

博士論文

論文題目 ファイトプラズマのてんぐ巢症状誘導因子 TENGU の
 プロセッシングと病徴誘導能に関する研究

氏 名 菅 原 杏 子

目次

1. 緒言
 - 1.1. ファイトプラズマ属細菌
 - 1.1.1. ファイトプラズマの性状
 - 1.1.2. ファイトプラズマの分類
 - 1.1.3. ファイトプラズマの比較ゲノム解析
 - 1.2. ファイトプラズマの病徴誘導機構
 - 1.2.1. ファイトプラズマ病の病徴
 - 1.2.2. ファイトプラズマの分泌タンパク質
 - 1.3. てんぐ巢症状誘導因子 TENGU
 - 1.4. 植物の生理活性ペプチド
2. TENGU の保存性の解析
 - 2.1. 序文
 - 2.2. 材料と方法
 - 2.2.1. 供試ファイトプラズマ系統
 - 2.2.2. 植物の育成方法
 - 2.2.3. *tengu* 相同遺伝子の単離
 - 2.2.4. 遺伝子の系統解析
 - 2.2.5. ウイルスベクターを用いた一過的発現
 - 2.2.6. ベクター構築
 - 2.2.7. アグロインフィルトレーション法
 - 2.2.7.1. アグロバクテリウムの形質転換
 - 2.2.7.2. アグロインフィルトレーション法
 - 2.3. 結果
 - 2.3.1. *tengu* 相同遺伝子の単離
 - 2.3.2. *tengu* 相同遺伝子における機能の保存性
 - 2.4. 考察
 - 2.4.1. ファイトプラズマにおける病徴誘導機構の保存性
 - 2.4.2. TENGU の由来
3. TENGU 形態異常誘導機能析
 - 3.1. 序文
 - 3.2. 材料と方法

- 3.2.1. 植物の育成方法
 - 3.2.2. ベクター構築
 - 3.2.3. 大腸菌でのタンパク質発現・精製
 - 3.2.4. *in vitro* processing assay
 - 3.2.5. プロテインシーケンス解析
 - 3.2.6. イムノブロット法
 - 3.2.7. 質量分析
 - 3.3. 結果
 - 3.3.1. TENGU の機能部分配列の探索
 - 3.3.2. *in vitro* プロセシングの可能性の検証
 - 3.3.3. 質量分析によるプロセシング産物の特定
 - 3.3.4. *in vitro* プロセシングの特性
 - 3.3.5. 植物体内におけるプロセシングの検証
 - 3.3.6. TENGU アミノ酸置換変異体の形態異常誘導活性
 - 3.3.7. TENGU ホモログタンパク質におけるプロセシングの保存性
 - 3.4. 考察
 - 3.4.1. TENGU プロセシングは3カ所でおこる
 - 3.4.2. プロセシングにはセリンプロテアーゼが関与する
 - 3.4.3. 12AA13 変異体野プロセシングでペプチドが検出されない理由
 - 3.4.4. TENGU プロセシングの意義
 - 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
 - 4.2. TENGU の病原性が宿主によって制御されることの意義
 - 4.3. TENGU と植物の生理活性ペプチドとの比較
 - 4.4. TENGU とセンチュウの CLE エフェクターとの比較
 - 5. 摘要
 - 6. 略語一覧
 - 7. 引用文献
- 謝辞

本論文の内容の一部は Plant physiology 誌 (www.plantphysiol.org) に、“The Alteration of Plant Morphology by Small Peptides Released from the Proteolytic Processing of the Bacterial Peptide TENGU” (Sugawara et al., 2013)として掲載された内容にもとづいており、その著作権は American Society of Plant Biologists に属します。
Copyright American Society of Plant Biologists.

1. 緒言

1.1. ファイトプラズマ属細菌

1.1.1. ファイトプラズマの性状

ファイトプラズマ属 (*Candidatus Phytoplasma spp.*) は、単子葉植物、双子葉植物、木本植物、裸子植物を含む 700 種以上の多様な植物に感染し、1,000 以上の病気を引き起こす、微小な植物病原細菌の一群である。ファイトプラズマは昆虫伝搬性であり、一部のカメムシ目昆虫に細胞内寄生して植物間を伝搬される (図 1.1)。ファイトプラズマは、植物においては光合成産物の通り道である篩部組織のみに局在しており、感染植物の篩管液を吸汁性の昆虫が摂食すると、口針を通して昆虫の中腸に到達する。媒介昆虫においては、昆虫の腸壁から血体腔内にファイトプラズマが侵入して全身感染する。こうしてファイトプラズマを保毒した昆虫が、続いて健全な宿主植物を吸汁すると、ファイトプラズマが唾液とともに植物の篩管内に分泌され、新たな植物への感染が成立する (図 1.1B) (Christensen et al. 2005)。ファイトプラズマの媒介昆虫における経卵感染や、植物における種子感染は殆どおこらないため、自然界における感染の拡大は主に昆虫伝搬によると考えられている (Agrios, 1997)。

ファイトプラズマの感染は、植物の正常な生育を阻害するため、商業作物においては収量の減少や品質の低下を引き起こして農業に被害を与える。また、ファイトプラズマ病は、一度発生すると媒介昆虫によって急速に感染が拡大するため、しばしば発生地に壊滅的な経済的被害を与える。2001 年には、ヨーロッパのリンゴ産地でファイトプラズマ病が多く発生し、ドイツにおいて 2500 万ユーロ、イタリアにおいて 1 億ユーロの経済的損失があったと推定されている (Strauss 2009)。

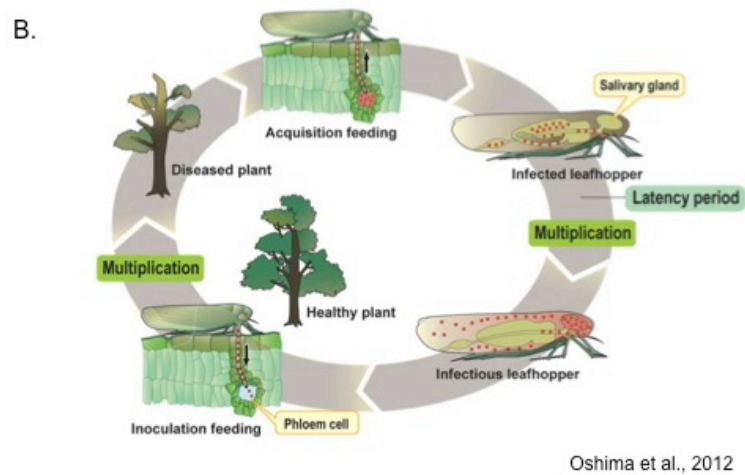
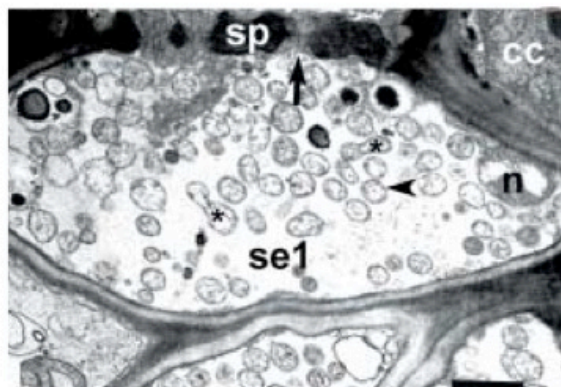


