TENGU-GST を植物粗抽出液と混合し、12 時間後の反応液から、グルタチオンセファロースカラムにより GST タンパク質を含む C 末端側の断片を回収して、プロテインシーケンス解析に供した。その結果、TENGU 成熟タンパク質の 13 アミノ酸から 17 アミノ酸に相当する配列が解読され、TENGU-GST タンパク質が TENGU 成熟型タンパク質の 12 番目のロイシン残基と 13 番目のイソロイシン残基の間で切断されていることが明らかになった (図 3.11)。

A.



B.

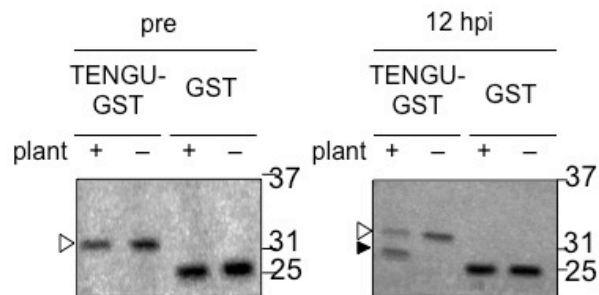


図3.10 TENGU-GST融合タンパク質のin vitro processing assay

- A. TENGU-GST融合タンパク質の安定性。TENGU-GST融合タンパク質の室温で静置し、24時間、48時間、72時間後にそれぞれ分解の有無をSDS-PAGEで解析した。
- B. TENGU-GST融合タンパク質あるいはGSTタンパク質の植物粗抽出液によるプロセッシング。各組換えタンパク質と植物粗抽出液を混合し、混合直後 (pre) から室温で12時間静置した後 (12hpi: hours post incubation) までの分子量の変化をSDS-PAGE解析した。白矢頭はTENGU-GST融合タンパク質を、黒矢頭はTENGU-GST融合タンパク質のプロセッシングにより生成するC末端側の断片を示す。

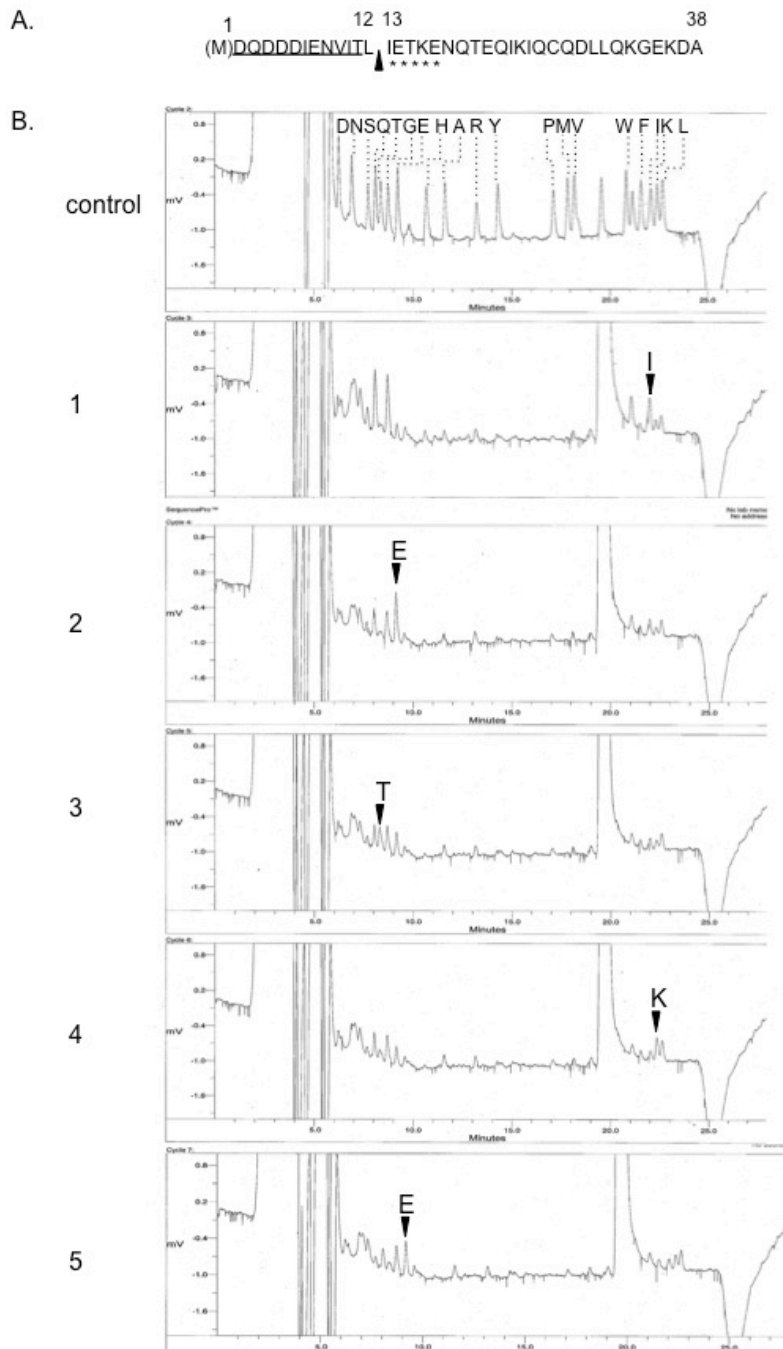


図3.11 in vitro processing assay 産物のタンパク質シーケンス解析

- A. TENGU成熟型タンパク質と推定プロセッシングサイト(矢頭)。タンパク質シーケンスで解読された残基をアスタリスクで示した。実際にin vitro processing assayで用いたGST融合タンパク質には翻訳開始のためのメチオニン残基を付加している。
- B. タンパク質シーケンス解析の結果。最上段のパネルはそれぞれのアミノ酸のリテンションタイムを示した(control)。1-5のパネルにはそれぞれのサイクルで得られたスペクトルを示す。各サイクルで解離されたアミノ酸のピークに矢頭を記した。

2.3.3. 質量分析によるプロセッシング産物の特定

プロテインシーケンスの結果、TENGU 成熟型タンパク質は 12 番目のロイシン残基と 13 番目のイソロイシン残基の間で切断されることが示された。TENGU の活性領域は成熟タンパク質の N 末端 11 アミノ酸であることから、TENGU はプロセッシングされることによって活性型領域を含む 12 アミノ酸を生じるだろうと予想される。そこで、TENGU-GST タンパク質のプロセッシングによって生じるペプチド種を、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法—飛行時間型質量分析(matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF-MS)により解析した (図 3.12)。

その結果、TENGU-GST 融合タンパク質と植物抽出液とを混合し、12 時間静置した反応液からは、ピークが主に 5 つ検出され、それぞれの質量電荷比は 1,992、2,364、2,587、2,835、3,204 (mass to charge ratio: m/z) であった。一方、TENGU-GST 融合タンパク質を抽出バッファーと混合した対照実験の反応液からは、ピークが主に 4 つ検出され、それぞれの質量電荷比は 1,922、2,832、2,958、3,204 (m/z) であった。すなわち、in vitro processing 反応によって生じるピークは、質量電荷比 2,364 と 2,587 (m/z) の二つであり、これらの値は、それぞれ TENGU の成熟型タンパク質の 19 アミノ酸、21 アミノ酸に翻訳開始のためのメチオニンを付加したタンパク質の分子量と一致していた。なお、検出が期待された切断産物である TENGU の N 末端 12 アミノ酸にメチオニンを付加したタンパク質の予想分子量は 1,520 Da であり、これに相当する質量電荷比のピークはいずれの実験区においても認められなかった。

以上の結果を総合すると、TENGU の in vitro assay においては、TENGU 成熟型タンパク質配列は 12 番目ロイシン、13 番目のイソロイシンの間、19 番目のグルタミン酸と 20 番目のアスパラギンの間、21 番目のグルタミンと 22 番目のスレオニンの間の、少なくとも三箇所切断されると考えられる。また、その結果として TENGU 成熟型タンパク質の N 末端 19 残基および N 末端 21 残基からなるペプチドが蓄積することが確認された。

