

博士論文

ファイトプラズマの主要抗原膜タンパク質
および接着因子に関する研究

煉谷 裕太郎

目次

第 1 章	6
緒論	
1.1. 植物の病気	6
1.2. ファイトプラズマ	7
1.2.1. 病徴および性状	7
1.2.2. 伝搬様式	9
1.2.3. ファイトプラズマ (マイコプラズマ様微生物) の発見	10
1.2.4. 系統学的分類	11
1.2.5. ゲノム解読	14
1.2.6. 分泌タンパク質	18
1.2.7. 膜タンパク質	21
第 2 章	24
poinsettia branch-inducing ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質の解析	
2.1. ポインセチア	24
2.1.1. 特徴	24
2.1.2. 形態とファイトプラズマの関係	25
2.1.3. 感染するファイトプラズマに関する知見	26
2.2. 材料および方法	27
2.2.1. 供試ポインセチア	27
2.2.2. ファイトプラズマ DNA の抽出	27
2.2.3. アミノ酸配列の解析と系統樹の作成	29
2.2.4. 適応進化の検出	30
2.2.5. PoiBI- <i>imp</i> と PoiBI- <i>idpA</i> のクローニング	31
2.2.6. PoiBI- <i>Imp</i> と PoiBI- <i>IdpA</i> の発現、精製、抗体作出	33
2.2.7. ウェスタンブロット解析	35
2.2.8. 免疫組織化学的解析	36

2.3. 結果	38
2.3.1. PoiBI ファイトプラズマの検出	38
2.3.2. PoiBI- <i>imp</i> と PoiBI- <i>idpA</i> の配列解読と局在推定	39
2.3.3. 品種の違いによる PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA の多様性	40
2.3.4. PoiBI と WX ファイトプラズマが保持する遺伝子の比較解析	42
2.3.5. <i>imp</i> 遺伝子および <i>idpA</i> 遺伝子の適応進化の検出	44
2.3.6. 大腸菌における PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の発現および精製	45
2.3.7. ウェスタンブロット解析	47
2.3.8. 免疫組織化学的解析	49
2.4. 考察	50
2.4.1. PoiBI ファイトプラズマの主要な膜タンパク質	50
2.4.2. ポインセチアからの PoiBI ファイトプラズマの検出	52
2.4.3. PoiBI と WX ファイトプラズマの比較	53
2.4.4. <i>P. pruni</i> の主要表面膜タンパク質の進化的考察	53
第 3 章	55
ファイトプラズマの接着因子候補 P38 の解析	
3.1. 細菌の接着因子	55
3.2. 材料および方法	56
3.2.1. 供試植物および昆虫	56
3.2.2. ファイトプラズマに共通して認められる P38 遺伝子のクローニング	56
3.2.3. P38 のクローニングおよび P38 の発現・精製・抗体作出	58
3.2.4. ウェスタンブロット解析	60
3.2.5. ドットブロット・ファーウェスタン解析	60
3.2.6. 酵素抗体結合試験	61
3.3. 結果	63
3.3.1. P38 の同定	63
3.3.2. P38 オルソログの配列解析	64
3.3.3. 大腸菌における P38 の発現および精製	66

3.3.4. ウェスタンブロット解析	67
3.3.5. ドットブロット・ファーウェスタン解析	68
3.3.6. 酵素抗体結合試験	69
3.4. 考察	72
3.4.1. マイコプラズマやスピロプラズマの接着因子との共通性	72
3.4.2. 宿主内で発現している P38 タンパク質	72
3.4.3. P38 の宿主内における発現変動	73
第 4 章	74
総合考察	
4.1. 主要表面膜タンパク質の進化	74
4.2. 接着因子と宿主との相互作用	76
4.3. まとめ	76
摘要	78
参考文献	82
謝辞	92

図表目次

図 1.1.	植物病による減収	6
図 1.2.	ファイトプラズマに感染した植物の特徴的な病徴	8
図 1.3.	ファイトプラズマの電子顕微鏡写真	9
図 1.4.	ファイトプラズマの生活環	10
図 1.5.	ファイトプラズマの系統学的位置	12
図 1.6.	ファイトプラズマの系統樹	13
図 1.7.	ファイトプラズマの染色体地図	15
図 1.8.	ファイトプラズマとマイコプラズマの膜輸送系・代謝系の比較	16
図 1.9.	TENGU, SAP11 により萎縮・叢生症状を呈する植物	19
図 1.10.	SAP54, PHYLL1 により葉化症状を呈する植物	20
図 1.11.	ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質	23
図 2.1.	FB 型および RB 型のポインセチア	25
図 2.2.	WX ファイトプラズマの <i>imp</i> 遺伝子と <i>idpA</i> 遺伝子を含むゲノム領域	26
図 2.3.	ポインセチアの形態比較	38
図 2.4.	PoiBI ファイトプラズマの <i>imp</i> 遺伝子と <i>idpA</i> 遺伝子を含む領域	40
図 2.5.	PoiBI および WX ファイトプラズマの Imp のアミノ酸アラインメント	41
図 2.6.	PoiBI 分離株および WX ファイトプラズマの Imp のアミノ酸配列を用いて作成した系統樹	42
図 2.7.	IdpA (A) および DnaD (B) のアミノ酸アラインメント	43
図 2.8.	抗体作成のために設計したコンストラクト	46
図 2.9.	PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA タンパク質の大量発現	47
図 2.10.	大量発現させた PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA-N の精製	47
図 2.11.	ウェスタンブロット解析による PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の検出	48
図 2.12.	免疫組織化学的手法による PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA タンパク質の検出	49
図 2.13.	大腸菌発現の抗原に対する抗体の反応性	51
図 2.14.	希釈した DNA を鋳型に行った PCR 産物の泳動	52
図 3.1.	本章で実験に用いた植物の病徴およびヨコバイの写真	57
図 3.2.	MAM 領域を持つ P40, P89, P38 タンパク質の模式図	63
図 3.3.	P38 オルソログのアラインメント	65
図 3.4.	P38 タンパク質の大量発現	66
図 3.5.	大量発現させた P38 の精製	67

図 3.6.	OY ファイトプラズマ感染宿主における P38 タンパク質のウェスタンブロット解析	68
図 3.7.	ドットブロット・ファーウェスタン解析	69
図 3.8.	変異導入した P38 タンパク質の模式図	70
図 3.9.	酵素抗体結合試験に用いたタンパク質の泳動	70
図 3.10.	酵素抗体結合試験の結果	71
図 4.1.	主要表面膜タンパク質の変遷モデル	75
表 1.1.	全ゲノム解読されたファイトプラズマ	17
表 1.2.	ドラフトゲノム配列が報告されたファイトプラズマ	17
表 2.1.	解析に供試したポインセチア品種と PoiBI ファイトプラズマの感染検査結果	28
表 2.2.	PoiBI ファイトプラズマ遺伝子の解読に用いたプライマー配列	30
表 2.3.	Imp および IdpA タンパク質の大量発現のクローニングに用いたプライマー配列	33
表 2.4.	<i>dnaD</i> および <i>idpA</i> 遺伝子の PoiBI vs WX の d_N/d_S 値と <i>P</i> 値	45
表 2.5.	<i>imp</i> 遺伝子の PoiBI 分離株 vs WX の d_N/d_S 値と <i>P</i> 値	45
表 2.6.	<i>idpA</i> 遺伝子の各系統間の d_N/d_S 値と <i>P</i> 値	54
表 2.7.	<i>imp</i> 遺伝子の各系統間の d_N/d_S 値と <i>P</i> 値	54
表 3.1.	P38 遺伝子オルソログの解析に用いたプライマー	58
表 3.2.	P38 タンパク質発現に用いたプライマー	59
表 3.3.	P38 オルソログ全長アミノ酸の配列同一性	64

第 1 章

緒論

1.1. 植物の病気

自然界に存在する植物は、常に植物病に罹る環境にさらされており、植物が生育不良・阻害を受けることを総称して植物病と呼ぶ (難波、2008)。植物病は病原体が原因の伝染性のものと、病原体以外が原因の非伝染性のものに大別される。非伝染性の中には、生物的障害 (雑草、寄生性高等植物)、化学的障害 (土壌栄養、汚染物質、農薬)、物理的障害 (光、温度、水分) などがあり、生理病・生理障害などと呼ばれることもある。伝染性の病気の主な原因は病原体であり、菌類、細菌、ウイルス、ファイトプラズマ、ウイロイドなどが知られている。これらの原因により病気に罹った植物は、生育不良だけでなく、時には早期に枯死することや、他の健全な植物への感染源となることがある。また、病原体では無いが雑草や寄生性高等植物による栄養の競合、昆虫やダニによる吸汁害および食害も植物に大きな被害をもたらす原因の一つであり、昆虫やダニによって病原体が伝搬されることも少なくない (眞山、2010)。

植物病は食料生産量の減収や農作物の品質低下を引き起こす。世界の人口は年々増加しているが、現在においても飢餓に苦しむ人の数は少なくない。一方で農作物を耕すための耕地面積の増加は見込めない。そのため、単位面積当たりの収量を増加させる必要があり、その方法の一つとして植物病の被害を抑えることが考えられている。世界で生産される作物のうち約 36%が微生物病や生理病、害虫病、雑草害などの植物病によって失われていると推定されており、この割合を少なくすることが収量増加の手段の一つとして期待されている (難波、2008; 図 1.1.)。

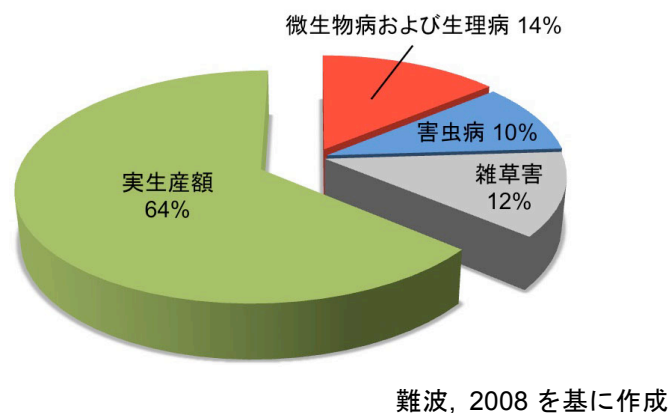


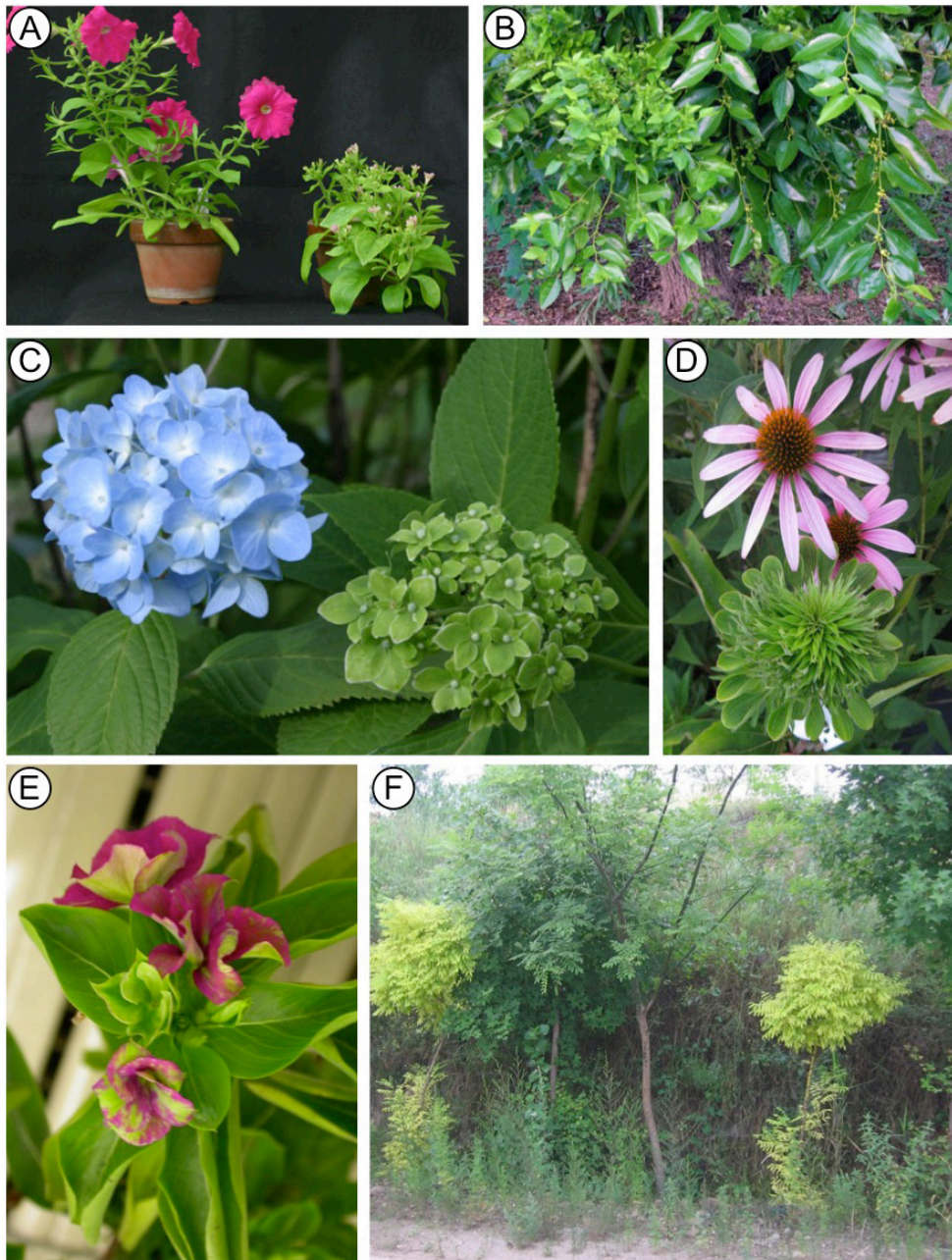
図 1.1. 植物病による減収
世界で可能な作物生産額を 100%とした時の各推定割合。

1.2. ファイトプラズマ

1.2.1. 病徴および性状

ファイトプラズマ (phytoplasma) は植物の篩部細胞内に寄生し、感染した植物に様々な病徴を引き起こす植物病原細菌である。ファイトプラズマは数百種以上の穀物、野菜、果樹や観葉植物を含む植物に感染する (Lee *et al.*, 2000)。ファイトプラズマに感染した植物は背丈が低くなる「萎縮」、枝分かれが多くなる「叢生」、花器官が形成されるべき箇所に葉が出来る「葉化」、花器官からさらに栄養成長が起こる「突き抜け」、葉や茎が赤紫色へ変色する「パープルトップ」、植物内の栄養を収奪することによって全体が黄色に変色する「黄化」、篩部の壊死など様々な病徴を呈する (Maejima *et al.*, 2014b; 図 1.2.)。ファイトプラズマによって引き起こされる農業への経済的被害は大きく、2001 年にはリンゴ栽培においてドイツで 2500 万ユーロ (当時のレート換算で約 28 億円)、イタリアで 1 億ユーロ (同、約 110 億円) の損失が報告されている (Strauss, 2009)。

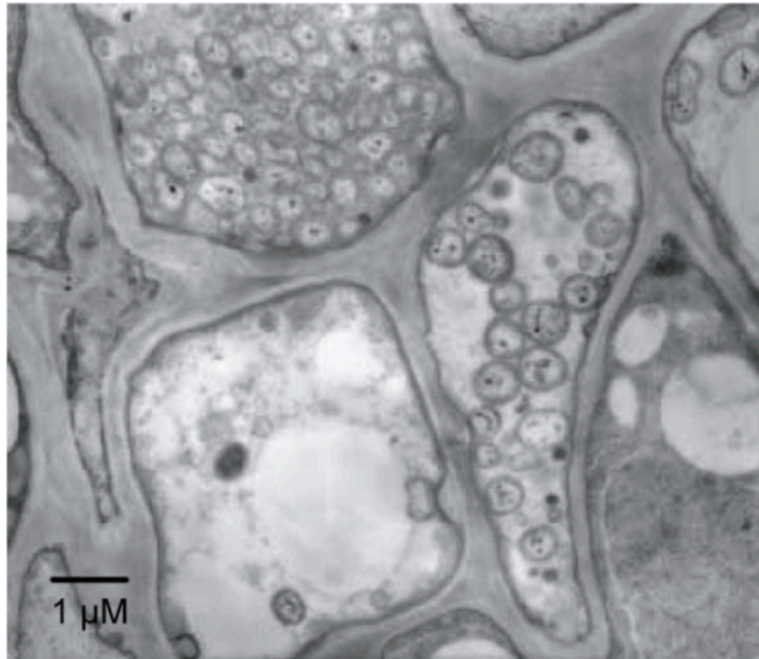
ファイトプラズマは植物の篩管および篩部柔細胞内に局在し、約 0.08~0.8 μm の不定形粒子構造をとり、細胞壁を持たず、厚さ約 8 nm の脂質二重膜からなる細胞膜に包まれている (土居ら、1967; 図 1.3.)。また、マイコプラズマ (mycoplasma) や、ファイトプラズマと同じく植物に対して病気を引き起こすスピロプラズマ (spiroplasma) では、人工的に作成した培地で培養可能な種が存在する (Chanock *et al.*, 1962; Whitcomb, 1983) が、ファイトプラズマの人工培養は困難である。



A: Himeno *et al.*, 2011、B,C: Maejima *et al.*, 2014b、D,E,F: Bertaccini & Duduk, 2009

図 1.2. ファイトプラズマに感染した植物の特徴的な病徴

- A: ファイトプラズマに感染して萎縮症状を呈するペチュニア（右）
- B: 萎縮・叢生症状を呈するナツメ（左）
- C: 葉化症状を呈するアジサイ（右）
- D: 葉化症状を呈するムラサキバレンギク（下）
- E: 緑化症状を呈するニチニチソウ
- F: 黄化症状を呈するシダレエンジュ



Oshima *et al.*, 2013

図 1.3. ファイトプラズマの電子顕微鏡写真

ファイトプラズマに感染した植物の篩部における電子顕微鏡写真。0.08~0.8 μm の多形性粒子がファイトプラズマであり、健全な植物の篩部ではこのような粒子の観察は認められない。

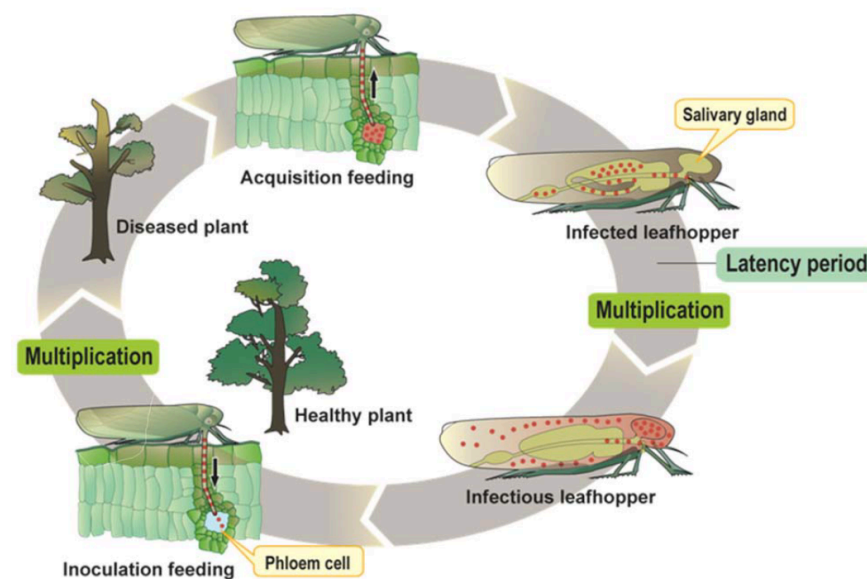
1.2.2. 伝搬様式

ファイトプラズマは自然界において、ヨコバイやウンカ、キジラミなどの昆虫によって伝搬される (Weintraub & Beanland, 2006)。ファイトプラズマは種や系統によって媒介可能な昆虫が決まっており、媒介昆虫の特異性は高いが、多くのファイトプラズマにおいて、媒介昆虫は未特定である。

ファイトプラズマに感染した植物を媒介昆虫が吸汁すると、吸汁した昆虫の消化器官をファイトプラズマが吸汁液の流れに乗って移行する。中腸に移行したファイトプラズマは、腸管内腔から腸管上皮細胞内に入り、基底板を横切って血体腔に移行する。昆虫体内に侵入した後は、血体腔やさまざまな器官の細胞内で増殖しながら移行し、唾液腺を含む昆虫体内全体にファイトプラズマが感染する。そして、ファイトプラズマに全身感染した昆虫が健全植物を吸汁すると、唾液腺内にいるファイトプラズマが唾液と共に口針を通じて健全植物の篩管細胞に注入され、新たな植物に感染を拡大させる (図 1.4.)。

昆虫に依らない伝搬には、寄生性植物であるネナシカズラ (*Cuscuta* spp.) の寄生によ

るものがある。ファイトプラズマが感染した植物に寄生したネナシカズラが、ファイトプラズマに非感染の植物にも寄生することでファイトプラズマが伝搬される。また、人の手が加わった伝搬の方法としては接ぎ木による伝搬がある。ファイトプラズマに感染した植物を接ぎ穂、非感染の植物を台木として接ぎ木を行った場合、接ぎ穂から台木植物にファイトプラズマが伝搬し、新たにファイトプラズマに感染した植物が生じる。



Oshima et al., 2011

図 1.4. ファイトプラズマの生活環

媒介昆虫への獲得吸汁後、ファイトプラズマは1~2週間の潜伏・増殖期間を経て接種吸汁が可能になる。

1.2.3. ファイトプラズマ (マイコプラズマ様微生物) の発見

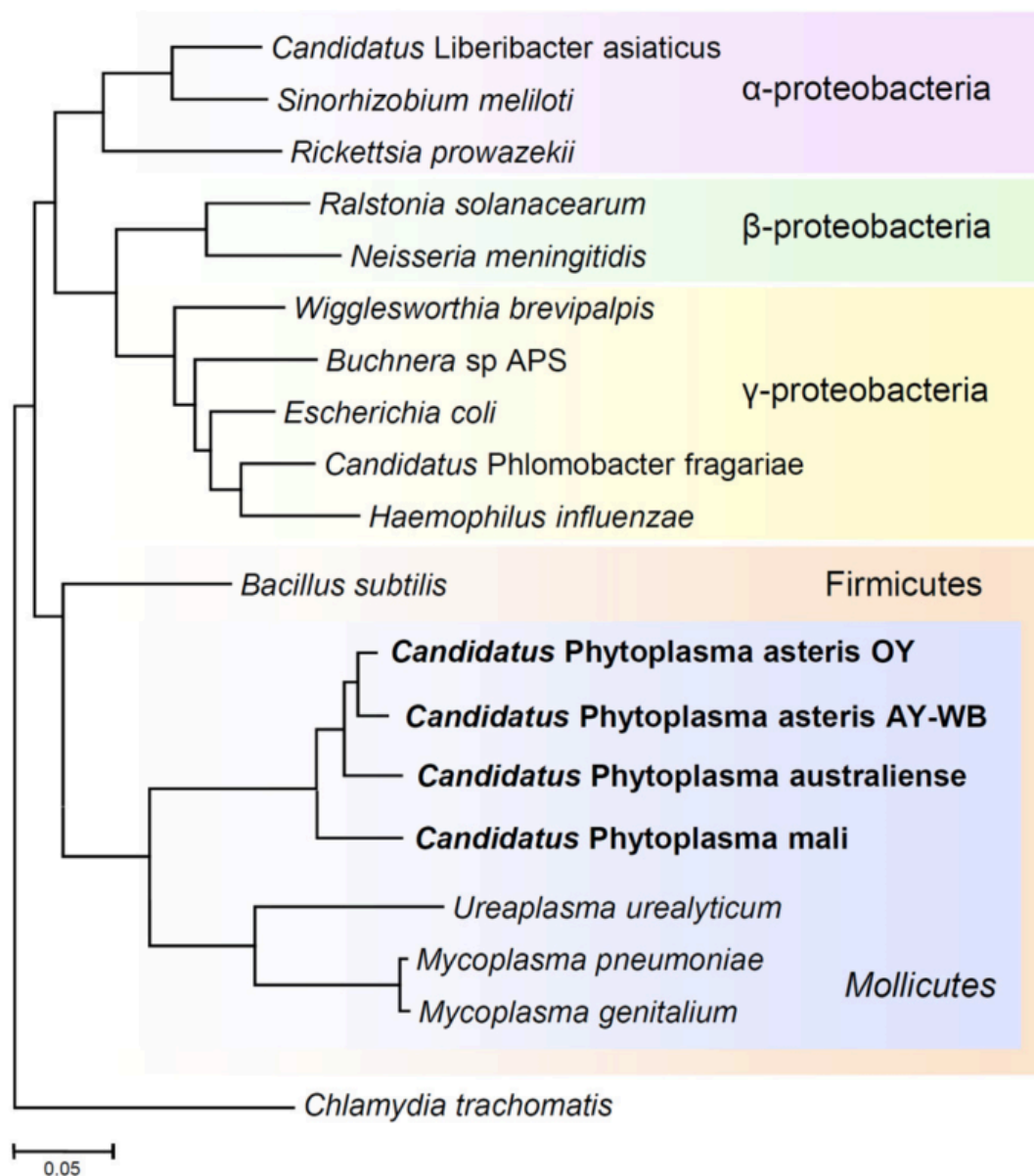
ファイトプラズマが原因で引き起こされる病徴は古くから存在し、日本国内においては江戸時代からクワ萎縮病の発生が知られていたと言われ、明治・大正時代にもキリてんぐ巢病やイネ萎黄病が九州・四国地方を中心とした広範な地域で発生していた(奥田、1972)。これらの萎縮・萎黄症状の原因については不明であり、昭和初期には生理障害やウイルスが原因であると考えられていた (Maramorosch, 1956)。しかし 1967 年、土居らの発見によってそれらの症状の原因が細菌によるものであることが明らかとなった (土居ら、1967)。細菌の形状がヒトや動物などに感染するマイコプラズマ属細菌の特徴と似ていたこと、マイコプラズマと同じくテトラサイクリン感受性であり、テ

トラサイクリンの処理によって症状の緩和が認められたことから、原因となる細菌はマイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organism: MLO) という名が付けられた (石家ら、1967)。MLO の発見により、ウイルスが原因もしくは原因が不明であるとされていたいくつかの病気の原因が MLO によるものであることが明らかとなった (Whitcomb & Davis, 1970; 奥田、1972)。

1.2.4. 系統学的分類

ファイトプラズマを含む真正細菌は 20 以上の門に分類され、植物病原細菌は多くのグラム陰性細菌が含まれる *Proteobacteria* 門、放線菌の仲間を含む *Actinobacteria* 門、日和見的で芽胞を形成するグラム陽性桿菌を含む *Firmicutes* 門の 3 つの門に含まれる。ファイトプラズマと近縁のマイコプラズマは *Firmicutes* 門に分類され、*Firmicutes* 門に分類される植物病原細菌には枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などが存在する (図 1.5.)。ファイトプラズマは MLO として発見されてから長らくの間、人工培養系が確立されていないなどの理由から詳細な分類や解析が遅れていた。MLO の分類については、MLO の *16S rRNA* 遺伝子が PCR によって増幅できることが判明してから急速に進み、その遺伝子断片の塩基配列解読によって系統学的な解析が行われた (Namba *et al.*, 1993b)。系統解析の結果、MLO は *Firmicutes* 門モリキューテス綱 (Class *Mollicutes*) に属するが、これまでに分類されたモリキューテス綱細菌の既知のどの分類群とも異なる独立した集団であることが明らかとなり、MLO を「ファイトプラズマ (phytoplasma)」と呼ぶことが決定された (Gundersen *et al.*, 1994; Tully, 1995)。その後、種の分類規定が曖昧であったファイトプラズマを暫定種 (*Candidatus*) 'Phytoplasma' に分類することが提案され、ファイトプラズマの種の分類が大きく見直された (IRPCM, 2004)。これによって既存のファイトプラズマ種との *16S rRNA* 遺伝子が 1,200 塩基より長く解読された上、その配列同一性が 97.5%未満、もしくは宿主範囲や媒介昆虫が既存種と大きく異なることが示された場合のみ、新たに種として認められるようになり、世界中で確認されているファイトプラズマは現在までに約 40 種に分類されている。種より細かい分類については正式に定められていないが、*16S rRNA* 遺伝子の制限酵素切断長断片多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 解析による分類 (Lee *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2009) や、リボソームタンパク質をコードする *rplV* や *rpsC* などの *16S rRNA* 遺伝子以外のリボソーム遺伝子 (Martini *et al.*, 2007)、輸送膜タンパク質遺伝子である *SecA* をコードする遺伝子配列による分類 (Hodgetts *et al.*, 2008) が試みられている。日本国内で発生しているファイトプラズマについて IRPCM の基準に基づいて整理すると、発生報告のあ