図1.1 ファイトプラズマによる病害

- A. ファイトプラズマに感染したブドウ(左上)ラズベリー(右上)コーンフラワー(左下)とファイトプラズマを媒介するカメムシ目昆虫(右下)。
- B. ファイトプラズマのライフサイクル。ファイトプラズマ感染植物を媒介昆虫が吸汁すると(獲得吸汁: acquisition feeding)、ファイトプラズマが篩管液とともに昆虫の消化管内に入る(上)。その後ファイトプラズマは昆虫の中腸から血体腔内に侵入して増殖し、一定の潜伏期間(latency period)を経て唾液腺(salivary gland)を含む全身に感染する(右上、右下)。ファイトプラズマを保毒した昆虫が新たに健全な植物を吸汁すると(接種吸汁: inoculation feeding)、唾液とともにファイトプラズマが篩管に入り、感染が成立する(左下)。

ファイトプラズマは、ペプチドグリカンなどの細胞壁を持たないため、その菌体は電子顕微鏡下では、一重の細胞膜で覆われた直径 0.2~0.8 μm 程度の球形あるいは不定形として観察される(図 1.2)。ファイトプラズマの存在が初めて確認されたのは、1967年、萎縮黄化症状を示す植物の超薄切片においてであり(土居ら、1967)、当初はその菌体がヒトや動物の病原であるマイコプラズマのものと類似していたことから、mycoplasma-like organism (MLO)と呼ばれた。その後、世界各国で様々な病原不明の植物体から MLO が見いだされ(Nasu, 1967)、系統解析の結果、MLO は *Mollicutes* 網に属し、マイコプラズマ属やアコレプラズマ属と近縁であるが、独立した単系統群を形成する事が明らかになった(Namba et al., 1993)。このため、1994年の国際細菌分類委員会において MLO は「ファイトプラズマ属」と命名される新設の暫定属に分類された。

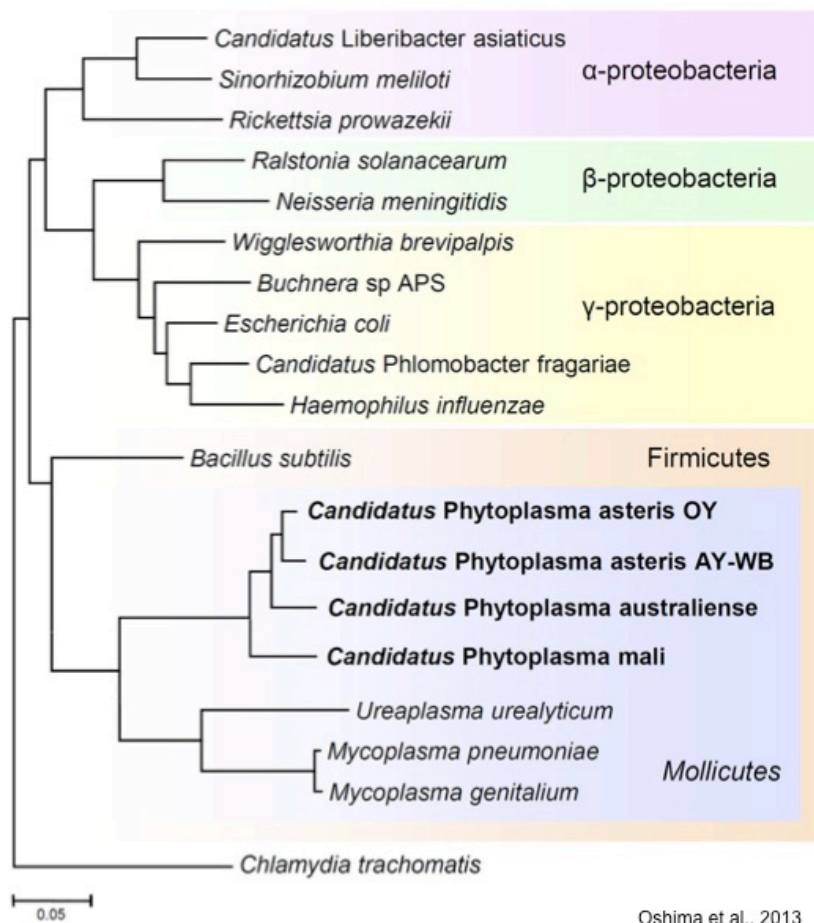
ファイトプラズマ属は系統学的には *Bacillus subtilis* などの GC 含量の低いグラム陽性細菌と近縁であり、*Firmicutes* 門 *Mollicutes* 網に分類される(図 1.3)。*Mollicutes* 網はマイコプラズマ属やスピロプラズマ属など、細胞壁を欠き極めて小さいサイズのゲノムを持つ細菌からなる分類群であり、ファイトプラズマのゲノムも他の *Mollicutes* 網細菌と同様に小さく、約 530-1,350 kb 程度である(Kube et al. 2012)。これは、同じ *Mollicutes* 網のマイコプラズマ属と並び、自律的に複製する生物のうちで最小クラスであるとされる。



Hogehout et al. 2008

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篩部の超薄切片像。
球状もしくは不定形に見えるものがファイトプラズマ菌体である(矢頭、アスタリスク)。cc: 伴細胞、n: 核、se1: 篩要素、sp: 篩板、矢頭: ファイトプラズマ菌体、アスタリスク: 分裂中のファイトプラズマ菌体



Oshima et al., 2013

図1.3 ファイトプラズマの系統学的位置づけ

ファイトプラズマと他の細菌の系統関係を示す。ファイトプラズマ(太字)は、*Bacillus subtilis*などGC含量の低いグラム陽性細菌の一群と同じくFirmicutes門(橙色)に属し、さらにそのなかでもマイコプラズマ属などとともに、Mollicutes綱(青)に属する、独立した単系統群である。系統樹は16SrRNA遺伝子配列に基づき、近隣結合法によって作成した。

1.1.2. ファイトプラズマの分類

現在、ファイトプラズマ属には、26 の暫定種が存在し、2012 年の時点では 32 の暫定種が提唱されている (Kube et al. 2012) (図 1.4)。さらに、ファイトプラズマ暫定種は、種以下の分類として、原宿主および病原性に基づいて系統に分類される (例: タマネギ萎黄病ファイトプラズマ弱毒系統、onion yellows phytoplasma mild strain: OY-M)。データベース上には 1,000 を超えるファイトプラズマ系統が登録されているが、系統の分類に明確な基準はなく、遺伝的に近縁なファイトプラズマが、宿主植物や検出された地域が異なる場合に違う系統として登録されることがある。一方で、類似の病気を引き起こすファイトプラズマ系統が、後に遺伝的に遠縁であることが判明する例もある。例えばココヤシが黄化し枯死に至る病害 coconuts lethal yellowing 病は、アメリカ・カリブ地域と、タンザニアをはじめとするアフリカ地域において発生しているが、それぞれ病原となるファイトプラズマは遺伝的に離れた系統である (Dickinson et al. 2013)。

