

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成23年度博士課程進学
氏名 菅原 杏子
指導教員名 難波 成任

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

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。

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（病徴に「衰弱」という言葉を使います？）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、ポインセチアにてんぐ巢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、てんぐ巢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。

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シングされることが示された。

また、TENGU のプロセ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シングされ、TENGU のプロセ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 が植物内でプロセシングされること、N 末端領域がてんぐ巣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。