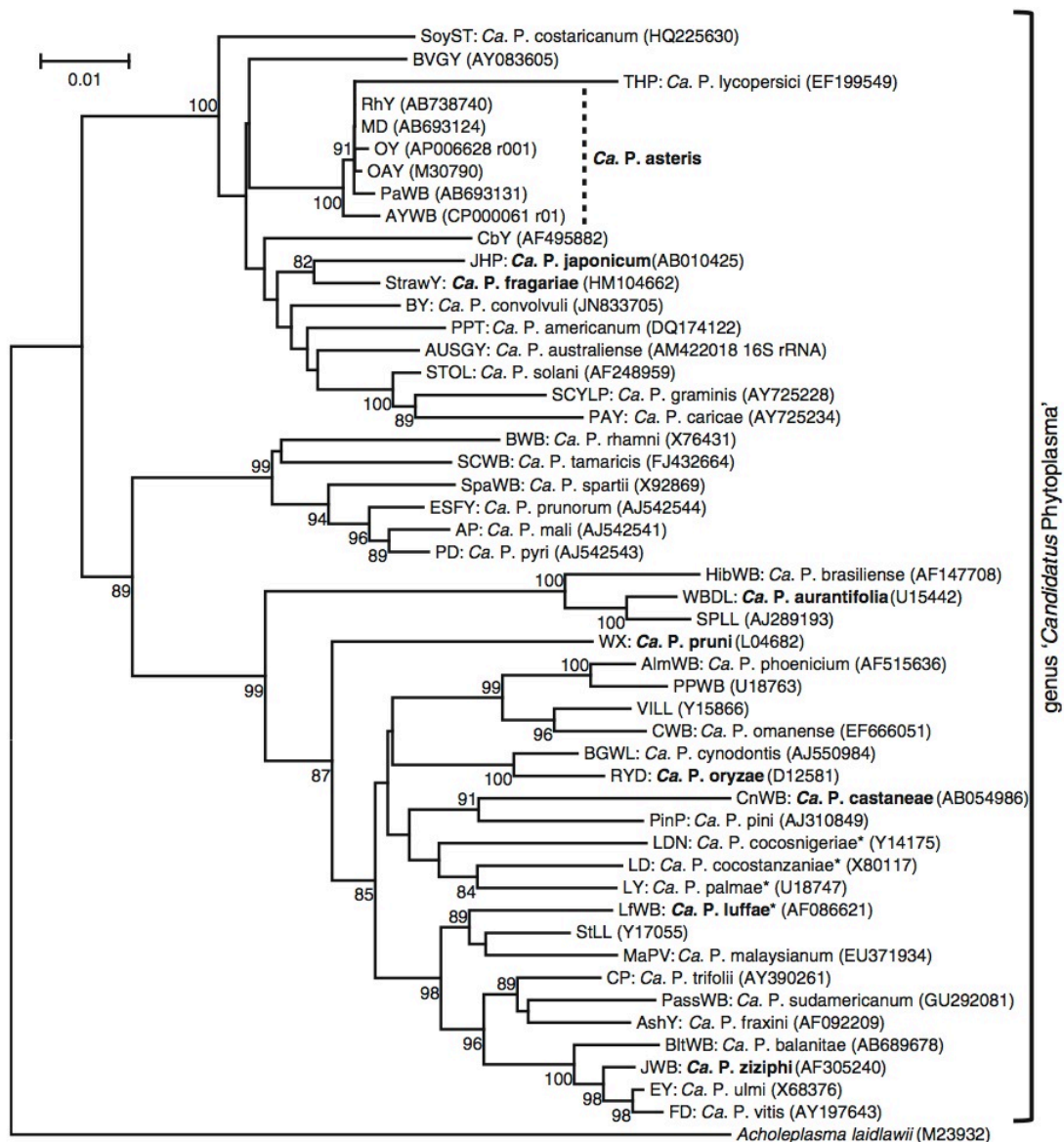
る 70 のファイトプラズマが原因で起こる病気は 9 つの種に分類される (Maejima *et al.*, 2014b; 図 1.6.)。



Oshima *et al.*, 2013

図 1.5. ファイトプラズマの系統学的位置

GenBankに登録された 16S *rRNA* 遺伝子の配列を基に近隣結合法 (Neighbor-joining method) で作成した系統樹。主に *Proteobacteria* および *Firmicutes* 門の細菌の配列を用い、アウトグループには *Chlamydia trachomatis* を用いている。ファイトプラズマは *Firmicutes* 門モリキューテス綱に属し、マイコプラズマ属細菌などと近縁である。



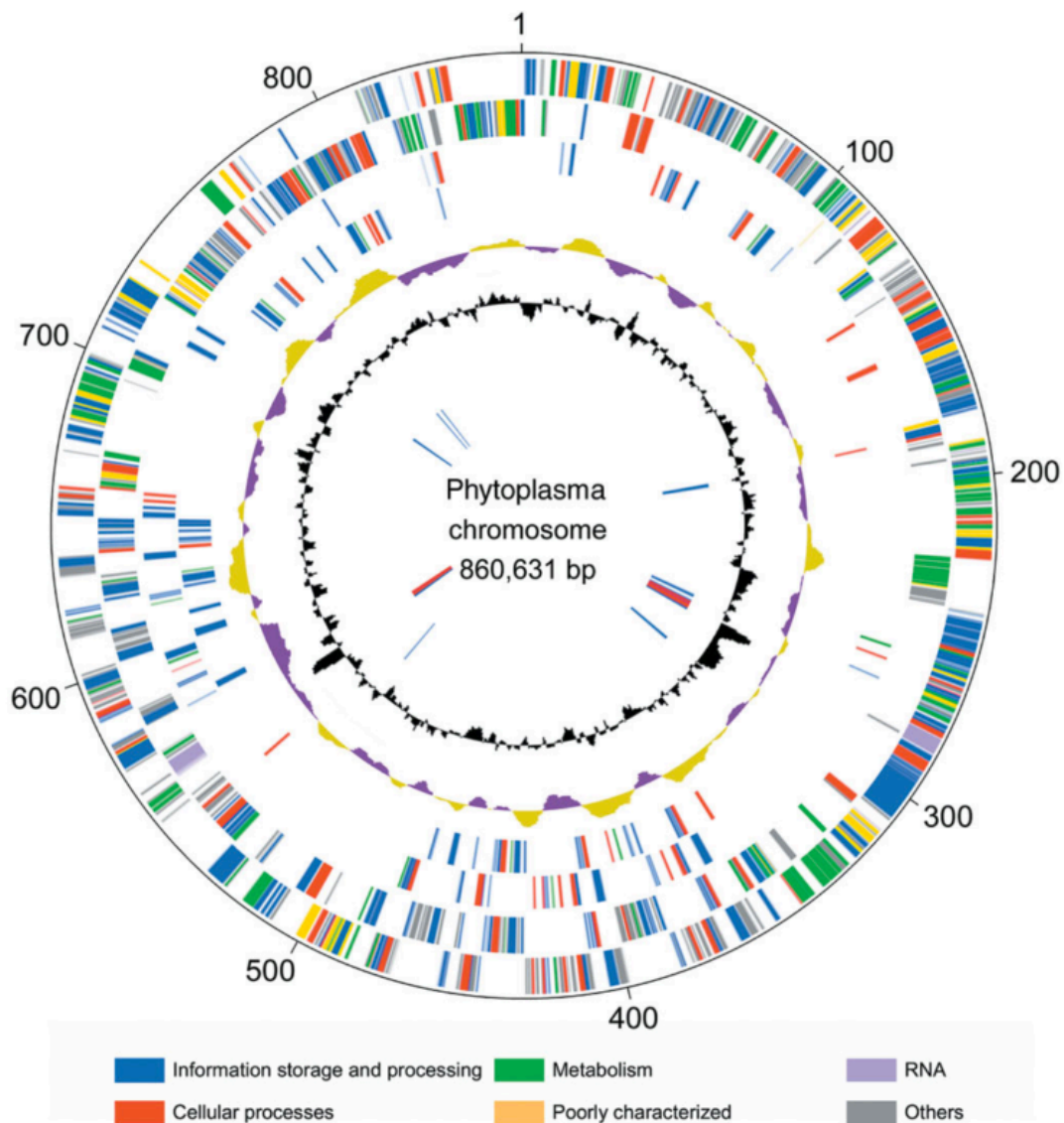
Maejima et al., 2014b

図 1.6. ファイトプラズマの系統樹

16S rRNA 遺伝子配列に基づいて近隣結合法で作成したファイトプラズマ (*Ca. P.*) の系統樹。アウトグループには *Acholeplasma laidlawii* を用いた。系統樹中の数字はブートストラップ値であり、80%以上のもののみ示した。図中の太字で示されているファイトプラズマ種は日本国内で発生が認められたものを表している。

1.2.5. ゲノム解読

ファイトプラズマの全ゲノム解読は 2004 年にタマネギ萎黄病 (onion yellows; OY) ファイトプラズマで初めて報告された (Oshima *et al.*, 2004; 図 1.7.)。OY ファイトプラズマは全長約 860 kbp の染色体、754 個の open reading frame (ORF) を持ち、数 kbp の長さの 2 つの染色体外 DNA を持っていた。染色体 DNA の G+C 含量の平均は 28% であり、その値は他の *Mollicutes* 綱細菌同様に低かった。染色体 DNA には、代謝系経路の遺伝子が少ないことや、F₀F₁ 型 ATP 合成酵素を持たないなどの特徴を持ち、自身の生存に必要な要素を宿主側に依存していると考えられた (図 1.8.)。OY ファイトプラズマの全ゲノム解読の報告の後、OY ファイトプラズマと同じく *Phytoplasma asteris* に属する aster yellow witches' broom (AY-WB) 系統 (Bai *et al.*, 2006) および *P. australiense* PAa 系統 (Tran-Nguyen *et al.*, 2008) および SLY 系統 (Andersen *et al.*, 2013)、*P. mali* AT 系統 (Kube *et al.*, 2008) の 3 種・5 系統で全ゲノム解読が完了し、染色体の長さは 600~960 kbp、500~1130 個の ORF、0~5 つの染色体外 DNA を持っていた。染色体 DNA の G+C 含量の平均は 21~28% であり、いずれも OY ファイトプラズマと似た特徴を持っていることが報告された (表 1.1.)。また、近年では大規模シーケンサーの活用により、4 種・8 系統のファイトプラズマにおいて、ドラフトゲノム配列が報告されている (Saccardo *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013; Mitrovic *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; 表 1.2.)。



Oshima *et al.*, 2004

図 1.7. ファイトプラズマの染色体地図

P. asteris OY 系統の染色体地図。円外の数字はゲノムの起点から数えた塩基番号 (kbp) である。外側の 4 周はタンパク質をコードする遺伝子部位を示しており、それぞれの遺伝子から予測される機能を、図の下部に書かれた機能に分類して色付けしている。最外周からプラス鎖方向、マイナス鎖方向、プラス鎖方向の重複遺伝子、マイナス鎖方向の重複遺伝子を示す。黄色と紫色で描かれた円状の山は $(G-C) \div (G+C)$ で計算された GC skew を示し、さらに内側の黒色の円状の山は G+C 含量を示す。内側 2 周の青色は tRNA、赤色は rRNA を示し、外側がプラス鎖方向、内側がマイナス鎖方向にコードされていることを示す。

表 1.1. 全ゲノム解読されたファイトプラズマ

種 系統	<i>P. asteris</i>		<i>P. mali</i>	<i>P. australiense</i>	
	OY-M	AY-WB	AT	PAa	SLY
総塩基数 (nt)	853,092	706,569	601,943	879,959	959,779
G+C 含量 (%)	27.8	26.9	21.4	27.4	27
ORF 数	751	673	481	686	1126
tRNA 数	32	31	32	35	35

表 1.2. ドラフトゲノム配列が報告されたファイトプラズマ

種 系統	<i>P. pruni</i>				<i>P. aurantifolia</i>
	VAC	MA1	MW1	JR1	PnWB NTU2011
総塩基数 (nt)	647,754	597,245	583,806	631,440	562,473
Contig 数	272	197	158	185	13
平均 Contig 長 (nt)	2,381	3,302	3,695	3,413	43,267
G+C 含量 (%)	27.4	27.1	27.5	27.3	24.3
ORF 数	650	624	529	654	421
tRNA 数	27	26	36	20	27

種 系統	<i>P. solani</i>		<i>P. asteris</i>
	stolbur 284/09	stolbur 231/09	WBD
総塩基数 (nt)	557,538	515,758	611,462
Contig 数	128	298	6
平均 Contig 長 (nt)	4,356	1,731	101,910
G+C 含量 (%)	28.2	28.6	27.1
ORF 数	520	573	532
tRNA 数	27	8	32

P. pruni; Saccardo *et al.*, 2012, *P. aurantifolia*; Chung *et al.*, 2013

P. solani; Mitrovic *et al.*, 2014, *P. asteris*; Chen *et al.*, 2014

1.2.6. 分泌タンパク質

ファイトプラズマのゲノム中に分泌タンパク質をコードする遺伝子は約 30 個あり、ファイトプラズマに特徴的な病徴である萎縮・叢生や葉化症状を引き起こすものが知られている。

萎縮・叢生を起こす分泌タンパク質に、OY ファイトプラズマで同定された TENGU がある (Hoshi *et al.*, 2009)。TENGU は、OY ファイトプラズマで分泌タンパク質であると予測される約 30 のタンパク質のうちのひとつであり、TENGU を発現させた *Nicotiana benthamiana* やシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において萎縮・叢生症状を引き起こす (図 1.9.)。TENGU は非常に小さな分子量のタンパク質であり、予測分子量が 4.5 kDa、N 末端に存在するシグナル配列切断後の成熟タンパク質の長さの予測は 38 アミノ酸であった。さらに、成熟タンパク質 38 アミノ酸のうち、N 末端側 11 アミノ酸のみで *N. benthamiana* に萎縮・叢生症状を引き起こし、TENGU の萎縮・叢生症状の誘導は非常に限られたアミノ酸のみで機能する (Sugawara *et al.*, 2013)。TENGU 以外の萎縮・叢生誘導活性を持つ分泌タンパク質には、AY-WB ファイトプラズマの SAP11 が同定されている (Sugio *et al.*, 2011)。SAP11 を発現させたシロイヌナズナにおいても TENGU の時と同様、萎縮・叢生や葉の奇形などの症状を引き起こす。2 つの分泌タンパク質、TENGU および SAP11 は萎縮・叢生症状を誘導する上、TENGU 発現植物ではオーキシン経路関連遺伝子の発現減少が、SAP11 発現植物ではジャスモン酸合成関連遺伝子の発現が変動し、ジャスモン酸蓄積量の減少が起こり、植物ホルモン関連因子の発現や蓄積に影響を与えるという点で共通点が多い。

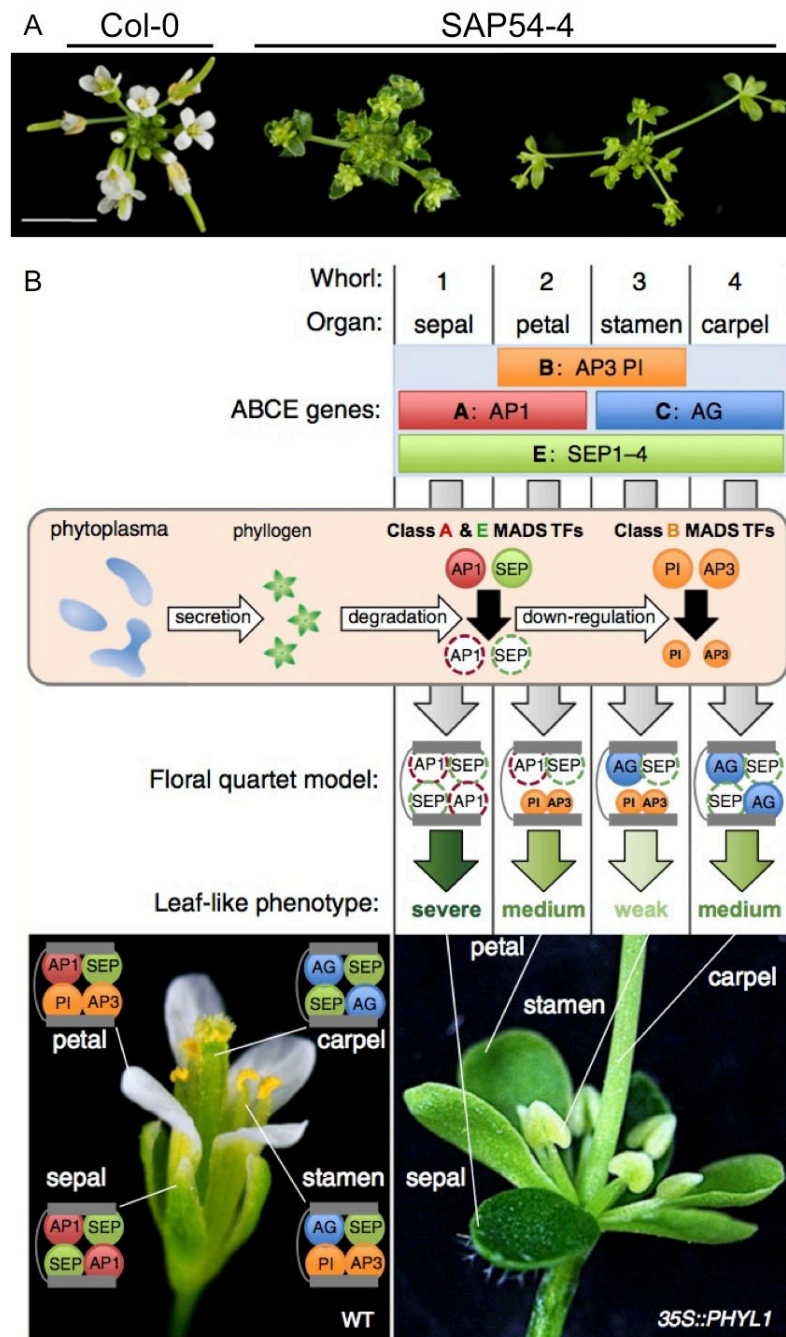
また、ファイトプラズマに感染した植物の中には、花器官が形成されるはずの場所が葉に似た構造物に変わる、葉化症状が現れることがある。葉化症状を引き起こす分泌タンパク質はファイロジェン (Phyllogen) と呼ばれ、これまでに AY-WB ファイトプラズマの SAP54 や OY ファイトプラズマの PHY1 が同定されている (MacLean *et al.*, 2011; Maejima *et al.*, 2014a; 図 1.10.)。ファイトプラズマに感染した植物では花器官形成に関与する遺伝子の発現が抑制されており、その抑制はそれぞれの花器官ごとに異なる (Himeno *et al.*, 2011)。さらに、ファイトプラズマから分泌された SAP54 や PHY1 は花器官の形成を司る転写因子である APETALA1 (AP1), APETALA3 (AP3), PISTILLATA (PI), SEPALLATA3 (SEP3) などと結合すること、これらの転写因子はプロテアソーム分解系によって分解されることで、正常な花器官が作られなくなる (Maejima *et al.*, 2014a; MacLean *et al.*, 2014)。



A,B,C,E: Hoshi *et al.*, 2009、D: Sugio *et al.*, 2011

図 1.9. TENGU, SAP11 により萎縮・叢生症状を呈する植物

TENGU によって萎縮・叢生症状を示す (A) *N. benthamiana* および (B,C) シロイヌナズナと(D) SAP11 によって萎縮・叢生症状を示すシロイヌナズナ。(E) 江戸時代の文化後期 (1811~17 年)、歌川国丸によって描かれた「金太郎と烏天狗」に収められた萎縮・叢生 (てんぐ巣) 症状



A: MacLean *et al.*, 2011、B: Maejima *et al.*, 2014a

図 1.10. SAP54, PHYL1 により葉化症状を呈する植物

A: SAP54 が発現することで葉化症状を示すシロイヌナズナ

B: ファイトプラズマ感染時に起こる葉化症状の誘導メカニズムのモデル図。花器官で正常に働くはずの ABCE クラス遺伝子のうち、ABE 遺伝子が分解され、量が減少することで花のカルテットモデルが崩れて葉化症状が引き起こされる。

1.2.7. 膜タンパク質

全ゲノム配列が解読されているファイトプラズマのゲノム配列解析より、ファイトプラズマには多くの膜タンパク質遺伝子が予測されている (Oshima *et al.*, 2004)。ファイトプラズマ菌体は細胞内で宿主の細胞質と直接相互作用するため、菌体表面に存在する膜タンパク質は宿主との相互作用に重要な働きを担うと考えられている。

細菌の菌体外への輸送機構には少なくとも 5 つの経路が存在し、そのうちの一つに Sec システムがある。大腸菌 (*Escherichia coli*) において、分泌機構である Sec システムにより、細胞膜の構成成分やタンパク質の輸送だけでなく、毒素、接着因子、加水分解酵素などが輸送される (Economou, 1999)。また枯草菌では、4 つある輸送経路の中でも Sec システムが最も重要な働きを担っていると考えられている (Tjalsma *et al.*, 2000)。ファイトプラズマでも輸送経路である Sec システムの構成成分について研究が行われており、OY ファイトプラズマにおいて SecA および SecY (Kakizawa *et al.*, 2001)、SecE (Kakizawa *et al.*, 2004) が同定されている。SecA, SecY, SecE の 3 つのタンパク質は Sec システムの構成に必須なタンパク質であると考えられており (Economou, 1999)、ファイトプラズマではこれらの構成タンパク質によって Sec システムが働き、膜タンパク質をはじめとしたタンパク質や物質の輸送が行われていると考えられる。

OY ファイトプラズマには、昆虫による伝搬能を喪失した系統が存在する (Oshima *et al.*, 2001)。この系統では 2 つのプラスミドのうち、1 つが消失しており、もう 1 つのプラスミドも配列の一部が欠失することにより長さが短くなっている。このため、2 つのプラスミドが共通して持つ遺伝子である *orf3* 遺伝子が失われている (Nishigawa *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2009a, b)。*orf3* 遺伝子から翻訳される ORF3 は膜貫通領域を持つため、膜タンパク質として働くことでファイトプラズマの昆虫伝搬に関連した役割を持つと考えられている。

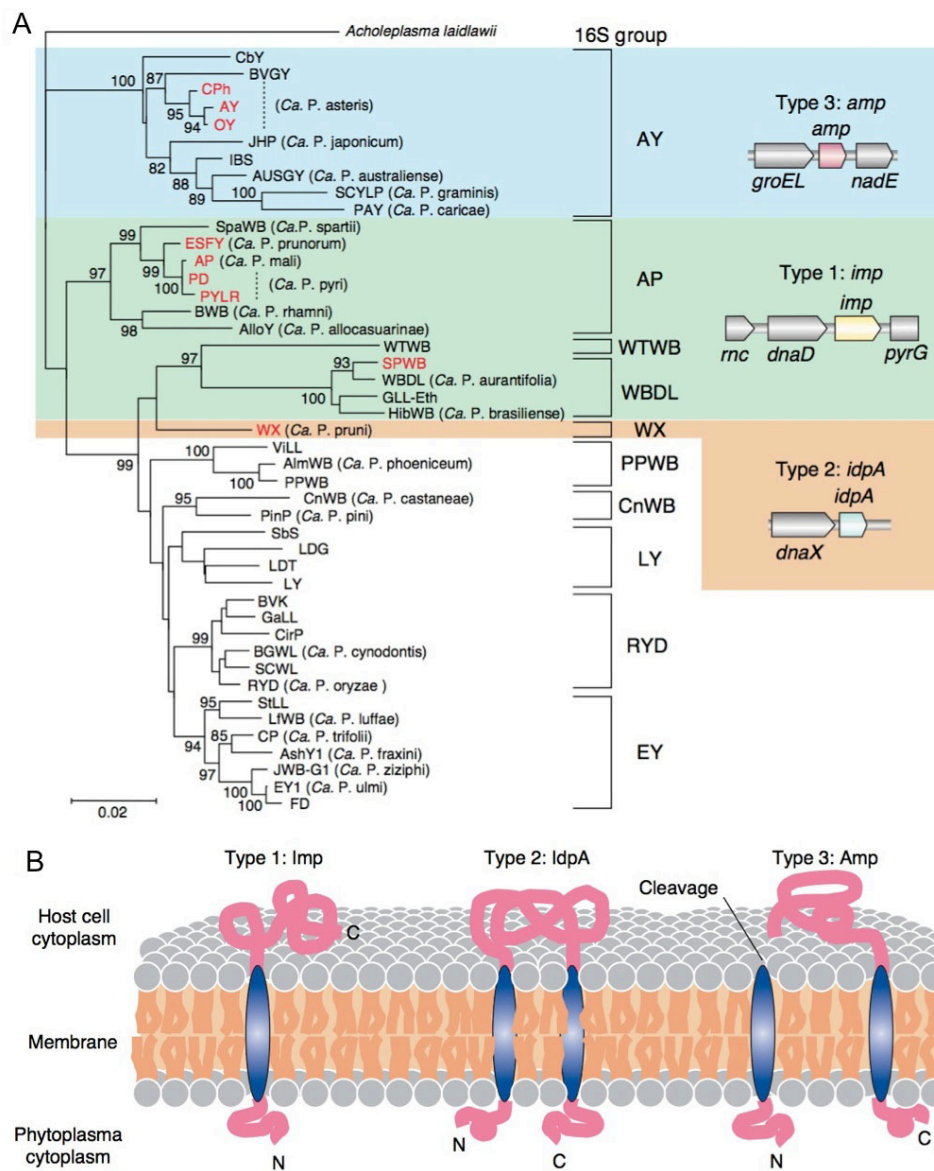
ファイトプラズマの菌体表面の大部分を覆うと考えられている膜タンパク質に主要抗原膜タンパク質がある。主要抗原膜タンパク質という名称は、ファイトプラズマに対する抗体を作出する際の標的となることが多いことに由来するが、近年では抗原性についての重要性は低いため、本論文では主要表面膜タンパク質と呼ぶ。ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質は antigenic membrane protein (Amp)、immunodominant membrane protein (Imp)、immunodominant membrane protein A (IdpA) の 3 つの型に大別され、それぞれは互いに相同で無い (Barbara *et al.*, 2002; Kakizawa *et al.*, 2006b)。どの型が主要表面膜タンパク質であるかはファイトプラズマの種によって異なるが、進化的に近縁なファイトプラズマからは同じ型の主要表面膜タンパク質が見出される傾向にあ

り、Amp は aster yellows ファイトプラズマや clover phyllody ファイトプラズマ (Barbara *et al.*, 2002)、OY ファイトプラズマ (Kakizawa *et al.*, 2004) などを含む AY グループのファイトプラズマ、Imp は sweet potato witches' broom (Yu *et al.*, 1998) や AP ファイトプラズマ (Berg *et al.*, 1999) などのファイトプラズマ、IdpA は western X-disease (WX; Blomquist *et al.*, 2001) ファイトプラズマで主要表面膜タンパク質として発現していることが分かっている (図 1.11.)。

OY ファイトプラズマの Amp は昆虫のマイクロフィラメントと結合することが分かっており、その結合は OY ファイトプラズマを媒介する昆虫特異的であることから、この結合の可否がファイトプラズマの媒介能を決定している可能性が示唆されている (Suzuki *et al.*, 2006)。また、*P. asteris* に属する chrysanthemum yellows ファイトプラズマ (CYP) の Amp は昆虫宿主の ATP 合成酵素と複合体を形成する (Galletto *et al.*, 2011)。*P. asteris* に属するファイトプラズマの *amp* 遺伝子では、アミノ酸変異を伴う変異がアミノ酸変異を伴わない変異より多く蓄積する正の選択圧がかかっており、アミノ酸変異が宿主との相互作用する上で重要な働きをしている可能性が示唆されている (Kakizawa *et al.*, 2006a)。*P. mali* が持つ Imp は植物アクチンと結合することが報告されており、この結合によって細胞内での局在や移行に有利に働いていると考えられる (Boonrod *et al.*, 2012)。さらに、Imp をコードする *imp* 遺伝子は、Imp を主要表面膜タンパク質としない OY や WX ファイトプラズマおよび主要表面膜タンパク質が未知であるファイトプラズマのゲノム中にも保存されているため、*imp* 遺伝子はファイトプラズマがそれぞれの種に分化する以前から保存されている遺伝子であると考えられている (Kakizawa *et al.*, 2009)。IdpA は WX ファイトプラズマでのみ主要表面膜タンパク質として発現していることは分かっている (Blomquist *et al.*, 2001) が、Amp や Imp で見られるような昆虫や植物宿主との相互作用については不明である。

膜タンパク質はファイトプラズマ菌体表面に露出しており、宿主との相互作用に深く関与しているものが多いと考えられることから、その機能の解明はファイトプラズマの性状を理解する上で重要であり、防除の標的としても有力な候補となりうる。本研究では、宿主との相互作用に関与する膜タンパク質に着目して解析を行った。まず第 2 章では、ファイトプラズマ菌体の大部分を覆っていると考えられる主要表面膜タンパク質に着目した。観賞用園芸植物のポインセチアに感染する poinsettia branch-inducing ファイトプラズマは主要表面膜タンパク質のうち 2 つの型の遺伝子を持つ。2 つのうち、どちらが強く発現しているのかについて調べ、さらに遺伝子の配列多様性についての解析を行った。続いて第 3 章では、細菌の宿主への侵入時に関与す