各ファイトプラズマ暫定種には参照系統が定められており、新たに植物からファイトプラズマが検出された場合、その 16S rRNA 遺伝子の配列と、既存の参照系統の配列とを比較して、種レベルの分類が決定する。すなわち、16S rRNA 遺伝子の類似性が 97.5%以上の参照系統が存在する場合にはその暫定種に分類され、いずれの参照系統と比較しても 16S rRNA 遺伝子の配列類似性が 97.5%を下回る場合には新たな暫定種が提唱される。ただし配列類似性が 97.5%を上回る場合においても、既存のファイトプラズマ種と宿主植物、媒介昆虫、引き起こす病徴などの特徴が大きく異なる場合には例外的に新暫定種とされることもある。これらの暫定種は 16S rRNA 遺伝子配列の系統樹に基づいて、図 1.4 に示すようにグループに分類されている (Hogenhout et al. 2008)。

さらに、上記の分類体系と並行して、ファイトプラズマ属の分類には 16S rRNA 遺伝子の RFLP (restriction fragment length polymorphism) パターンによる方法が広く利用される (Dickinson et al. 2013)。この方法は、ファイトプラズマの 16SrRNA 遺伝子配列の一部を PCR 反応によって増幅し、増幅産物を制限酵素で処理した切断パターンによってファイトプラズマを分類する方法である。RFLP による分類は、配列解読を必要としないため、実験設備が限られた環境でも利用可能である点で優れており、主に植物病診断の現場で利用されている。

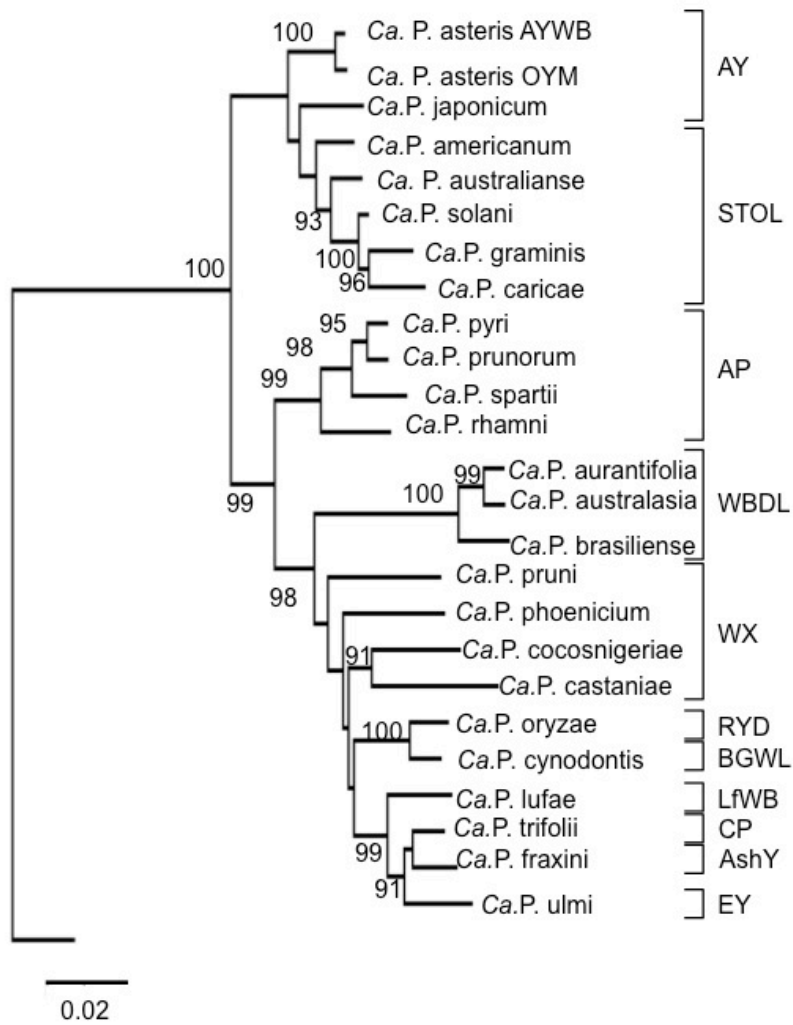


図1.4ファイトプラズマ属の分類

ファイトプラズマ属の代表的な暫定種について、16SrRNA遺伝子に基づく系統関係を示した。系統樹の右には、上位分類である、グループを示した。

1.1.3. ファイトプラズマの比較ゲノム解析

マイコプラズマやスピロプラズマなど、他の *Mollicutes* 網の細菌が人工培地上での純粋培養が可能であるのに対し(Whitcomb, 1983)、ファイトプラズマの純粋培養の試みは成功していない(Kirkpatrick, 1987)。このため、ファイトプラズマに対しては形質転換や変異体の単離といった手法を適用することはできず、分子生物学的研究としては遺伝子配列の解析が主として行われている。2004 年には、はじめてタマネギ萎黄病ファイトプラズマ弱毒株 (OY-M) の全ゲノム配列が解読され(Oshima et al. 2004)、2013 年 8 月現在では、*Ca. P. asteris* (OY-M, AY-WB)、*Ca. P. australiense* (PAa)、*Ca. P. mali* (AT) の 4 つのファイトプラズマ系統の全ゲノム配列解読が終了している (Bai et al. 2006; Kube et al. 2008; Tran-Nguyen et al. 2008)。さらに、次世代シーケンス解読技術を用いた解析により、*Ca. P. pruni* の IchP, PoiBI, VACp, MYp、*Ca. P. australasia* の PnWB の 5 系統について、ゲノムのドラフト配列が解読され、公開されている (Saccardo et al. 2012; Chung et al. 2013)。

表 1.1 ゲノム配列が公開されたファイトプラズマ系統

全配列公開					
種	<i>Ca. P. asteris</i>		<i>Ca. P. australianse</i>		<i>Ca. P. mali</i>
系統	OY-M	AYWB	PAa		AT
サイズ (bp)	860,631	706,569	879,959		601,943
GC量 (%)	27.8	26.9	27.4		21.4
ORF数	754	671	684		479
文献	Oshima <i>et al.</i>	Bai <i>et al</i>	Tran-Nguyen <i>et al</i>		Kube <i>et al.</i>

ドラフト配列公開					
種	<i>Ca. P. pruni</i>				<i>Ca. P. australasia</i>
系統	VAC	MA1	JR1	MW1	NTU2011
サイズ (bp)	647,754	597,245	631,440	583,806	562,473
GC量 (%)	27.4	27.1	27.3	27.5	24.3
ORF数	677	650	654	565	421
文献	Saccardo <i>et al.</i>				Chung <i>et al</i>