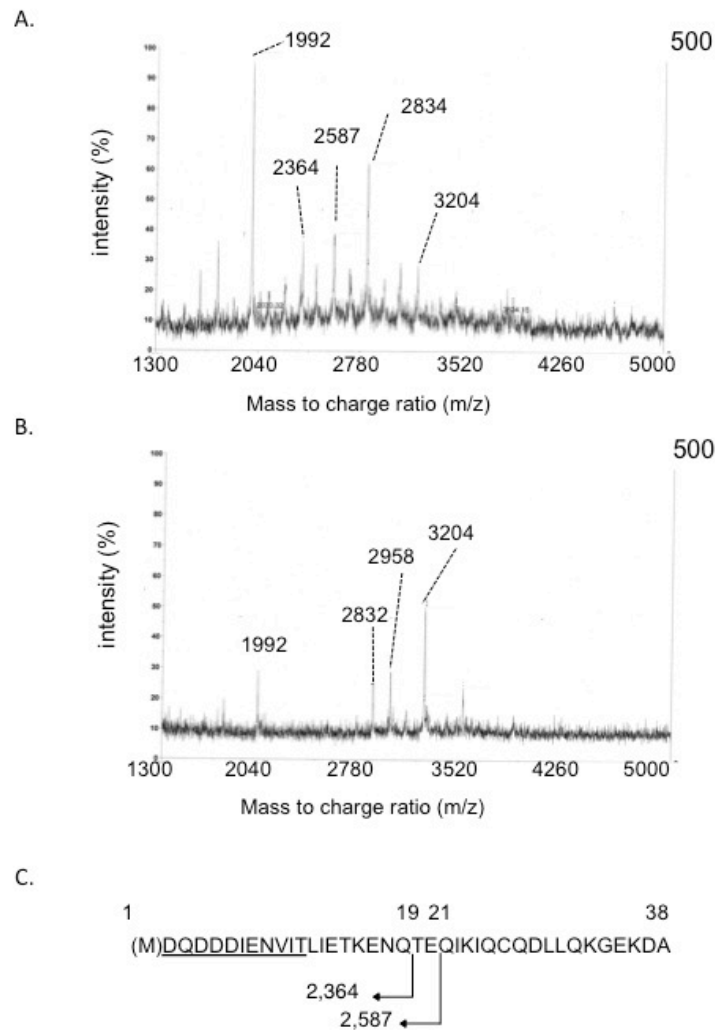


図3.12 インビトロプロセッシング産物の特定

- A. TENGU-GST融合タンパク質を植物粗抽出液と混合し、12時間室温で静置した後の反応液をMALDI-TOF-MS解析した。主要なピークについては質量電荷比を示した。
- B. TENGU-GST融合タンパク質と抽出バッファーを混合し、12時間室温で静置した後の反応液をMALDI-TOF-MS解析した。主要なピークについて質量電荷比を示した。
- C. TENGU成熟型タンパク質配列と、その断片の分子量(Da)を配列の下に記した。下線は形態異常誘導に関わる11アミノ酸を示す。

2.3.4. in vitro processing の特性

続いて TENGU をプロセッシングする機構について知見を得るため、一連の阻害実験を行なった。まず、プロセッシングに用いる植物抽出液をあらかじめ 99 度で 5 分間処理したのちに実験に供した(図 3.13A、熱処理+)。その結果、熱処理を行わないコントロールでは 12 時間後に約 30kDa の分解産物のバンドが観察されるのに対し、熱処理を行った場合には切断産物に相当するバンドは観察されず、プロセッシングには宿主のタンパク質など熱に弱い因子が関与していることが明らかになった。さらに、植物抽出液を調整後、10 倍および 100 倍に希釈して実験に用いた(図 3.13A) 場合、用いる植物抽出液の希釈倍率が高いほど、反応 12 時間後、TENGU-GST タンパク質の分解産物に相当するバンドは薄く、TENGU-GST タンパク質全長に相当するタンパク質のバンドは濃く観察された(図 3.13A) ことから、TENGU のプロセッシングに宿主の因子が関与している可能性が支持された。そこで、プロテアーゼ阻害剤を添加し、プロテアーゼ活性を阻害することによりプロセッシング反応がおこらなくなるか調べた。プロテアーゼの中でもセリンプロテアーゼの一群を非可逆的に阻害する薬剤である PMSF を添加した場合、12 時間反応後に生成する約 30kDa の産物の量が PMSF 非添加区と比較して減少した。以上から、植物のセリンプロテアーゼが TENGU のプロセッシングに関与する可能性が考えられた(図 3.13B)。

2.3.5. 植物体内におけるプロセッシングの検証

ファイトプラズマ感染植物において、TENGU は篩部の細胞質中に分泌されると考えられる。一方の、in vitro processing assay で使用する植物抽出液は液胞に局在するプロテアーゼなど、通常感染植物内における TENGU との相互作用が期待されない因子も含まれている。そこで、本節では、in vitro processing assay で認められた現象が実際に感染植物内で起き得るかを検証した。

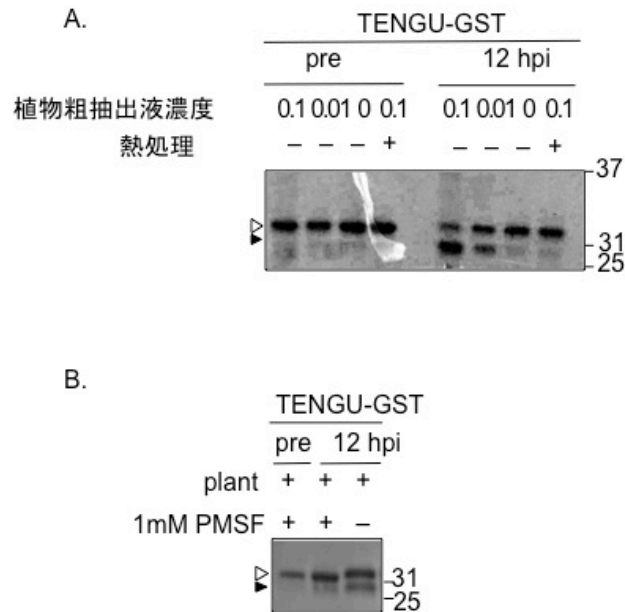


図3.13 TENGUインビトロプロセシングの阻害

- A. 植物粗抽出液の熱処理によるプロセシングの阻害。99 °C、5分の熱処理を行った植物粗抽出液(+)あるいは熱処理していない粗抽出液(-)をTENGU-GST融合タンパク質と混合して室温で静置し、混合直後(pre)と静置12時間後(12hpi:hours post incubation)との分子量の変化をSDS-PAGEにより解析した。植物粗抽出液濃度は反応液に対する用いた植物粗抽出液の相対量を示している。白矢頭はTENGU-GST融合タンパク質を、黒矢頭はTENGU-GST融合タンパク質のプロセシングにより生成するC末端側の断片を示す。
- B. セリンプロテアーゼインヒビター添加によるプロセシングの阻害。TENGU-GST融合タンパク質と植物粗抽出液を混合し、1mM PMSF(+)あるいは溶媒を添加して室温で12時間静置し、分子量の変化をSDS-PAGEにより解析した。白矢頭はTENGU-GST融合タンパク質を、黒矢頭はTENGU-GST融合タンパク質のプロセシングにより生成するC末端側の断片を示す。

TENGU を *N. benthamiana* において一過的に発現した際に、in vitro processing 実験と同様のプロセッシングが起こるかどうか調べた。具体的には、TENGU 成熟型タンパク質の N 末端に myc-GST タンパク質を融合したタンパク質 (myc-GST-TENGU)、あるいは myc-GST のみのコントロールタンパク質をアグロインフィルトレーション法により発現し、インフィルトレーション 4 日後および 5 日後に、蓄積するタンパク質のサイズを myc タグに対する免疫プロットティングによって解析した (図 3.14)。

その結果、myc-GST タンパク質を発現させた植物からは、4 日後、5 日後ともに myc-GST タンパク質の分子量に相当するバンドが検出されたのに対し myc-GST-TENGU タンパク質を発現する植物では、4 日後に myc-GST-TENGU に相当すると思われるバンドが検出され、5 日目にはこのバンドに加えて移動の早い新たなバンドが検出された。この移動度の異なるバンドは myc-GST-TENGU と myc-GST との中間的なサイズを示しており、バンドのパターンが in vitro processing assay で認められたバンドの変化に類似していることから、myc-GST-TENGU が植物体内でプロセッシングされたことによる切断産物である可能性が考えられた。