るとされる接着因子をファイトプラズマのゲノムから探索し、接着因子の同定および性状の解析を行った。その結果、接着因子間で保存性の高いアミノ酸配列が接着能に重要である可能性が示唆された。本研究の結果よりファイトプラズマが持つ膜タンパク質の進化的考察および宿主感染機構について新たな知見が得られ、重要な示唆が与えられたと考えられる。



Kakizawa et al., 2006b

図 1.11. ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質

A: ファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子の配列を元に近隣結合法で作成した系統樹および、3 タイプの主要表面膜タンパク質をコードする遺伝子。アウトグループには *Acholeplasma laidlawii* を用いている。B: 3 タイプの主要表面膜タンパク質のファイトプラズマ膜表面における想定図。膜貫通領域は青色、その他のアミノ酸領域はピンク色で示している。

第 2 章

poinsettia branch-inducing ファイトプラズマの 主要表面膜タンパク質の解析

2.1. ポインセチア

2.1.1. 特徴

ポインセチア (*Euphorbia pulcherrima* Wild. Klotz) はトウダイグサ科に属するメキシコ原産の常緑性低木であり、短日条件において葉に似た形態を持つ苞葉 (ほうよう) が赤く染まることから、クリスマスシーズンの観葉植物として人気がある。アメリカでは 2005 年に 240 万ドル (Jerardo, 2006)、日本でも 2008 年に 16 億円 (農林水産省, 2010) 規模の市場が存在し、重要な観賞用園芸植物の一つである。

ポインセチアは挿し木により容易に増やすことが出来る栄養繁殖性植物であるが、品種登録されたポインセチアは種苗法によって育成者権を持つ者が保護されるため、日本国内において自家増殖するには育成者権を持つ者の許諾が必要である。種苗法は「植物の新品種の保護に関する国際条約 (UPOV 条約)」に対応しており、UPOV 条約に基づいた保護制度を持ち、ポインセチアが保護対象となる国に対しては輸出入可能であるが、その際に無断で増殖した植物を使用、販売、輸出入してはならない。アメリカでは、植物特許法によって栄養繁殖性植物であるポインセチアの育成者権を持つ者が保護されており、日本と同様、無断で増殖させた植物の使用、販売、輸出入が禁じられている。

ポインセチアの形態には、強い頂芽優勢を示す Restricted-branch 型 (RB 型) と頂芽優勢が弱く、多くの枝分かれを生じる Free-branch 型 (FB 型) の 2 つが存在する (図 2.1.)。FB 型のポインセチアは背丈が低く小ぶりであり、赤く染まる苞葉が密集して見た目が華やかに見えるため、商業的に販売されているポインセチアの大部分は FB 型の品種である。



図 2.1. FB 型および RB 型のポインセチア

強い頂芽優勢を示す Restricted-branch 型（RB 型：左）と頂芽優勢が弱く、多くの枝分かれを生じる Free-branch 型（FB 型：右）の 2 つのポインセチア。右の FB 型のポインセチアはファイトプラズマに感染しており、背丈が低く、枝分かれが多くなっている。

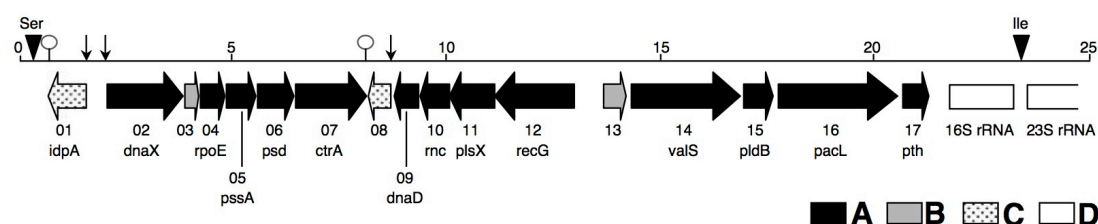
2.1.2. 形態とファイトプラズマの関係

FB 型を示すポインセチアは、高温処理や組織培養などの伝統的な植物病原体の除去手法により FB 型の性質を失うことから、植物病原体がポインセチアに感染して形態を変化させていると考えられてきたが (Dole *et al.*, 1993)、その原因は長い間分かっていなかった。1997 年、Lee らによってポインセチアの形態変化にファイトプラズマが深く関与していることが分かった (Lee *et al.*, 1997)。Lee らは FB 型を示すポインセチアからファイトプラズマを検出した。また、ファイトプラズマの検出されたポインセチアからネナシカズラ (*Cuscuta* sp.) を用いて、健全なポインセチアにファイトプラズマを伝搬させ、FB 型の形態になることを示した。これより、FB 型の形態を示すポインセチアに感染しているファイトプラズマが poinsettia branch-inducing (PoiBI) ファイトプラズマと呼ばれるようになった。

ポインセチアの大半の品種は育種の後、樹高を低く保ち、葉を密生させる目的で PoiBI ファイトプラズマに感染させたうえで出荷されている。PoiBI ファイトプラズマに感染したこのようなポインセチアは、流通・販売・栽培の過程で新たな感染源となる可能性がある。しかし、PoiBI ファイトプラズマの性状に関する解析はほとんど行われていない。

2.1.3. 感染するファイトプラズマに関する知見

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分類によれば、PoiBI ファイトプラズマは WX ファイトプラズマに代表される *P. pruni* に属する (Lee *et al.*, 1998; IRPCM, 2004)。WX ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質は IdpA であることが報告されている (Blomquist *et al.*, 2001)。WX ファイトプラズマのゲノム上には *imp* 遺伝子もコードされていることが報告されているが、WX ファイトプラズマの *imp* 遺伝子産物については解析されていない (Liefting and Kirkpatrick, 2003; 図 2.2.)。また、PoiBI ファイトプラズマのドラフトゲノム解析が JR1 系統で行われており、PoiBI ファイトプラズマと同じ *P. pruni* に属する vaccinium witches' broom (VAC) ファイトプラズマ、Italian clover phyllody ファイトプラズマ MA 系統 (MA1) および milkweed yellow (MW1) ファイトプラズマの 3 系統のファイトプラズマのドラフトゲノム解析と合わせて報告されている (Saccardo *et al.*, 2012)。



Liefting and Kirkpatrick, 2003

図 2.2. WX ファイトプラズマの *imp* 遺伝子と *idpA* 遺伝子を含むゲノム領域

「08」で示された左向きの矢印が *imp* 遺伝子を示し、「01」に *idpA* 遺伝子が示されている。2 つの遺伝子は近傍に存在し、*imp* 遺伝子と *idpA* 遺伝子の距離は約 7.5 kbp である。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 供試ポインセチア

本研究で用いた計 32 品種のポインセチアは東京都内 (由来：東京) および千葉県内 (由来：千葉)、京都府立植物園 (由来：京都) より入手したものを使用した (表 2.1.)。

2.2.2. ファイトプラズマ DNA の抽出

DNeasy Plant Kit (Qiagen) を用いて表 2.1.で示したポインセチアから DNA を抽出した。DNeasy Plant Kit を用いた DNA の抽出法では、まず植物を機械的に磨砕した後、キット付属のバッファーでタンパク質および多糖類を沈殿させ、RNase で RNA を分解させた。この溶液を、DNA が選択的に結合するシリカゲルメンブレンに供試し、夾雑物や酵素阻害物質を透過させた。最後に、シリカゲルメンブレンに溶出バッファーを加え、純度の高い DNA 溶液を得た。DNA 抽出はキットに付属のプロトコルに従い、最終的に 100 μ l の DNA 溶液を得た。DNA 抽出の成否は分光光度計にて測定した DNA 濃度を元に行った。

得られた DNA 溶液を PCR の DNA テンプレートとし、次に述べる手法でファイトプラズマ感染の有無を検定した。PCR の手法には long and accurate PCR (LA-PCR) を採用し、2.5 mM の $MgCl_2$ 、LA-PCR Buffer (Takara Bio)、400 μ M の dNTPs、0.8 ユニットの Takara LA *Taq* DNA ポリメラーゼ (Takara Bio)、各 0.5 μ M のファイトプラズマがコードする 16S *rRNA* 遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット (SN910601 および SN910502; Namba *et al.*, 1993a; 表 2.2.)、50~100 ng の鋳型 DNA を混ぜ、全体が 25 μ l になるように DW でメスアップした。この溶液を 94°C で 2 分間 DNA を変性させた後、94°C で 30 秒間の変性、60°C で 30 秒間のアニーリング、68°C で 90 秒間の DNA 伸長を 35 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 7 分間の伸長を行った。

表 2.1. 解析に供試したポインセチア品種と PoiBI ファイトプラズマの感染検査結果

品種名	略称	由来	感染
アンネットヘッグダークレッド (Annette hegg dark red)	AHDR	京都	+
アンネットヘッグディバ (Annette hegg diva)	AHD	京都	-
アンネットヘッグレディ (Annette hegg lady)	AHL	京都	+
アンネットヘッグマーブル (Annette hegg marble)	AHM	京都	-
アンネットヘッグマクシ (Annette hegg maxi)	AHMaxi	京都	+
アンネットヘッグピンク (Annette hegg pink)	AHP	京都	+
アンネットヘッグスブリーム (Annette hegg supreme)	AHS	京都	+
アンネットヘッグホホワイト (Annette hegg white)	AHW	京都	-
アークティック (Arctic)	Ar	千葉	+
エックスポイント C-1 レッド (Eckespoint C-1 red)	C-1	京都	-
エリザベスエッケ (Elizabeth ecke)	EE	京都	+
エンデュアリングピンク (Enduring pink)	EP	千葉	+
エンデュアリングレッド (Enduring red)	ER	千葉	+
エンデュアリングホホワイト (Enduring white)	EW	千葉	+
フレイミングスフィア (Flaming sphere)	FIS	京都	-
グートビア V-10 エミー (Gutbier V-10 amy)	V-10	京都	+
アイスパンチ (Ice punch)	IP	千葉	+
ジェスタージングルベル (Jester jingle bell)	JJ	東京	+
ジェスターマーブル (Jester marble)	JM	東京	+
ジェスターレッド (Jester red)	JR	東京	+
ジングルベルズ (Jingle bells)	JB	京都	+
モンレアル (Monreale)	M	千葉	+
ピータースターマーブル (Peterstar marble)	PSM	千葉	+
ピータースターレッド (Peterstar red)	PSR	千葉	+
プレミアムポーラー (Premium polar)	PP	千葉	+
プレミアムレッド (Premium red)	PR	千葉	+
プレステージブライトレッド (Prestige bright red)	PBR	東京	+
プリメーロジングルベル (Primero jingle bells)	PJ	千葉	+
シルバースターレッド (Silverstar red)	SR	千葉	+
ヴィジョンオブグランデール (Vision of grandeur)	VG	千葉	+
ウィンターローズピンク (Winter rose pink)	WP	千葉	+
ウィンターローズホホワイト (Winter rose white)	WW	千葉	+

2.2.3. アミノ酸配列の解析と系統樹の作成

PoiBI ファイトプラズマがコードしている *16S rRNA* 遺伝子 (PoiBI-*16S rRNA*) および *dnaD* 遺伝子 (PoiBI-*dnaD*) と *imp* 遺伝子 (PoiBI-*imp*)、*idpA* 遺伝子 (PoiBI-*idpA*) の塩基配列を解読した。配列の解読には PCR 産物のダイレクトシーケンス法を用いた。PoiBI-*16S rRNA* の増幅・解読には SN910601 および SN910502 プライマーセットを用い、PoiBI-*dnaD* と PoiBI-*imp* の増幅には PoiBI-*imp*-C02F および PoiBI-*imp*-C06R プライマーセットを用い、PoiBI-*idpA* 遺伝子の増幅には PoiBI-*idpA*-C2R および PoiBI-*idpA*-C4F プライマーセットを用いた。*16S rRNA* 遺伝子以外のプライマーセットは既報の WX ファイトプラズマの配列 (INSD Acc. No. AF533231; Liefting and Kirkpatrick, 2003) を参考に作成した。PoiBI-*16S rRNA*、PoiBI-*dnaD*、PoiBI-*imp* および PoiBI-*idpA* の増幅およびシーケンスに用いたプライマーの詳細は表 2.2. に示した。5 μ l の PCR 産物に対して、2 μ l の ExoSAP-IT (Amersham Bioscience) を加え、37°C で 15 分間の後、80°C で 15 分間処理し、PCR 反応時の余剰なプライマーおよび dNTP を除いたサンプルを以下のシーケンス反応に用いた。塩基配列の決定には PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用い、Dyedeoxyterminator 法で塩基配列の解析を行った。リアクションの反応組成は 50-250 ng PCR 産物、0.32 μ l プライマー (5 μ M)、1.75 μ l 5 \times Seq buffer (Applied Biosystems)、0.5 μ l PreMix (Applied Biosystems) で、DW で 10 μ l にメスアップした。この溶液を 96°C で 3 分間 DNA を変性させた後、96°C で 15 秒間の変性、48°C で 30 秒間のアニーリング、60°C で 4 分間の DNA 伸長を 25 サイクル繰り返した。カラム担体である Sephadex G-50 SuperFine (粉末状; Applied Biosystems) を適量ウェルに入れ、そこに 330 μ l の DDW を入れ、室温で 2 時間静置してゲルを水和させた。910 \times g で 5 分間遠心し、カラムから余計な水分を取り除いた。リアクション後のサンプルをカラムにアプライし、910 \times g で 5 分間遠心した。溶出された溶液を 45 分間遠心濃縮機にかけ、サンプルを完全に乾燥させた。乾燥したサンプルを 15 μ l のホルムアミドで溶解し、振盪することで DNA を溶解した。95°C で 5 分間煮沸し、DNA を 1 本鎖の状態にし、その後すぐに氷水中に入れて急冷させた。サンプルを PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) 内にセットし、塩基配列の解読を行った。解読した塩基配列は解析ののち DDBJ/ENA/GenBank から構成される国際塩基配列データベース (INSD) に登録した (INSD Acc. No. AB636356-407)。

解読した塩基配列から予測された PoiBI ファイトプラズマの Imp タンパク質 (PoiBI-Imp) および PoiBI ファイトプラズマの IdpA タンパク質 (PoiBI-IdpA)、PoiBI ファイトプラズマの DnaD タンパク質 (PoiBI-DnaD) のアミノ酸配列と WX ファイトプラ

ズマのアミノ酸配列 (INSD Acc. No. AF533231; Liefing and Kirkpatrick, 2003) を ClustalW (Tompson *et al.*, 1994) でアラインメントした。系統樹作成には MEGA version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) を用い、Model には近隣結合法、Gap は Pairwise deletion、Bootstrap replication = 1,000 を選択した。

さらに PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA が持つタンパク質としての特徴を予測した。膜貫通領域は SOSUI プログラム (version 1.11; Hirokawa *et al.*, 1998) を用いて予測し、分泌シグナルの予測には SignalP (version 3.0; Bendtsen *et al.*, 2004) を用いた。さらにタンパク質の局在予測には PSORT (version 1; Horton *et al.*, 2007) を用いた。SignalP、PSORT のプログラムでは 0~1 の値で各性質が予測される。各予測プログラムは World Wide Web (WWW) 上で利用できるプログラムであり、各プログラムの URL を以下に記す。

- SOSUI : <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>
- SignalP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- PSORT : <http://psort.hgc.jp/>

表 2.2. PoiBI ファイトプラズマ遺伝子の解読に用いたプライマー配列

プライマー名	塩基配列 (5'→3')
<u>16S rRNA 遺伝子の増幅及びシーケンス</u>	
SN910601	GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT
SN910502	AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC
<u>dnaD 遺伝子及び imp 遺伝子の増幅及びシーケンス</u>	
PoiBI-imp-C02F	GCT ATT TAT TTA GAT TTA GG
PoiBI-imp-C03F	TGA TTT TAA AAC TMA AYT ACA AG
PoiBI-imp-C04F	GCG AAC CTT TCT AAA AAC GAA CTA G
PoiBI-imp-C05F	CAA TTT AGT CTC TAA ATG GGA C
PoiBI-imp-C06R	CCA GAA TTT TTA TCT CGT CCT CTG AAG CCA CAT CC
<u>idpA 遺伝子の増幅及びシーケンス</u>	
PoiBI-idpA-C2R	GGT TCG AAT CCC TTC TGC TCC GCC
PoiBI-idpA-C4F	GAA MCA AAC AAA CGC TAA ATA TCA CAC
PoiBI-idpA-C5R	GCT GTT TTA ACT TCT TCC AAA GTT TTT TC

M および Y は縮重塩基であり、M は A or C, Y は C or T を表す。

2.2.4. 適応進化の検出

ClustalW を用いて PoiBI および WX ファイトプラズマの *imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子、*dnaD* 遺伝子の塩基配列をアラインメントし、非同義置換率 (d_N) と同義置換率 (d_S) の比 (d_N/d_S) を計算した。計算は MEGA version 5.2 を用い、Distances Estimation (Bootstrap method, No. of Bootstrap Replication = 1,000)、Gap は Pairwise deletion、Model は Nei-Gojobori 法、Jukes-Cantor モデルを選択した。計算は $d_S \neq 0$ の場合のみ行った。

さらに、 d_N と d_S の間に有意な差があるかどうかを検定した。有意差検定に用いた t 値は、以下に示す式で計算した。

$$\frac{|d_N - d_S|}{\sqrt{SE(d_N)^2 + SE(d_S)^2}}$$

t 値が 1.96 より大きい場合は d_N と d_S の値の間に 5%レベルの有意差が、2.58 より大きい場合は 1%レベルの有意差があるといえる。 d_N , d_S , d_N および d_S の標準誤差を表す $SE(d_N)$, $SE(d_S)$ の値は MEGA プログラム内で計算された結果を用い、 t 値および学生 t 分布確率計算で得られる P 値は、MEGA の出力結果から算出した。

2.2.5. PoiBI-*imp* と PoiBI-*idpA* のクローニング

抗体作出を目的として抗原タンパク質の発現・精製を行うために、pET システムを利用したクローニング・発現系を利用した。pET プラスミドを用いたクローニングでは、目的遺伝子がバクテリオファージ T7 転写・翻訳支配下にクローニングされる。T7 プロモーター下流にクローニングされた目的遺伝子は、T7 RNA ポリメラーゼの存在下で転写・翻訳が誘導されるため、T7 RNA ポリメラーゼを発現させることによって目的遺伝子由来のタンパク質を大量に得ることが出来る。タンパク質発現用の大腸菌として、T7 RNA ポリメラーゼ上流に *lacUV5* プロモーターを持つ大腸菌 BL21 (DE3) 株 (Agilent technologies) を使用した。*lacUV5* プロモーターは Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で下流遺伝子の発現を誘導するため、IPTG を添加することにより T7 RNA ポリメラーゼが誘導され、pET プラスミドに導入された目的遺伝子由来の転写産物を大量発現することが可能となる。本研究では pET プラスミドとして pET-30a(+) ベクターを使用した。pET-30a(+) ベクターは目的遺伝子から発現したタンパク質に 6 つのヒスチジン残基が連続したタグ (His-tag) を付加して発現させることが出来る。この His-tag をニッケルイオン (Ni^{2+}) カラムを用いることで、大量発現したタンパク質から目的のタンパク質を特異的に精製することが可能になる。

pET ベクターへのクローニングのため、初めに PoiBI-*imp* と PoiBI-*idpA* を PCR で増幅した。PoiBI-*Imp* の全長 (PoiBI-*Imp*) および N 末端側の膜貫通領域を除いた親水性領域 (PoiBI-*Imp-out*)、PoiBI-*IdpA* の全長 (PoiBI-*IdpA*) および親水性領域 (PoiBI-*IdpA-cent*)、親水性領域の N 末端側半分 (PoiBI-*IdpA-N*)、親水性領域の C 末端側半分 (PoiBI-*IdpA-C*) をコードする領域 (図 2.8.) を増幅するため、以下のプライマーセットを設計した (表 2.3.)。NdeI は外側に 7 塩基以上、XhoI は外側に 3 塩基以上の付加配列が存在しないと制限酵素によって切断されないため、それぞれの認識サイトの外

側に 7 および 3 塩基の配列を付加した。

- ・ PoiBI-Imp : impfull-F、impfull-R
- ・ PoiBI-Imp-out : impout-F、impfull-F
- ・ PoiBI-IdpA : idpAfull-F、idpAfull-R
- ・ PoiBI-IdpA-cent : idpAcent-F、idpAcent-R
- ・ PoiBI-IdpA-N : idpAcent-F、idpA534-R
- ・ PoiBI-IdpA-C : idpA532-F、idpAcent-R

PCR 増幅した DNA をフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、適当量の TE で溶解した。増幅断片および pET-30a(+) ベクターを *Nde*I と *Xho*I 両酵素により完全切断するように処理した。0.7%アガロースゲルで泳動後、臭化エチジウム (EtBr) と紫外線照射で可視化し、目的のサイズのバンドをゲルより回収し、UltraClean 15 DNA purification kit (MO BIO laboratories) を用いて精製した。精製プロトコルは、付属のマニュアルに従った。

精製した制限酵素処理済みの PCR 産物 (インサート) および pET-30a(+) (ベクター) を Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて 16°C で 60 分間 ligation させた。ligation 後の DNA 溶液に 100 µl の大腸菌 BL21 (DE3) 株のコンピテントセルを氷上で混合し 30 分間静置した。その後、42°C で 1 分間熱ショックを与え、5 分間氷上で静置した後、SOC 培地を 1 ml 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。形質転換された大腸菌を、LB/カナマイシン固形培地に散布して 37°C で一晩静置して多数のコロニーを得た。いくつかのコロニーを選んで LB/カナマイシン液体培地において 37°C で 12~16 時間振盪培養し、アルカリ SDS 法でプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを鋳型、インサートの増幅に用いたプライマーを用いた PCR でインサートのチェックを行い、目的の大きさの断片が増幅されたクローンを選抜し、シーケンスにより配列を確認した。シーケンスには、pET-30a(+) のマルチクロニングサイトの外側にある配列である T7 プロモーターおよびターミネーターに相補な配列を持つプライマー (表 2.3.) を用いた。シーケンスの方法は、2.2.1.項と同様である。目的の配列が挿入されていたクローンを選び、次項の発現誘導に用いた。

・ SOC 培地 : Bacto-tryptone 20 g, Yeast extract 5 g, NaCl 0.5 g, 終濃度 2.5 mM KCl, 終濃度 10 mM MgCl₂, 終濃度 20 mM glucose を 1000 ml の DW に溶解した溶液

・ LB/カナマイシン固形培地 : Bacto-tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, Agarose 15 g を 1000 ml の DW に溶解した溶液を滅菌処理し、終濃度 50 µg/ml のカナマイシンを加えた溶液。LB/カナマイシン液体培地は、固形培地組成より Agarose を除いて作製

表 2.3. Imp および IdpA タンパク質の大量発現のクローニングに用いたプライマー配列

プライマー名	塩基配列 (5'→3')
<u>Imp タンパク質の発現・精製</u>	
impful-F	GGA ATT CCA TAT GGT AGC AAT GGA TAA GCA CAA TA
impout-F	GGA ATT CCA TAT GAA TTC ACC TTC TAA AGC GAT T
imp-R	CGG CTC GAG TTC TAA TCC GTA AGC TAT TTT AGA T
<u>IdpA タンパク質の発現・精製</u>	
idpAful-F	GGA ATT CCA TAT GTT TTC GCA AAA TAA AAA TT
idpAcent-F	GGA ATT CCA TAT GCA TAA TAA GGT GTT TGG GAT GA
idpA532-F	GGA ATT CCA TAT GAG AGG TTT AGA AAA TCA A
idpA534-R	CCG CTC GAG CAT ATT GGT TTC TAA TAA TTG A
idpAcent-R	CGG CTC GAG AGT GTT GAT GTT TTT TTC TTT ATC A
idpAful-R	CGG CTC GAG TCT TTT AGA TTG AGG TTT TTT AAT T
<u>インサートのチェック</u>	
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TA
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

2.2.6. PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の発現、精製、抗体作出

PoiBI-*imp* および PoiBI-*idpA* の全体あるいは部分領域が挿入された pET30a(+) ベクターを持つ大腸菌 BL21 株のコロニーを、LB/カナマイシン液体培地 5 ml に植え継ぎ、37℃で一晩振盪培養した (前培養)。前培養後、新たに 200 ml の LB/カナマイシン液体培地に、前培養した培養液を 2 ml 加え、37℃で振盪培養した (本培養)。2～3 時間程度 (O.D.₆₀₀ = 0.7 付近になるまで) 培養した後、IPTG を終濃度 1 mM になるように加えて目的遺伝子の発現を誘導した。37℃で振盪培養を継続し、1 時間おきに 10 ml の培養液を回収し、氷上で保存した。IPTG 添加による発現誘導から 3 時間後、全ての培養液を回収し、氷水中に保持して冷却した。途中で回収した培養液も含め、全ての培養液を 5,000 rpm、4℃で 15 分間遠心し集菌した。

上清を除去し、集菌した目的遺伝子を発現した大腸菌を、10 ml の培養液あたり 0.4 ml の Binding buffer に懸濁した。氷上で超音波破碎した後、破碎液を 12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、可溶性画分 (上清) と不溶性画分 (沈殿) に分離した。不溶性画分には 0.4 ml の Binding buffer を加え、再懸濁した。可溶性画分と不溶性画分ともに、4×SDS-PAGE サンプルバッファーを 1/3 volume 加えて、終濃度を 1×とした。95℃で 5 分間熱変性を行い SDS-PAGE の泳動に供した。

- Binding buffer : 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM imidazole
- 4×SDS-PAGE サンプルバッファー : 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 24% β-mercaptoethanol, 40% グリセロール, 0.01-0.1% Bromophenol blue (BPB)

タンパク質のゲル電気泳動には、ATTO 製電気泳動槽を使用し、25 mA/ゲルの固定電

流で 40-60 分間行った。泳動バッファーには 25 mM トリス、190 mM グリシン、0.1% SDS 溶液を用いた。SDS-PAGE の泳動ゲルには、Tris-HCl バッファー系のプレキャスト-アクリルアミドゲルのレディーゲル (BIO-RAD) を用いた。PoiBI-Imp の検出には分離ゲル濃度が 12.5%、PoiBI-IdpA の検出には分離ゲル濃度が 7.5%の泳動ゲルを用いた。泳動後、CBB 染色を行う場合のタンパク質サイズマーカーには、SDS-PAGE スタンダード Broad (BIO-RAD) を用いた。ただし、PoiBI-Imp タンパク質の大量発現を確認するサイズマーカーには Precision Plus Protein Standards All Blue (BIO-RAD) を用いた。

泳動後の染色は脱色が容易な CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色キットである Quick-CBB (Wako)を用いた。まず、泳動ゲルを固定液 (50% メタノール、10% 酢酸) に浸し、室温で 10 分間振盪した。Quick-CBB の A 液と B 液を等量混合し、室温で 30 分間振盪し染色を行った。染色後、泳動ゲルを蒸留水で数回洗浄して脱色し、非特異的染色を十分取り除いた後、染色されたバンドを可視光下で撮影した。

PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N は不溶性画分で多く発現していたことから、不溶性画分を可溶化した。超音波破碎後の遠心によって得られた沈殿を、集菌前の培養液量の 1/10 量の Binding Buffer に懸濁した。氷上で超音波破碎した後、12,000×g、4℃で 15 分間遠心して沈殿を得た後、同じ操作をもう一度繰り返して再び沈殿を得た。沈殿に imidazole 濃度を 20 mM にした Binding Buffer を加えて可溶化し、沈殿を溶かした。これを 12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、上清を次の精製に用いた。

PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N を発現させた大腸菌より、His-tag 付加した各タンパク質を Ni^{2+} カラムによりアフィニティー精製した。連続した数残基のヒスチジン残基は Ni^{2+} とキレート結合することから、 Ni^{2+} カラムを使用することにより pET30a(+)で発現させた His-tag 付加のタンパク質を選択的に Ni^{2+} カラムに結合させることが出来る。 Ni^{2+} カラムに結合した His-tag 付加したタンパク質の溶出にはイミダゾール溶液を用いる。イミダゾールはヒスチジン残基の側鎖の構造と同じ物質であり、キレート結合の競合反応によって His-tag 付加したタンパク質を溶出することが出来る。以下の手順で Ni^{2+} カラムによる His-tag 付加したタンパク質の精製を行った。

1. 断面円 1.2 cm²、15 ml 容量のカラム (Novagen) に、50%スラリー(懸濁体) の Ni-NTA His-Bind Resins (Novagen) を 2 ml 加えた。
2. 樹脂を樹脂容量 (1 ml) の 3 倍量の滅菌水で洗浄。
3. 樹脂容量の 5 倍量の Charge Buffer (50 mM NiSO_4) を加え、樹脂に Ni^{2+} を結合。
4. 樹脂容量の 3 倍量の Binding Buffer (6 M Urea 入り) を加えて Ni^{2+} カラムを平衡化。
5. 可溶化したタンパク質溶液を加えた。
6. Ni^{2+} カラムへの結合量を増すため、素通り画分を再度 (計 3 回) 加えた。