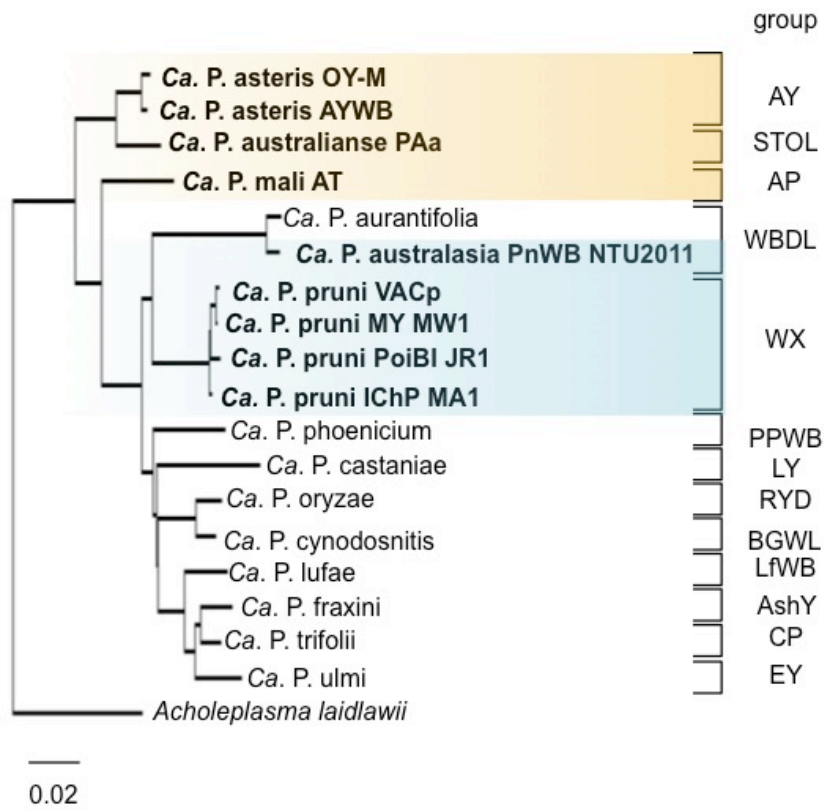


図1.5 ファイトプラズマの比較ゲノム解析

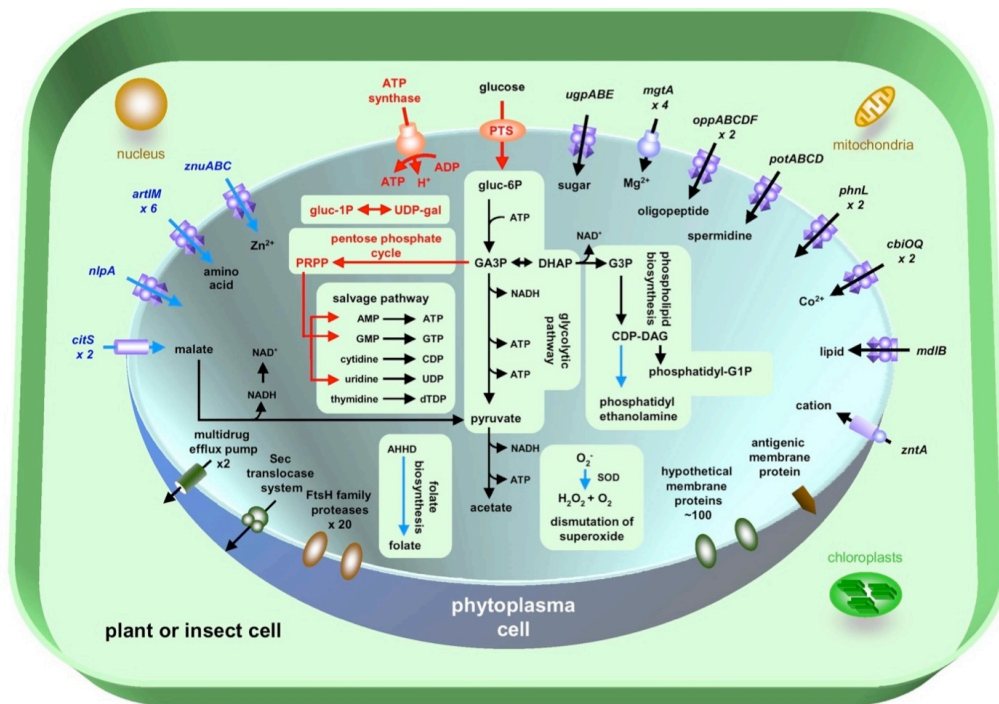
ゲノム解析が行われているファイトプラズマ9系統(太字)の系統関係を、ファイトプラズマの系統樹上に示した。黄色のバックグラウンドは全ゲノム配列が解読された系統を、青のバックグラウンドは、ドラフト配列が解読された系統をそれぞれ示す。系統樹の作成は、外群に*Acholeplasma laidlawii*を用い、近隣結合法で作成した。

上記の 9 系統のファイトプラズマ属細菌のゲノム情報の比較解析が行われた結果 (Kube, 2012; Saccardo, 2012; Chung, 2013)、ファイトプラズマ属細菌は共通して、DNA 合成、転写・翻訳、細胞分裂、細胞膜合成、核酸合成、タンパク質の輸送に関わる基本的な遺伝子を保持している一方で、代謝系関連遺伝子の多くを欠損していることが明らかになっている。

Mycoplasma genitalium は *Bacillus subtilis* に比べて TCA 回路、電子伝達系、アミノ酸合成、脂肪酸合成、コレステロール合成に関与する遺伝子を持っておらず、自律増殖する生物で最少遺伝子を持つと知られている (Razin, 1998)。ファイトプラズマは更に代謝関連遺伝子が少なく、ペントースリン酸回路、ホスホトランスフェラーゼシステム、加えてこれまで生命にとって必須と考えられていた F_1F_0 型 ATP 合成酵素のサブユニットをコードする遺伝子を保持していない。一方で、ファイトプラズマは膜上のトランスポーターを多数有しており、これによって宿主細胞質から必要な栄養分を取り込んでいると予想される (図 1.6) (Oshima et al. 2004)。

このような特徴的なゲノム構成は、ファイトプラズマが特に栄養豊富な植物節部に生息するため、退行的進化により遺伝子の多くを失ったためと考えられる。ファイトプラズマがこれまで人工培養に成功していないことも、これら代謝系関連遺伝子が少ないことに関連しているのではないかと考えられる。

また、ファイトプラズマの持つ代謝系は、系統や暫定種によってやや異なることが近年明らかになっている。例えば、*Ca. Phytoplasma mali* は、解糖系の酵素の一部を失っているが (Kube et al. 2008)、2013 年にゲノムのドラフト配列が公開された PnWB STN 系統は、既知のいずれのファイトプラズマ系統も持っていなかった、クエン酸分解経路の酵素を保持していた (Chung, 2013)。ゲノム解読の進展により、ファイトプラズマ属のもつ代謝経路については、今後さらに多様性が見いだされる可能性がある。



Oshima et al., 2004

図 1.6 ファイトプラズマのもつ代謝系とトランスポーター

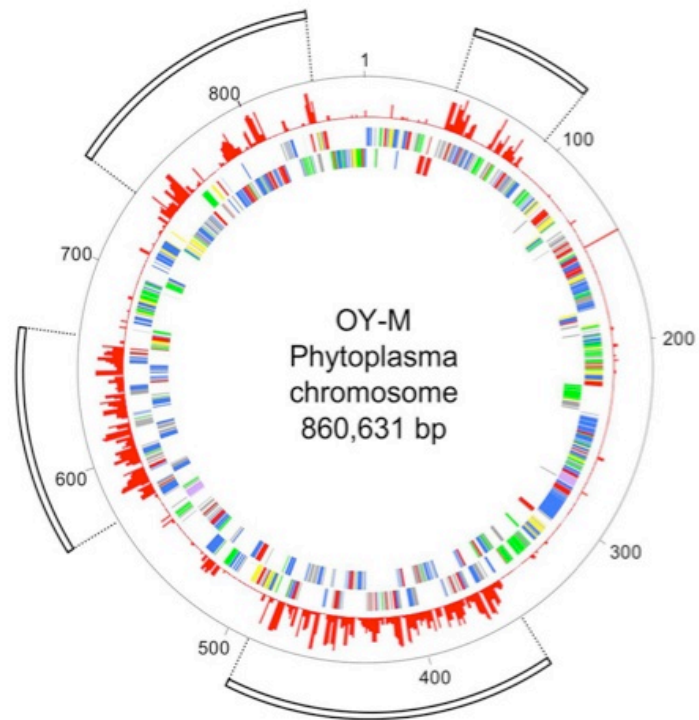
赤字は *Mycoplasma genitalium* に存在するが *Ca. P. asteris* においては欠損している代謝系を、青字は *Ca. P. asteris* が保持し、*Mycoplasma genitalium* にはない代謝系およびトランスポーターを示す