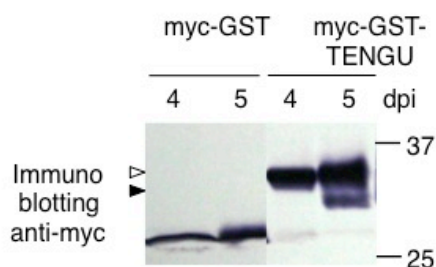


図3.14 myc-GST-TENGUタンパク質の植物内におけるプロセッシング
myc-GSTあるいはmyc-GST-TENGUをアグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の葉において発現させ、接種後4日後と5日後に目的タンパク質の蓄積をmycタグに対する免疫プロットティングにより検出した。myc-GST-TENGUを発現させた植物では、接種4日後に myc-GST-TENGU融合タンパク質(白矢頭)の蓄積が認められ、接種5日後にはこれに加えてmyc-TENGU-GST融合タンパク質とmyc-GSTタンパク質との中間的なサイズを示すバンド(黒矢頭)が確認された。

2.3.6. TENGU アミノ酸置換変異体の形態異常誘導活性

これまでの解析により、TENGU 成熟型タンパク質が宿主因子によるプロセッシングを受けることで機能領域を含むペプチドを生じること、また、類似のプロセッシング現象は TENGU 成熟型タンパク質を植物体内で発現させた場合にも認められることが明らかになった。そこで、本節では TENGU のプロセッシング現象とその形態異常の誘導機能との関連について、TENGU の推定プロセッシング部位の一部に変異を導入した変異体を用いて解析した。

3.3.3、3.3.4 節の結果から、TENGU 推定プロセッシングサイトは 3 つ予想されている、このうちのひとつを挟む 12 番目のロイシン残基と 13 番目イソロイシン残基をアラニンに置換した変異 TENGU 成熟型タンパク質（以下、12AA13）を発現するコンストラクトを作成した。

まず 12AA13 が形態異常を誘導するかどうか、*N. benthamiana* における一過的発現により調べた。野生型の TENGU 成熟型タンパク質と、12AA13 を発現するウイルスベクター、および空のベクターを *N. benthamiana* に接種し、3 週間後に形態異常が誘導されるか、接種植物の草丈、主茎に着生する葉の枚数、葉の総枚数を測定した（図 3.15）。その結果、12AA13 を発現した植物では、節間伸長が抑制されるものや葉が増加する個体の割合が少なく、形態異常誘導能は失われてはいないものの、野生型の TENGU 成熟型タンパク質と比較して著しく低かった。表 3.3 は野生型の TENGU 成熟型タンパク質と 12AA13 の形態異常誘導効率を示している。12AA13 は野生型と比較して形態異常誘導効率が半分以下に低下していた。12AA13 変異体は TENGU 成熟型タンパク質の N 末端 11 アミノ酸からなる機能領域を含んでいることから、導入したアミノ酸置換がプロセッシングの効率に影響することで形態異常誘導機能が低下した可能性が考えられた。

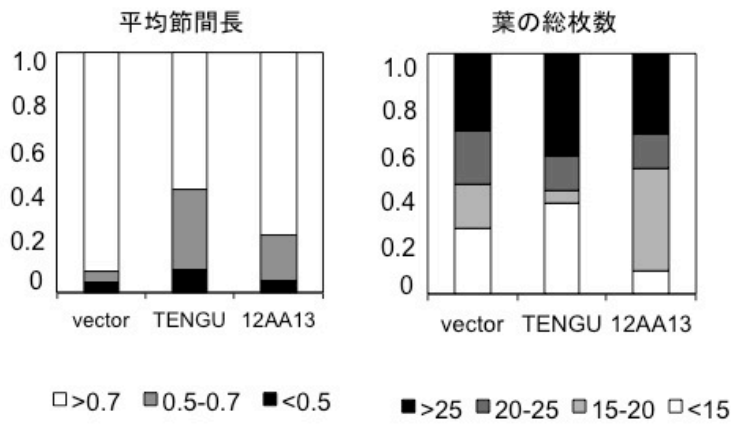
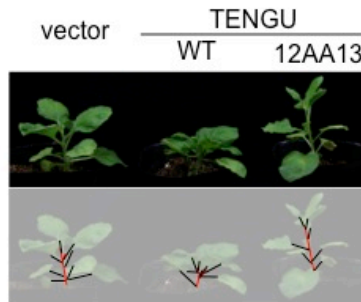


図3.15 TENGU予想プロセッシングサイト変異体の形態異常誘導機能
 A. TENGU成熟型タンパク質あるいはTENGU成熟型タンパク質のアラニン置換体(12AA13)を発現するウイルスベクターを接種した*N. benthamiana*。写真は接種後21日目の典型的な接种植物の形態を示す。下のパネルでは茎を赤で、葉柄を黒で示している。
 B. 接种植物の平均節間長(左)と葉の総枚数(右)の分布を示す。

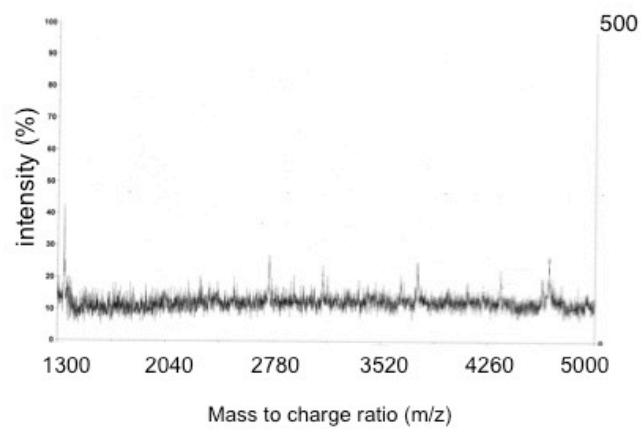
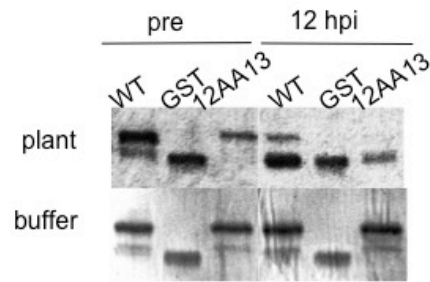
表 3.3 TENGU アミノ酸置換変異体の病徴誘導活性

Parameter	Vector	TENGU	
		野生型	12AA13
No.	23	21	21
Symptom ^a	0	7	3
Frequency (%)	0	33.33	19.05

各発現コンストラクトについて、接種個体数・形態異常を示した個体数を示した
^a: 平均節間長が0.7 cm以下で葉の枚数が15枚以下の植物体の数を示す

そこで、実際に 12AA13 変異タンパク質のプロセッシング効率を調べるため、12AA13 の C 末端側に GST を融合した組換えタンパク質 (12AA13-GST) を作出し、in vitro processing assay を行った。12AA13-GST を 植物粗抽出液あるいは抽出バッファーと混合して 12 時間後に SDS-PAGE で分子量の変化を解析した。その結果、12AA13-GST (レーン: 12AA13) はバッファーと混合した場合には分子量が変化しなかったが、植物粗抽出液と混合した場合には 12 時間後にプロセッシングによると考えられるバンドの移動度の変化が見られた(図 3.16A)。すなわち、12AA13 タンパク質は、野生型の TENGU 成熟型タンパク質 (レーン: WT) と同様にプロセッシングされ得ることが明らかになった。

続いて、この 12AA13-GST の in vitro processing assay 後の産物を MALDI-TOF-MS 解析に供し、プロセッシングにより生じる断片を解析した。その結果、野生型 TENGU-GST 融合タンパク質のプロセッシング反応液に認められたピークはいずれも存在せず、12AA13 変異 TENGU-GST 融合タンパク質のプロセッシング反応液のうちにはペプチドが蓄積していない事が明らかになった (図 3.16B)。以上の結果から、TENGU のプロセッシングによって生じる 19 アミノ酸あるいは 21 アミノ酸からなるペプチドの蓄積は、TENGU による形態異常の誘導に関与している可能性が考えられた。



1 38
(M)DQDDDIENVIT**AA**ETKENQTEQIKIQCDLLQKGEKDA

図3.16 TENGU12AA13変異体のプロセッシング

- A. 12AA13変異体のin vitro processing assay。12AA13-GST(レーン: 12AA13)あるいは野生型のTENGU-GST(レーン: WT)タンパク質と、植物粗抽出液(パネル: plant)あるいは抽出バッファー(パネル: buffer)と混合し、室温で12時間静置した。静置前後の分子量の変化をSDS-PAGEで解析した。
- B. TENGUプロセッシングサイト変異体のインビトロプロセッシング産物の質量分析結果
- C. プロセッシング変異体のアミノ酸配列。変異させた部位を太字で示した。下線は機能領域を示す