7. 樹脂容量の 10 倍量の Binding Buffer (6 M Urea 入り) を加え Ni^{2+} カラムを洗浄。
8. 樹脂容量の 6 倍量の Wash Buffer (6M Urea 入り) を加え、 Ni^{2+} カラムを洗浄。
(Wash Buffer : 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 60 mM imidazole)
9. 樹脂容量の 6 倍量の Elute Buffer (6M Urea 入り) を加え、His-tag が付加されたタンパク質を溶出 (Elute Buffer : 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 M imidazole)。
10. Ni^{2+} カラムに加える前のタンパク質溶液、各段階 (6, 7, 8, 9) で Ni^{2+} カラムを通して得られた溶液を SDS-PAGE でゲル電気泳動してタンパク質の発現パターンを検証した。

精製した PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N を家兎に免疫し、抗血清を得た。抗体の発現を上昇させるため、初回の注射から 4 週間後に抗原の二次注射を行った。二次注射の 1 週間後に一次採血を行い、さらにその 1 週間後に抗原の三次注射を行った。三次注射の 1 週間後に全採血を行い、兎の抗血清を得た。得られた抗血清から Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare) を用いて IgG 精製を行った。IgG 精製の具体的な手順は以下の通りである。

1. 断面円 1.2 cm^2 、15 ml 容量のカラム (Novagen) に、Protein A Sepharose CL-4B を 1 ml 加えた。
2. Protein A カラムに Running Buffer を 10 ml 加え、平衡化。
(Running Buffer : 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Sodium Azide)
3. 抗血清 1 ml と Running Buffer 1 ml とを混ぜた溶液を Protein A カラムに加えた。
4. Running Buffer 10 ml を 2 回加え、Protein A カラムを洗浄。
5. Eluting Buffer (100 mM Glycine-HCl, pH 3.0) を 1 ml 加え、抗体を溶出。これを 10 回繰り返し、それぞれを別の画分として回収。
6. 溶出した画分の O.D.₂₈₀ の値を分光光度計でそれぞれ測定し、IgG 濃度を測定。
7. IgG が多量に含まれていた画分に Neutralizing Buffer (1 M Tris-HCl, pH 9.0) を加え、pH を 7.0~8.0 に合わせた。

IgG タンパク質の濃度測定には紫外吸光法を利用した分光光度計で行った。溶出画分 5 μl に対し Eluting Buffer 45 μl を加えて 50 μl とし、280 nm の吸収を測定した。Blank には Eluting Buffer を用いた。IgG 濃度には以下の式で算出された値を用いた。

$$(\text{O.D.}_{280} \text{ の値}) \div 1.445 \times 10 \text{ (mg/ml)}$$

2.2.7. ウェスタンブロット解析

調整したタンパク質を、SDS-PAGE に供試し、続いてウェスタンブロット解析を以下の手順で行った。タンパク質サイズマーカーには、Precision Plus Protein Standards All

Blue (BIO-RAD) を用いた。

1. SDS-PAGE でタンパク質を泳動したゲルを、ブロッティングバッファーに浸した。ブロッティングバッファーは 100 mM のトリス、192 mM のグリシン、20% (v/v) メタノールを混合したものをを用いた。
2. SDS-PAGE の泳動ゲルと同じ大きさに切った厚手のろ紙をブロッティングバッファーに浸し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore) を、100% メタノールに浸した後、ブロッティングバッファーに浸した。
3. セミドライ式のブロッティング装置 (BIO-RAD) に、ろ紙 2 枚、PVDF 膜、泳動ゲル、ろ紙 2 枚の順で重層した。
4. 10V で 30 分間に続き、15V で 30 分間のブロッティングを行った。
5. ブロッティング後の PVDF 膜をブロッキングバッファーに浸けて室温で 1 時間振盪した。ブロッキングバッファーは 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20、5 % (v/v) スキムミルク (BD Difco) を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に混合したものをを用いた。
6. ブロッキング後の PVDF 膜を PBST で洗浄した。
7. 一次抗体溶液 (2.2 $\mu\text{g/ml}$ の抗 PoiBI-Imp 抗体もしくは抗 PoiBI-IdpA-N 抗体を混合した PBST) に PVDF 膜を浸し、37°C で 40 分間反応させた。
8. PBST で PVDF 膜を洗浄した後、二次抗体溶液 (二次抗体を PBST で 3000 倍希釈したもの) に PVDF 膜を浸し、37°C で 40 分間反応させた。二次抗体にはアルカリフォスファターゼ (AP) 標識の抗ウサギ IgG-ヤギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。
9. PVDF 膜を PBST で洗浄した後、ECL Western Blotting Reagent Pack (Amersham Pharmacia Biotech) に浸け、LAS4000 (Fuji film) でシグナル検出を行った。

2.2.8. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析は以下の手順で行った。

1. 植物を固定液内に入れ、デシケーター内での脱気を繰り返すことで植物組織内の空気を抜いた後、4°C で一晩固定した。植物は健全および PoiBI ファイトプラズマ感染のポインセチアを使用し、ファイトプラズマが多く局在している篩部を含む茎部分を用いた。固定液には 4% (w/v) パラホルムアルデヒド、0.25% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) を用いた。
2. 固定液を捨て、30% エタノールを入れて 1 時間以上振盪した。以降、50% エタノール、50% エタノール + 10% *tert*-ブチルアルコール (TBA、体系名：2-メチル-2-プロパノールなど)、50% エタノール + 20% TBA、50% エタノール + 30% TBA、40% エタノール

- ール+50% TBA、25% エタノール+75% TBA および 100% TBA で振盪して脱水した。
3. 80% TBA+20% クロロホルムを加えて静置した後、パラフィン (Paraplast Plus: Sherwood Medical) を加えて 60℃で一晩静置した。
 4. パラフィンで包埋した茎を維管束方向にマイクロームで 10 μ m の厚さに切断し、PLL コートのスライドガラス上に乗せた。
 5. キシレンおよび 50% キシレン+50% エタノールでパラフィンを取り除いた。以降、段階的にエタノール濃度を下げた溶液につけて再水和した。
 6. 純水で洗浄した後、PBS で洗浄し、10% BSA を加えて室温で 30 分間静置してブロッキングを行った。
 7. 10% BSA を取り除いた後、10 μ g/ml の抗 PoiBI-Imp 抗体もしくは抗 PoiBI-IdpA-N 抗体を含む 10% BSA を加え、4℃で 1 晩反応させた。
 8. 反応させたスライドガラスを PBST で洗浄し、1000 倍希釈のアルカリフォスファターゼを結合させた抗ウサギ IgG を入れ、室温で 1 時間反応させた。
 9. アルカリフォスファターゼ (AP) バッファーで洗浄した後、暗黒下で発色液を加えて発色反応を行った。AP バッファーは 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ を混合した 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) を用いた。発色液は 0.175 mg/ml の 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIIP) および 0.34 mg/ml のニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を混合した AP バッファーを用いた。
 10. 発色反応後、反応液を捨て TE で洗浄して反応を停止させた。その後、段階的にエタノールで再水和させ、Eukit (O Kindler) でプレパラートを作製し、顕微鏡で観察した。

2.3. 結果

2.3.1. PoiBI ファイトプラズマの検出

ポインセチアは品種改良によって多くの品種が開発、商品化されている。まず日本国内のポインセチアが PoiBI ファイトプラズマに感染しているかどうかを調べるため、複数のポインセチア品種を用いてファイトプラズマ感染の有無を調べた。ファイトプラズマ DNA の検出は、ファイトプラズマの *16S rRNA* 遺伝子の部分配列の 1.3 kbp を増幅するユニバーサルプライマーを用いた PCR によって行った。調査した 32 品種のうち、27 品種で DNA 増幅断片が得られた (表 2.1.)。一方、AHD, AHM, AHW, C-1 および FIS の 5 品種では *16S rRNA* 遺伝子の増幅は認められなかった。DNA 増幅の認められた 27 品種由来の増幅断片をダイレクトシーケンスで配列を解読した結果、全ての配列について、既報の PoiBI ファイトプラズマの *16S rRNA* 遺伝子 (Lee *et al.*, 1997; GenBank Acc. No. AF190223) の配列と一致したため、DNA の増幅した 27 品種には PoiBI ファイトプラズマが感染していることが示唆された。ポインセチアの形態を PoiBI ファイトプラズマ感染の有無によって比較した所、PoiBI ファイトプラズマが感染した品種は背丈が低く、枝分かれの多い形態を示していた (図 2.3.)。

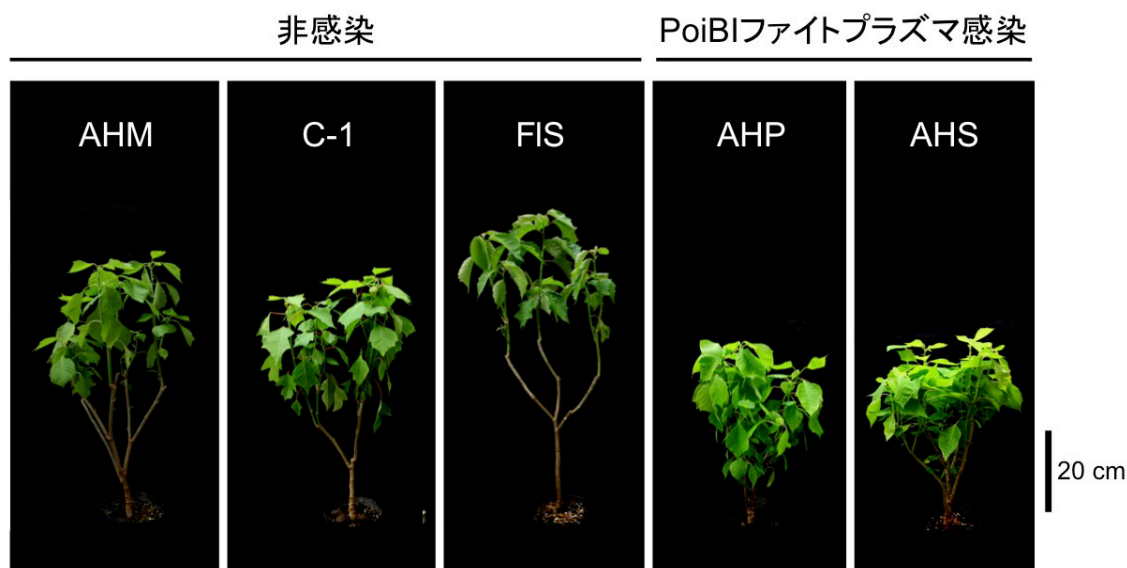


図 2.3. ポインセチアの形態比較

PoiBI ファイトプラズマ感染の有無によるポインセチアの形態の比較。16S *rRNA* 遺伝子の増幅が認められなかった 3 品種 (AHM, C-1, FIS) および増幅が認められた 2 品種 (AHP, AHS) を比較した。

2.3.2. PoiBI-*imp* と PoiBI-*idpA* の配列解読と局在推定

PoiBI ファイトプラズマが持つ遺伝子の多様性を調べるため、PoiBI ファイトプラズマの感染が認められた 27 品種のポインセチアを材料として用いて *imp* 遺伝子 (PoiBI-*imp*) と *idpA* 遺伝子 (PoiBI-*idpA*) を含むゲノム領域をクローニングし、配列を解読した。配列を解読するために増幅した 2 つの領域を図 2.4.A に記した。*amp* 遺伝子については、これまでの報告によりオルソログの存在が確認されていないため増幅を行わなかった (Liefting & Kirkpatrick, 2003; Saccardo *et al.*, 2012)。

PoiBI-*imp* から翻訳される Imp タンパク質 (PoiBI-Imp) と PoiBI-*idpA* から翻訳される IdpA タンパク質 (PoiBI-IdpA) のアミノ酸配列を、PJ の塩基配列から推定し、これらの配列の膜貫通領域の有無を SOSUI ver 1.11 (Hirokawa *et al.*, 1998) を用いて調べたところ、PoiBI-Imp では N 末端側の 20~42 アミノ酸が、PoiBI-IdpA では N 末端側の 6~28 アミノ酸および C 末端側の 297~319 アミノ酸が膜貫通領域であると推定された (図 2.4.B)。Imp で N 末端側に 1 つの膜貫通領域が、IdpA では両末端側にそれぞれ 1 つずつ、計 2 カ所の膜貫通領域があるという特徴は、Imp や IdpA に関するこれまでの報告と一致していた (Kakizawa *et al.*, 2006b, 2009)。

次に SignalP ver 3.0 を用いて、これらのタンパク質の分泌シグナル配列の有無を調べたところ、PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA はともに高い確率 (それぞれ 0.885 と 0.824) で分泌シグナル配列を持ち、PoiBI-Imp は N 末端から数えて 48 番目と 49 番目のアミノ酸の間で、PoiBI-IdpA は同じく 35 番目と 36 番目のアミノ酸の間で切断されると推定された。さらに PSORT を用いた局在推定では、PoiBI-Imp は細胞外へ分泌されると予測されたが、その確率は 0.300 と低く、PoiBI-Imp の局在については推定できなかった。PoiBI-IdpA は 0.769 の高い確率で菌体膜の表面に存在することが推定された。

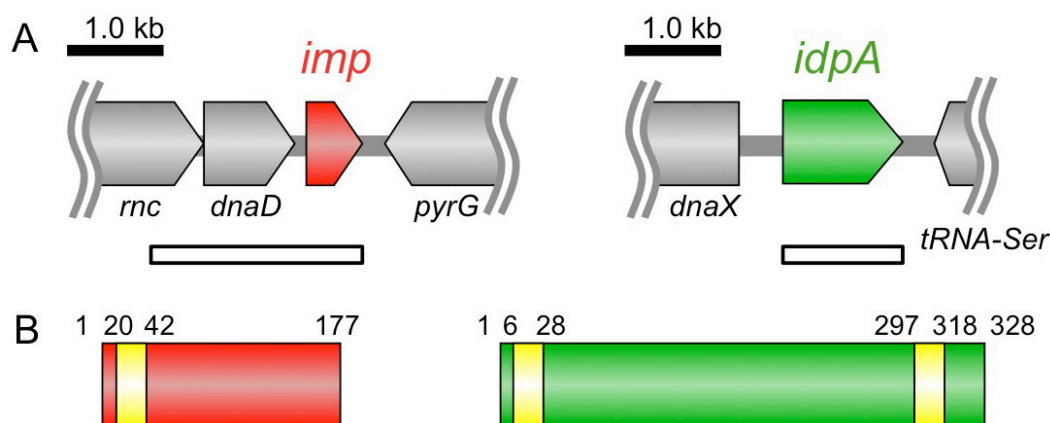


図 2.4. PoiBI ファイトプラズマの *imp* 遺伝子と *idpA* 遺伝子を含む領域

(A) PoiBI ファイトプラズマの *imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子とその周辺の遺伝子構成。遺伝子構成の下に白抜線領域を、27 品種由来の PoiBI ファイトプラズマで配列解読した。
(B) PoiBI ファイトプラズマの *imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子から推定される Imp および IdpA タンパク質の特徴。黄色で示された領域が SOSUI にて膜貫通領域と予測された。数字は N 末端からのアミノ酸番号。

2.3.3. 品種の違いによる PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA の多様性

PoiBI ファイトプラズマ感染の認められたポインセチア 27 品種から得られた、27 分離株の PoiBI-*imp* 配列を比較したところ、その塩基配列に多様性が認められた。いずれもアミノ酸変異を伴う塩基置換 (非同義置換) であり、アミノ酸変異を伴わない塩基置換 (同義置換) は認められなかった。27 分離株のうち、AHMaxi、AHP、AHS、Ar、EE、JB、PSR、PR、WW では PoiBI-Imp の配列が 100%一致し、これとは別に、PBR、PJ、VG の PoiBI-Imp 配列も 100%一致した。得られた PoiBI および WX ファイトプラズマの Imp のアミノ酸配列のアラインメントを図 2.5.に示した。上で述べた、配列が 100%一致したものに関しては WW および PJ を用い、この 2 品種と配列が 100%一致した品種の配列は図 2.5.では省略した。

PoiBI-Imp はいくつかの異なる箇所では配列に多様性が見られるがアミノ酸配列の同一性は高く、同一性が最も低い組み合わせは EP vs JJ, JM, PSM で、アミノ酸配列の同一性は 97.2%であった。PoiBI および WX ファイトプラズマの Imp 配列を基にした系統樹を図 2.6.に示した。

PoiBI-*imp* 配列が多様性に富むのに対し、PoiBI-*idpA* や PoiBI-16S rRNA では、塩基配列が完全に一致し、PoiBI ファイトプラズマ分離株間の違いは見られなかった。PoiBI-*imp* に隣接するハウスキーピング遺伝子の PoiBI-*dnaD* でも塩基配列が完全に一致し、*imp* 遺伝子の周辺の染色体が変異しやすいという可能性は低いと考えられた。

		20	40	60	
AHDR :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
AHL :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
EP :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
ER :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
EW :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
V-10 :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
IP :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
JJ :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
JM :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
JR :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
M :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
PSM :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
PP :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
PJ :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
SR :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
WP :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
WW :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKAI	KNLDSNLVSKW
WX :	MVAMDKHNKQSYLKTNGKIVLGVVS	AVVVILTAI	GVWFFMKN	SPSKV	KNLDSNLVSKW
		80	100	120	
AHDR :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
AHL :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
EP :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
ER :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
EW :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
V-10 :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
IP :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
JJ :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
JM :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
JR :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
M :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
PSM :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
PP :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
PJ :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
SR :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
WP :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
WW :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDAT	KKKTAY
WX :	DAVYTDAITKANNENSADKKAAL	KKVVKTLRTYYN	KDMDYLTNEE	KNKKPEDA	AKKTAY
		140	160		
AHDR :	EEAQKAAKTVKDALDEADKEV	TGQDDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 178
AHL :	EEAQKAAKTVKDALYEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
EP :	EEAQKAAKTVKYALDEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
ER :	EEAQKAAKTVKYALDEADNKVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 178
EW :	EEAQKAAKTVKYALDEADDKVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 178
V-10 :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-NVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
IP :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
JJ :	EEAQKAAKTVKDALNEED-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
JM :	EEAQKAAKTVKDALNEED-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
JR :	EEAQKAAKTVKDALNEED-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
M :	EEAQKAAKTVKDALDEADDKVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 178
PSM :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
PP :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
PJ :	EEAQKAAKTVKDALNEADDKVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 178
SR :	EEAQKAAKTVKDALDEDD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
WP :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-RVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
WW :	EEAQKAAKTVKDALDEAD-KVTGQ	DDAAVTS	LNNALAKVTKD	ICQKVVTQSKI	AYGLE : 177
WX :	EEAQKAAKTVKGALDEAD-LATGQ	DDAAVTS	LNKALEKVT	KD	ICQKVVTQSKIAYGLE : 176

図 2.5. PoiBI および WX ファイトプラズマの Imp のアミノ酸アラインメント

Imp は N 末端に 1 つの膜貫通領域（黒下線部）を持ち、この領域内のアミノ酸配列の保存性は高かった。一方で菌体外に露出する領域のアミノ酸は置換や欠失が認められた。

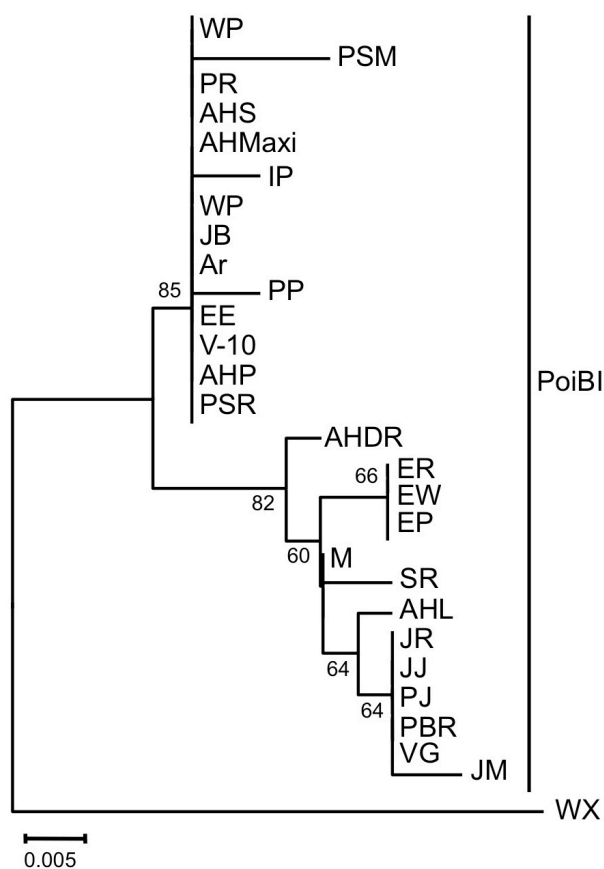


図 2.6. PoiBI 分離株および WX ファイトプラズマの Imp のアミノ酸配列を用いて作成した系統樹。近隣結合法に基づいて作成した系統樹。図中のブートストラップ値は 60 以上のみ表示し、アウトグループに WX ファイトプラズマを用いた。

2.3.4. PoiBI と WX ファイトプラズマが保持する遺伝子の比較解析

PoiBI と WX ファイトプラズマの Imp の同一性は 92.6～93.8%であり、中間値は 93.3%であった (図 2.5.)。PoiBI と WX ファイトプラズマの IdpA および Imp に隣接する DnaD のアミノ酸配列を調べた結果、PoiBI と WX ファイトプラズマ間の同一性はそれぞれ 64.7%と 98.0%であった。IdpA は N 末端と C 末端にそれぞれ 1 つの膜貫通領域 (図 2.7. の黒下線部) を持ち、この膜貫通領域内の配列はよく保存されていた。しかし、膜貫通領域に挟まれた親水性領域には多くの変異やギャップが認められた。IdpA は PoiBI と WX ファイトプラズマの配列を比較した時、菌体外に露出すると予想される領域において多くのアミノ酸置換があり、Imp や DnaD に比べて同一性が低かった。一方、ゲノム中で *imp* 遺伝子に隣接する *dnaD* 遺伝子の配列から予想される DnaD のアミノ酸配列は、PoiBI と WX ファイトプラズマでほとんど違いが無かった (図 2.7.)。

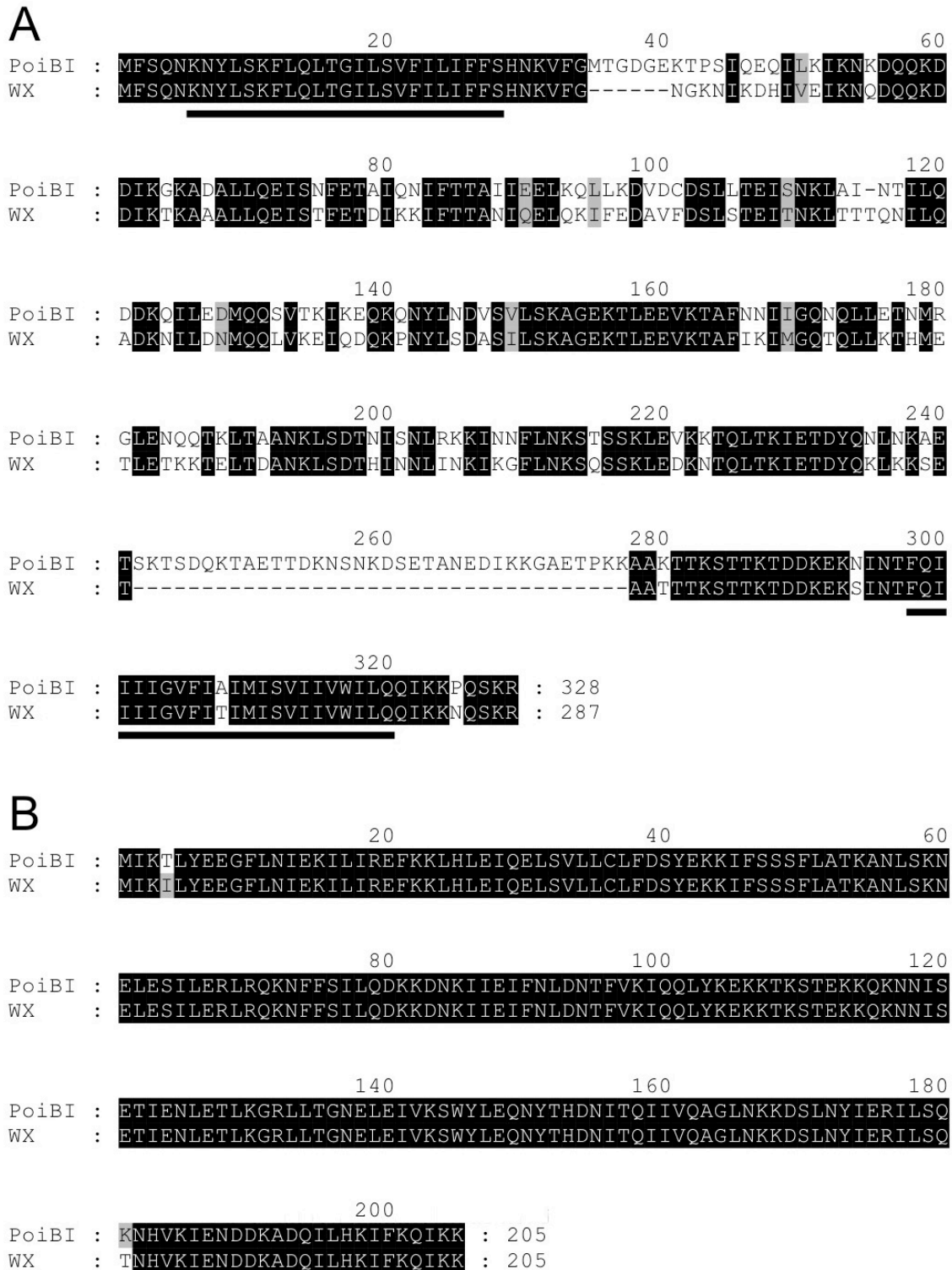


図 2.7. ldpA (A) および DnaD (B) のアミノ酸アラインメント

PoiBI ファイトプラズマの ldpA および DnaD 配列は全ての分離株で完全に一致したため、図では PoiBI のみ示した。WX-ldpA および WX-DnaD 配列は INSD Acc. No. AF533231 に登録された配列を用いた。黒下線部は膜貫通領域を示す。

2.3.5. *imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子の適応進化の検出

塩基の置換はアミノ酸変異を伴う非同義置換と、アミノ酸変異を伴わない非同義置換の大きく 2 つに分けられる。アミノ酸置換を伴う変異はタンパク質の機能的制約のためその多くが有害である一方、アミノ酸変異の伴わない (サイレントな) 変異はタンパク質のアミノ酸配列に影響しない。そのため、通常の遺伝子においてはサイレントな変異の割合が多く認められる。偽遺伝子などの中立的な遺伝子やアミノ酸変異によって機能を損なわない場合は、アミノ酸置換を伴う変異もサイレントな変異も同程度に蓄積する。しかし、アミノ酸の置換を伴う変異によって機能の増強などの利益が生じる場合には、正の選択圧が発生し、アミノ酸の置換を伴う変異がサイレントな変異よりも早く蓄積する。これを適応進化と呼ぶ。塩基配列の比較でタンパク質レベルでの正の選択圧を計る指標には、非同義置換率 (d_N) と同義置換率 (d_S) の比 (d_N/d_S) が重要である (Nei, 1987)。 d_N/d_S 値を計算したときに、その値が 1 より小さいときは安定的な選択圧を、1 に等しいときは中立変異を、1 より大きいときは正の選択圧を受けていると考えられる。

配列を解読した *dnaD* 遺伝子および *imp* 遺伝子、*idpA* 遺伝子において正の選択圧の影響を受けているかどうかを調べるため、 d_N/d_S の値を計算した。*PoiBI-dnaD* 遺伝子および *PoiBI-idpA* 遺伝子は全ての *PoiBI* 分離株で配列が一致していたため、 d_N/d_S の値の計算は出来なかった。さらに、*PoiBI-imp* 遺伝子は *PoiBI* ファイトプラズマ分離株間で塩基配列の違いが認められたものの、その変異は全てアミノ酸置換を伴う変異であった。そのため、全ての組み合わせで $d_S=0$ となるため、 d_N/d_S の値の計算は出来なかったが、*PoiBI-imp* 遺伝子は *PoiBI* 分離株間で強い適応進化が生じていることが示唆された。次に、*PoiBI* と *WX* ファイトプラズマの配列を用いて d_N/d_S の値を計算した。*dnaD* 遺伝子の d_N/d_S は 0.444 で 1 より小さいため、サイレントな変異がアミノ酸置換を伴う変異よりも多く、安定的な選択圧を受けていると考えられた (表 2.4.)。*imp* 遺伝子の宿主細胞に露出すると考えられる領域の d_N/d_S は 1.26~1.85 と 1 より大きいものの、 d_N と d_S の値に間に統計学的に有意な差はなかった (P 値=0.1700~0.3730; 表 2.5.)。 *dnaD* 遺伝子や *imp* 遺伝子で統計学的に有意な差が検出されなかったのに対して、*idpA* 遺伝子の宿主細胞に露出すると考えられる領域の d_N/d_S は 2.05、 P 値は 0.0018 で 1%有意であり、正の選択圧の影響を受けていると考えられた (表 2.4.)。