さらに、ファイトプラズマ属のゲノムの特徴として、遺伝子の重複が多い事が挙げられる。*ssb*, *dam*, *tmk*, *hflB*, *uvrD* 遺伝子など、通常細菌のゲノム上に1コピーのみ存在する遺伝子が、ファイトプラズマのゲノム上には多コピー存在し、このような重複遺伝子は OY-M ゲノムの全遺伝子の 18%、全領域の 23%にも及ぶ (表 1.2)。重複遺伝子のゲノム上の分布はランダムではなく、OY-M 系統においては主に 4 カ所の領域に集中している (図 1.7)。その配列にはある程度の規則性が存在し、5' - *fliA* - *ssb* - *himA* - *hflB* . . . *tmk* - *dnaB* - *dnaG* - *tra5* - 3' のような約 10-20 kbp の遺伝子クラスターを形成している場合が多い (Arashida et al. 2008) (図 1.8)。このクラスターは、DNA の複製に関わる遺伝子と転移酵素をコードする *tra5* を含むことから、複製しながらファイトプラズマのゲノム上を転移する、トランスポゾン様の領域ではないかと予想されている。この遺伝子クラスターは、一本鎖 DNA 転移性遺伝子クラスター (potential mobile unit: PMU) と呼ばれ、これまでにゲノム配列の解読が行なわれた全てのファイトプラズマ系統で存在が確認されている (Kube, 2012)。

表 1.2 PMUに含まれる重複遺伝子。

遺伝子	コピー数	機能
<i>tra5</i>	12	転移酵素
<i>dnaB</i>	10	DNAヘリカーゼ
<i>ssb</i>	16	1本鎖DNA結合タンパク質
<i>uvrD</i>	7	DNA, RNAヘリカーゼ
<i>tmk</i>	6	チミジル酸キナーゼ
<i>himA</i>	15	DNA結合タンパク質
<i>dnaG</i>	7	DNAプライマーゼ
<i>dam</i>	4	メチラーゼ
<i>fliA</i>	13	RNA複製酵素 σ サブユニット
<i>hflB</i>	14	ATP依存性Znプロテアーゼ
<i>smc</i>	6	細胞分裂関連タンパク質
<i>sbcC</i>	5	DNA修復に関与するタンパク質

DNA修復・複製 (*dnaB*, *ssb*, *uvrD*, *tmk*, *himA*, *dnaG*, *dam*, *sbcC*)、細胞増殖に関与する遺伝子 (*hflB*, *smc*)、転移酵素(*tra5*)を含む



本間 2010

図1.7 ファイトプラズマのゲノム上に認められる重複遺伝子の分布
 内側の2つの円はOY-Mゲノムのそれぞれプラス鎖とマイナス鎖にコードされるORFを示している。外側の赤い線はそれぞれのORFがゲノム中に何コピーあるかを表しており、外側にいくほどコピー数が多いことを示している。外側の四角は重複遺伝子に富んだ4つの領域を示している。

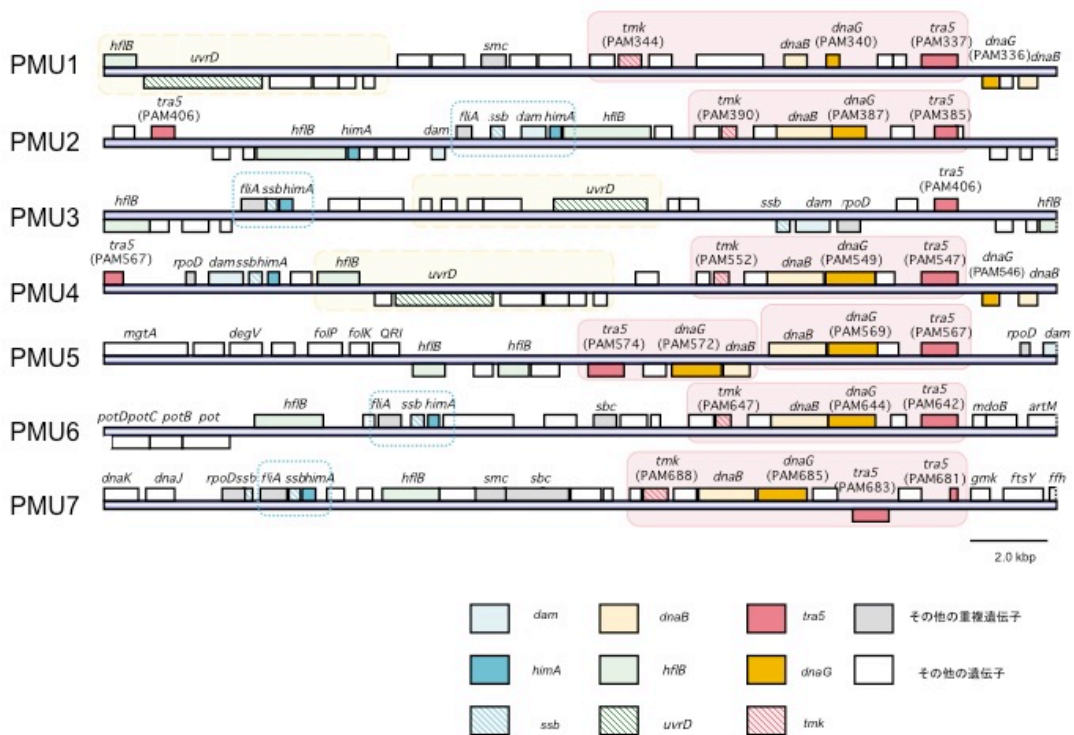


図1.8 OY-Mゲノム上に存在する転移性遺伝子クラスター (PMU)

OY-Mゲノム上に存在する7つのPMUの遺伝子構造を示す。保存された遺伝子構造 *tmk-dnaB-dnaG-tra5*の配列をピンク色、*hflB-uvrD*の配列を黄色、*fliA-ssb-himA*の配列を水色の枠で囲い、それぞれ示した。灰色のボックスはその他の重複遺伝子を、白色のボックスはゲノム上に1コピーの遺伝子を示す。遺伝子機能が既知のものは遺伝子名を示した。

1.2. ファイトプラズマの病徴誘導機構

1.2.1. ファイトプラズマ病の病徴

ファイトプラズマ病の最大の特徴は、宿主植物に形態の異常を伴う病徴を引き起こす点である（図 1.9）。以下、ファイトプラズマ病に特徴的な病徴の例をあげる。

緑化・葉化症状

ファイトプラズマ感染によって、本来花器官を分化する部分に、網目状の葉脈やトライコームなど葉の特性を持つ組織が分化する症状を、（花）葉化症状と呼ぶ。また、花器官が緑色に着色するが組織変化は伴わない場合は、葉化症状と区別して緑化症状と呼ばれる。

つきぬけ 突抜症状

ファイトプラズマ感染植物において、有限成長するはずの花メリステムから、再び栄養成長のシュートが出ることで花の部分から茎が突き抜けて出ているように見える症状を突抜症状と呼ぶ。

てんぐ巣症状

草丈が低くなる萎縮症状と枝分かれが増加するそうせい叢生症状とを併発し、多くの小さい枝が形成される症状。日本では以前よりこの症状は、「てんぐ」の巣になぞらえて、てんぐ巣症状と呼ばれる。

黄化

葉が退緑し、黄色くなる症状。ファイトプラズマ感染植物では篩部が壊死することから、光合成産物の転流が阻害されることが黄化現象の一因であると推測されている(Oshima et al. 2007)。

A.