2.3.7. TENGU 相同遺伝子産物におけるプロセシングの保存性

TENGU は AY グループに保存された病原性因子であり、AYWB 系統、ACLR 系統、PPT 系統のコードする TENGU 相同遺伝子産物は、成熟型タンパク質のアミノ酸配列に多型があるが、いずれも *N. benthamiana* で発現させた際に、形態異常を誘導する機能的なオーソログである (第二章)。そこで、これらのアミノ酸配列の異なる TENGU 相同遺伝子産物においてもプロセシング現象が保存されているのか、in vitro processing assay によって調べた。AY-WB, ACLR, PPT 系統のコードする TENGU 相同遺伝子産物について、それぞれ成熟型タンパク質の C 末端側に GST を融合した組換えタンパク質を作出し、植物粗抽出液あるいは抽出バッファーと混合して 12 時間室温で静置した。SDS-PAGE により、静置前後の分子量の変化を解析したところ、AYWB, ACLR, PPT 系統いずれの系統の TENGU 相同遺伝子産物も 12 時間後にバンド移動度の変化が認められ、OY-M の TENGU と同様にプロセシングされた (図 3.17)。このことから、プロセシング現象はアミノ酸配列の異なる相同遺伝子産物においても認められる現象であることが確認できた。

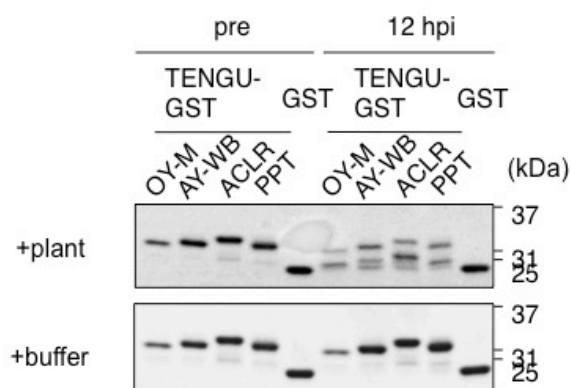


図3.17 TENGUプロセシングの保存性

OY-M, AY-WB, ACLR, PPT系統のTENGU相同遺伝子産物がプロセシングされるかin vitro processing assayにより解析した。上のパネル (+plant)は、各系統のTENGU相同遺伝子産物のGST融合組換えタンパク質(レーン:TENGU-GST)あるいはGSTタンパク質(レーン:GST)を植物粗抽出液とを混合して室温で12時間静置し、静置前後 (pre, 12hpi: hour post incubation) の分子量の変化をSDS-PAGEで解析した結果を示す。

下のパネルは(+buffer)は植物粗抽出液のかわりに植物からの全タンパク質抽出に用いたバッファーを添加した対照区の結果を示す。

右の数字はサイズマーカー(kDa)

2.4. 考察

2.4.1. TENGU プロセッシングは3カ所でおこる

本章では、TENGU の機能領域を探索し、成熟型タンパク質の N 末端 11 アミノ酸が機能に十分である事を示した。また、成熟型タンパク質がプロセッシングを受けることを見だし、TENGU がプロセッシングされることが形態異常誘導する機能に関わる可能性を示唆した。本研究の結果、TENGU がプロセッシングされると考えられた部位を図 3.18 に示す。

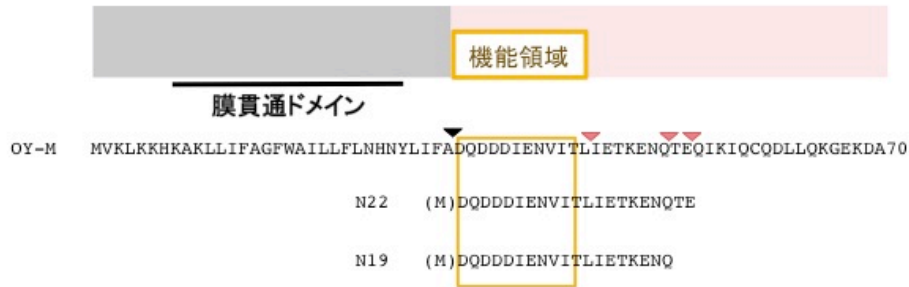
本研究では TENGU のプロセッシング部位の解析を、C 末端断片のプロテインシーケンス解析および N 末端断片の質量分析の 2 種の方法により行った。その結果、プロテインシーケンス解析においては 12-13 アミノ酸間がプロセッシングされていた一方で、N 末端断片の質量分析では 12 アミノ酸からなる断片は検出されず、解析手法により結果に違いが生じた。

この原因は不明であるが、以下のような可能性が考えられる。検出された 3 カ所のいずれでも切断が起こるが、N 末端 12 アミノ酸からなる断片が不安定で質量分析で検出されない可能性、あるいは植物のプロテアーゼ活性は生長の過程や周辺環境に応じて厳しく制御されているため、実験間の植物サンプルの微妙な違いによって、個々のプロテアーゼ活性の強さに違いがあり、実験時により TENGU プロセッシングの主要な部位が異なる可能性である。In vitro processing assay においては複数の切断産物が確認されることはこれらの可能性を支持している。

2.4.2. プロセッシングにはセリンプロテアーゼが関与する

各種阻害験により、プロセッシング機構を解析したところ、TENGU は熱に弱い宿主の因子によるプロセッシングをうけると考えられた。特にセリンプロテアーゼ阻害剤である PMSF の添加がプロセッシング反応をやや阻害したことから、TENGU のプロセッシングにはセリンプロテアーゼが関与すると推測される。しかし、PMSF はプロセッシングを完全には阻害しなかった。この理由としては、インビトロプロセッシング複数箇所で行われているために、一種類のプロテアーゼ阻害剤を添加しただけではタンパク質の分解を完全に阻害することができない可能性が考えられる。

A.



B.

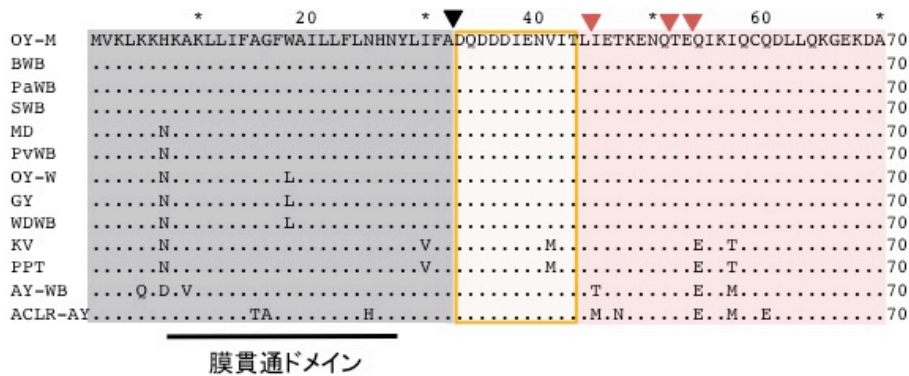


図3.19 TENGUプロセッシング部位の模式図

- A. 灰色部分はシグナル配列を、黒矢頭はシグナル配列切断部位を、ピンク色部分は分泌されるペプチドを示す。黄枠は、成熟型タンパク質N末端11アミノ酸部分の機能領域を、赤矢頭はプロセッシングが確認された部位を示す。
- B. ホモログタンパク質のアラインメント上に、OYMで明らかになった機能領域、プロセッシング部位を示す。

2.4.3. 12AA1 変異体のプロセッシングで、ペプチドが検出できない理由

12 番目と 13 番目の残基をアラニン置換した TENGU 変異体 (12AA13) はプロセッシングをうけるものの、その結果生成するペプチドが蓄積しなかった。このことは、12 番目と 13 番目の残基がペプチドの安定性に関わる可能性を示唆している。図 3.3.6-3A の 12AA13-GST タンパク質の *in vitro processing assay* では、中間的なサイズの切断産物の蓄積は認められず、このことは、12AA13 のプロセッシングの結果生成する短いペプチドが、不安定である可能性を支持している。