表 2.4. *dnaD* および *idpA* 遺伝子の PoiBI vs WX の d_N/d_S 値と P 値

遺伝子	d_N/d_S	P 値
<i>dnaD</i>	0.44	0.2991
<i>idpA</i>	2.05 **	0.0018

idpA 遺伝子は宿主細胞に露出すると考えられる領域の塩基配列を用いて計算した

** : d_N と d_S の値の間に 1% レベルで有意差あり

表 2.5. *imp* 遺伝子の PoiBI 分離株 vs WX の d_N/d_S 値と P 値

d_N/d_S	P 値	PoiBI 分離株
1.85	0.1700	PSM
1.85	0.1705	JM
1.85	0.1708	JJ
1.71	0.2174	ER, EP, EW
1.71	0.2097	AHL
1.70	0.2130	DPP
1.70	0.2121	PBR, PJ, JR, VG
1.69	0.2161	IP
1.69	0.2155	SR
1.56	0.2615	AHDR, AHMaxi, AHP, AHS, Ar, EE, JB, JR1, M, PSR, PR, WW
1.26	0.3730	V-10, WP

宿主細胞に露出すると考えられる領域の塩基配列を用いて計算した

2.3.6. 大腸菌における PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の発現および精製

ファイトプラズマの細胞表面に露出していると考えられる Imp および IdpA タンパク質に対する抗体を作出し、植物内において PoiBI ファイトプラズマがそれらタンパク質を発現しているかどうかを解析した。まず、PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA タンパク質を大腸菌内で発現させるため、それぞれの遺伝子のクローニングを行った。PoiBI-Imp は全長領域と膜貫通領域を除いた親水性領域 (PoiBI-Imp-out) の 2 つ、PoiBI-IdpA は全長領域と膜貫通領域を除いた親水性領域 (PoiBI-IdpA-cent)、親水性領域を半分にした N 末端側 (PoiBI-IdpA-N) と C 末端側 (PoiBI-IdpA-C) の 4 つのコンストラクトの作成を試みた (図 2.8.)。ベクターへのクローニングが成功しなかった PoiBI-IdpA および PoiBI-IdpA-cent 以外のコンストラクトについて IPTG によるタンパク質発現誘導の後、SDS-PAGE によって、目的のタンパク質の発現を確認した。その結果、PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA-N でのみ、不溶性画分において予想されたサイズ付近にタンパク質の特異

的な発現が認められた (図 2.9.)。PoiBI-Imp-out および PoiBI-IdpA-C は、予想のサイズをはるかに超えるタンパク質の発現が認められた。以後の実験には PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N を使用した。

PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA-N を発現した大腸菌の不可溶性画分を変性させて可溶化した後、 Ni^{2+} カラムに注ぎ入れ、His-tag が付加した PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N を精製した。精製タンパク質の純度は SDS-PAGE で確認した (図 2.10.)。PoiBI-Imp および PoiBI-IdpA-N を回収し、家兎に免疫し、抗 PoiBI-Imp 抗血清および抗 PoiBI-IdpA-N 抗血清を得た。抗血清を Protein A Sepharose CL-4B を用いたカラム精製により IgG を精製し、精製後の画分ごとに分光高度計により吸光度を測定した。吸光度を基に精製 IgG の濃度を算出した結果、どちらの抗体も 2 度目に溶出した画分が最も多量の IgG を含んでいた (抗 PoiBI-Imp : 2.16 mg/ml、抗 PoiBI-IdpA : 2.24 mg/ml)。この画分の pH を 7.3 付近になるように調製し、抗 PoiBI-Imp 抗体および抗 PoiBI-IdpA-N 抗体として以後の解析に供試した。

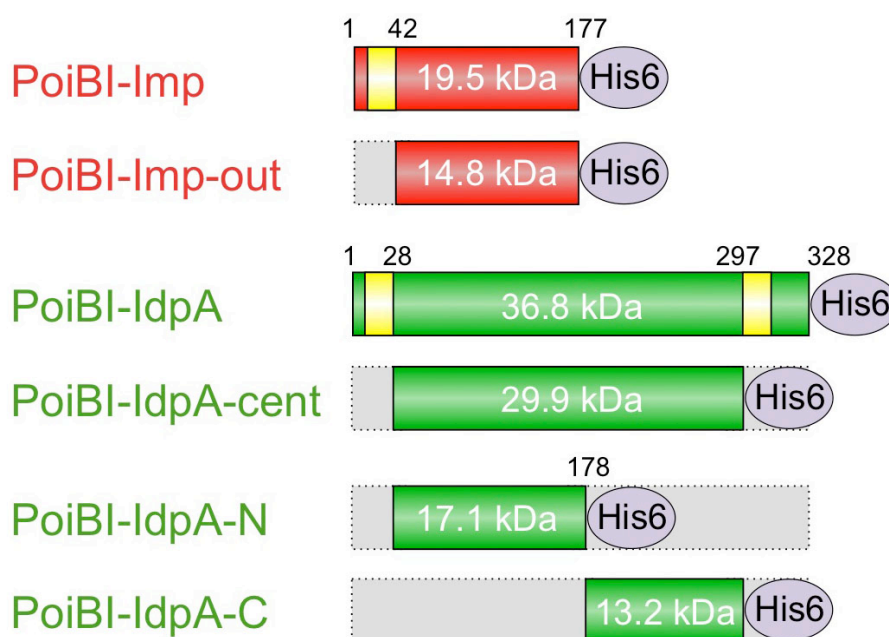


図 2.8. 抗体作成のために設計したコンストラクト

PoiBI-Imp は全長 (PoiBI-Imp) と膜貫通領域を除いた領域 (PoiBI-Imp-out)、PoiBI-IdpA は全長 (PoiBI-IdpA) と膜貫通領域を除いた親水性領域 (PoiBI-IdpA-cent)、親水性領域の N 末端側半分 (PoiBI-IdpA-N) と C 末端側半分 (PoiBI-IdpA-C) を設計した。上部の数字は N 末端からのアミノ酸番号。コンストラクトに書かれた予想分子量は His-tag を除いた大きさ。

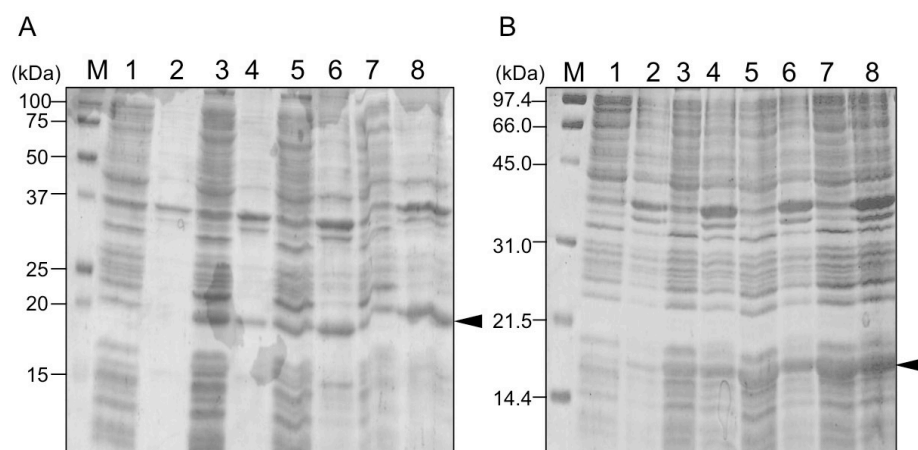


図 2.9. PoiBI-Imp と PoiBI-IldpA タンパク質の大量発現

SDS-PAGE、CBB 染色による PoiBI-Imp (A) と PoiBI-IldpA-N (B) の発現確認 (黒矢頭)。レーン M; タンパク質サイズマーカー。レーン 1, 3, 5, 7; 可溶性画分、レーン 2, 4, 6, 8; 不溶性画分、レーン 1, 2; IPTG 添加前、レーン 3, 4; IPTG 添加 1 時間後、レーン 5, 6; IPTG 添加 2 時間後、レーン 7, 8; IPTG 添加 3 時間後。

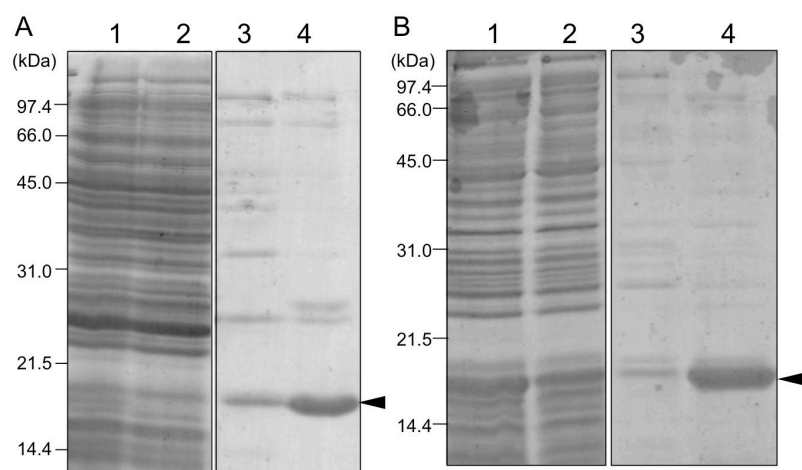


図 2.10. 大量発現させた PoiBI-Imp と PoiBI-IldpA-N の精製

Ni²⁺ カラムで精製した PoiBI-Imp (A) と PoiBI-IldpA-N (B) の泳動 (CBB 染色)。レーン 1; 精製前 (大腸菌画分)、レーン 2; Flow through、レーン 3; 洗浄バッファー、レーン 4; 抽出バッファー。矢頭はカラム精製によって得られたタンパク質のバンドを示す。

2.3.7. ウェスタンブロット解析

PoiBI ファイトプラズマが感染したポインセチアでの PoiBI-Imp と PoiBI-IldpA の発現量を調べるため、PoiBI ファイトプラズマ感染ポインセチア品種である JR の粗汁液 (感染粗汁液) と PoiBI ファイトプラズマ非感染ポインセチア品種である FIS の粗汁液 (健全粗汁液) に対して、2.3.5.項で得られた抗体を用いてウェスタンブロット解析を行う

た。それぞれの植物から 2×サンプルバッファーによって抽出した全タンパク質粗抽出液を 15,000 rpm で遠心し、上清を試料として抗 PoiBI-Imp 抗体および抗 PoiBI-IdpA-N 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、抗 PoiBI-Imp 抗体を用いた検出では、感染粗汁液を泳動したレーンのみで特異的なバンドが得られた (図 2.11.A)。しかし抗 PoiBI-IdpA-N 抗体を用いた検出では、健全粗汁液および感染粗汁液いずれに対してもバンドは得られなかった (図 2.11.B)。

ウェスタンブロット解析では抗 PoiBI-Imp 抗体を用いたときに PoiBI ファイトプラズマ感染植物から PoiBI-Imp 全長の大きさに近い約 19.6 kDa のバンドが検出された。この結果より 2.3.2.項で PoiBI-Imp に存在すると予想されたシグナル配列は切断されず、ポインセチアの植物内で PoiBI-Imp は膜タンパク質として存在することが示唆された。一方、大腸菌で発現させた PoiBI-Imp のうち、抗 PoiBI-Imp 抗体と最も良く結合するタンパク質は、感染植物で検出されたバンドに比べ数 kDa 小さかった。これにより、大腸菌内で PoiBI-Imp を発現させた場合、PoiBI-Imp が持つシグナル配列によってタンパク質が切断されている可能性が示唆された。

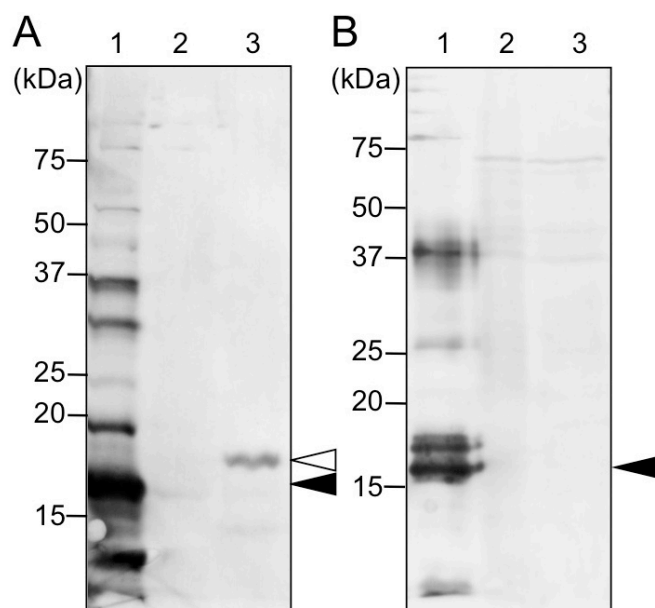


図 2.11. ウェスタンブロット解析による PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の検出

ウェスタンブロット解析による PoiBI-Imp (A)と PoiBI-IdpA (B) の検出。レーン 1; 大腸菌発現させた PoiBI-Imp (A)、PoiBI-IdpA-N (B)、レーン 2; PoiBI ファイトプラズマ非感染ポインセチア (FIS) 抽出物、レーン 3; PoiBI ファイトプラズマ感染ポインセチア (JR) 抽出物。黒矢頭は大腸菌発現させたタンパク質のうち抗体と最も良く結合しているタンパク質を、白抜矢頭は PoiBI ファイトプラズマ感染ポインセチア由来のタンパク質のうち、抗体と最も良く結合しているタンパク質のバンドの位置を示す。

2.3.8. 免疫組織化学的解析

さらに PoiBI ファイトプラズマ感染ポインセチアにおける PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の局在を免疫組織化学的に調べた。感染および健全のポインセチアにはウェスタンブロット解析と同じ品種を使用し、抗体反応を行う植物切片にはパラフィン包埋したポインセチアの茎を維管束方向に切断した切片を用いた。観察の結果、抗 PoiBI-Imp 抗体および抗 PoiBI-IdpA-N 抗体のどちらを用いた場合も、感染ポインセチアの篩部で特異的に抗体が検出された (図 2.12.)。

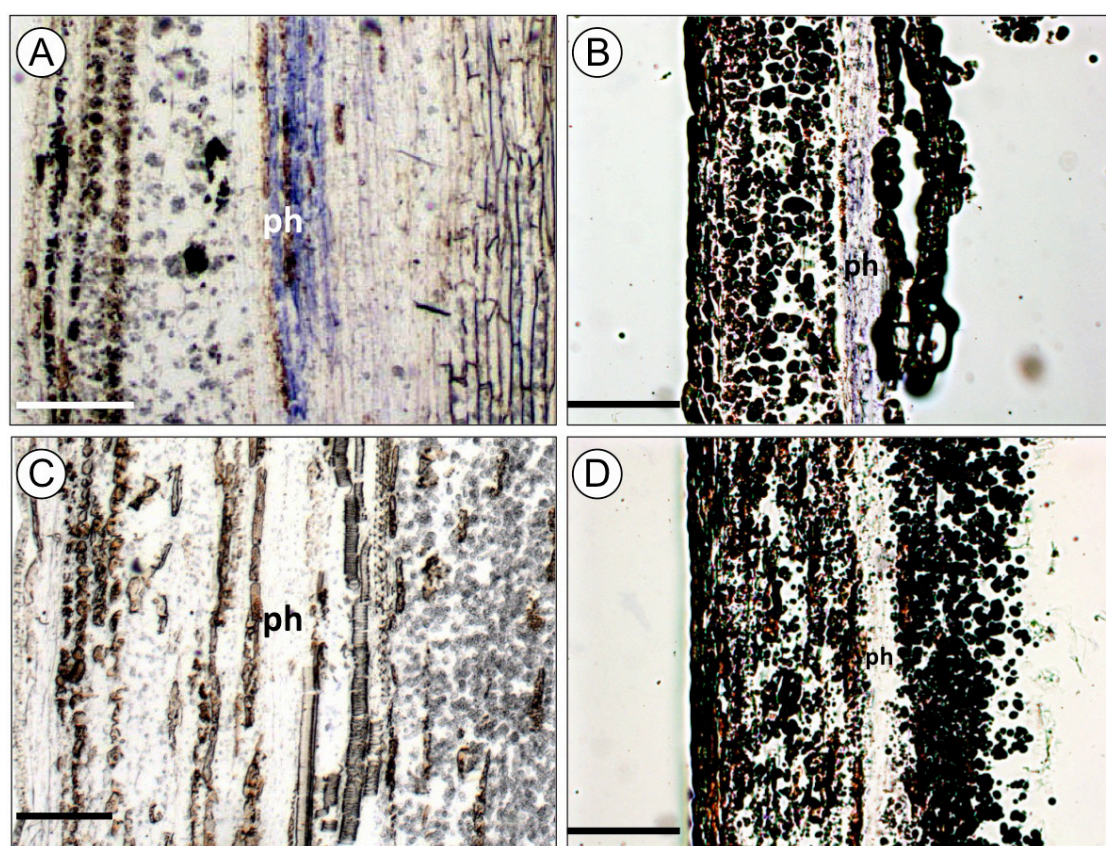


図 2.12. 免疫組織化学的手法による PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA タンパク質の検出

免疫組織化学的手法による PoiBI-Imp と PoiBI-IdpA の検出。A, C; 抗 PoiBI-Imp 抗体による検出、B, D; 抗 PoiBI-IdpA-N 抗体による検出。A, B; PoiBI ファイトプラズマ感染ポインセチア (JR)、C, D; PoiBI ファイトプラズマ非感染ポインセチア (FIS) の維管束方向の断面。ph: 篩部。スケールバーは 250 μ m。A および B の感染ポインセチアの篩部で、抗体との反応を示す青い発色が検出された。

2.4. 考察

2.4.1. PoiBI ファイトプラズマの主要な膜タンパク質

PoiBI ファイトプラズマは *Imp* と *IdpA* タンパク質をコードする *imp* 遺伝子と *idpA* 遺伝子を保持しており、これら 2 つは互いに相同な関係でない。*imp* 遺伝子は広範囲のファイトプラズマ種で保存されていることが既に知られている (Kakizawa *et al.*, 2009)。WX ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質は *IdpA* であることが報告されているが (Blomquist *et al.*, 2001)、WX ファイトプラズマと同種別系統である PoiBI ファイトプラズマの主要表面膜タンパク質についてはこれまで研究されていなかった。本研究では、PoiBI ファイトプラズマの感染が確認されたポインセチアの粗汁液や茎の切片をサンプルとして、ウェスタンブロット解析および免疫組織化学的解析を行い、どちらの手法でも PoiBI-*Imp* の発現を確認した。しかし、PoiBI-*IdpA* は免疫組織化学的解析で発現を確認出来た一方で、ウェスタンブロット解析では検出できなかった。これまで、ウェスタンブロット解析よりも免疫組織化学的解析の方で検出感度が高いことが複数の研究において報告されている (Jiang *et al.*, 1988; Friedlander *et al.*, 1989; Gala *et al.*, 1994)。このため、今回も同様にウェスタンブロット解析で検出できなかった PoiBI-*IdpA* が、免疫組織化学的解析では検出が可能であったと考えられる。

免疫組織化学的解析で検出されたシグナル強度は PoiBI-*Imp* の方が強く、ウェスタンブロット解析では PoiBI-*Imp* のみバンドが検出された (図 2.11.)。大腸菌で発現させた抗原に対する抗体の反応性は、ウェスタンブロットにおいて同程度であったため (図 2.13.)、感染植物内で PoiBI ファイトプラズマは *IdpA* より *Imp* を多く発現していることが示唆された。

PoiBI-*16S rRNA* や PoiBI-*dnaD*、PoiBI-*idpA* の塩基配列はポインセチアの品種によらず一致していたのに対し、PoiBI-*imp* は PoiBI ファイトプラズマの由来となるポインセチアの品種によって配列が異なっていた。さらに、PoiBI-*imp* に認められた塩基置換は全てアミノ酸変異を伴っており、塩基置換箇所は全て膜貫通領域より下流のファイトプラズマ菌体外に露出する領域であった (図 2.5.)。菌体外に露出する領域は宿主と直接相互作用すると考えられ、また、ファイトプラズマが局在する篩部細胞内の環境は品種ごとに少しずつ異なると予想される。さらに、ポインセチアに PoiBI ファイトプラズマを感染させる接ぎ木は、それぞれの品種ごとに行われてきたと考えられ、PoiBI ファイトプラズマが同じ品種内で繰り返し伝搬されることで、それぞれの品種内で生存するのに有利な PoiBI ファイトプラズマが優勢になった結果、PoiBI-*imp* における配列の多

様性が認められた可能性がある。

OY ファイトプラズマや AY, CYP などが属する *P. asteris* のファイトプラズマは、本来の主要表面膜タンパク質である Amp をコードする *amp* 遺伝子の他に、Imp をコードする *imp* 遺伝子を保持している。OY 系統を用いて植物体内におけるこれらのタンパク質の発現量を比較したところ、Amp が Imp よりも約 10 倍発現量が多く、また Amp のほうが系統間における配列多様性に富み、強い適応進化が認められている (Kakizawa *et al.*, 2009)。PoiBI ファイトプラズマでは、PoiBI-Imp が PoiBI-IdpA よりも多く発現していたことから、PoiBI ファイトプラズマにおける主要な膜タンパク質は Imp であると示唆されるが、*P. asteris* の解析例と同様に、アミノ酸配列の多様性に富むことが示された。これは、主要表面膜タンパク質は発現量が高いだけでなく、アミノ酸配列多様性に富む傾向があることを示している。一方、PoiBI ファイトプラズマと同種別系統の WX ファイトプラズマにおいては、IdpA が主要表面膜タンパク質であると報告されている (Blomquist *et al.*, 2001)。本章の結果から、PoiBI と WX は同種のファイトプラズマでありながら、主要な膜タンパク質が異なるという可能性が示唆された。これまでの知見では、同種のファイトプラズマで発現している主要な膜タンパク質は同じであると考えられてきたため (Kakizawa *et al.*, 2006b)、本章で得られた結果は興味深い知見であるといえる。

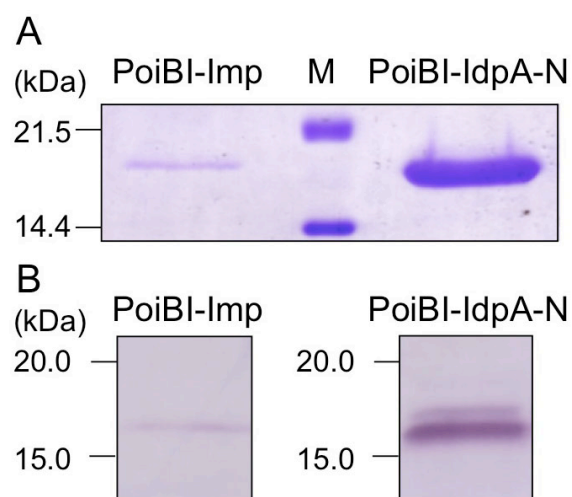


図 2.13. 大腸菌発現の抗原に対する抗体の反応性

A：大腸菌で発現した各タンパク質を SDS-PAGE で泳動したのち、CBB 染色結果。

B：それぞれの抗体で精製タンパク質のウェスタンブロット結果。

2.4.2. ポインセチアからの PoiBI ファイトプラズマの検出

本研究で調査したほとんどのポインセチア品種で PoiBI ファイトプラズマの感染が確認されたが、中には感染が認められなかった品種もあった。C-1 およびエックスポイント C-1 ホワイトは RB 型の品種として既に報告がされており (Dole and Wilkins, 1991)、これらの品種はファイトプラズマ・フリーの品種であることが推定される。本研究で調査した C-1 も *16S rRNA* 遺伝子をターゲットとした PCR ではファイトプラズマを検出できなかった。C-1 以外の AHD や AHM、AHW、FIS でも、ファイトプラズマを検出できなかったことから、品種として登録されているポインセチアの全てが PoiBI ファイトプラズマに感染しているわけではない可能性が強く示唆された。ただし、今回の PoiBI ファイトプラズマ感染の検出は PCR でのみ行っているため、PoiBI ファイトプラズマが検出されなかったこれらの品種では、(1) PoiBI ファイトプラズマの蓄積量が少なく PCR による検出限界以下である可能性や、(2) 植物由来の阻害物質の存在による影響などのため PCR で遺伝子が増幅されづらかったという可能性が考えられる。しかし、ポインセチアの DNA 抽出に際しては、ファイトプラズマの存在量が多いと考えられる維管束部分を用い、PoiBI ファイトプラズマの検出の可否に関わらず全て同じ手法で抽出を行っている。さらに、PCR 阻害物質の影響を排除するため、抽出した DNA を 10 倍および 100 倍に希釈した溶液をテンプレートとして PCR を行った場合でも、先に述べた 5 品種では DNA の増幅が確認出来なかったため (図 2.14.)、(2) の可能性も低い。従って PCR でファイトプラズマを検出できなかった 5 品種はファイトプラズマ・フリーの品種である可能性が高いと考えられる。

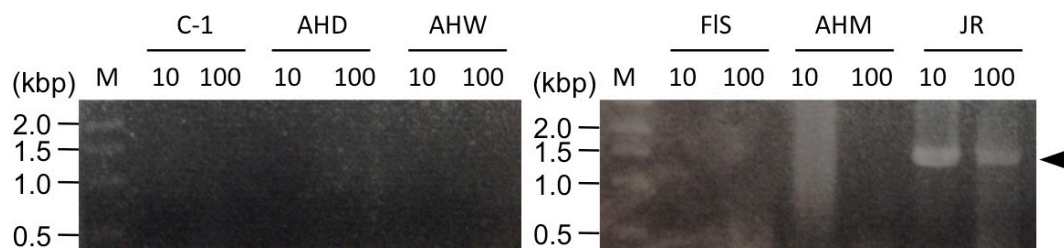


図 2.14. 希釈した DNA を鋳型に行った PCR 産物の泳動

抽出した DNA 溶液を 10 倍および 100 倍に希釈した溶液を鋳型に PCR を行い、電気泳動した結果。希釈したテンプレートを用いても DNA の増幅は確認できなかった。感染が確認されている JR では PCR による DNA の増幅が確認された (矢頭)。M : 1 kb ラダー、10 および 100 : 10 倍および 100 倍希釈した DNA を鋳型とした PCR 産物の泳動レーン。

2.4.3. PoiBI と WX ファイトプラズマの比較

PoiBI と WX ファイトプラズマの *imp* 遺伝子の塩基配列の同一性は、平均 97.2%であったのに対し、*idpA* 遺伝子の同一性は 77.7%と低かった。PoiBI と WX ファイトプラズマの間で *idpA* 遺伝子はアミノ酸変異を伴う置換がアミノ酸変異を伴わない (サイレントな) 置換よりも多く生じていることが分かった (菌体外に露出する領域の $d_N/d_S = 2.05$)。WX ファイトプラズマにおいて IdpA は主要表面膜タンパク質であることが、ファイトプラズマ特異的なモノクローナル抗体を用いた実験により示されている (Blomquist *et al.*, 2001)。このため、WX ファイトプラズマにおいて *idpA* 遺伝子が宿主とファイトプラズマの間の相互作用に重要な役割を持つ可能性が考えられており、WX ファイトプラズマの *idpA* 遺伝子の変異により、WX ファイトプラズマの宿主への適応度が上昇した可能性がある。

2.4.4. *P. pruni* の主要表面膜タンパク質の進化的考察

P. pruni に属するファイトプラズマでは、VAC, MA1 および MW1 ファイトプラズマのドラフトゲノム配列の解読が行われている (Saccardo *et al.*, 2012)。これらドラフトゲノム配列から Imp および IdpA に相同な配列を取得し、菌体外に露出する領域の d_N/d_S の値を計算した。*idpA* 遺伝子では VAC vs PoiBI および VAC vs WX で $d_N/d_S > 1$ かつ P 値 < 0.05 の結果が得られた (表 2.6.)。 *imp* 遺伝子では MA1 vs PoiBI 分離株の一部の組み合わせおよび MA1 vs MW1 で $d_N/d_S > 1$ かつ P 値 < 0.05 の結果が得られた (表 2.7.)。 d_N/d_S の値が 1 を超え、 d_N と d_S の値の間に有意な差が認められる場合は、その膜タンパク質が宿主に適応していると予想されることから、VAC, MA1 および MW1 ファイトプラズマにおいても Imp および IdpA が主要な膜タンパク質として発現している可能性がある。しかし、MA1, MW1 および VAC ファイトプラズマではタンパク質の発現量解析が行われていないので、Imp と IdpA のどちらが主要表面膜タンパク質であるかを判断することは出来ない。今後、これらのファイトプラズマ系統で IdpA と Imp の発現量比較が行われることで、*P. pruni* に属するファイトプラズマの主要な膜タンパク質についての知見が得られ、より詳細な進化的考察が出来ると考えられる。

表 2.6. *idpA* 遺伝子の各系統間の d_N/d_S 値と P 値

d_N/d_S	PoiBI	WX	VAC	MA1
WX	2.05 **			
VAC	1.53 *	1.71 *		
MA1	1.23	1.21	1.35	
MW1	1.10	0.94	1.16	1.34
P 値	PoiBI	WX	VAC	MA1
WX	0.0018			
VAC	0.0365	0.0193		
MA1	0.1951	0.2321	0.1392	
MW1	0.3382	0.4040	0.2884	0.2319