Takinami et al., 2012

B.



Oshima et al., 2001

図1.9 ファイトプラズマ病の病徴

- A. ファイトプラズマが感染したアジサイ。感染植物全体(左上)と、葉化した花器官(右上)、緑化した花器官(左下)、突抜症状を示す花器官(右下)の拡大図を示す。突抜症状を示す花では、萼と花弁の間から新たな栄養生長性のシュートが伸長している。
- B. ファイトプラズマ感染により黄化・叢生症状を示すシュンギク(右)と健全シュンギク(左)。

ファイトプラズマ感染による形態の変化を示す植物は、その特徴的な外観から、古来より珍重されてきた。近代においても、ファイトプラズマによる形態の変化は植物の鑑賞上の価値を高めるために利用されることがある。たとえば、観葉植物として人気のあるポインセチアの場合、栽培しやすいことなどから草丈が低く、枝分かれの多い形質が好まれており、商業的に取引されるポインセチア品種にはファイトプラズマが感染している(Strauss 2009) (図 1. 10)。

ファイトプラズマが植物の形態形成に影響するメカニズムについては、特に緑化・葉化症状において研究が行なわれており、緑化・葉化した花の組織では、花の形態形成を制御する遺伝子群の発現が変動していることが知られている(Himeno et al. 2011; Pracros et al. 2006)。近年では、さらにゲノム情報を基にした研究によって、ファイトプラズマが植物の生理に影響する具体的なメカニズムが明らかになりつつある。



図1.10 園芸植物におけるファイトプラズマ感染による鑑賞性の向上の例
PoiBIファイトプラズマが感染しているたポインセチア(右)と健全ポインセチア(左)

1.2.2. ファイトプラズマの分泌タンパク質

グラム陰性細菌は、細胞膜（内膜）の外側を薄いペプチドグリカン層と、外膜と呼ばれる膜で覆われている。この膜構造を通過して物質を分泌するために、グラム陰性細菌は Sec システムあるいは Tat (Twin-arginine target) システムの 2 つの膜輸送系と 1 型から 6 型に分類される分泌機構をもっている (図 1.11)。これらの分泌機構のうち、2 型と 5 型の分泌機構は、Sec 系あるいは Tat 系の膜輸送系によって外膜と内膜の間隙に輸送された物質がさらに外膜上の輸送体によって細胞外に分泌される、ツーステップの輸送系である。一方 1 型、3 型、4 型、6 型分泌機構は内膜から外膜まで貫通した分泌装置によって細胞内から細胞外に物質を 1 ステップで輸送するシステムである。グラム陰性の植物病原細菌においては、特に 3 型と 4 型分泌機構によって宿主植物の細胞壁を貫通して宿主の細胞質中に送り込まれる分子が、病原性に重要であるとされている (Alfano & Collmer 2004; Valentine & Crops 2003)。

ファイトプラズマは、多くの植物病原細菌と異なり、グラム陽性の *Bacillus* spp. と比較的近縁である。ファイトプラズマのゲノムにおいては、上述の輸送装置のうち、Sec システムと呼ばれるタンパク質輸送装置をコードする遺伝子群のみ保持されている (Kakizawa et al. 2001; Kube et al. 2012) (図 1.12)。Sec システムはバクテリアに広く保存された、細胞膜上のトランスロカーゼで、真核生物の小胞体膜上に存在する輸送装置に相当する (Clemons et al. 2004)。Sec システムでは、N 末端の疎水性アミノ酸に富むシグナル配列をもつタンパク質が積み荷タンパク質 (cargo protein) として認識されて細胞膜上の輸送装置にリクルートされる。その後、膜上で N 末端のシグナル配列部分が切断されたのち、C 末端側の成熟型タンパク質部分が ATP 依存的に細胞外に輸送される。積み荷タンパク質は、成熟型タンパク質の部分に膜貫通領域をもつ場合は膜上に係留し、膜貫通領域を持たない場合には、細胞膜外の空間、すなわち、グラム陰性細菌においては外膜と細胞膜（内膜）の間のペリプラズムとよばれる空間に分泌される。一方、細胞壁を持たず宿主の篩部細胞内に生息するファイトプラズマにおいては、膜貫通領域を持たない積み荷タンパク質は、宿主の細胞質中に分泌される。そのため、ファイトプラズマの分泌タンパク質は宿主の細胞中で、直接宿主のタンパク質と相互作用する可能性があるため、病原性因子の最有力候補とされている (Bai et al. 2009; Oshima et al. 2004)。

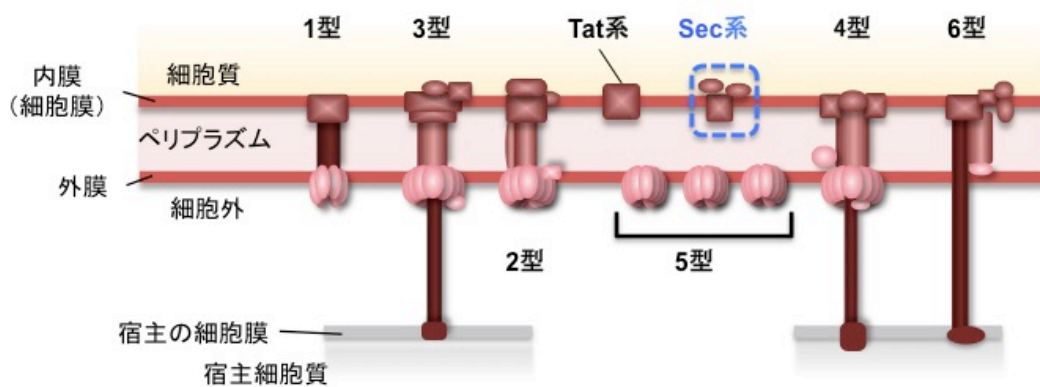


図1.11 一般的なグラム陰性細菌のタンパク質分泌機構
 グラム陰性細菌の表層構造と、1-6型の分泌機構およびSec系とTat(Twin-arginine-target)系の膜輸送系を模式的に示した。特に植物病原細菌においては、3型や4型分泌機構は、宿主の細胞質中に病原性因子を分泌する事に利用される。