2.4.4. TENGU プロセッシングの意義

TENGU のプロセッシングは、TENGU 成熟型タンパク質を含む融合タンパク質を植物内で発現させた場合にも認められることから、TENGU プロセッシングはファイトプラズマ感染植物体内で実際に起こり得る現象だと考えられる。また、TENGU 部分配列が、TENGU 成熟型タンパク質全長よりもやや高い萎縮叢生症状誘導効率を示すこと、およびプロセッシングが TENGU 相同遺伝子産物において広く認められることは、TENGU のプロセッシングがその機能に重要であるという仮説と矛盾しない。

この仮説を検証するため TENGU のプロセッシング部位の一つを挟む 12 番目と 13 番目のアミノ酸に変異を導入した TENGU 変異体 12AA13 を作出したところ、野生型よりも弱い形態異常誘導能を示した。この TENGU 変異型体は病徴誘導に十分な N 末端 11 アミノ酸部分を保持しており、さらにその安定性やプロセッシング効率は野生型と同程度であるが、質量分析の結果、プロセッシングによって生じるペプチドの蓄積は確認されなかった。すなわち、変異型 TENGU においてはプロセッシングによって生成するペプチド断片が不安定であり、このために病徴誘導効率が減少した可能性が考えられた。

4. 総合考察

4.1 ファイトプラズマ属における病徴誘導機構の進化

本研究において、*tengu* 相同遺伝子は供試した AY グループのファイトプラズマのすべてから単離され、そのアミノ酸配列は AY グループ内でよく保存されていることが明らかになった。また他のファイトプラズマの病原性因子が、ファイトプラズマゲノム内の転写性遺伝子クラスターに座乗することと対照的に、*tengu* 遺伝子はゲノム内の重複遺伝子の少ない領域に座乗していた。これらの *tengu* 遺伝子の特徴は、*tengu* 遺伝子が AY グループのファイトプラズマとともに進化してきたと考えるとよく説明できる。

AY グループに属さないファイトプラズマ系統の一部、例えばリンゴなどに感染する *Ca. P. mali* は、てんぐ巣症状をひき起こすことができるものの、*tengu* 遺伝子を保持していない(Kube et al. 2008)。従って、これらのファイトプラズマは TENGU によらないメカニズムで、てんぐ巣症状を誘導していると考えられる。すなわち、ファイトプラズマの感染によって引き起こされるてんぐ巣症状は外見上よく似ているが誘導メカニズムの異なる症状からなるようである。ファイトプラズマ属においててんぐ巣症状を誘導するメカニズムが複数進化していることは、宿主植物においててんぐ巣症状を呈することが、ファイトプラズマの生存に重要であった可能性を示唆している。ファイトプラズマが植物に形態異常を誘導する意義については、媒介昆虫を誘引する作用があるのではないかと推測されている(Hoshi, 2009)。

4.2 TENGU の病原性が宿主因子によって制御されることの意義

本研究では、一過的に発現させた TENGU タンパク質が、植物内においてプロセッシングを受けることを明らかにした。また、TENGU がプロセッシングされることによって生じる産物が病徴誘導に関わるという仮説が示唆された。

植物病原細菌の病原性因子が宿主によるプロセッシングを受ける例として、*Pseudomonas syringae* の AvrRPS4 (Sohn et al. 2009) がある。AvrRPS4 は全長 221 アミノ酸からなる病原性因子であり、TypeIII 分泌機構によって植物細胞質中に分泌された後に切断され、133 アミノ酸の N 末端側断片と 88 アミノ酸の C 末端断片を生じる。AvrRPS4 のプロセッシング能を失った変異体は宿主の抵抗性を抑制することができない。すなわち、AvrRPS4 においても、プロセッシングされることはその病原性の機能に必須である。

また、病原性因子の中には、プロセッシング以外の宿主による翻訳後修飾を受けるものがある。例えば *P. syringae* のエフェクターである AvrPphB の N 末端には脂質修飾モチーフが存在し、

このモチーフ部分が宿主内で脂質修飾されることで AvrPphB が細胞膜上に局在し、同じく膜上に存在する宿主因子を分解する(Dowen et al. 2009)。

このように病原性の発揮に、宿主による翻訳後修飾を必要とする例は少なくない。病原性の発揮に宿主の機構を利用する意義としては、病原性因子が活性をもつ時期や場所を制御している可能性が考えられる。例えば、TENGU は感染植物体内を移動することが示されているが、ファイトプラズマは、TENGU のプロセシングに宿主のプロテアーゼを利用することで、プロテアーゼの発現部位のみで、機能ペプチドが生じるように TENGU の活性を調節しているのかもしれない。

また、あるファイトプラズマ菌株を複数の遺伝型の異なる植物に接種すると、ファイトプラズマのもつ病原性因子に違いがないにも関わらず、宿主によってしばしば異なる病徴を示すことがある(Cettul & Firrao 2011)。この原因としては、宿主の遺伝型により、ファイトプラズマ抵抗性やファイトプラズマの病原性因子のターゲットとなる因子が異なるなどの可能性が考えられる。さらに一つの可能性として、TENGU のプロセシングが起こるかどうか、すなわち宿主がプロセシングプロテアーゼを保持しているかどうかの違いが、宿主による病徴の違いに関与しているのかもしれない。TENGU はシロイヌナズナの粗抽出液によって切断され、さらに *N. benthamiana* においては in vivo で切断されることが確認されたが、このことは TENGU がシロイヌナズナにおいても *N. benthamiana* においても形態異常を誘導することと矛盾しない。

4.3 TENGU と植物のペプチド性因子との比較

TENGU は成熟型タンパク質が 38 アミノ酸からなるペプチドであり、植物の形態形成に影響する病原性因子である。植物においては、内在性のペプチド性因子が形態形成に重要であり、その機能や構造などの特性が解析されている。そこで、以下では本研究で明らかになった TENGU の分子レベルの特徴を、既知の植物内在性のペプチド性因子の特徴と比較する。

植物内在性のペプチド性因子は細胞非自律的に働く CLE や stomagen などの分泌ペプチドと、細胞自律的に働く ROT4、や POLARIS とに大きく分けることができる(松林, 2010)。TENGU は篩部細胞内に分泌されると考えられ、分泌後には細胞外に移行するシグナルを持たないため、通常は細胞内で機能すると予想される。しかし、抗 TENGU 抗体を用いた免疫染色の結果、TENGU は篩部の発達していない茎頂部分にも局在することが示されており、TENGU が細胞外に放出される可能性も否定できない(Hoshi et al. 2009)。また、今回 TENGU が N 末端 11 アミノ酸の機能ドメインを持つ事、その機能ドメインを含む短いペプチドがプロセシングされる

ことが示されたが、これらの特徴は植物のもつ分泌ペプチドにも共通して認められる特徴である(Kondo et al. 2006; Ni & Clark 2006; Ohyama et al. 2009)。また、内在性のペプチド性因子である PSK 前駆体の一つや、RALFL23 は、セリンプロテアーゼである site-1-protease によりプロセシングされる(Srivastava et al. 2008; Srivastava et al. 2009)が、TENGU のプロセシングにもセリンプロテアーゼが関与することが示唆された。このように翻訳後修飾ペプチドに共通して認められる特徴の一部が TENGU にも共通して認められたことは、TENGU ペプチドの作用機構を考える上で興味深い。例えば、植物内在性の分泌ペプチドの一部は、生成する細胞と異なる細胞に受容され、細胞間シグナル分子として機能することが知られている。TENGU もまた篩部細胞内に分泌された後植物の組織間を移動しており、植物の分泌ペプチドと同様に離れた組織に働いているのかもしれない。

4.4 TENGU とセンチュウの CLE エフェクターとの比較

TENGU のほかにも病原体がコードするペプチド性の病原性因子として、植物病原センチュウの持つ CLE エフェクターが知られている。

植物病原センチュウは、植物の根の維管束鞘細胞に口針とよばれる器官を差し込み、生きた細胞から栄養を摂取する絶対寄生性生物であり、寄生した細胞内に口針を介して病原性因子を分泌することによって、寄生細胞の分化運命をかく乱し、寄生に適した細胞へと作り替える(Davis et al. 2000)。植物細胞に分泌されるエフェクター分子を生成する組織から調整した cDNA ライブラリーの解析から、分泌シグナル配列をもつエフェクター候補分子が明らかにされている(Gao et al. 2003)。その一つのエフェクターは機能的な CLE ドメインを持っており、CLE エフェクターと呼ばれている(Wang et al. 2005; Mitchum et al. 2008)。CLE エフェクターは、植物細胞内に分泌された後、何らかのメカニズムで細胞外に移行し、プロセシングを受けたのちに細胞表面の受容体に受容されると考えられている(Guo et al. 2011)。実際に受容体の変異体はセンチュウの感染に抵抗性を示すことから(Replogle et al. 2011)、CLE エフェクターによって植物内在性のシグナル伝達経路をかく乱する寄生戦略をとっていると考えられる。