宿主細胞に露出すると考えられる領域の塩基配列を用いて計算した
 d_N と d_S の値の間に 5% (*) および 1% (**) レベルで有意差あり

表 2.7. *imp* 遺伝子の各系統間の d_N/d_S 値と P 値

d_N/d_S	PoiBI	WX	VAC	MA1
WX	1.26 - 1.84			
VAC	1.05 - 1.15	0.90		
MA1	1.77 - 2.04 *	1.22	1.67	
MW1	1.41 - 1.52	1.19	1.41	4.18 ***
P 値	PoiBI	WX	VAC	MA1
WX	0.1700 - 0.3730			
VAC	0.3596 - 0.4456	0.3935		
MA1	0.0493 - 0.0892	0.3158	0.0981	
MW1	0.1328 - 0.1874	0.3328	0.2438	0.0003

宿主細胞に露出すると考えられる領域の塩基配列を用いて計算した
 d_N と d_S の値の間に 5% (*) および 0.1% (***) レベルで有意差あり
MA1 vs PoiBI は、MA1 vs PSM, MA1 vs JJ のみ 5%レベルで有意差有り

第 3 章

ファイトプラズマの接着因子候補 P38 の解析

3.1. 細菌の接着因子

病原細菌は、初めに宿主細胞表面に対して接着することで感染する (Soto & Hultgren, 1999)。多くの病原細菌において、菌体の接着には、接着因子 (adhesin) と呼ばれる宿主細胞表面に付着する菌体表面の膜タンパク質が機能する (Giron *et al.*, 1996; Soto & Hultgren, 1999)。従って、接着因子を同定し、性状解析をすることは細菌の感染の最初のステップを解明する上で重要である。

モリキューテス綱は、細胞壁を持たない低 G+C 細菌の一群であり、マイコプラズマ、スピロプラズマ、ファイトプラズマなどが属する (Razin *et al.*, 1998; Rottem, 2003; Oshima *et al.*, 2004)。モリキューテスは、ヒト、動物、虫、植物など広範囲の宿主に寄生する。これまで、宿主細胞表面への接着が、ヒトや動物に感染性を示すマイコプラズマ属細菌の感染にとって重要なステップであることが知られている。例えば、*Mycoplasma agalactiae* では接着因子として膜タンパク質の P40 が同定されている。*M. agalactiae* を抗 P40 抗体と共培養すると、宿主細胞への感染効率が著しく低下することが示されていることから、P40 は感染に必須であると考えられている (Fleury *et al.*, 2002)。スピロプラズマも、接着因子を介して昆虫宿主細胞に接着している (Steiner *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1983)。また、*Spiroplasma citri* にコードされる膜タンパク質である P89 も接着因子であり、昆虫宿主培養細胞に対する接着に関与することが示唆されている (Yu *et al.*, 2000)。*M. agalactiae* と *S. citri* はモリキューテス綱の異なる属に属する細菌であるが、P40 と P89 の菌体外に露出していると思われる領域に約 40 アミノ酸の保存領域モチーフが存在する (Fleury *et al.*, 2002)。以下、この保存領域モチーフを *Mollicutes adhesin motif* (MAM) と呼ぶ。

本章では、マイコプラズマやスピロプラズマで共通性のある接着因子のモチーフ (MAM) に着目した。これまでファイトプラズマでは接着因子の報告が無かったが、OY ファイトプラズマゲノム配列から *pam289* (P38) 遺伝子に MAM を発見し、*P. asteris* の複数の系統にオルソログが保存されていることを明らかにした。さらに OY ファイトプラズマ感染宿主で P38 が発現していることを確かめ、P38 は宿主粗汁液と結合能を示すこと、MAM 依存的に昆虫宿主と相互作用することを明らかにした。その上で P38 が宿主とファイトプラズマの相互作用において果たす役割について考察する。

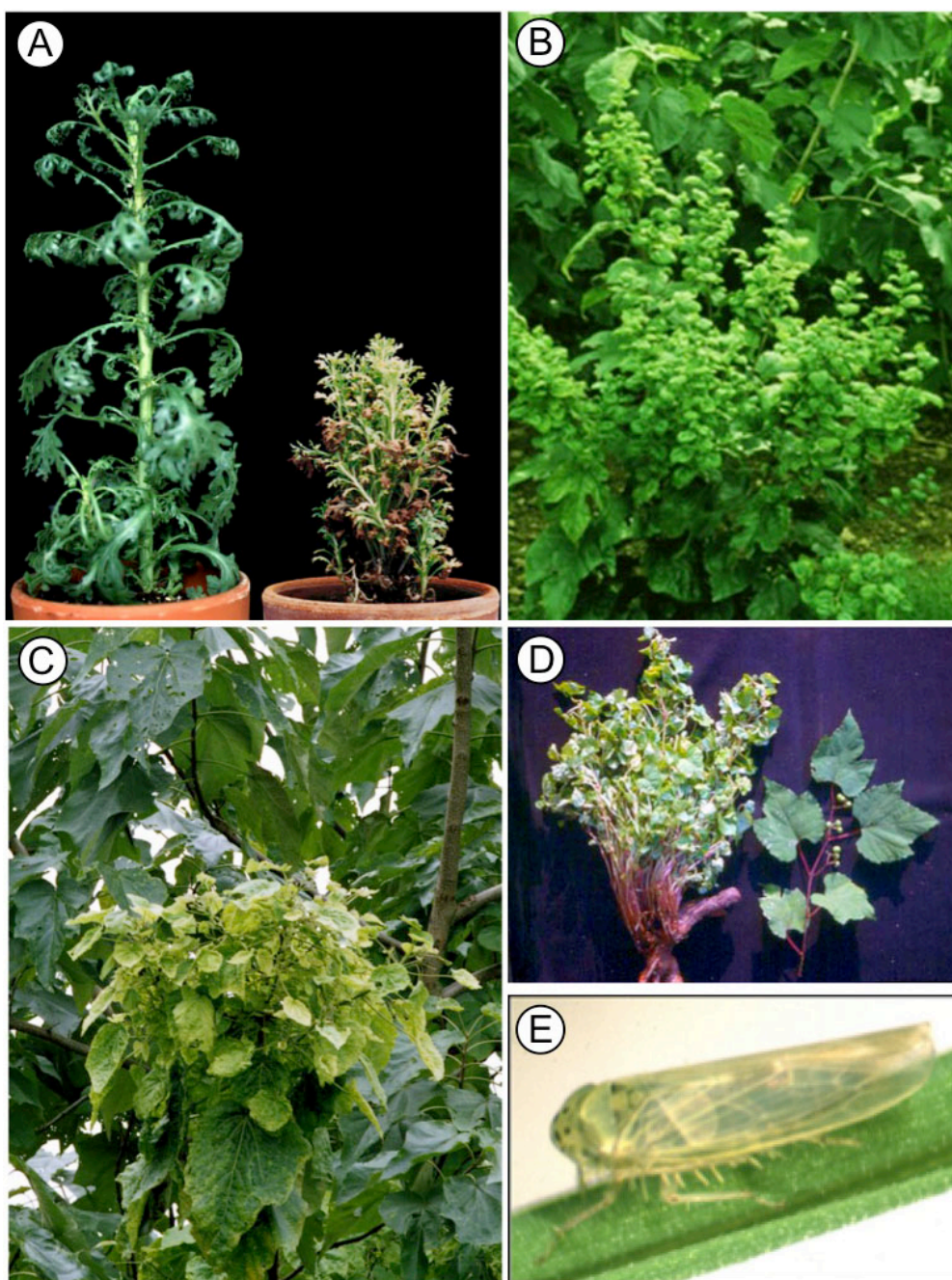
3.2. 材料および方法

3.2.1. 供試植物および昆虫

OY ファイトプラズマは1982年に佐賀県のタマネギ (*Allium cepa*) より分離されたものである。OY ファイトプラズマは植物宿主としてシュンギク (*Glebionis coronarium*)、昆虫宿主としてヒメフタテンヨコバイ (*Macrostelus striifrons*) を用いた。OY ファイトプラズマに感染したシュンギクをヒメフタテンヨコバイに吸汁させたのち、ファイトプラズマ非感染のシュンギクと同一環境に置くことで新たにファイトプラズマ感染植物を作り、ファイトプラズマの維持・継代を行った (図 3.1.)。クワ萎縮病 (mulberry dwarf: MD) ファイトプラズマおよびキリてんぐ巢病 (paulownia witches' broom: PaWB) ファイトプラズマに感染した植物組織は西村典夫博士および土崎常男博士に分譲していただいた。また、ノブドウの一種 (*Ampelopsis brevipedunculata*) に感染した porcelain vine witches' broom (PvWB) ファイトプラズマは韓国で発生するものである (Jung *et al.*, 2003)。上記の OY, MD, PaWB および PvWB ファイトプラズマは *16S rRNA* 遺伝子の配列同一性より、全て *P. asteris* に分類されている (IRPCM, 2004) (図 1.6.)。

3.2.2. ファイトプラズマに共通して認められる P38 遺伝子のクローニング

P38 遺伝子全長の配列を解読するため、OY, MD, PaWB および PvWB ファイトプラズマに感染した植物組織より DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型として P38 遺伝子を含む DNA 断片を PCR にて増幅した。PCR 手法には LA-PCR を用い、PCR 組成は全体の反応容量が 50 μ l であることを除いて、2.2.2.項で記述した組成に従った。増幅プライマーには P38 遺伝子上流と相同な配列を持つ P38N-F および下流と相同な配列を持つ P38C-R (表 3.1.) を用いた。反応溶液を 94°C で 2 分間 DNA を変性させた後、94°C で 30 秒間の変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、68°C で 2 分間の DNA 伸長を 35 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 7 分間の伸長を行った。pGEM-T easy vector system (Promega) を用いて、PCR 産物をインサートとして pGEM-T easy vector に組み込んだ。PCR 産物を組み込んだプラスミドを大腸菌 JM109 コンピテントセルと混合し、2.2.4.項に記述した手法によって精製したプラスミドを得た。得られたプラスミドの配列の解読は 2.2.3.項に記述したダイレクトシーケンス法により行い、シーケンスには M13F および M13R プライマーを用いた (表 3.1.)。解読した塩基配列から得られた MD, PaWB, PvWB ファイトプラズマの P38 オルソログ配列は INSD に登録した (AB902909-11)。



A: Oshima *et al.*, 2001, B: Hoshi *et al.*, 2009, C: Maejima *et al.*, 2014b

D: Jung *et al.*, 2003, E: Oshima *et al.*, 2011

図 3.1. 本章で実験に用いた植物の病徴およびヨコバイの写真

- A: OY ファイトプラズマに感染し、萎縮・叢生および黄化症状を呈するシュンギク（右）
 B: MD ファイトプラズマに感染し、萎縮・叢生症状を呈するクワ
 C: PaWB ファイトプラズマに感染し、てんぐ巣症状を示すキリ
 D: PvWB ファイトプラズマに感染し、葉が小さく黄化し、立ち枯れ症状を示す
 ノブドウの一種 (*Ampelopsis brevipedunculata* : 左)
 E: OY ファイトプラズマを媒介する、ヒメフタテンヨコバイ

解読した塩基配列から予測された P38 タンパク質のアミノ酸配列と AY-WB ファイトプラズマ (Bai *et al.*, 2006; INSD Acc. No. CP000061) の P38 オルソログ (AYWB432) のアミノ酸配列を ClustalW (Tompson *et al.*, 1994) を用いてアラインメントした。さらに P38 が持つタンパク質としての特徴を予測した。膜貫通領域は SOSUI プログラム (version 1.11; Hirokawa *et al.*, 1998) および TMpred を用いて予測し、分泌シグナルの予測には SignalP (version 3.0; Bendtsen *et al.*, 2004) を用いた。さらにタンパク質の二次構造予測には PSIPRED protein analysis workbench (ver. 3.3; Buchan *et al.*, 2013) を用いた。各予測プログラムは WWW 上で利用できるプログラムであり、各プログラムの URL を以下に記す。SOSUI および SignalP の URL については 2.2.3.項に記した。

- TMpred : http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
- PSIPRED protein analysis workbench : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

表 3.1. P38 遺伝子オルソログの解析に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')
<u>P38 遺伝子オルソログの増幅</u>	
P38N-F	AGA TGG TAT TTT CAC TTA TC
P38C-R	TTG TAC ATT TGG ATT TTG CA
<u>P38 遺伝子オルソログのシーケンス</u>	
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC

3.2.3. P38 のクローニングおよび P38 の発現・精製・抗体作出

P38 に対する特異的な抗体の作出を目的として、P38 タンパク質を大腸菌で発現させた。初めに OY 系統の P38 タンパク質の N 末端および C 末端の膜貫通領域を除いた領域をコードする配列を LA-PCR によって増幅した。LA-PCR の詳細な実験条件は、68℃ の DNA 伸長時間が 1 分であること、増幅に用いたプライマーが Nd-P38-F および Xh-P38-R (表 3.2.) であることを除いて 2.2.2.項で記述した組成・条件に従った。PCR 増幅した DNA の精製以降、形質転換された大腸菌からプラスミドを精製し、T7 terminator プライマー (表 2.3.) を用いた目的の配列の解読までの手法は 2.2.4.項の記述に従った。さらに 2.2.5.項の記述に従い、液体培地での培養、タンパク質発現の誘導、SDS-PAGE によるタンパク質発現の確認、Ni²⁺カラムを用いたタンパク質の精製、家兎への免疫および抗体の IgG 精製を行った。

さらに P38 の変異タンパク質の作出を行うため、KOD FX PCR を用いて遺伝子の増幅を行った。KOD FX PCR Buffer (TOYOBO)、400 μM dNTPs、各 0.3 μM の Forward お

よび Reverse プライマー、1.0 U KOD FX DNA polymerase (TOYOBO)、50～100 ng の鋳型 DNA を混ぜ、DW で反応容量を 50 μ l にした。使用したプライマーは以下のコンストラクトの説明および表 3.2. に記述した。混合した溶液を 94°C で 2 分間、DNA を変性させた後、94°C で 30 秒間の変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、68°C で 1 分間の DNA 伸長を 35 サイクル繰り返し、最後に 68°C で 7 分間の伸長を行った。

P38 タンパク質の N 末端側を欠失させた変異タンパク質 P38 Δ N および P38 Δ NM の遺伝子増幅には、P38 Δ N-F / P38-R プライマーセットおよび P38 Δ NM-F / P38-R プライマーセットをそれぞれ用いた (図 3.8. および表 3.2.)。P38 の MAM 領域にアラニン置換を導入した P38m1、P38m2 および P38m3 の作成には、それぞれ 2 つの DNA 断片を増幅し、P38-F / P38m1-R、P38m2-R、P38m3-R プライマーセットおよび P38m1-F、P38m2-F および P38m3-F / P38-R プライマーセットを用い、それぞれの増幅産物を P38-F / P38-R プライマーセットを用いた PCR によってライゲーションした。これら 5 つの PCR 産物を GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用いて、pET-30a(+)ベクターの *NdeI* および *XhoI* サイトの間に挿入した。pET-30a(+)ベクターに導入後、大腸菌にてタンパク質発現を誘導した。Ni²⁺カラムを用いたタンパク質の精製は、P38 タンパク質で用いた手法と同様である。

表 3.2. P38 タンパク質発現に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')
P38 タンパク質の発現	
Nd-P38-F	AAG AAT TCC ATA TGA AAG CTG CTC CAA CAG
Xh-P38-R	TGA GCT CGA GTC CAT AAT TTG TAT TTT CG
変異導入した P38 タンパク質の発現	
P38-F	TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATA GAT ATC AGC ACT ATT GAA AA
P38-R	GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG GTT ATT ATC TGT TTT TTC GCT T
P38 Δ N-F	TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATT GGA GAC GAT TTA GAA GTT G
P38 Δ NM-F	TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG CAA AAT AAA GCT TTA GGG GAT AT
P38m1-F	AGT GGT CTT TCT GCT GCA GCC GCT GCA GCA GCT GTT TTG ATA AAC
P38m1-R	GTT TAT CAA AAC AGC TGC TGC AGC GGC TGC AGC AGA AAG ACC ACT
P38m2-F	TTG ATA AAC AAT AAC AAA GCA GCT GCC GCA GCA GCA GCA GCT GCT GCA AAA ATT AAA GGT CAA GTA GAA
P38m2-R	TTC TAC TTG ACC TTT AAT TTT TGC AGC AGC TGC TGC TGC TGC GGC AGC TGC TTT GTT ATT GTT TAT CAA
P38m3-F	GAA AAT TCT AAA AAA ATT AAA GCT GCA GCA GCA GCT GCT GCT GCT GCC AAA GAA GAC CTA AAT GTT TTA
P38m3-R	TAA AAC ATT TAG GTC TTC TTT GGC AGC AGC AGC AGC TGC TGC TGC AGC TTT AAT TTT TTT AGA ATT TTC

3.2.4. ウェスタンブロット解析

ファイトプラズマ非感染もしくは感染のシュンギクおよびヒメフタテンヨコバイを液体窒素および乳鉢・乳棒を用いてすりつぶし、50 μ l の 4×SDS-PAGE サンプルバッファーを加え懸濁した。1.5 ml チューブに移し、95℃で 10 分間煮沸した後、15,000×g、4℃で 1 分間遠心分離し、上清を回収して SDS-PAGE で泳動した。SDS-PAGE の泳動方法およびウェスタンブロット解析の手法は、以下に述べる箇所を除いて 2.2.6.項と同様の手順で行った。

- ・一次抗体溶液に抗 P38 抗体 (最終濃度 4.5 μ g/ml) を使用した
- ・CBB 染色を行う際のタンパク質サイズマーカーには、Precision Plus Protein Standards All Blue (BIO-RAD)、ウェスタンブロット解析を行う際のタンパク質サイズマーカーには Prestained Protein Marker, Broad range (7-175 kDa) (NEB) を使用

3.2.5. ドットブロット・ファーストウェスタン解析

PVDF 膜に滴下する粗汁液には、ファイトプラズマ非感染のシュンギクおよびヒメフタテンヨコバイを供試した。それぞれ液体窒素および乳鉢・乳棒を用いてすりつぶし、シュンギクに対しては植物重量の 4 倍量、ヒメフタテンヨコバイに対しては昆虫 1 個体あたり 70 μ l の RX バッファーをそれぞれ加えて懸濁し、粗汁液とした。ドットブロット・ファーストウェスタンの実験は以下の手順で行った。

- ・RX バッファー：0.1% Triton X-100, 100 mM KCl, 3 mM NaCl, 3.5 mM MgCl₂, 1.25 mM EGTA, 10 mM Hepes を混合し、pH 7.3 に調整した溶液
1. 粗汁液の濃度を 50%、10%に RX バッファーで希釈した希釈粗汁液を作成して PVDF 膜に滴下し、自然乾燥。
 2. PVP を 2%含んだ TBST バッファー (TBST-PB) に 2%のスkimミルクを溶解したブロッキングバッファーで PVDF 膜を 30 分間振盪。
 3. 大腸菌で発現して精製した P38 タンパク質とともに 4℃で一晩反応。P38 に対するネガティブコントロールにはウシ血清由来アルブミン (BSA, Sigma) を使用。
 4. 一晩インキュベートした PVDF 膜を TBST-PB バッファーで 2 回洗浄。
 5. 一次抗体として 3.2.3.項にて作製した抗 P38 抗体 (最終濃度 4.5 μ g/ml)、抗 BSA 抗体 (最終濃度 12 μ g/ml、MP Biomedicals) もしくは免疫前ウサギ抗体 (最終濃度 14.3 μ g/ml) とともに 4℃で 1 時間反応。希釈には TBST バッファーを使用。
 6. 反応させた PVDF 膜を TBST-PB バッファーで 2 回洗浄。

7. 二次抗体として HRP 結合した抗ウサギ抗体 (5000 倍希釈、Amersham Bioscience) とともに 4℃で 1 時間反応。

8. ECL-Plus detection reagent (Amersham Bioscience) で二次抗体を検出し、LAS-1000 Plus Imaging System (Fujifilm) で蛍光を可視化。

3.2.6. 酵素抗体結合試験

結合試験には DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を応用した手法を採用した。DAS-ELISA 法では、ELISA プレートに抗体を吸着させた後、抗原を含む溶液を加え、抗体と抗原を結合させる。結合が終わったらウェルを洗浄して余分な液を捨て、捕捉された抗原に対する抗体を加える。ここで加える抗体は、ELISA プレートに吸着させた抗体とは異なる抗原部位を認識し、酵素標識した抗体を用いる。色素系基質を加えた時に発色反応が進み、抗原の存在量を色素強度によって定量することが出来る。

酵素抗体結合試験では、ELISA プレートに吸着させる抗体の代わりに、植物もしくは昆虫の粗汁液を用いた。植物および昆虫粗汁液は 3.2.5.項で使用したものと同様に調整した。抗原には His-tag を付加の P38 および変異導入 P38 を加え、プレートに吸着させた粗汁液と結合させた。抗原の検出には 2 つの抗体を用いた。His-tag-P38 を検出するため、マウス由来の抗 His-tag 抗体をウェルに加えて His-tag-P38 と結合した後、His-tag を検出するためにアルカリフォスファターゼで標識した抗マウス抗体を加え、最後に基質として *p*-ニトロフェニルリン酸 ($C_6H_5NO_6P$) を加えた。*p*-ニトロフェニルリン酸は、アルカリ条件下でアルカリフォスファターゼによって *p*-ニトロフェノールが遊離する。*p*-ニトロフェノールは黄色を示すため、吸光度を測定することで粗汁液と P38 の結合能を定量することが出来る。測定した吸光度の統計処理には、基準となる群に対して他の全ての群を比較する手法である Dunnett 法を用いた多重比較法を行った。酵素抗体結合試験の実験手順を以下に記述する。

1. 昆虫および植物の粗汁液を ELISA プレート (Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate, Affymetrix) のウェルに滴下し、4℃で一晩インキュベート。
2. 粗汁液を捨て、5%スキムミルクを含む RX バッファーでブロッキングした後、His-tag 付加の P38 および変異導入した P38 タンパク質をウェルに加え、4℃で一晩インキュベート (タンパク質は SDS-PAGE で泳動し、CBB 染色によって検出されたバンドからタンパク質量を推定し、各タンパク質溶液が等濃度になるよう調整)。
3. P38 溶液を捨て、RX バッファーでウェルを洗浄した後、抗 His-tag 抗体 (マウスモノ

クローナル抗体、1000 倍希釈、GE healthcare) とともに 30℃で 4 時間インキュベート。

4. 抗 His-tag 抗体溶液を捨て、RX バッファーでウェルを洗浄した後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識の抗マウス抗体 (4000 倍希釈、Invitrogen) とともに 30℃で 4 時間インキュベート。

5. 抗マウス抗体溶液を捨て、基質として *p*-ニトロフェニルリン酸 (1 mg/mL, Sigma) 溶液を添加。

6. 基質を添加した 2 時間後に、EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) で 405 nm 吸光度を計測。

3.3. 結果

3.3.1. P38 の同定

ファイトプラズマの接着因子を同定するため、P40 と P89 の 2 つの接着因子のモチーフ (MAM) を持つタンパク質をコードする遺伝子を、OY ファイトプラズマのゲノム上で探索した。P40 および P89 の MAM 領域のアミノ酸配列を Query、OY ファイトプラズマゲノム配列を Dataset として tblastn で検索を行った結果、*pam289* 遺伝子を同定し、翻訳されるタンパク質の予想分子量から P38 と名付けた。MAM のアミノ酸配列同一性 (類似性) は P38 と P40 の間で 42.6% (59.6%)、P38 と P89 の間で 36.2% (57.4%) であった。これらの配列同一性および類似性は P40 と P89 の間の値 (同一性 38.8%、類似性 63.3%) とほぼ同じであった。P38 の MAM には 3 つの β -シート構造が予測され、この構造は P40, P89 にも予測された (図 3.2.)。しかし、3 つのタンパク質で、MAM に含まれない領域ではアミノ酸配列の保存性は無かった。P38 は 338 アミノ酸からなるタンパク質であり、SOSUI で膜貫通領域の有無を調べた所、N 末端側の 15~37 番目および C 末端側の 309~331 番目のアミノ酸が膜貫通領域であると推定された。SignalP を用いてシグナル配列の有無を調べた所、0.959 という高い確率で分泌シグナル配列を持ち、N 末端から数えて 38 番目と 39 番目のアミノ酸の間で切断されると推定された (図 3.2.)。これらの特徴から、P38 はファイトプラズマの細胞表面に局在する膜タンパク質であることが示唆された。

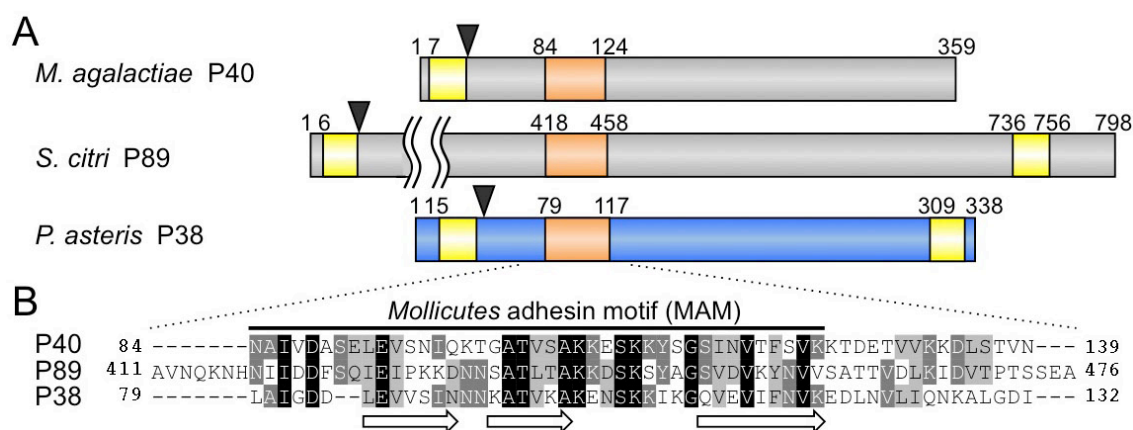


図 3.2. MAM 領域を持つ P40, P89, P38 タンパク質の模式図

黄色の領域は膜貫通領域、橙部は MAM を表す。黒の矢頭は予測切断サイトを示し、上部の数字は先頭からのアミノ酸数を示す。下部のアラインメント図はそれぞれの MAM 周辺配列のアミノ酸配列を示し、白矢印は β -シート構造を示す。

3.3.2. P38 オルソログの配列解析

P38 遺伝子がファイトプラズマにおいて広く保存されているかどうか調べるため、*P. asteris* に属する OY, MD, PaWB および PvWB ファイトプラズマの DNA を鋳型として PCR を行った。全てのファイトプラズマより、338 アミノ酸からなる ORF を持つ領域の配列が得られた (図 3.3.)。得られた P38 オルソログの全長アミノ酸の配列同一性は 95%以上であり (表 3.3.)、MAM に限って比較すると配列同一性は 100%であり高度に保存されていた (図 3.3.)。配列データベース上に登録されている AYWB432 との配列同一性は、全長、MAM 配列ともに約 80%であった。

