

博士論文

ファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子の発現
および機能に関する研究

三浦 千裕

目次

第 1 章 緒論	4
1.1. ファイトプラズマ属細菌	4
1.1.1. ファイトプラズマの性状.....	4
1.1.2. ファイトプラズマの分類.....	9
1.1.3. ファイトプラズマのゲノム構成.....	11
1.2. 細菌の遺伝子発現制御と感染戦略	18
1.2.1. 細菌の遺伝子発現.....	18
1.2.2. 細菌の発現制御機構.....	20
1.2.3. 細菌のシグナル伝達と発現制御.....	20
1.3. 病原細菌の感染戦略	21
1.3.1. 細菌の遺伝子発現と病原性.....	21
1.3.2. 細胞内寄生性細菌の感染戦略.....	22
1.3.3. ファイトプラズマの感染戦略.....	23
第 2 章 ファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現の網羅的解析	27
2.1. 序文	27
2.1.1. 網羅的遺伝子発現解析法.....	27
2.1.2. 宿主転換する微生物とその遺伝子発現.....	28
2.2. 材料および方法	30
2.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫.....	30
2.2.2. RNA 抽出.....	31
2.2.3. DNase I 処理.....	31
2.2.4. マイクロアレイ解析.....	32
2.2.5. リアルタイム RT-PCR 解析.....	33
2.3. 結果	35
2.3.1. 宿主転換に伴うファイトプラズマ遺伝子のマイクロアレイ解析.....	35
2.3.2. リアルタイム RT-PCR によるマイクロアレイ解析結果の検証.....	49
2.4. 考察	50
2.4.1. 絶対寄生性細菌の遺伝子発現変動.....	50
2.4.2. 代謝系関連遺伝子の発現変動.....	51
2.4.3. 膜輸送体遺伝子の発現変動.....	53

2.4.4. 分泌タンパク質遺伝子の発現変動	54
第3章 ファイトプラズマにおける機械刺激受容チャネルの機能解析	56
3.1. 序文	56
3.1.1. 機械刺激受容チャネルを介した細菌の浸透圧調節	56
3.1.2. 植物細胞および昆虫細胞の浸透圧	56
3.1.3. ファイトプラズマの機械刺激受容チャネル	57
3.2. 材料および方法	58
3.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫	58
3.2.2. MscL の相同性比較	58
3.2.3. RNA 抽出	58
3.2.4. リアルタイム RT-PCR 解析	59
3.2.5. 塩化ガドリニウム処理	59
3.2.6. DNA 抽出	59
3.2.7. リアルタイム PCR 解析	60
3.3. 結果	61
3.3.1. MscL のアミノ酸配列相同性解析	61
3.3.2. <i>OY-mscL</i> の発現量解析	63
3.3.3. 塩化ガドリニウム処理によるファイトプラズマ増殖量への影響	64
3.4. 考察	65
3.4.1. ファイトプラズマにおける MscL の保存性	65
3.4.2. ファイトプラズマにおける MscL の機能	66
3.4.3. MscL の発現とファイトプラズマの増殖	66
第4章 ファイトプラズマにおける活性酸素種分解酵素の活性解析	68
4.1. 序文	68
4.1.1. 活性酸素種の生成とその影響	68
4.1.2. 活性酸素種を介した宿主と病原体の相互作用	68
4.1.3. 活性酸素種分解酵素の役割	69
4.1.4. ファイトプラズマの SOD	70
4.2. 材料および方法	72
4.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫	72

4.2.2. SOD の相同性比較	72
4.2.3. RNA 抽出.....	72
4.2.4. リアルタイム RT-PCR 解析.....	72
4.2.5. DNA 抽出	73
4.2.6. SOD 発現ベクターの構築	73
4.2.7. SOD の大量発現および精製	76
4.2.8. 抗 SOD 抗体作製.....	77
4.2.9. タンパク質抽出	78
4.2.10. ウェスタンブロット解析	78
4.2.11. SOD の酵素活性測定	79
4.2.12. SOD の酵素活性阻害	81
4.3. 結果.....	82
4.3.1. SOD の相同性比較解析	82
4.3.2. <i>sod</i> のリアルタイム RT-PCR 解析.....	84
4.3.3. SOD 発現ベクターの構築、発現、精製.....	85
4.3.4. SOD のウェスタンブロット解析	87
4.3.5. SOD の酵素活性.....	88
4.3.6. SOD の活性阻害による活性中心金属の特定.....	89
4.4. 考察.....	91
4.4.1. ファイトプラズマにおける SOD の保存性.....	91
4.4.2. 植物宿主内および昆虫宿主内における OY-SOD の発現	93
4.4.3. ファイトプラズマにおける SOD の重要性.....	93
4.4.4. ファイトプラズマの活性酸素種分解機構.....	95
第 5 章 総合考察	97
5.1. ファイトプラズマの防除法の確立に向けて	97
5.2. 難培養性細菌の遺伝子機能解析	98
摘要	100
引用文献	104
謝辞	116