TENGU と CLE エフェクターを比較すると、TENGU は植物を含めてこれまでファイトプラズマ以外の生物から類似の配列が報告されたことはないことから、植物宿主においても、昆虫宿主においても分子擬態としては働いている可能性は低い。TENGU がどのように形態異常を誘導するのか明らかになれば、植物におけるペプチドの生理活性の新たな知見になると考えられる。

5. 摘要

ファイトプラズマは、昆虫によって媒介される微小な植物病原細菌の一群で、主要作物を含む 700 種以上もの植物の篩部に感染する。ファイトプラズマが感染した植物は、黄化、草丈の萎縮、枝分かれの増加（叢生）、花器官の葉化など、さまざまな特徴的な形態異常を示す。それらの形態異常により、感染植物は成長が阻害され、作物の品質が低下し、収量が減少することから、ファイトプラズマが植物の形態形成に影響する分子機構を明らかにし、その防除法を確立することは重要な課題である。

近年、ファイトプラズマのゲノム解読が完了したことをきっかけに、ファイトプラズマによる病徴の誘導に関わるファイトプラズマの分泌タンパク質の研究が進展を見せている。

Tengu-su inducer (TENGU) はそのひとつであり、植物にてんぐ巢症状（萎縮叢生症状）を誘導する活性を持ち、分泌される領域が 38 アミノ酸からなる低分子タンパク質である。TENGU を植物体内で発現させるとオーキシン初期応答遺伝子群の発現が抑制されることが明らかになっているが、その分子レベルでの機能は不明であり、詳細な作用機構も明らかではない。そこで、本研究では TENGU の作用機構を解明する一助とするため、その性状を解析し、病徴誘導活性との関連を明らかにすることを目的とした。

5.1. TENGU の保存性に関する解析

ファイトプラズマ属は、30 以上の暫定種を含む多様な細菌群であり、系統によって誘導する病徴には多様性が認められる。たとえばてんぐ巢症状はファイトプラズマ感染により共通して誘導される病徴であるが、植物の萎縮・叢生の程度等に系統により違いがある。そこで本研究では、まず植物にてんぐ巢症状を誘導する分泌タンパク質である TENGU が、ファイトプラズマ属内で保存されているか解析し、ファイトプラズマ属における病徴誘導機構の保存性について考察した。

まず、多数のファイトプラズマ系統を収集し、tengu 相同遺伝子の単離を試みた。その結果、はじめに TENGU が単離されたタマネギ萎黄病ファイトプラズマ系統とその近縁な系統を含む AY グループのファイトプラズマについては、供試した 11 系統のすべてから tengu 相同遺伝子が単離された。ウイルスベクターを用いた一過的発現実験により AY グループのファイトプラズマの tengu 相同遺伝子は、全て病徴誘導活性を有する機能的なオーソログであることが示された。一方、AY グループに属さないファイトプラズマ系統については、全塩基配列が解読された *Ca. P. mali* AT 系統および *Ca. P. australiense* PAa 系統のゲノム上には tengu 相同遺伝子は存在せず、近年ゲノムのドラフトシーケンスが解読された 5 系統のファイトプラズマにおいても tengu 相同遺伝子は見いだされなかった。また、AY グループに属さず、ゲノムが解析されて

いない系統からの、*tengu* 相同遺伝子の単離も成功しなかった。すなわち TENGU は AY グループのファイトプラズマにおいては保存された病原性因子であると考えられたものの、ファイトプラズマ属全般では保存されていないことが明らかになった。AY 以外のグループに属する AT, Vacp, JR1p 各系統のファイトプラズマは TENGU を保持しないものの、それぞれリンゴ、ニチニチソウ、ポインセチアにててんぐ巣症状を誘導することが知られていることから、ファイトプラズマ属は TENGU により誘導される経路以外にも、てんぐ巣症状を誘導するメカニズムを有していると考えられる。本研究により、TENGU をコードする *tengu* 遺伝子が AY グループ内で認められ、ファイトプラズマの分子系統樹とその有無が一致することが明らかになった。

5.2. TENGU のプロセッシングに関する解析

TENGU の N 末端シグナル配列を除いた成熟型タンパク質である 38 アミノ酸のうち病徴誘導に重要な配列を解析した。まず TENGU の N 末端側 19 アミノ酸、C 末端側 19 アミノ酸をそれぞれ発現させ病徴誘導活性を調べたところ、N 末端には病徴誘導活性が認められたが、C 末端側には活性が認められなかった。そこで、N 末端部分に着目し、さらに領域を絞り込んだところ、N 末端 11 アミノ酸には病徴誘導活性が認められ、N 末端 10 アミノ酸は活性を示さなかった。すなわち、TENGU の N 末端 11 アミノ酸が病徴誘導活性を有しており、11 残基目が病徴誘導に必要であることが示された。興味深いことに、N 末端 11 アミノ酸を含む短い部分配列は、TENGU の成熟型タンパク質全長よりも高い病徴誘導活性を示した。また、この 11 アミノ酸は機能的なホモログ間でよく保存されており、TENGU における病徴誘導に重要な領域であると考えられた。

植物の形態形成を制御する生理活性ペプチドは、その一部が翻訳後プロセッシングを受けることが知られている。TENGU は部分配列のみで機能することが明らかになったことから、続いて TENGU がプロセッシングされるかどうかを検証した。TENGU の Glutathione-S-Transferase 融合タンパク質を植物のタンパク質と混合して、分解されるかどうかを調べる *in vitro* processing assay を行った結果、TENGU-GST タンパク質の分解が認められた。一方、対照として用いた GST タンパク質は分解されず、TENGU 配列部分が特異的にプロセッシングされることが示された。次いで、切断部位の解析を行った。まず、プロセッシング後の C 末端側断片のペプチドシーケンス解析を行ったところ、TENGU の 13-17 アミノ酸に相当する配列が解読され、TENGU が 12 と 13 番目のアミノ酸の間でプロセッシングされることが示唆された。次いで、プロセッシング後の反応液に含まれる N 末端断片ペプチドの質量分析を行った結果、N 末端の 19 アミノ酸と 21 アミノ酸に相当する質量イオンを示すピークが得られた。以上の結果から、TENGU のプロセッシングは少なくとも 12, 13 アミノ酸の間、19, 21 アミノ酸の間、20, 21 アミ

ノ酸の間の三カ所で起こり、結果として 19 あるいは 20 アミノ酸からなるペプチドが蓄積することが明らかになった。

続いて TENGU のプロセッシングに関わる機構を明らかにするため、プロセッシング活性の阻害実験を行った。その結果、TENGU のプロセッシングは植物粗抽出液を熱処理した場合、およびセリンプロテアーゼインヒビター-PMSF を添加した場合に阻害されたため、TENGU は植物のセリンプロテアーゼによって切断されると考えられた。

In vitro processing assay に用いる植物粗抽出液には、通常液胞などに局在しているペプチダーゼなどが混在していると考えられ、植物内での TENGU と植物との相互作用を完全に再現しているわけではない。そこで、TENGU のプロセッシング現象が植物体内でも起こりうるのかを検証するため、myc-GST-TENGU タンパク質を in planta で発現させた場合に分解するのかを調べた。myc-GST タンパク質を *Nicotiana benthamiana* 内で発現させたところ、予想される分子量のバンドが検出されたが、myc-GST-TENGU タンパク質を発現させた場合には予想される分子量のバンドに加えて、分解産物に相当するやや小さいサイズのバンドが検出された。これらの結果から、TENGU 配列は植物体内でもプロセッシングされることが示された。

また、TENGU のプロセッシングがファイトプラズマ系統間で保存された現象であるのかを明らかにするため、アミノ酸配列の異なるホモログの GST 融合タンパク質を作出し、プロセッシングされるかを解析した。その結果、すべての機能的な TENGU オーソログがプロセッシングされ、TENGU のプロセッシングがホモログ間で保存された現象であることがわかった。