表 3.3. P38 オルソログ全長アミノ酸の配列同一性

(%)	OY	MD	PaWB	PvWB
MD	95.9			
PaWB	95.3	97.6		
PvWB	95.6	99.7	97.3	
AY-WB	79.9	80.5	81.1	80.2

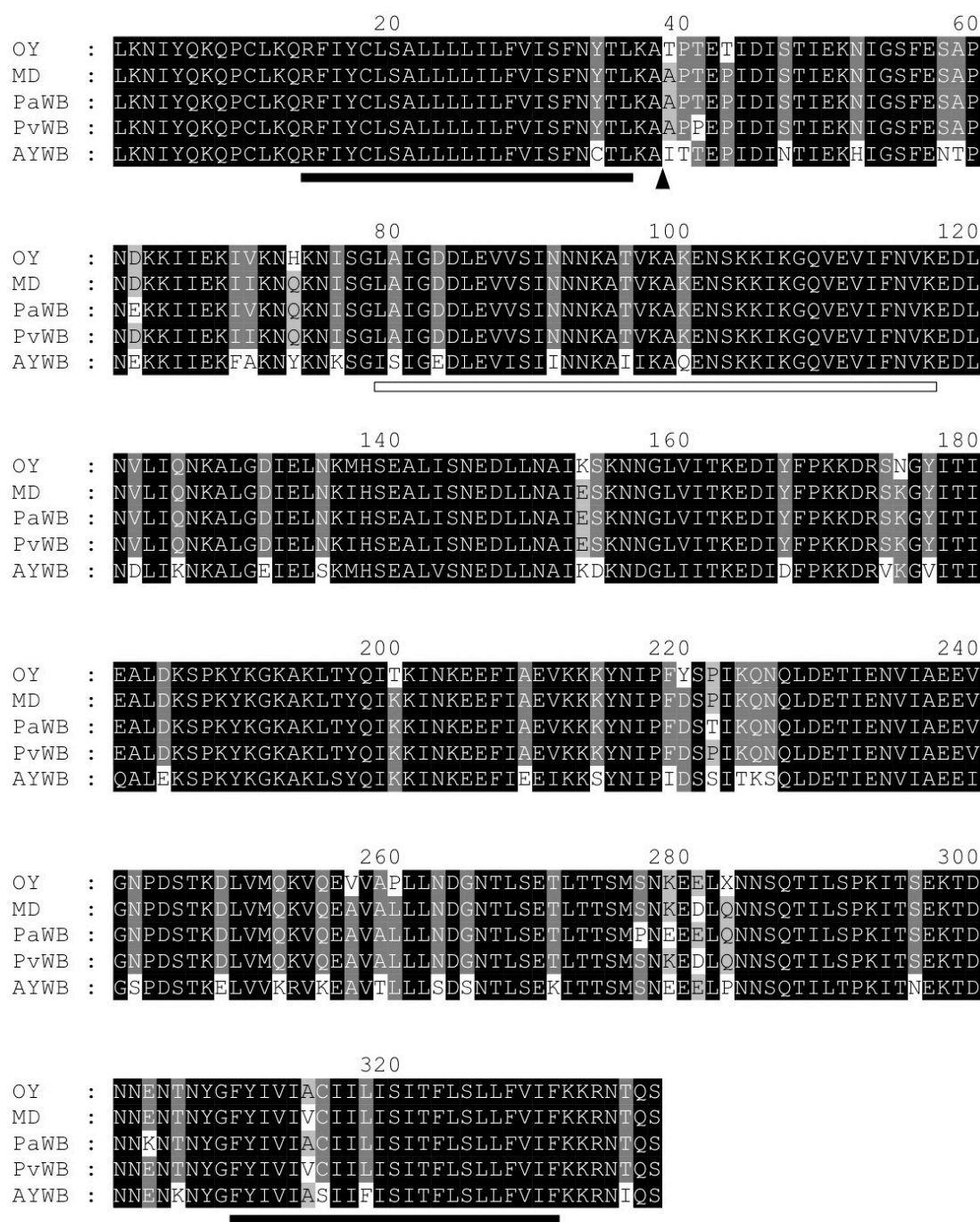


図 3.3. P38 オルソログのアラインメント

アミノ酸配列の黒下線は膜貫通領域、白抜下線は MAM、矢頭は予測切断部位を示す。

3.3.3. 大腸菌における P38 の発現および精製

免疫化学的手法によって P38 の発現および機能について解析するため、OY ファイトプラズマの P38 タンパク質をクローニングし、P38 に対する抗体を作出した。初めに OY ファイトプラズマから P38 のファイトプラズマ膜表面に発現していると考えられる遺伝子領域 (図 3.8. の”P38”) のクローニングを行った。目的のタンパク質に 6 つの His-tag を付加する pET-30a(+) ベクターにクローニングしたプラスミドを、タンパク質発現用の大腸菌に導入し、IPTG によるタンパク質発現誘導の後、SDS-PAGE によって目的のタンパク質の発現を確認した。その結果、予想されるサイズとほぼ同じ大きさのタンパク質の発現が可溶性画分を中心に認められた (図 3.4.)。発現の認められた可溶性画分の溶液を Ni^{2+} カラムに注ぎ入れ、His-tag が付加した P38 タンパク質を精製した。精製したタンパク質の純度は SDS-PAGE で確認した (図 3.5.)。P38 タンパク質を回収して家兎に免疫し、抗 P38 抗血清を得た。抗血清を Protein A Sepharose CL-4B を用いたカラムで IgG を精製し、精製後の画分ごとに分光光度計により吸光度 (O.D._{280}) を測定した。吸光度より精製 IgG の濃度を算出し、最も多量の IgG を含んでいた画分の pH を 7.3 付近になるよう調整し、抗 P38 抗体として以降の解析に供試した。

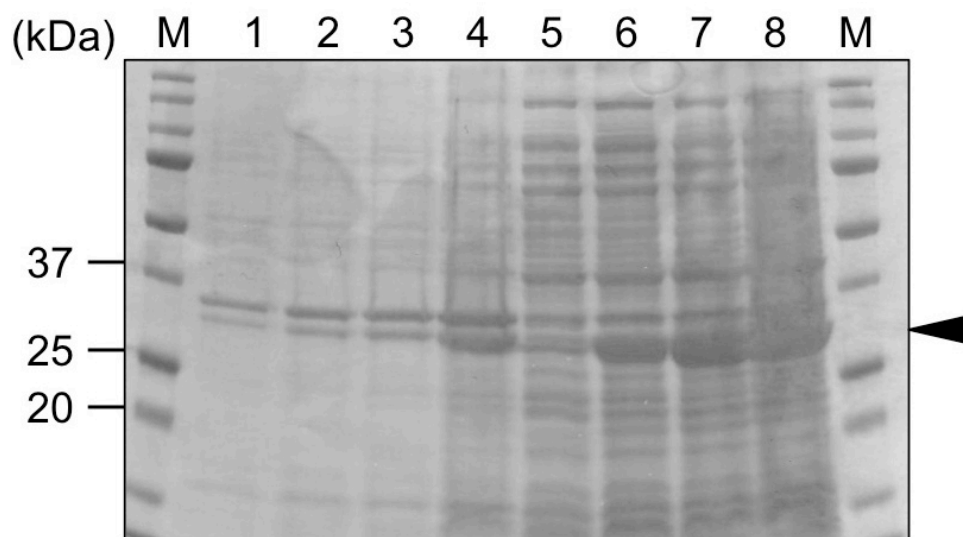


図 3.4. P38 タンパク質の大量発現

SDS-PAGE、CBB 染色による P38 の発現確認 (黒矢頭)。レーン M : タンパク質サイズマーカー。レーン 1~4 : 不溶性画分、レーン 5~8 : 可溶性画分、レーン 1,5 : IPTG 添加前、レーン 2,6 : IPTG 添加 1 時間後、レーン 3,7 : IPTG 添加 2 時間後、レーン 4,8 : IPTG 添加 3 時間後。

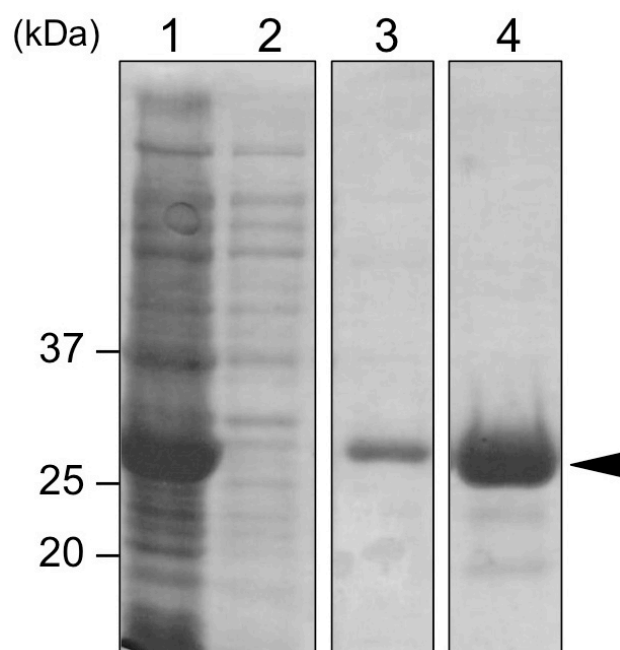


図 3.5. 大量発現させた P38 の精製

Ni²⁺カラムによる精製後の OY-P38 タンパク質の泳動 (CBB 染色) レーン 1: 精製前 (大腸菌画分)、レーン 2: Flow through、レーン 3: 洗浄バッファー、レーン 4: 抽出バッファー。矢頭はカラム精製によって得られた主なタンパク質のバンドを表す。

3.3.4. ウェスタンブロット解析

P38 タンパク質が宿主感染時に発現しているかどうか調べるため、OY ファイトプラズマに感染した、あるいは健全な植物 (シュンギク) および昆虫 (ヒメフタテンヨコバイ) からタンパク質を抽出し、これらタンパク質を SDS-PAGE で泳動した後、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、OY ファイトプラズマに感染した植物および昆虫のみから約 30 kDa のバンドが得られ、健全宿主ではバンドは得られなかった (図 3.6.)。得られたバンドの大きさは P38 の切断後の予測分子量である 33.6 kDa より小さかったが、ウェスタンブロットの結果よりファイトプラズマが感染した昆虫および植物で P38 の発現が確認できた。

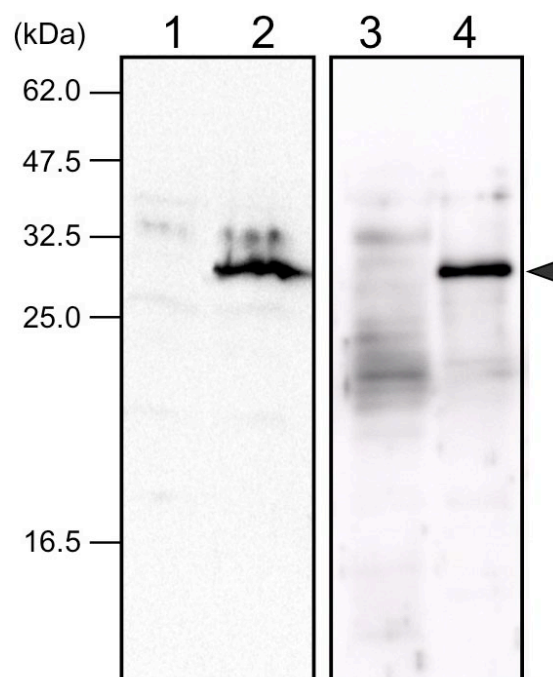


図 3.6. OY ファイトプラズマ感染宿主における P38 タンパク質のウェスタンブロット解析
 レーン 1 : 非感染昆虫、レーン 2 : OY ファイトプラズマ感染昆虫、レーン 3 : 非感染植物、
 レーン 4 : OY ファイトプラズマ感染植物の抽出物を泳動。黒矢頭が P38 タンパク質特異
 的なバンドを示している。

3.3.5. ドットブロット・ファウエスタン解析

P38 の宿主粗汁液に対する接着能を調べるため、大腸菌で合成してタンパク質精製を行って得られた P38 タンパク質および抗血清より IgG 精製した抗 P38 抗体を用いて、ドットブロット・ファウエスタン解析を行った。段階希釈した昆虫および植物粗汁液を PVDF 膜に滴下し、PVDF 膜に大腸菌で合成した P38 タンパク質もしくは BSA (コントロール) を供試した。続いて P38 あるいは BSA に対する抗体を供試し、抗ウサギ-AP 抗体でシグナルを検出した。その結果、昆虫および植物いずれの粗汁液を用いた場合でも、P38 タンパク質の供試箇所ではシグナルが得られた (図 3.7.)。しかし、免疫前抗体を用いた場合や、P38 タンパク質を加えなかった場合はシグナルが得られなかった。これらの結果より、P38 タンパク質は昆虫および植物の粗汁液と *in vitro* 条件下で相互作用することが示唆された。

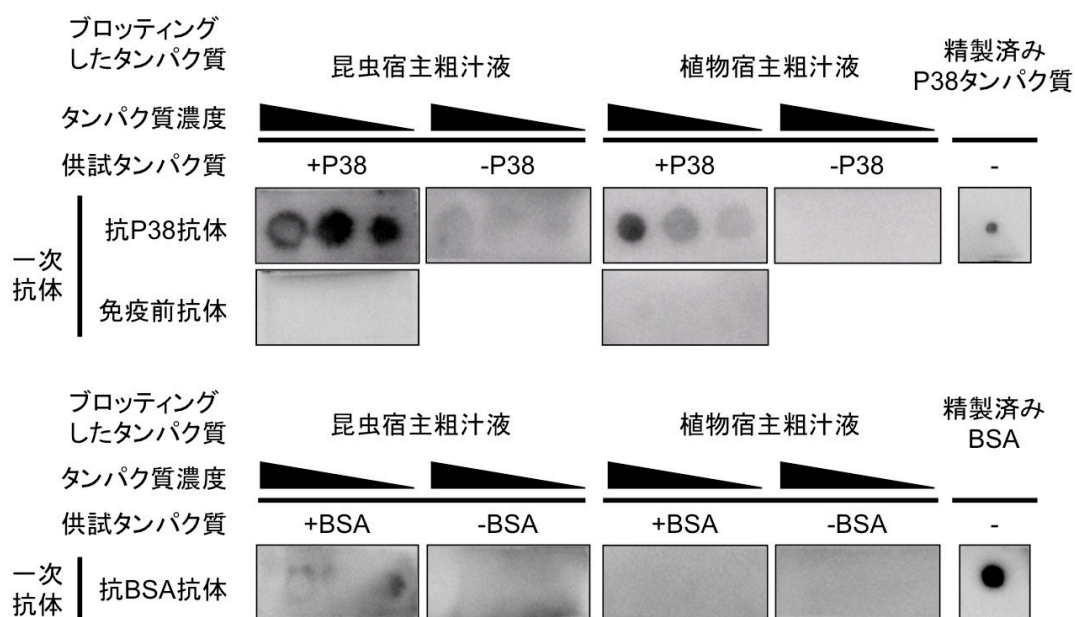


図 3.7. ドットブロット・ファウウェスタン解析

昆虫または植物宿主の粗汁液を PVDF 膜に滴下し、P38 タンパク質や BSA、あるいはそれらが無い条件でインキュベートした。矢頭はブロットニングしたタンパク質濃度を示しており、相対量は各ブロックの左から 10, 5, 1 である。P38 タンパク質および BSA をブロットニングした区画はドットブロット・ファウウェスタン解析のコントロールとして用いた。

3.3.6. 酵素抗体結合試験

P38 タンパク質のどの部分が宿主との接着に関与しているのかについて調べるため、酵素抗体結合試験を行った。ELISA プレートに宿主粗汁液を吸着させた後、His-tag 付加した P38 タンパク質を供試し、抗 His-tag 抗体および抗マウス-AP 抗体を加えて反応させて、吸光度を測定した。

昆虫粗汁液において、P38 タンパク質を加えた時にコントロールと比べて有意に吸光度が上昇した (図 3.10.A、レーン 1 および 2) これに対して、植物粗汁液では P38 タンパク質を加えた場合と加えなかった場合で吸光度に有意な差は認められなかった (図 3.10.B、レーン 1 および 2)。これらの結果は、P38 が昆虫粗汁液と相互作用することを示している。次に、昆虫粗汁液との結合に関与する領域を特定するため、部分長の変異導入した P38 タンパク質を作出した (図 3.8.)。P38 および変異導入した P38 タンパク質の量は、SDS-PAGE によって泳動した際のバンドの濃さが等しくなるように調整したものを用いた (図 3.9.)。MAM より N 末端側を欠く P38 Δ N タンパク質を昆虫粗汁液に加えた場合、吸光度が上昇したのに対し、MAM を含む N 末端側を欠く P38 Δ NM タンパク質は P38 タンパク質を加えた時と比べて低い吸光度を示した (図 3.10.A、レーン

3 および 4)。相互作用に与える MAM の重要性を調べるため、MAM の配列をアラニン置換した変異 P38 タンパク質を作成した (図 3.8.)。結合試験の結果、変異 P38 タンパク質を加えた場合、昆虫粗汁液に対しては何も加えなかった場合と同等の吸光度上昇を示した (図 3.10.A、レーン 4~7)。植物粗汁液の場合、吸光度は上昇したが、P38 を加えた場合、何も加えなかった場合、変異 P38 を加えた場合で吸光度に差がなかった (図 3.10.B)。これらの結果は、P38 の MAM が昆虫粗汁液との相互作用に関与していることを示している。

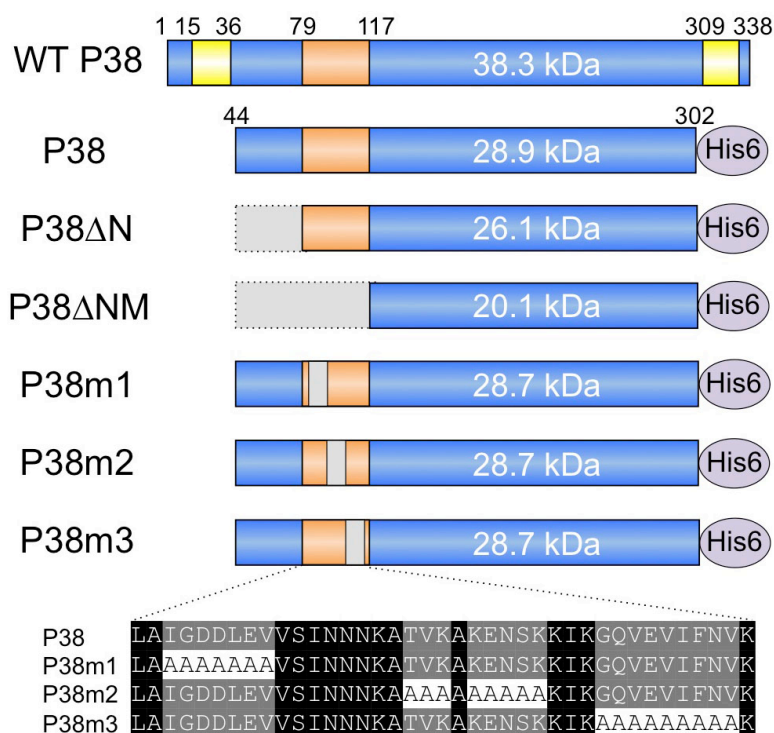


図 3.8. 変異導入した P38 タンパク質の模式図

黄色の領域は膜貫通領域、橙部は MAM を表す。MAM 内部の灰色部はアラニン置換したアミノ酸部位を表している。置換したアミノ酸箇所は下部のアラインメント図で示した。コンストラクトに書かれた予想分子量は His-tag を除いた大きさ。

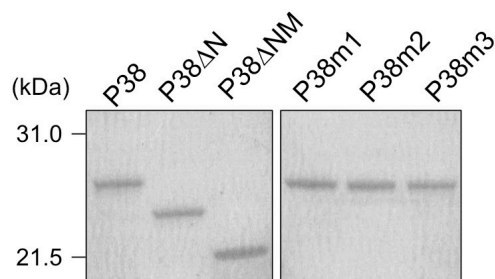


図 3.9. 酵素抗体結合試験に用いたタンパク質の泳動

加えるタンパク質量が均一になるように濃度を調整した後、等量を SDS-PAGE で泳動した。

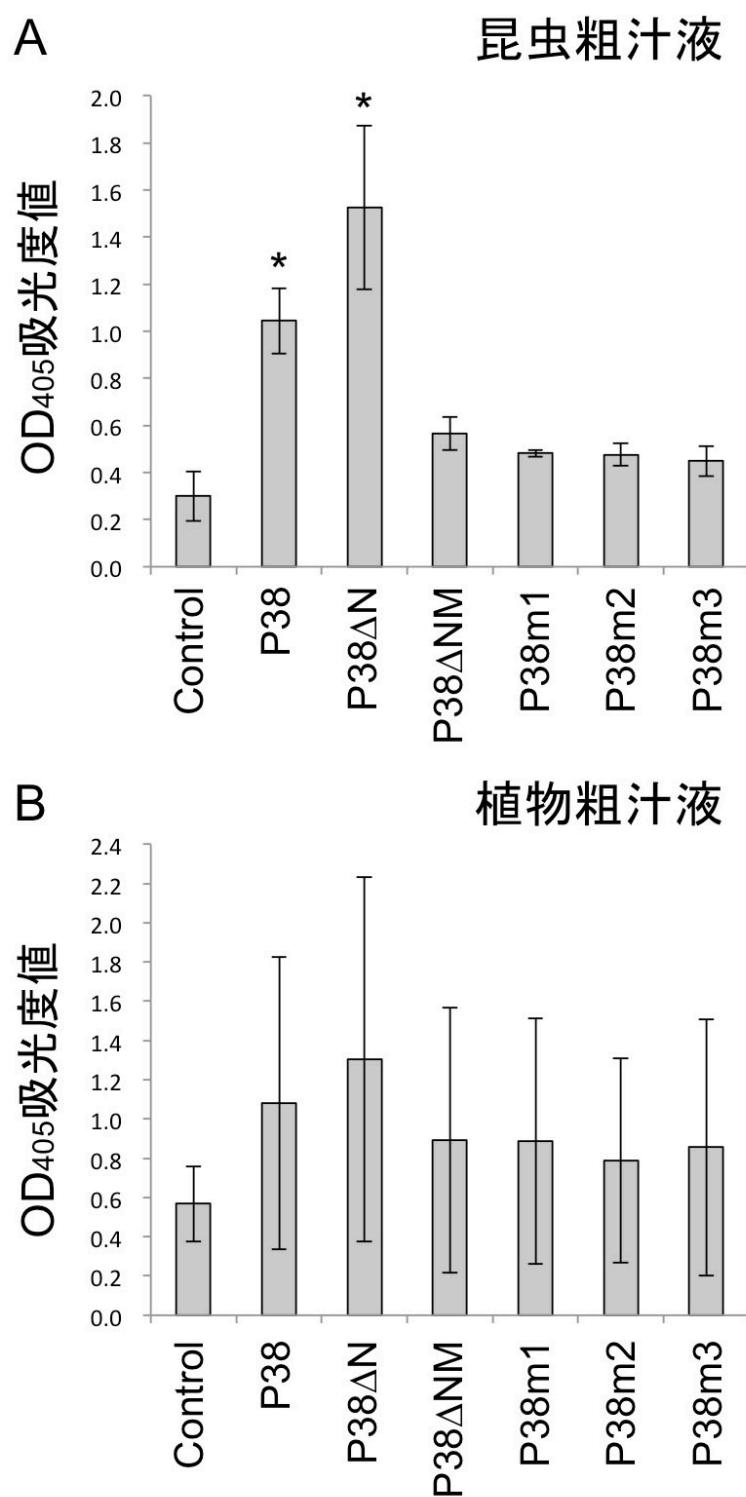


図 3.10. 酵素抗体結合試験の結果

昆虫 (A) および植物 (B) の粗汁液に対する吸光度の上昇。基質を加えて 2 時間後の OD₄₀₅ 吸光度を測定した。エラーバーは標準誤差、「*」は Dunnett 法による検定で、Control 群に対して有意 ($P < 0.05$) である区を表す。

3.4. 考察

3.4.1. マイコプラズマやスピロプラズマの接着因子との共通性

M. agalactiae の接着因子 P40 や *S. citri* の接着因子 P89 では MAM が共通して保存されている (Fleury *et al.*, 2002) が、モリキューテス綱以外の細菌では MAM に類似した配列は見つかっていない。本研究では、ファイトプラズマで初めて、接着因子の単離解析を行った。まず、MAM の配列を手がかりとして OY ファイトプラズマのゲノム解析から膜タンパク質 P38 を接着因子候補として見出した。MAM は P38, P40, P89 に高度に保存されている配列であることから、P38 は OY ファイトプラズマの接着因子候補であり、植物および昆虫の粗汁液と結合することが分かった。さらに、昆虫粗汁液については MAM 依存的に相互作用することを示した。このことは P38 の MAM が宿主との相互作用に重要な働きを持つという考えを支持するものである。P38, P40, P89 のいずれの膜タンパク質においても、標的となる宿主因子は見つかっていないが、以上の結果よりこれらの接着因子は MAM を介してそれぞれの宿主因子と相互作用すると推測される。

これまで *M. agalactiae* や *S. citri* の P40 および P89 が宿主への接着に必要であることは知られていたが、その接着における MAM の関与については調べられていなかった (Yu *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, 2002)。本研究でファイトプラズマの膜タンパク質 P38 が宿主との相互作用に関与し、MAM が昆虫宿主との相互作用に必要であることを明らかにした (図 3.7., 図 3.10.)。MAM の機能を調べ、宿主との相互作用に必要であることを明らかにしたのはモリキューテスで初めてである。

3.4.2. 宿主内で発現している P38 タンパク質

図 3.6. のウェスタンブロット解析から予想される P38 タンパク質の分子量は、遺伝子の配列から予測した分子量より小さいものであった。ウェスタンブロット解析で得られた約 30 kDa の大きさの場合、P38 タンパク質は N 末端が P38 Δ N とほぼ同じ箇所から始まるタンパク質が発現しているか、両末端の膜貫通領域を除いた領域のタンパク質が発現していると考えられる。2つの可能性のどちらであっても、発現したタンパク質に MAM は含まれており、P38 が持つ接着能は保存されていると考えられる。また、*M. agalactiae* の接着因子である P40 において、感染宿主でウェスタンブロット解析を行った所、37 kDa 付近にバンドが得られている。P40 は N 末端に予測切断サイトがあ

り、この場所で切断された場合 P40 は膜貫通領域を持たないタンパク質であると予測されるが、膜画分と可溶性画分を分離したサンプルで行ったウェスタンブロット解析により P40 は膜画分に存在することから、P40 は膜タンパク質として機能していると考えられる (Freury *et al.*, 2002)。そのため、P38 が膜貫通領域を持たない場合であっても、P40 の場合と同様に膜タンパク質として機能する可能性はある。

3.4.3. P38 の宿主内における発現変動

P38 は両宿主内において発現が確認された (図 3.6.) が、これまでの研究により P38 の mRNA は昆虫体内で高発現していることが示されている (昆虫/植物 mRNA 発現量比、マイクロアレイ : 5.17 倍、リアルタイム PCR : 3.73 倍) (Oshima *et al.*, 2011)。これは P38 が昆虫内で主要な働きをすることを裏付けるものである。一方、P38 と植物の結合は、少なくとも酵素抗体結合実験の条件では結合が弱い不安定であり、MAM の接着能への関与も不明であるが、ドットブロット・ファールウェスタン解析では結合が認められることから、昆虫宿主に比べると弱いながらも、結合能があると考えられる。

第4章 総合考察

4.1. 主要表面膜タンパク質の進化

PoiBI ファイトプラズマの膜タンパク質の解析により、PoiBI ファイトプラズマでは Imp が主要な膜タンパク質であることが示唆された。PoiBI ファイトプラズマと同種に分類される WX ファイトプラズマでは IdpA が主要表面膜タンパク質として報告されており、同種のファイトプラズマで主要な膜タンパク質が異なるという報告は初である。3つの主要表面膜タンパク質をコードする遺伝子のうち、*imp* 遺伝子はファイトプラズマの種に関係なく保存されていることから、ファイトプラズマの共通祖先が *imp* 遺伝子を有しており、Imp を主要表面膜タンパク質として利用していた可能性が考えられている (Kakizawa *et al.*, 2009)。この仮説が正しいとすると、PoiBI ファイトプラズマは Imp を主要な膜タンパク質として利用し続けているのに対して、WX ファイトプラズマにおいては IdpA の発現量が増加し、主要表面膜タンパク質として利用されるようになったのではないかと考えられる。WX ファイトプラズマはヨコバイの *Colladonus montanus* によって媒介されることが知られているが (Kirkpatrick *et al.*, 1987)、PoiBI ファイトプラズマは媒介虫が特定されていないうえ、PoiBI ファイトプラズマはポインセチアの接ぎ木によって伝搬されている。さらにファイトプラズマのゲノムは高い可塑性を示すことが分かっている。例えば、ファイトプラズマの継代を行う際に媒介昆虫を使用せず、感染植物の接ぎ木や組織培養のみによって継代すると、昆虫伝搬能が失われるとともにプラスミドが容易に変異あるいは喪失する (Oshima *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2009a, b)。主要表面膜タンパク質は宿主との相互作用に関与するため、PoiBI と WX ファイトプラズマが持つ2つの主要表面膜タンパク質をコードする遺伝子は伝搬様式の違いによって異なる進化を遂げた可能性があり、その結果として膜タンパク質の発現量の差となって現れたと考えられる (図 4.1.)。

さらに、*P. pruni* に属するファイトプラズマのドラフトゲノム配列を用いた解析により、主要表面膜タンパク質をコードする遺伝子は、系統ごとに正の選択圧を受ける遺伝子が異なることが分かった (表 2.6.; 表 2.7.)。今後、主要表面膜タンパク質を含む遺伝子の配列比較や、発現量比較などの解析を行うことで、膜タンパク質の性状解析やファイトプラズマの進化的考察が進むと期待される。

主要表面膜タンパク質の一つである Amp は、昆虫のマイクロフィラメントや ATP 合成酵素と複合体を形成するという報告があり、昆虫の宿主因子との相互作用に働く

膜タンパク質であることが示唆されている (Suzuki *et al.*, 2006; Galetto *et al.*, 2011)。一方で *P. mali* の *Imp* は植物のアクチンと結合するという報告があり、植物との相互作用に働く膜タンパク質であることが示唆されている (Boonrod *et al.*, 2012)。PoiBI ファイトプラズマは、宿主植物であるポインセチアに感染した個体から、接ぎ木によって新たなポインセチアにファイトプラズマの伝搬が行われていると考えられる。これらを総合して考えると、PoiBI ファイトプラズマの *Imp* は宿主であるポインセチアとの相互作用により、感染したそれぞれの品種に適応する形で配列が変異した結果、主要な膜タンパク質の適応進化が生じたと考えられる。