第1章 緒論

1.1. ファイトプラズマ属細菌

1.1.1. ファイトプラズマの性状

ファイトプラズマ属（*Candidatus Phytoplasma* spp.；以下 *Phytoplasma* spp.）は、単子葉植物および双子葉植物を含む 700 種以上の多様な植物に感染する植物病原細菌である。ファイトプラズマに感染した植物は、突き抜け、てんぐ巢（萎縮、叢生）葉化、緑化、黄化などの特徴的な病徴を示す（図 1.1）（Hogenhout *et al.*, 2008; Maejima *et al.*, 2014）。ファイトプラズマはヨコバイなど一部のカメムシ目昆虫により永続的に伝搬され、感染を拡大する（Christensen *et al.*, 2005）。その生活環においてファイトプラズマは植物の篩部細胞内に局在し、媒介昆虫が感染植物の篩管を吸汁することにより昆虫の口針を通して中腸に到達する。その後腸壁から血体腔内に侵入し昆虫の全身に感染する。このようにしてファイトプラズマを保毒した昆虫が新たに健全な植物を吸汁すると、菌体が唾液とともに植物篩管内に放出され、新たな植物への感染が成立する（図 1.2）。ファイトプラズマでは宿主植物での種子伝染や媒介昆虫での経卵伝染による伝染経路はほとんど知られていないため、自然界における感染の拡大は垂直伝搬ではなく、媒介昆虫による水平伝搬によると考えられている（Khan *et al.*, 2002; Nipah *et al.*, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008）。

ファイトプラズマが感染した植物は上で述べたような病徴を呈し正常な生育が阻害されるため、農作物の収量減少や品質の低下が問題となる。ファイトプラズマ病による被害は世界中で報告されており、例えば、2001 年にはリンゴに発生したファイトプラズマ病によりドイツで 3100 万ユーロ（およそ 3100 万ドル）、イタリアで 1 億ユーロ（およそ 1 億 2500 万ドル）の経済的損失があったと推定されている（Strauss, 2009）。また、中国ではキリがてんぐ巢病により枯死し、木材生産上大きな問題となった（Yue, 2008）。さらに南米では、飲料、石鹸、バター、繊維などに利用されるココヤシがファイトプラズマによる coconut lethal yellowing 病により壊滅的な被害を受けた（Brown *et al.*, 2006）。日本においてもキリてんぐ巢病のほか、アジサイの花器官に緑化や葉化、突き抜け症状などを引き起こす葉化病が発生している（Sawayanagi *et al.*, 1996; Takinami *et al.*, 2013）。しかしこれまでにファイトプラズマ病を直接防除する有効な方法は確立

されておらず、現在のところ媒介昆虫を駆除することが最も効果的な防除法とされている。ただし媒介昆虫が特定されているファイトプラズマは限られており、媒介昆虫が特定されていない場合には、防除が非常に困難である。



Maejima *et al.*, 2014b

図 1.1 ファイトプラズマ病による病徴

ファイトプラズマに感染したアジサイの葉化症状 (a)、ナツメのてんぐ巣症状 (b)、キリのとんぐ巣症状 (c)