さらに、プロセッシングが TENGU の病徴誘導活性と関連しているかを解析することを目的として、TENGU のプロセッシング部位の一つを挟む 12 番目と 13 番目のアミノ酸に変異を導入した TENGU の変異体 (12AA13) を作出し、病徴誘導活性を解析した。その結果、12AA13 は野生型の TENGU よりも低い頻度で病徴誘導活性を示した。そこで、12AA13 が正常にプロセッシングされているかを解析した。12AA13 の GST 融合タンパク質のプロセッシング効率は野生型の TENGU と差がなかったが、N 末端断片をペプチドを質量分析によって検出したところ、野生型 TENGU と異なり、ピークが検出されなかった。これらの結果から、12AA13 タンパク質はプロセッシングを受けるが、その結果生成する N 末端側ペプチド断片が植物内で蓄積しないと考えられた。12AA13 変異の導入により N 末端側ペプチド断片が不安定になった可能性が考えられる。

本研究の結果、TENGU がファイトプラズマ系統間で保存されることを見出し、TENGU が植物内でプロセッシングされること、N 末端領域がてんぐ巢症状の誘導に重要であることを明らかにした。今後 TENGU およびそのプロセッシングによって生じるペプチドの作用機構が明らかになれば、植物病原体による新たな病原性誘導機構が明らかになると考えられる。

6. 略語一覽

AP	alkaline phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase p-toluidine salt
CBB	coomasie brilliant blue
CLE	CLAVATA/ESR-related
CLV3	CLAVATA3
EPF1	epidermal patterning factor1
GST	glutathione-S-transferase
IPTG	isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MLO	mycoplasma-like organism
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PMU	potential mobile unit
PSK	phytosulfokine
PVDF	polyvinylidene difluoride
RALFL23	rapid alkalization factor like
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SAP	secreted protein of AY-WB phytoplasma
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tat	twin-arginine target
TDIF	tracheary element differentiation inhibitory factor
TFA	trifluoroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

7. 引用文献

- Agrios, G.N. 1997. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. *In* Plant Pathology, 4th, pp. 457-470. Edited by G. N. Agrios. New York: Academic Press
- J. R. Alfano and A. Collmer, "Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense." *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 42, pp. 385–414, Jan. 2004.
- R. Arashida, S. Kakizawa, A. Hoshi, Y. Ishii, H.-Y. Jung, S. Kagiwada, Y. Yamaji, K. Oshima, and S. Namba, "Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma.," *DNA Cell Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 209–17, Apr. 2008.
- X. Bai, V. R. Correa, T. Y. Toruño, E.-D. Ammar, S. Kamoun, and S. a Hogenhout, "AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei.," *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 22, no. 1, pp. 18–30, Jan. 2009.
- X. Bai, J. Zhang, A. Ewing, S. A. Miller, A. J. Radek, D. V Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J. W. Campbell, and S. A. Hogenhout, "Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 188, no. 10, pp. 3682–3696, 2006.
- S. A. Casson, P. M. Chilley, J. F. Topping, I. M. Evans, M. A. Souter, and K. Lindsey, "The POLARIS Gene of Arabidopsis Encodes a Predicted Peptide Required for Correct Root Growth and Leaf Vascular Patterning," *Plant Cell*, vol. 14, no. August, pp. 1705–1721, 2002.
- E. Cettul and G. Firrao, "Physiological and Molecular Plant Pathology Development of phytoplasma-induced flower symptoms in Arabidopsis Thaliana," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 76, no. 3–4, pp. 204–211, 2011.
- P. M. Chilley, S. a Casson, P. Tarkowski, N. Hawkins, K. L.-C. Wang, P. J. Hussey, M. Beale, J. R. Ecker, G. K. Sandberg, and K. Lindsey, "The POLARIS peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling.," *Plant Cell*, vol. 18, no. 11, pp. 3058–72, Nov. 2006.

- N. M. Christensen, K. B. Axelsen, M. Nicolaisen, and A. Schulz, "Phytoplasmas and their interactions with hosts.," *Trends Plant Sci.*, vol. 10, pp. 526–35, 2005.
- W. Chung, L. Chen, W. Lo, C. Lin, and C. Kuo, "Comparative Analysis of the Peanut Witches' -Broom Phytoplasma Genome Reveals Horizontal Transfer of Potential Mobile Units and Effectors," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e62770, 2013.
- W. M. Clemons, J.-F. Ménétret, C. W. Akey, and T. a Rapoport, "Structural insight into the protein translocation channel.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 390–6, Aug. 2004.
- J. M. Cock and S. McCormick, "A Large Family of Genes That Share Homology with CLAVATA3," *Plant Physiol.*, vol. 126, no. July, pp. 939–942, 2001.
- E. L. Davis, R. S. Hussey, T. J. Baum, J. Bakker, A. Schots, M. N. Rosso, and P. Abad, "Nematode parasitism genes," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 38, no. 1, pp. 365–396, 2000.
- M. Dickinson, M. Tuffen, and J. Hodgetts, "Chapter 1 The Phytoplasmas: An Introduction," *Methods Mol. Biol.*, vol. 938, pp. 1–14, 2013.
- R. H. Downen, J. L. Engel, F. Shao, J. R. Ecker, and J. E. Dixon, "A family of bacterial cysteine protease type III effectors utilizes acylation-dependent and -independent strategies to localize to plasma membranes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 23, pp. 15867–79, Jun. 2009.
- K. W. Earley, J. R. Haag, O. Pontes, K. Opper, T. Juehne, K. Song, and C. S. Pikaard, "Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics.," *Plant J.*, vol. 45, no. 4, pp. 616–29, Feb. 2006.
- J. C. Fletcher, "Shoot and floral meristem maintenance in arabidopsis.," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 53, pp. 45–66, Jan. 2002.

- B. Gao, R. Allen, T. Maier, E. L. Davis, T. J. Baum, and R. S. Hussey, "The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*," *Mol. plant-microbe Interact.*, vol. 16, no. 8, pp. 720–726, 2003.
- Y. Guo, J. Ni, R. Denver, X. Wang, and S. E. Clark, "Mechanisms of Molecular Mimicry of Plant CLE Peptide Ligands by the Parasitic Nematode *Globodera rostochiensis*," *Plant Physiol.*, vol. 157, no. 1, pp. 476–84, Sep. 2011.
- K. Hara, R. Kajita, K. U. Torii, D. C. Bergmann, and T. Kakimoto, "The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule.," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 14, pp. 1720–5, Jul. 2007.
- M. Himeno, Y. Neriya, N. Minato, C. Miura, K. Sugawara, Y. Ishii, Y. Yamaji, S. Kakizawa, K. Oshima, and S. Namba, "Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner.," *Plant J.*, vol. 67, no. 6, pp. 971–9, Sep. 2011.
- Y. Hirakawa, H. Shinohara, Y. Kondo, A. Inoue, I. Nakanomyo, M. Ogawa, S. Sawa, K. Ohashi-Ito, Y. Matsubayashi, and H. Fukuda, "Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 39, pp. 15208–13, Sep. 2008.
- S. Hogenhout, K. Oshima, E.-D. Ammar, S. Kakizawa, H. N. Kingdom, and S. Namba, "Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 9, pp. 403–423, 2008.
- A. Hoshi, K. Oshima, S. Kakizawa, Y. Ishii, J. Ozeki, M. Hashimoto, K. Komatsu, S. Kagiwada, Y. Yamaji, and S. Namba, "A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 15, pp. 6416–21, Apr. 2009.
- M. Ikeuchi, T. Yamaguchi, T. Kazama, T. Ito, G. Horiguchi, and H. Tsukaya, "ROTUNDIFOLIA4 regulates cell proliferation along the body axis in *Arabidopsis* shoot.," *Plant Cell Physiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 59–69, Jan. 2011.