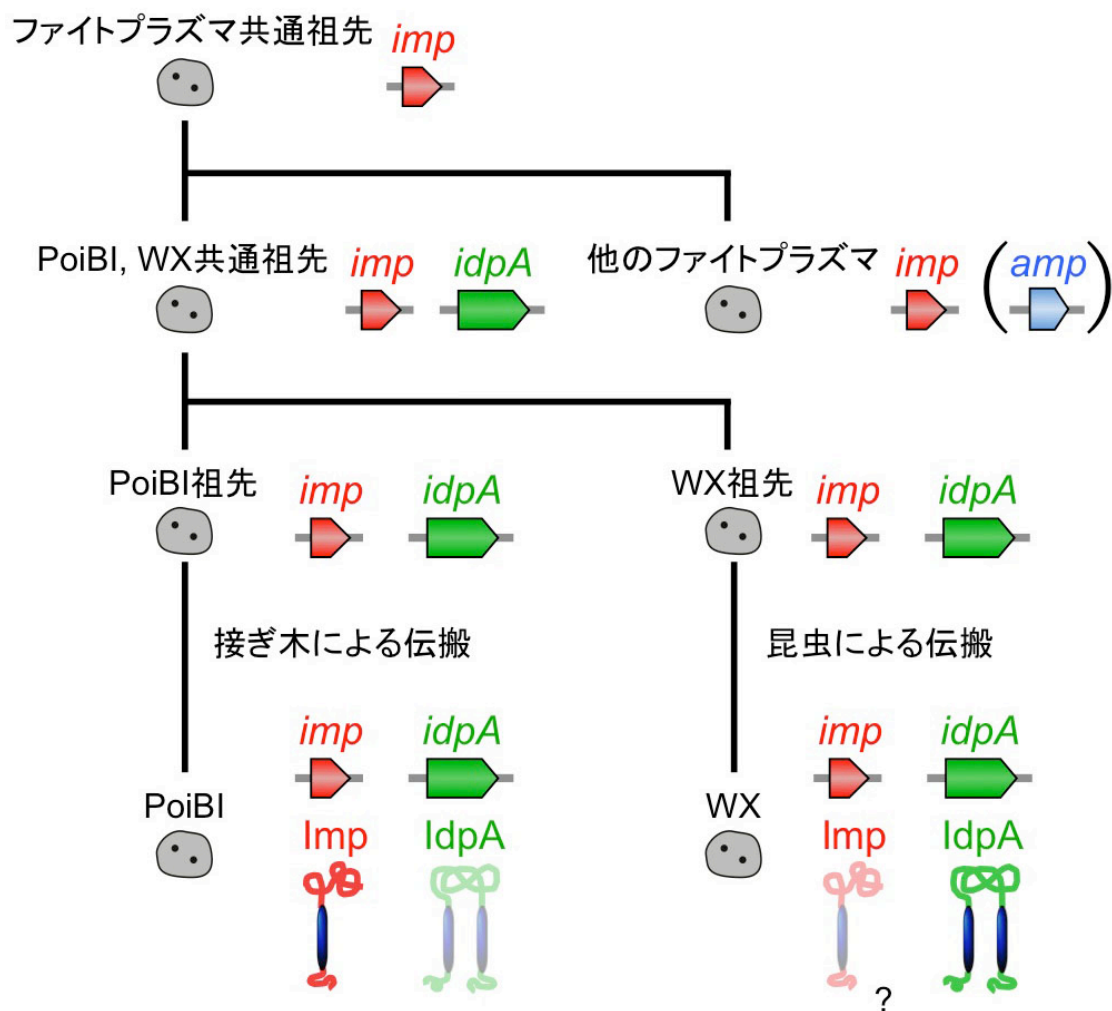


図 4.1. 主要表面膜タンパク質の変遷モデル

それぞれのファイトプラズマが持つ主要表面膜タンパク質遺伝子を図で示し、PoiBI と WX ファイトプラズマについては膜タンパク質発現量の結果および考察を示した。

4.2. 接着因子と宿主との相互作用

OY ファイトプラズマのゲノム解析により接着因子 P38 を同定し、昆虫粗汁液との結合には共通モチーフである MAM が必要であることが示唆された。昆虫伝搬の成立には、ファイトプラズマは中腸を通して血体腔に入り、唾液腺を含む複数の組織に侵入しなければならない (Hogenhout *et al.*, 2008)。その中でも中腸から血体腔、血体腔から唾液腺に侵入する過程は物理的な障壁があり、どのように侵入するかについては不明な点が多いが、P38 がファイトプラズマの接着因子として働き、昆虫細胞内への侵入に寄与している可能性が考えられた。昆虫のアクチンフィラメントと相互作用する膜タンパク質として Amp が知られている (Suzuki *et al.*, 2006) が、アクチンフィラメントは細胞内に存在しており、複合体の形成はファイトプラズマが細胞内に侵入した後に起こると考えられる。

ファイトプラズマは感染昆虫の吸汁により、植物の篩管細胞内に注入され、篩管細胞の他に篩部柔細胞や伴細胞に局在する (土居ら、1967; 山田ら、1978)。植物内のファイトプラズマは篩孔を通じて移行していると考えられている (Parthasarathy, 1974; 山田ら、1978) が、篩部柔組織や伴細胞には篩孔が発達していない。そのため、篩部柔細胞や伴細胞にはファイトプラズマの接着・侵入によって移行し、これに P38 が関与する可能性がある。本研究の結果により、P38 は植物粗汁液に対しても結合能を示したが、昆虫粗汁液と比較するとその結合能は安定的でない可能性がある。今後、P38 と結合する植物側の因子の同定や P38 が機能する部位を調べることで、ファイトプラズマの侵入・移行の詳細が明らかになると期待される。

4.3. まとめ

本研究により、ファイトプラズマで広く保存されている *imp* 遺伝子は種間や系統間だけでなく、系統内においても正の選択圧を受けて適応進化していること、同種のファイトプラズマであっても伝搬様式が異なれば、主に発現する膜タンパク質の種類が異なる可能性があることが示唆された。また、宿主との相互作用に関与する膜タンパク質として、主要表面膜タンパク質とは異なる接着因子を同定し、相同配列である MAM が接着能に関与することが示唆された。Amp は昆虫の因子と、Imp は植物の因子と結合することが明らかとなっているが、昆虫・植物両宿主と結合能を示す膜タンパク質は P38 が初めてである。接着因子は昆虫・植物両宿主と結合能を示すことから、ファイトプラズマと宿主生物との相互作用についての理解を深める上で新しい知見が

得られたといえる。昆虫によるファイトプラズマの伝搬に関与していると考えられるものとして、プラスミド上にコードされる膜タンパク質 ORF3 もあり、今後これらの宿主との相互作用に関与する因子の解析により、ファイトプラズマの宿主感染機構についての理解が進むことが期待される。

摘要

ファイトプラズマは、モリキューテス綱に属する植物病原細菌であり、700 種以上の植物に感染して萎縮・黄化症状のほか、側芽の増生による叢生症状や、花器官の緑化・葉化・突き抜け症状など、ユニークな病徴を引き起こす。ファイトプラズマはヨコバイなどにより伝搬され、昆虫の体内で増殖する。ファイトプラズマは細胞壁を持たず、宿主植物の篩部細胞内に寄生することから、その膜タンパク質は宿主の細胞質に露出しており、膜タンパク質が宿主との相互作用に重要な役割を果たすと推定されている。ファイトプラズマの菌体表面の大半は、主要抗原膜タンパク質と総称される表面膜タンパク質によって覆われていると考えられている。この表面膜タンパク質はこれまでに Amp, Imp, IdpA の 3 種類が知られており、*Phytoplasma asteris* OY 系統では Amp、*P. mali* では Imp、*P. pruni* WX 系統では IdpA がそれぞれ主要な表面膜タンパク質であることが分かっている。また、OY ファイトプラズマや WX ファイトプラズマは Amp や IdpA 以外に、Imp をコードする遺伝子も持つ。*P. pruni* に属し、ポインセチアに感染する poinsettia branch-inducing (PoiBI) ファイトプラズマは WX ファイトプラズマと同様、IdpA と Imp をコードする遺伝子を持つことが知られているが、PoiBI ファイトプラズマの主要な膜タンパク質については分かっていない。本研究では、宿主と相互作用すると予測されるファイトプラズマの膜タンパク質について研究を行った。すなわち、表面膜タンパク質の発現および遺伝的多様性の解析を行い、さらに宿主に侵入する際に必要であるとされる接着因子について調べ、このタンパク質の宿主への接着能について解析し、ファイトプラズマと宿主との相互作用に関わる膜タンパク質の働きについて考察した。

1. ファイトプラズマの表面膜タンパク質の発現および遺伝的多様性に関する解析

ポインセチア (*Euphorbia pulcherrima*) はクリスマスシーズンを中心に、世界中の市場に出荷される商業上重要な鑑賞用園芸植物である。色、形態ともに多様な苞葉をつける多数の品種が登録され、葉の密生する品種ほど商品価値が高い。しかし、ほとんどの品種は開発の後、樹高を低く保ち、葉を密生させる目的で PoiBI ファイトプラズマに人工的に感染させたうえで出荷されている。PoiBI ファイトプラズマに感染したポインセチアは、栽培・流通・販売の過程で新たな感染源となる恐れがあるが、PoiBI ファ

イトプラズマに関する解析はほとんど行われていない。

初めに市販されるポインセチアにおけるファイトプラズマ感染の有無を調べるため、32 品種のポインセチアから DNA を抽出し、ファイトプラズマの *16S rRNA* 遺伝子を増幅するユニバーサルプライマーを用いて PCR で検出を行った。その結果、27 品種から DNA 増幅断片が得られ、それら全ての塩基配列が既報の PoiBI ファイトプラズマの *16S rRNA* 遺伝子配列と一致した。PoiBI ファイトプラズマ感染が確認された 27 分離株について、*imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子、ハウスキーピング遺伝子である *dnaD* 遺伝子の塩基配列を比較したところ、*dnaD* 遺伝子や *idpA* 遺伝子の塩基配列は全ての PoiBI ファイトプラズマ分離株間で完全に一致したのに対し、*imp* 遺伝子の塩基配列には多様性が認められ、全ての塩基置換はアミノ酸変異を伴っていた。

そこで、PoiBI ファイトプラズマの *Imp* および *DnaD*、*IdpA* のアミノ酸配列を同種別系統の WX ファイトプラズマと比較した。PoiBI ファイトプラズマと WX ファイトプラズマのアミノ酸配列同一性は、*Imp* と *DnaD* においてはそれぞれ 92.6~93.8%、98.0% と保存性が高かった一方で、*IdpA* においてはわずか 64.7%であった。*IdpA* に関しては、膜貫通領域の保存性は高かったのに対し、菌体表面に露出すると予想される親水性領域の保存性は低く、また WX ファイトプラズマにおいては 2 カ所に大きな欠失があった。

以上より、PoiBI ファイトプラズマは *imp* 遺伝子および *idpA* 遺伝子の両遺伝子をコードしていたが、これまで両遺伝子より発現する *Imp* および *IdpA* タンパク質について解析された例はない。そこで、大腸菌で発現させた *Imp* および *IdpA* を家兎に免疫することにより各タンパク質に対する抗体を作出し、これらを用いて PoiBI ファイトプラズマ感染植物における *Imp* および *IdpA* の検出を試みた。健全植物と PoiBI ファイトプラズマ感染植物の粗汁液を SDS-PAGE にて泳動し、抗 *Imp* 抗体または抗 *IdpA* 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、推定分子量約 19 kDa の *Imp* は感染植物の粗汁液でのみ特異的なバンドとして観察されたのに対し、推定分子量約 37 kDa の *IdpA* は健全・感染のいずれの植物の粗汁液においても観察されなかった。大腸菌で発現させた等量の抗原に対する抗体の反応性は、ウェスタンブロットにおいて同程度であったため、PoiBI ファイトプラズマは植物内で *IdpA* よりも *Imp* に比べて高レベルで発現していることが示唆された。

さらに健全植物と感染植物の茎切片に対する免疫組織化学的解析により、*Imp* および *IdpA* の検出を行った。その結果、感染植物の茎の篩部において *Imp* および *IdpA* の存在を示す特異的なシグナルが認められたが、そのシグナルは *Imp* の方が強かった。免疫組織化学的解析からも、*Imp* の方が *IdpA* よりも発現量が高く、PoiBI ファイトプラ

ズマの主要な膜タンパク質が Imp であることが示唆された。

P. pruni に属するファイトプラズマは Imp と IdpA をコードする遺伝子を保持しているが、両タンパク質の発現量比較は本研究の PoiBI ファイトプラズマが初である。さらに、主に発現している Imp をコードする *imp* 遺伝子は PoiBI ファイトプラズマ分離株間においても配列の多様性が認められた。

以上より、PoiBI ファイトプラズマは分離株間で *imp* 遺伝子の配列に多様性があり、変異の全てが非同義置換であった。さらに PoiBI ファイトプラズマは植物組織内で、IdpA に比べて Imp を多く発現していると考えられた。一方で、同種別系統の WX ファイトプラズマでは IdpA が主要な表面膜タンパク質であり、同種のファイトプラズマで発現している主要な膜タンパク質が異なる。これは媒介虫によって伝搬が行われる WX ファイトプラズマと、接ぎ木によって伝搬される PoiBI ファイトプラズマの伝搬様式の違いによって生じた可能性があり、ファイトプラズマの膜タンパク質の進化を考える上で興味深い。

2. ファイトプラズマの接着因子 P38 の解析

病原細菌の多くは、菌体表面の膜タンパク質を介して宿主細胞に接着し、侵入・感染する。病原細菌が宿主細胞に接着するためには、宿主細胞接着因子と呼ばれる菌体表面の膜タンパク質が重要な機能を担うことが、多くの病原細菌において報告されている。従って、宿主細胞接着因子を特定し、その特徴および機能の解析を行うことが、病原細菌の感染メカニズムを解明する上で重要である。

モリキューテス綱細菌は、宿主細胞への感染に際して、P40 (*Mycoplasma agalactiae*) および P89 (*Spiroplasma citri*) などの接着因子を必要とすることが知られているが、ファイトプラズマにおける接着因子の存否もその性状は不明である。

P40 と P89 はタンパク質全体の相同性は無いが、約 40 アミノ酸の類似性の高い保存領域モチーフ (*Mollicutes adhesin motif*: MAM) が存在する。全ゲノム配列が解読されている OY ファイトプラズマで MAM 配列の BLAST 検索を行ったところ、MAM に類似した配列を持つタンパク質 P38 を見出した。OY ファイトプラズマの P38 遺伝子の塩基配列をもとにした PCR および配列データベースでの BLAST 検索により、OY ファイトプラズマに近縁な 4 系統のファイトプラズマにおいて P38 遺伝子のオルソログを見出した。これらは互いに高い配列同一性を示した。また、OY ファイトプラズマの P38 タンパク質に対する抗体を作出し、この抗体を用いて植物および昆虫宿主における P38 の発現をウェスタンブロット解析により調べたところ、P38 のバンドがファイトプラズ

マ感染宿主特異的に検出された。この結果から、ファイトプラズマは植物・昆虫いずれの宿主内においても P38 を高レベルで発現していることが示唆された。

次いで、抗 P38 抗体を用いたドットブロット・ファールウェスタン解析により、宿主である植物および昆虫の粗抽出液に対する P38 の接着能を調べたところ、強いシグナルが認められた。一方、P38 の代わりに抗 BSA 抗体を用いて BSA の接着能を調べた場合は、シグナルが認められなかったことから、P38 が接着因子として働く可能性が強く示唆された。

さらに酵素抗体結合試験で P38 と宿主との接着能を調べたところ、植物粗抽出液に対しては明確な結合を示さなかったが、昆虫粗抽出液に対して P38 が結合することが示された。さらに、MAM を除いた P38 や MAM にアミノ酸置換を導入した P38 を酵素抗体結合試験に供したところ、結合を示さなくなったことから、P38 と昆虫粗汁液との結合は MAM 依存的に起こると考えられた。以上より、P38 は宿主と相互作用し、特に昆虫宿主に対しては MAM 依存的に機能する接着因子である可能性が示唆された。

以上を要するに、ファイトプラズマの膜タンパク質は宿主との相互作用に関与し、宿主への侵入段階において機能するものと考えられ、宿主の分化の過程で多様性が獲得されたものと考えられた。今後、これらのタンパク質の機能の詳細がさらに明らかになれば、宿主感染機構についての理解が深まると考えられる。

参考文献

- Andersen MT, Liefting LW, Havukkala I & Beever RE (2013) Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of “Candidatus Phytoplasma australiense” reveals genome plasticity. *BMC Genomics* 14: 529.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW & Hogenhout SA (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.* 188: 3682–3696.
- Barbara DJ, Morton A, Clark MF & Davies DL (2002) Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148: 157–167.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G & Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783–795.
- Berg M, Davies DL, Clark MF, Vetten HJ, Maie G, Marcone C & Seemuller E (1999) Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145: 1937–1943.
- Betraccini A & Duduk B (2009) Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 355–378.
- Blomquist CL, Barbara DJ, Davies DL, Clark MF & Kirkpatrick BC (2001) An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147: 571–580.
- Boonrod K, Munteanu B, Jarausch B, Jarausch W & Krczal G (2012) An immunodominant membrane protein (Imp) of “Candidatus Phytoplasma mali” binds to plant actin. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 25: 889–895.

- Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K & Jones DT (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* 41: W349–57.
- Chanock BRM, Hayflicki L & Barile MF (1962) Growth on artificial medium of an agent associated with a typical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48: 41–49.
- Chen W, Li Y, Wang Q, Wang N & Wu Y (2014) Comparative genome analysis of wheat blue dwarf phytoplasma, an obligate pathogen that causes wheat blue dwarf disease in China. *PLoS One* 9: e96436.
- Chung W-C, Chen L-L, Lo W-S, Lin C-P & Kuo C-H (2013) Comparative analysis of the peanut witches'-broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. *PLoS One* 8: e62770.
- 土居養二、寺中理明、与良清、明日山秀文 (1967) クワ萎縮病、ジャガイモてんぐ巢病、Aster yellows 感染ペチュニアならびにキリてんぐ巢病の罹病茎葉篩部に見出された Mycoplasma 様 (あるいは PLT 様) 微生物について. 日植病報 33: 259–266.
- Dole JM & Wilkins HF (1991) Vegetative and reproductive characteristics of poinsettia altered by a graft-transmissible agent. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116: 307–311.
- Dole JM, Wilkins HF & Desborough SL (1993) Investigations on the nature of a graft-transmissible agent in poinsettia. *Can J Bot* 71: 1097–1101.
- Economou A (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.* 7: 315–320.
- Fleury B, Bergonier D, Berthelot X, Peterhans E, Frey J & Vilei EM (2002) Characterization of P40, a cytoadhesin of Mycoplasma agalactiae. *Infect. Immun.* 70: 5612–5621.
- Friedlander ML, Bell DR, Leary J & Davey RA (1989) Comparison of western blot analysis and immunocytochemical detection of P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *J. Clin. Pathol.* 42: 719–722.

- Gala JL, McLachlan JM, Bell DR, Michaux JL & Ma DDF (1994) Specificity and sensitivity of immunocytochemistry for detecting P-glycoprotein in haematological malignancies. *J. Clin. Pathol.* 47: 619–624.
- Galetto L, Bosco D, Balestrini R, Genre A, Fletcher J & Marzachi C (2011) The major antigenic membrane protein of “Candidatus Phytoplasma asteris” selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS One* 6: e22571.
- Girón J a, Lange M & Baseman JB (1996) Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect. Immun.* 64: 197–208.
- Gundersen DE, Lee I, Rehner SA, Davis RE & Kingsbury DT (1994) Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176: 5244–5254.
- Himeno M, Neriya Y, Minato N, Miura C, Sugawara K, Ishii Y, Yamaji Y, Kakizawa S, Oshima K & Namba S (2011) Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *Plant J.* 67: 971–979.
- Hirokawa T, Boon-Chieng S & Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378–379.
- Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N & Dickinson M (2008) 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.* 58: 1826–1837.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar E-D, Kakizawa S, Kingdom HN & Namba S (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9: 403–423.
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ & Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35: W585–7.

- Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, Ishii Y, Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Kagiwada S, Yamaji Y & Namba S (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 6416–6421.
- IRPCM (2004) “Candidatus Phytoplasma”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243–1255.
- 石家達爾、土居養二、与良清、明日山秀文 (1967) クワ萎縮病の病徴発現におよぼすテトラサイクリン系抗生物質の影響. 日植病報 33: 267–275.
- Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K & Namba S (2009a) In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology* 155: 2058–2067.
- Ishii Y, Oshima K, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y & Namba S (2009b) Process of reductive evolution during 10 years in plasmids of a non-insect-transmissible phytoplasma. *Gene* 446: 51–57.
- Jerardo A (2006) Potted flowering and foliage plants. *Floriculture and nursery crops yearbook*. page v.
- Jiang YP, Lei JD & Chen TA (1988) Purification of aster yellows agent from diseased lettuce using affinity chromatography. *Phytopathology* 78: 828–831.
- Jung H-Y, Yae M-C, Lee J-T, Hibi T & Namba S (2003) Aster yellows subgroup (Candidatus Phytoplasma sp. AY 16S-group, AY-sg) phytoplasma associated with porcelain vine showing witches’ broom symptoms in South Korea. *J. Gen. Plant Pathol.* 208–209.
- Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, Nishigawa H, Jung H-Y, Sawayanagi T, Tsuchizaki T, Miyata S, Ugaki M & Namba S (2001) Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14: 1043–1050.
- Kakizawa S, Oshima K, Nishigawa H, Jung H-Y, Wei W, Suzuki S, Tanaka M, Miyata S, Ugaki M & Namba S (2004) Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows

- phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150: 135–142.
- Kakizawa S, Oshima K, Jung H-Y, Suzuki S, Nishigawa H, Arashida R, Miyata S, Ugaki M, Kishino H & Namba S (2006a) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J. Bacteriol.* 188: 3424–3428.
- Kakizawa S, Oshima K & Namba S (2006b) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol.* 14: 254–256.
- Kakizawa S, Oshima K, Ishii Y, Hoshi A, Maejima K, Jung H-Y, Yamaji Y & Namba S (2009) Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 293: 92–101.
- Kirkpatrick BC, Stenger DC, Morris TJ & Purcell AH (1987) Cloning and Detection of DNA from. *Science* 238: 197–200.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R & Seemüller E (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma “*Candidatus Phytoplasma mali*”. *BMC Genomics* 9: 306.
- Lee I-M, Klopmeier M, Bartoszyk IM, Gundersen-Rindal DE, Chou T-S, Thomson KL & Eisenreich R (1997) Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nat. Biotechnol.* 15: 178–182.
- Lee I-M, Gundersen-rindal DE, Davis RE & Bartoszyk M (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153–1169.
- Lee I-M, Davis RE & Dawn E (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 221–255.
- Liefting LW & Kirkpatrick BC (2003) Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 203–211.

- Liu HY, Gumpf DJ, Oldfield GN & Calavan EC (1983) The relationship of *Spiroplasma citri* and *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 73: 585–590.
- MacLean AM, Sugio A, Makarova O V, Findlay KC, Grieve VM, Tóth R, Nicolaisen M & Hogenhout SA (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 157: 831–841.
- MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzanich K, Zdziarska AM, Angenent GC, Immink RGH & Hogenhout SA (2014) Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* 12: e1001835.
- Maejima K, Iwai R, Himeno M, Komatsu K, Kitazawa Y, Fujita N, Ishikawa K, Fukuoka M, Minato N, Yamaji Y, Oshima K & Namba S (2014a) Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *Plant J.* 78: 541–554.
- Maejima K, Oshima K & Namba S (2014b) Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 210–221.
- Maramorosch K (1956) Multiplication of aster yellows virus in in vitro preparations of insect tissues. *Virology* 2: 369–376.
- Martini M, Lee I-M, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ & Osler R (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2037–2051.
- 眞山滋志 (2010) 植物病理学とは. 植物病理学 pp.1-9 文栄堂出版 東京.
- Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Molling K, Broecker F, Beyerlein P, Buttner C, Bertaccini A & Kube M (2014) Generation and analysis of draft sequences of “stolbur” phytoplasma from multiple displacement amplification templates. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1–11.

- Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H & Tsuchizaki T (1993a) Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 786–791.
- Namba S, Oyaizu H, Kato S, Iwanami S & Tsuchizaki T (1993b) Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 461–467.
- 難波成任 (2008) 植物病と植物医科学. 植物医科学 (上) pp.1-30 養賢堂 東京.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. pp.73-76, Columbia University Press, New York.
- Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung H-Y, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M & Namba S (2002) Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148: 1389–1396.
- 農林水産省 (2010) 青果物・花きの流通量及び価格. 第 84 次農林水産省統計表 (平成 20～21 年) . pp. 538-539.
- 奥田誠一 (1972) わが国に発生するマイコプラズマ病. 植物防疫 26(5): 6-9.
- Oshima K, Shiomi T, Kuboyama T, Sawayanagi T, Nishigawa H, Kakizawa S, Miyata S, Ugaki M & Namba S (2001) Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. *Phytopathology* 91: 1024–1029.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H-Y, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M & Namba S (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36: 27–29.
- 大島研郎、難波成任 (2004) 植物病原細菌ファイトプラズマの全ゲノム解読の意義 退行的進化を遂げた微生物の生存戦略. 蛋白質 核酸 酵素 49: 649–654.
- Oshima K, Ishi Y, Kakizawa S, Sugawara K, Neriya Y, Himeno M, Minato N, Miura C, Shiraishi T, Yamaji Y & Namba S (2011) Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS One* 6: e23242.

- Oshima K, Maejima K & Namba S (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Front. Microbiol.* 4: 230.
- Parthasarathy MV (1974) Mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology* 64: 667–674.
- Razin S, Yogev D & Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094–1156.
- Rottem S (2003) Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 83: 417–432.
- Saccardo F, Martini M, Palmano S, Ermacora P, Scortichini M, Loi N & Firrao G (2012) Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII. *Microbiology* 158: 2805–2814.
- Soto GE & Hultgren SJ (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059–1071.
- Steiner T, McGarrity GJ & Phillips DM (1982) Cultivation and partial characterization of spiroplasmas in cell cultures. *Infect. Immun.* 35: 296–304.
- Strauss E (2009) Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325: 388–390.
- Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, Himeno M, Oshima K & Namba S (2013) The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiol.* 162: 2005–2014.
- Sugio A, Kingdom HN, MacLean AM, Grieve VM & Hogenhout SA (2011) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: E1254–63.
- Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung H-Y, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M & Namba S (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 4252–4257.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood , evolutionary distance , and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH & Dijk JM Van (2000) Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 515–547.
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R & Gibb KS (2008) 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.* 190: 3979–3991.
- Tully JG (1995) International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes: Minutes of the Interim Meeting, 17 and 26 July 1994, Bordeaux, France. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 415–417.
- Weintraub PG & Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 91–111.
- Whitcomb RF & Davis RE (1970) Evidence on Possible Mycoplasma Etiology of Aster Yellows Disease. *Infect. Immun.* 2: 209–215.
- Whitcomb RF (1983) Culture media for spiroplasmas. *Methods Mycoplasma*. 1: 147-158.
- 山田義男、長島久和子、井上金治、小島暁 (1978) クワ萎縮病新梢の葉柄篩部組織内に見出せるマイコプラズマ様微生物の微細構造. 日植病報 44: 35–46.
- Yu J, Wayadande AC & Fletcher J (2000) *Spiroplasma citri* surface protein P89 implicated in adhesion to cells of the vector *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 90: 716–722.
- Yu Y, Yeh K & Chan-pin L (1998) An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches’ broom. *Microbiology* 144: 1257–1262.

Zhao Y, Wei W, Lee I-M, Shao J, Suo X & Davis RE (2009) 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.* 59: 2582–2593.

本論文の内容は、下記の国際学術雑誌にて印刷・公表された。

Neriya Y, Sugawara K, Maejima K, Hashimoto M, Komatsu K, Minato N, Miura C, Kakizawa S, Yamaji Y, Oshima K & Namba S (2011) Cloning, expression analysis, and sequence diversity of genes encoding two different immunodominant membrane proteins in poinsettia branch-inducing phytoplasma (PoiBI). *FEMS Microbiol. Lett.* 324: 38–47.

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

謝辞

本研究は、2010 年 4 月から 2015 年 3 月にかけて、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室において行ったものである。本研究を遂行するにあたり研究全体に対して懇切丁寧な指導をしていただいた、東京大学大学院 農学生命科学研究科の難波成任教授に、深い感謝の念を申し上げます。

大島研郎教授（現 法政大学 生命科学部）、柿澤茂行主任研究員（現 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門）、小松健准教授（現 東京農工大学 農学研究院）、前島健作助教（東京大学大学院 農学生命科学研究科）には、平素の実験手法ならびに本博士論文の執筆に際し、多くの有益な助言をいただきました。また、東京大学の植物病理学研究室および植物医科学研究室の先輩・後輩・技術補佐員の方々、生産・環境生物学専攻の同期の方々にもお世話になりました。この場を借りて、お礼申し上げます。

本研究で用いた各ファイトプラズマ感染植物は、南村佐保氏（京都府立植物園）、西村典夫博士（鯉淵学園）、土崎常男博士より分譲していただきました。心よりお礼申し上げます。