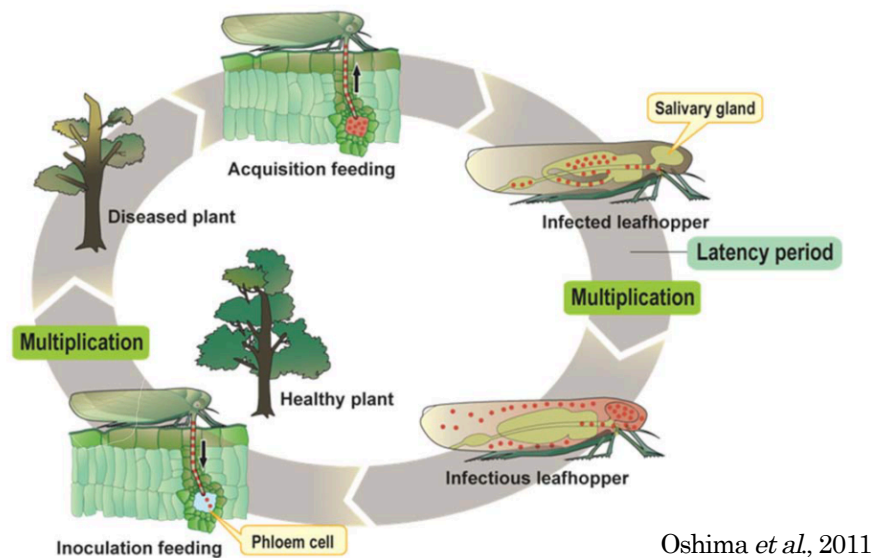
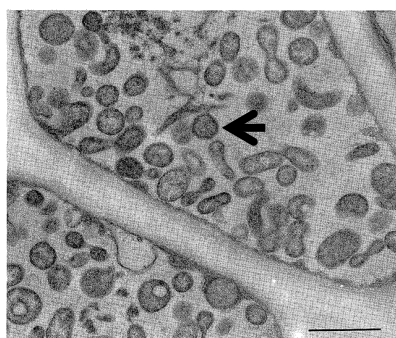


図 1.2 ファイトプラズマのライフサイクル

ファイトプラズマを赤色の点で示す。ファイトプラズマは獲得吸汁 (acquisition feeding) により昆虫体内に侵入する (上)。その後ファイトプラズマは一定の潜伏期間 (latency period) を経て唾液腺 (salivary gland) を含む全身に感染する (右上、右下)。ファイトプラズマ保毒昆虫が新たに健全な植物を吸汁することで (接種吸汁: inoculation feeding)、ファイトプラズマが篩管に侵入し、感染が成立する (左下)。

ファイトプラズマは培養が困難であることから、長年その存在が特定されずにいた。さらにファイトプラズマは菌体が非常に小さく濾過性であること、ファイトプラズマ感染植物の病徴やファイトプラズマ病の伝播様式等の特性が植物ウイルスのそれと類似していることが、病原の特定をより困難にしていた。1967 年、土居らは電子顕微鏡観察により、萎縮黄化症状を呈するクワの篩部組織に、健全植物には見られない球体が存在することを確認した (土居ら、1967)。当初はその球体がヒトや動物の病原であるマイコプラズマと形態的に類似していたこと、マイコプラズマと同様にテトラサイクリン感受性であったことから、この病原体はマイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organism; MLO) と呼ばれた。その後、世界各国で病原不明とされていた様々な植物体から一重の細胞膜で覆われた大きさ $0.1\sim 1.0\ \mu\text{m}$ の球形あるいは不定形の MLO が観察された (図 1.3)。1993 年には MLO の 16S rRNA 遺伝子の特異的に増幅する手法が開発され

(Namba *et al.*, 1993a)、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) 解析および塩基配列解析によって MLO の系統解析を行うことが可能となった (Lee *et al.*, 1991; Namba *et al.*, 1993a)。これらの系統解析の結果、MLO はマイコプラズマ属やアコレプラズマ属と近縁であるが、独立した単系統群を形成することが明らかとなった (図 1.4) (Namba *et al.*, 1993b; Tully *et al.*, 1993)。これに伴い 1994 年の国際細菌分類委員会において MLO は「ファイトプラズマ」と改称され (Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1995)、2004 年には新設の暫定属に分類された (The IRPCM Phytolasma/Spiroplasma Working Team, 2004)。