- Y. Ito, I. Nakanomyo, H. Motose, K. Iwamoto, S. Sawa, N. Dohmae, and H. Fukuda, "Dodeca-CLE Peptides as Suppressors of Plant Stem Cell Differentiation," *Science* (80-), vol. 313, no. 5788, p. 842, 2006.
- W. Jarausch, M. Lansac, and F. Dosba, "Long-term maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant," *Plant Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 778–786, Aug. 1996.
- S. Kakizawa, K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H. Jung, T. Sawayanagi, T. Tsuchizaki, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba, "Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 14, no. 9, pp. 1043–50, Sep. 2001.
- T. Kondo, S. Sawa, A. Kinoshita, S. Mizuno, T. Kakimoto, H. Fukuda, and Y. Sakagami, "A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis.," *Science.*, vol. 313, no. 5788, pp. 845–8, Aug. 2006.
- M. Kube, J. Mitrovic, B. Duduk, R. Rabus, and E. Seem, "Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism," *Sci. World J.*, vol. 2012, ID185942, 2012.
- M. Kube, B. Schneider, H. Kuhl, T. Dandekar, K. Heitmann, A. M. Migdoll, R. Reinhardt, and E. Seemüller, "The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'." *BMC Genomics*, vol. 9, p. 306, Jan. 2008.
- A. M. MacLean, A. Sugio, O. V Makarova, K. C. Findlay, V. M. Grieve, R. Tóth, M. Nicolaisen, and S. a Hogenhout, "Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants.," *Plant Physiol.*, vol. 157, no. 2, pp. 831–41, Oct. 2011.
- Y. Matsubayashi, "Post-Translational Modifications in secreted peptide hormones in plants," *Plant Cell Physiol.*, vol. 52, no. 1, pp. 5–13, 2011.
- Y. Matsubayashi and Y. Sakagami, "Peptide hormones in plants.," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57, pp. 649–74, Jan. 2006.

- Y. Matsubayashi, L. Takagi, and Y. Sakagami, "Phytosulfokine-alpha, a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 24, pp. 13357–62, Nov. 1997.
- Y. Matsuzaki, M. Ogawa-Ohnishi, A. Mori, and Y. Matsubayashi, "Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*.,," *Science (80- .)*, vol. 329, no. 5995, pp. 1065–7, Aug. 2010.
- M. G. Mitchum, X. Wang, and E. L. Davis, "Diverse and conserved roles of CLE peptides.," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 75–81, Mar. 2008.
- N. N. Narita, S. Moore, G. Horiguchi, M. Kubo, T. Demura, H. Fukuda, J. Goodrich, and H. Tsukaya, "Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*.,," *Plant J.*, vol. 38, no. 4, pp. 699–713, May 2004.
- Y. Neriya, K. Sugawara, K. Maejima, M. Hashimoto, K. Komatsu, N. Minato, C. Miura, S. Kakizawa, Y. Yamaji, K. Oshima, and S. Namba, "Cloning, expression analysis, and sequence diversity of genes encoding two different immunodominant membrane proteins in poinsettia branch-inducing phytoplasma (PoiBI).," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 324, no. 1, pp. 38–47, Nov. 2011.
- J. Ni and S. E. Clark, "Evidence for functional conservation, sufficiency, and proteolytic processing of the CLAVATA3 CLE domain.,," *Plant Physiol.*, vol. 140, no. 2, pp. 726–33, Feb. 2006.
- K. Ohyama, H. Shinohara, M. Ogawa-Ohnishi, and Y. Matsubayashi, "A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*.,," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 578–80, Aug. 2009.
- K. Oshima, Y. Ishii, S. Kakizawa, K. Sugawara, Y. Neriya, M. Himeno, N. Minato, C. Miura, T. Shiraishi, Y. Yamaji, and S. Namba, "Dramatic Transcriptional Changes in an Intracellular Parasite Enable Host Switching between Plant and Insect". *Plos One*, vol.6, e23242. Aug. 2011

- K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, Y. Ishii, A. Hoshi, Y. Hayashi, S. Kagiwada, and S. Namba, "Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 8, pp. 481–489, 2007.
- K. Oshima, S. Kakizawa, H. Nishigawa, H.-Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba, "Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma," *Nat. Genet.*, vol. 36, no. 1, pp. 27–9, 2004.
- K. Oshima, K. Maejima, & S. Namba. "Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas", *Front. Microbiol.*, vol. 4, ID 230, Aug, 2013
- G. Pearce, D. Strydom, S. Johnson, and C. A. Ryan, "A Polypeptide from Tomato Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor protein," *Science.*, vol. 253, no. 5022, p. 895, 1991.
- P. Pracros, J. Renaudin, S. Eveillard, A. Mouras, and M. Hernould, "Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 19, no. 1, pp. 62–8, Jan. 2006.
- A. Replogle, J. Wang, A. Bleckmann, R. S. Hussey, T. J. Baum, S. Sawa, E. L. Davis, X. Wang, R. Simon, and M. G. Mitchum, "Nematode CLE signaling in *Arabidopsis* requires *CLAVATA2* and *CORYNE*.,," *Plant J.*, vol. 65, no. 3, pp. 430–40, Mar. 2011.
- F. Saccardo, M. Martini, S. Palmano, P. Ermacora, M. Scortichini, N. Loi, G. Firrao, V. Vegetale, and S. Cacce, "Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII Printed in Great Britain," pp. 2805–2814, 2012.
- K. H. Sohn, Y. Zhang, and J. D. G. Jones, "The *Pseudomonas syringae* effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function.,," *Plant J.*, vol. 57, no. 6, pp. 1079–91, Mar. 2009.

- R. Srivastava, J.-X. Liu, H. Guo, Y. Yin, and S. H. Howell, "Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis.," *Plant J.*, vol. 59, no. 6, pp. 930–9, Sep. 2009.
- R. Srivastava, J.-X. Liu, and S. H. Howell, "Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis.," *Plant J.*, vol. 56, no. 2, pp. 219–27, Oct. 2008
- G.-E. Stenvik, N. M. Tandstad, Y. Guo, C.-L. Shi, W. Kristiansen, A. Holmgren, S. E. Clark, R. B. Aalen, and M. a Butenko, "The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2.," *Plant Cell*, vol. 20, no. 7, pp. 1805–17, Jul. 2008.
- E. Strauss, "Phytoplasma research begins to bloom," *Science.*, vol. 325, pp. 388–390, 2009.
- S. S. Sugano, T. Shimada, Y. Imai, K. Okawa, A. Tamai, and M. Mori, "Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis," *Nature*, vol. 463, no. 7278, pp. 241–244, 2010.
- K. Sugawara, Y. Honma, K. Komatsu, M. Himeno, K. Oshima, and S. Namba, 2013. "The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic plossessing of the bafcterial peptide TENGU", *Plant Physiology*, vol. 162, pp.2005-2014
- A. Sugio, A. M. Maclean, H. N. Kingdom, V. M. Grieve, R. Manimekalai, and S. A. Hogenhout, "Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 49, pp. 175–195, 2011.
- A. Sugio, H. N. Kingdom, A. M. MacLean, V. M. Grieve, and S. a Hogenhout, "Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 48, pp. E1254–63, Nov. 2011.
- L. T. T. Tran-Nguyen, M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt, and K. S. Gibb, "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., vol. 190, no. 11, pp. 3979–91, Jun. 2008.

L. Valentine and G. M. Crops, "Update on Agrobacterium-Mediated Transformation of Plants Agrobacterium tumefaciens and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics 1," vol. 133, no. November, pp. 948–955, 2003.

X. Wang, M. G. Mitchum, B. Gao, C. Li, H. Diab, T. J. Baum, R. S. Hussey, and E. L. Davis, "A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of Arabidopsis thaliana.," Mol. Plant Pathol., vol. 6, no. 2, pp. 187–91, Mar. 2005.

土居養二、新海 昭、與良 清、明日山秀文 1967. サツマイモてんぐ巢病およびマメ類てんぐ巢病の罹病茎葉に見出される Mycoplasma 様微生物について. 日植病報 33: 344.

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病理学研究室 難波成任教授には、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りましたことに衷心より感謝申し上げます。

また、同研究室の大島准教授、山次准教授、小松助教、前島博士研究員、姫野博士研究員には本研究を推進する上で重要な助言と指導、および本稿の校閲の労をいただきました。謹んで感謝申し上げます。植物病理学研究室並びに植物医科学研究室の博士研究員、学生の皆様、卒業生の皆様には、研究生活並びに学生生活の様々な面でご支援をいただきました。心よりお礼申し上げます。

本研究で用いた pPVX201 は Sainsbury Laboratory の David Charles Baulcombe 博士 (現 University of Cambridge, School of the Biological Sciences, Department of Plant Sciences) より分譲いただきました。また各種ファイトプラズマ感染植物の DNA は Assunta Bertaccini 博士 (University of Bologna, Alma mater studiorum, Patologia Vegetale)、塩見敏樹氏 (中央農研)、西村典夫博士 (鯉淵学園)、宇杉富雄氏 (中央農研)、土崎常男博士 (鯉淵学園) より分譲いただきました。ここに厚くお礼申し上げます。