

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 24 年度博士課程進学

煉谷 裕太郎

指導教員 東京大学大学院教授 難波 成任

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

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の相同性は、*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。