塩見ら、1999

図 1.3 ファイトプラズマの電子顕微鏡写真

ファイトプラズマ感染植物の超薄切片像。矢印で示されているように球状もしくは不定形に見えるものがファイトプラズマの菌体である。スケールバーは1 μm 。

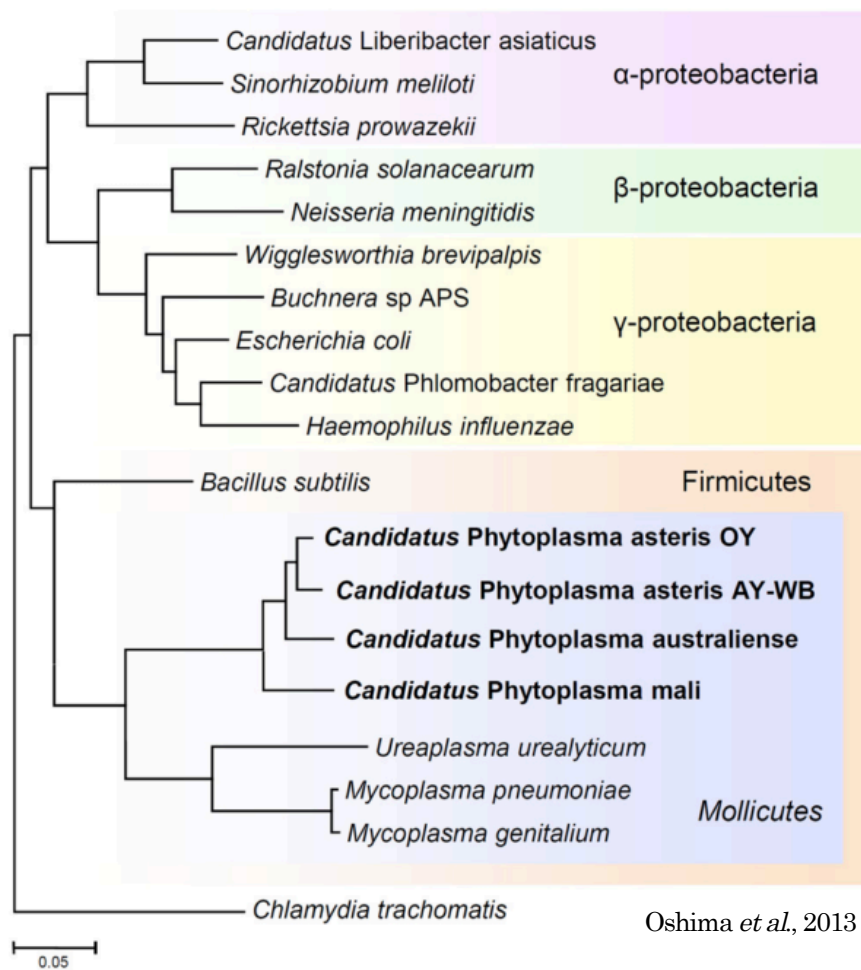


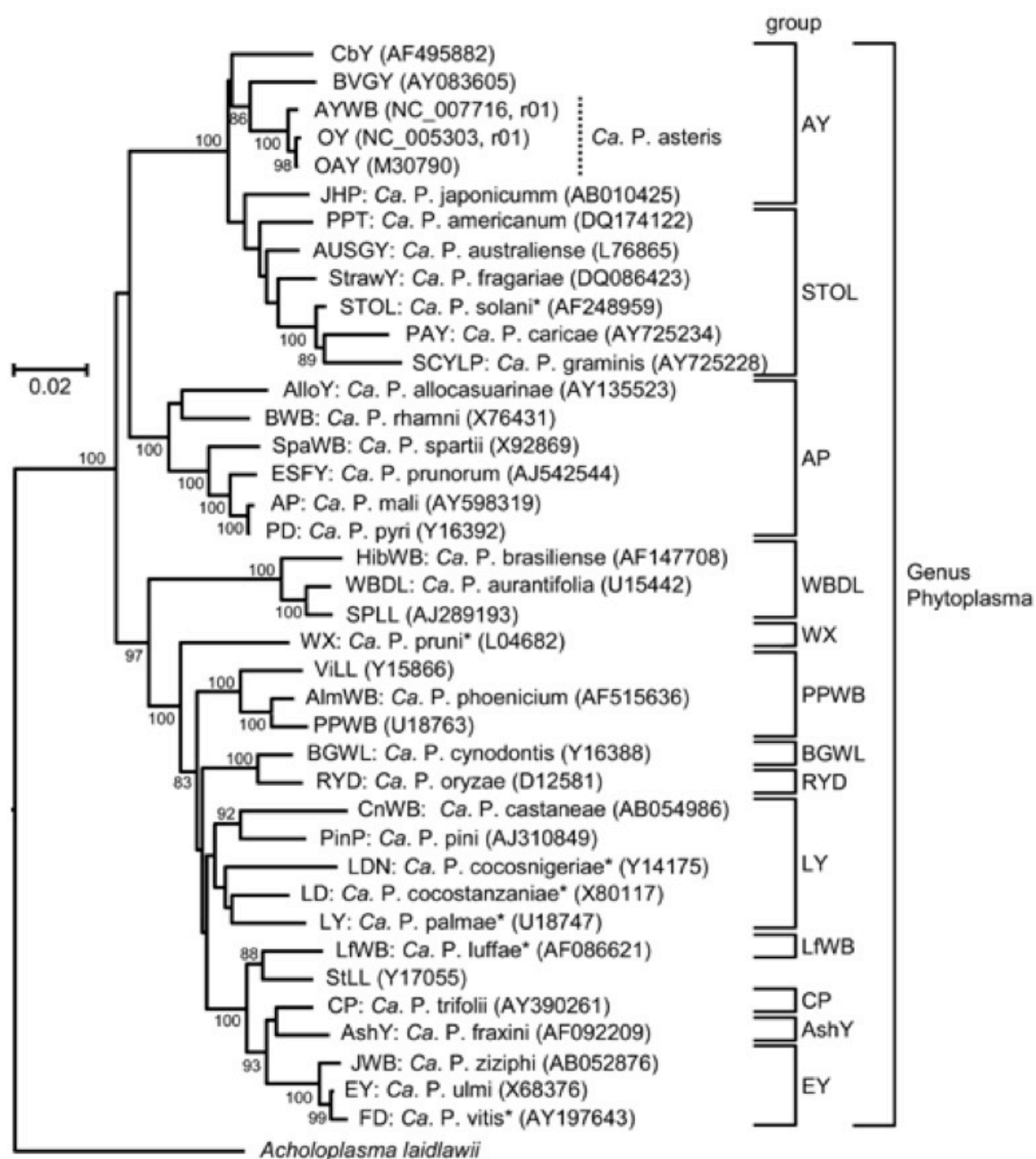
図 1.4 ファイトプラズマの系統学的位置づけ

他の細菌とファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子配列に基づく近隣結合法による分子系統樹。ファイトプラズマ (太字) は *Bacillus subtilis* など GC 含量の低いグラム陽性細菌の一群と同じ *Firmicutes* 門に属し、さらにマイコプラズマ属などが含まれる *Mollicutes* 綱に属する。

1.1.2. ファイトプラズマの分類

各ファイトプラズマ暫定種には International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) で認められた **reference strain** が定められており、ある植物から新たにファイトプラズマが検出された場合、その 16S rRNA 遺伝子の 1200 bp 以上の配列と既存の **reference strain** の配列とを比較することで、種レベルの分類を決定する。