実際に、ファイトプラズマの分泌タンパク質を対象とした病原性因子のスクリーニングの結果、病原性因子として働く分泌タンパク質が同定されている。これまでに同定された病原性因子は、OY-M 系統のもつ萎縮叢生症状を引き起こす因子である Tengu-su inducer (TENGU)(Hoshi et al. 2009)、AYWB 系統のもつ縮葉・萎縮叢生症状・媒介昆虫の誘引を引き起こす因子である SAP11 (secreted AYWB protein 11)(Sugio,et al. 2011a)、花の葉化症状・花序の有限性の喪失を引き起こす因子である SAP54(MacLean et al. 2011) の3つである(図 1.13) これらの分泌タンパク質はいずれも、そのシグナル配列を除いた成熟型タンパク質部分をシロイヌナズナや *N. benthamiana* の体内で過剰発現させると、ファイトプラズマ感染時と類似の形態の変化が引き起こされる。

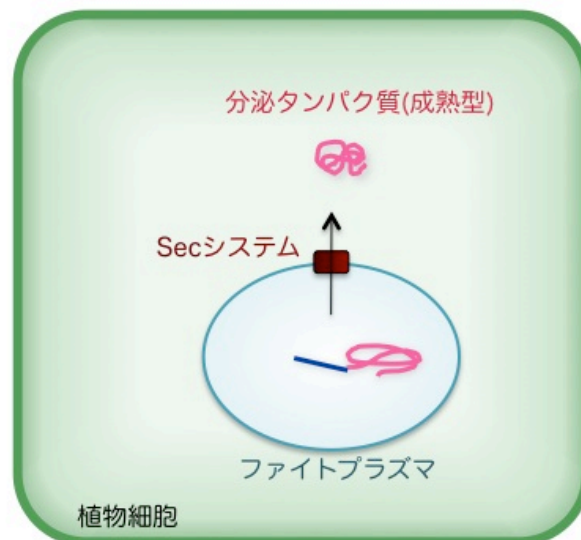


図1.12 ファイトプラズマの病原性因子の分泌機構
 ファイトプラズマの病原性因子分泌機構。Secシステムは細胞膜上に存在し、積み荷タンパク質を細胞内から細胞外へ輸送する分泌機構である。ファイトプラズマは細胞壁を持たず、植物細胞内に寄生しているため、シグナル配列(青線)を持つ分泌タンパク質は、Secシステムにより認識されて、その成熟型(ピンク線)タンパク質が宿主の細胞質中に分泌される。

A.



Hoshi et al. 2009

B.



Sugio et al. 2011

C.



McClean et al., 2012

図1.13 ファイトプラズマの、形態異常誘導に関わる病原性因子
A. TENGU形質転換体(右)はGUS形質転換体(左)と比較して萎縮叢生する
B. SAP11形質転換体(左3個体)は野生型(右)と比較して萎縮叢生する
C. SAP54形質転換体(右2個体)では、花が葉化・緑化する

1.3. TENGU

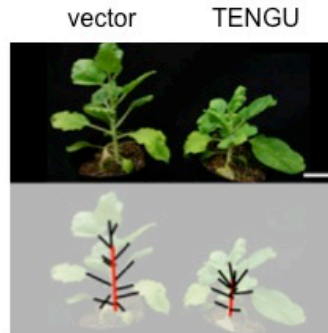
TENGU はファイトプラズマ OY-M 系統のゲノム上にコードされる分泌タンパク質のひとつであり、N 末端に 32 アミノ酸のシグナル配列を含む 70 アミノ酸からなるタンパク質として転写翻訳されたのち、シグナルを除く 38 アミノ酸の成熟型タンパク質が植物体内に分泌され病原性因子として機能する (図 1.14A)。ウイルスベクターを用いて *Nicotiana benthamiana* の全身で TENGU の成熟型タンパク質を発現させると、主茎の生長が抑制されるとともに腋芽が生長して、葉の枚数が増加し、ファイトプラズマ感染植物にみられるてんぐ巢症状のような形態を示す。また、TENGU の成熟型タンパク質をシロイヌナズナに過剰発現させると、ファイトプラズマ感染時に認められる萎縮叢生症状のほか、葉序性の異常や、不稔症状などの形態異常が引き起こされる (図 1.14B, C)。

TENGU を過剰に発現するシロイヌナズナにおけるマイクロアレイ解析の結果、TENGU 発現植物ではオーキシン初期応答遺伝子群が顕著に発現減少していることが明らかになり、TENGU がオーキシンの働きを阻害することが示唆されている (図 1.14D) (Hoshi et al. 2009)。

A.

MVKLKKHKAKLLIFAGFWAILLFLNHNYLIFADQDDDIENVITLIETKENQTEQIKI
 QCQDLLQKGEKDA

B.



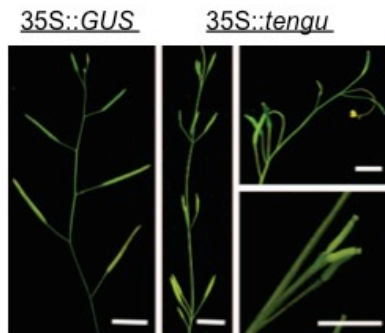
Sugawara et al., 2013

D.

AGI code	Fold change	Category
At4 g32280	28.6	AUX/IAA遺伝子
At3g23050	2.5	
At3 g53250	10.8	SAUR遺伝子
At4g38850	9.1	
At1 g75590	8.3	
At5g18010	7.8	
At5 g18080	6.8	
At5g18060	6.5	
At5 g18030	6.5	
At1g29460	6.2	
At5 g18050	6.0	
At5g18020	5.5	
At5 g03310	5.4	
At1g29500	3.8	
At1 g29450	3.6	
At1g29440	2.9	
At1 g29510	2.8	
At3g03850	2.4	
At4 g27260	3.3	GH3遺伝子
At5 g19140	3.9	その他

Hoshi et al., 2009

C.



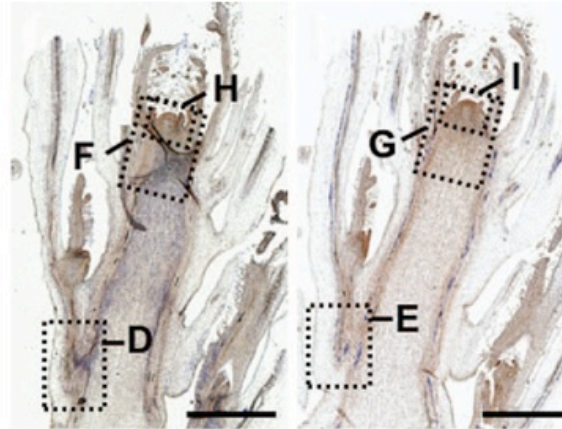
Hoshi et al., 2009

図1.14 TENGUによる病徴の誘導

- TENGUのアミノ酸配列。シグナル配列(下線)を含む70アミノ酸として転写翻訳され、その後シグナルを除くC末端部分が植物細胞質中に分泌される
- ウイルスベクターによりTENGUを発現させた*N. benthamiana*が示す萎縮叢生症状
- TENGUを形質転換したシロイヌナズナにおける形態の異常。葉序の異常(中央・右上)や二股の鞘が見られる(右下)
- TENGUを形質転換したシロイヌナズナにおいて発現が減少するオーキシン初期応答遺伝子。右に遺伝子機能を示した。

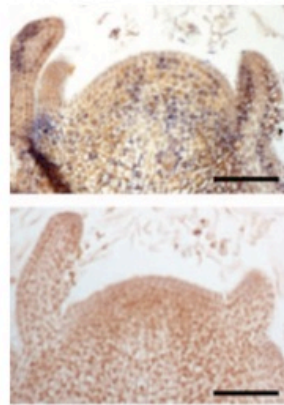
ファイトプラズマ感染植物における免疫組織化学的解析の結果、TENGU は、ファイトプラズマ菌体の局在の指標となる Amp タンパク質の局在が認められない部位からも検出されたことから、TENGU がファイトプラズマから分泌されたのち、植物体内を移動すると考えられた (図 1.15)。また、植物の形態形成を司る茎頂分裂組織においては、ファイトプラズマは存在しないものの、TENGU が局在していることが確認された。このことから TENGU がファイトプラズマから分泌された後に植物体内を移動して、オーキシンの働きを抑制することによって、てんぐ巢症状を引き起こすモデルが提唱された。

A.



Hoshi et al., 2009

B.



Hoshi et al., 2009

図1.15 TENGUの局在解析

- A. 青のシグナルがファイトプラズマ感染シュンギクにおけるTENGU(右)あるいはファイトプラズマの膜タンパク質であるAmp(左)の局在を示す。Amp(右)のシグナルはファイトプラズマの局在を示すと考えられる。TENGUはファイトプラズマが検出されない髄からも検出される。
- B. AのH(上)、I(下)部分の拡大図。青のシグナルがファイトプラズマ感染植物の茎頂部分におけるTENGUの局在を示す(上)。ファイトプラズマの局在を示すAmpのシグナルは茎頂部分では認められない(下)。

1.4 植物の生理活性ペプチド

近年、植物において多くの生理活性ペプチドが単離され、ペプチドがさまざまな生理現象に関わることが明らかになっている(Matsubayashi 2011; Matsubayashi & Sakagami 2006)。表 1.3 は、2013 年 9 月の時点で機能が明らかになっているペプチドを示している。なお、植物の生理活性ペプチドは、配列相同性を示す遺伝子ファミリーにコードされることが多いことから、そのようなファミリーについては代表的なメンバーについて詳細な情報を示した。

これまでに単離された生理活性ペプチドは機能・構造ともに多様であるが、特にシグナル配列を持つ前駆体の形で転写翻訳され、アポプラストに放出されるペプチドの一群は、細胞間情報伝達を媒介するシグナル因子として重要であることが明らかになってきていることから、シグナル配列を持たないペプチドと区別して扱われる。分泌ペプチドの例としては、篩部で発現し、近接する前形成層細胞の導管への分化を阻害する 12 アミノ酸のペプチド *tracheary element differentiation inhibitory factor (TDIF)*(Ito et al. 2006; Hirakawa et al. 2008)や、茎頂の L1 層で発現し、より内層にある幹細胞の分化を阻害する 13 アミノ酸のペプチド *CLAVATA3 (CLV3)* (Fletcher 2002; Ohyama et al. 2009)、葉肉細胞で発現し表皮細胞の気孔への分化を促進するペプチドである *stomagen*、表皮細胞で発現し、ホモログである *stomagen* と競合的に表皮細胞の気孔への分化を負に制御する *epidermal factor patterning factor 1 (EPF1)* (Hara et al. 2007; Sugano et al. 2010)などがある。

これらの分泌ペプチドは、特に保存されたアミノ酸配列などはもたないものの、構造の共通性に基づいて大きく 2 つのグループに分類される。

第一のグループは、100 アミノ酸程度の比較的大きな前駆体タンパク質の形で翻訳された後に、プロセッシングを受けて 20 アミノ酸以下の短いペプチドになるグループである。このグループには、TDIF や CLV3 などが含まれ、プロセッシングのほかにも糖鎖修飾やチロシンの硫酸化、プロリンのヒドロキシ化など、分泌の過程で様々な翻訳後修飾を受けることが知られている(Matsubayashi et al. 1997; Ohyama et al. 2009; Matsuzaki et al. 2010)。さらにこのグループのペプチドの特徴として、前駆体タンパク質間ではアミノ酸保存性が低いものの、プロセッシングを受けて生成する機能型ペプチド部分のみで高い配列保存性を示す遺伝子ファミリーを形成することがあげられる(Matsubayashi 2011; Cock & McCormick 2001)。例えば CLV3 と TDIF はいずれも *CLAVATA/ESR-related (CLE)* と呼ばれる、シロイヌナズナにおいては 32 遺伝子からなる遺伝子ファミリーのメンバーにコードされており、CLE 遺伝子ファミリーのメンバーは、CLE ドメインと呼ばれる C 末端の 14 アミノ酸の領域のみが保存された前駆体タンパク質として転写翻訳される。TDIF, CLV3 においては、CLE ドメインのみで機能をもつこと、それ

ぞれ CLE ドメイン内の 12 あるいは 13 アミノ酸がプロセッシングによって切り出されて働くことが明らかになっている(Ni & Clark 2006; Ohyama et al. 2009)。

第二のグループは、保存された偶数個のシステイン残基をもち、これらがジスルフィド結合を形成して分子内架橋構造を取るグループである。これらには、*stomagen* や *EPF1* が含まれる。なお、動植物に保存された抗菌物質であるディフェンシン類 (*A. thaliana* における *PDF1.2* など) は、シグナル配列を持ち、植物においては 8 個のシステイン残基間で分子内架橋構造をとるが、抗菌物質として微生物の細胞膜に作用する機能を持つことが明らかであり、植物体内で他の細胞の膜上にある受容体に作用して細胞間シグナル伝達を媒介する分泌ペプチドとは、区別して扱われることがある(Matsubayashi 2011)。

また、シグナル配列を持たない生理活性ペプチドをコードする遺伝子も知られている。そのひとつに、プロモータートラップ解析で、根で特異的に発現する遺伝子として単離された *POLARIS(POL)* がある(Casson et al. 2002; Chilly et al. 2006)。*POL* はシグナル配列を持たない全長 36 アミノ酸の短いタンパク質をコードしており、オーキシンなどの植物ホルモンの応答性に関わることで、根の形態形成に関与していると考えられている。またその他のペプチドをコードする遺伝子に *ROTUNDIFOLIA4(ROT4)* がある。*ROT4* の機能獲得型変異体は葉の形態が異常になることから、葉の形態形成に関わると考えられる。*Arabidopsis thaliana* において *ROT4* 遺伝子は配列の類似する 23 遺伝子が見いだされており、これらは遺伝子ファミリーを形成している(Ikeuchi et al. 2011; Narita et al. 2004)。

さらに、シグナル配列を持たない生理活性ペプチドに *systemin* がある(Pearce et al. 1991)。*systemin* は防御関連遺伝子発現誘導活性を指標としてトマトの導管液から単離されたペプチドであり、全長アミノ酸からなる前駆体としてコードされ篩部柔細胞で発現する。*systemin* は 18 アミノ酸からなるタンパク質が細胞外液から単離されていることから、細胞外で働いていると考えられるが、その前駆体がシグナル配列を持たないことから、どのような機構で分泌されているのかは不明である。

このように現在では植物においても多数の生理活性ペプチドが単離解析されており、アミノ酸配列レベルでは相同性の認められないペプチド間でも、構造の特徴や作用機構に一定の共通性が存在することが明らかになっている。ファイトプラズマの病原性因子である *TENGU* はペプチドであり、オーキシン応答を抑制することで植物の形態形成に影響することが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、*TENGU* の作用機構の解明をめざすための基礎的知見として、*TENGU* の分子レベルの性状を解析し、植物の既知の生理活性ペプチドとの共通点・相違点を考察した。