既存の暫定種との 16S rRNA 遺伝子の配列類似性が 97.5% 以上の場合はその暫定種に分類され、いずれの **reference strain** と比較しても 16S rRNA 遺伝子の配列類似性が 97.5% を下回る場合には新たな暫定種が提唱される。ただし、暫定種との配列類似性が 97.5% を上回る場合でも、媒介昆虫、植物宿主、病徴などの特徴が大きく異なる場合には新たな暫定種とされる場合がある。これらの基準に基づいたファイトプラズマ属の分類を図 1.5 に示す。

現在、ファイトプラズマ属には現在およそ 40 の暫定種が存在する (Kube *et al.*, 2012)。各ファイトプラズマ暫定種はさらに下位の分類として、原宿主および病原性に応じて系統として区別される。データベース上には 1,000 を超えるファイトプラズマ系統の 16S rRNA 遺伝子配列が登録されているが、系統の分類に明確な基準はなく、遺伝的に近縁なファイトプラズマが、宿主植物や検出された地域が異なる場合に異なる系統として登録されることがある。一方で、類似の病気を引き起こすファイトプラズマ系統が、後に遺伝的に遠縁であることが判明する例もある。例えばココヤシが黄化し枯死に至る病害 **coconuts lethal yellowing** 病は、アメリカ・カリブ地域と、タンザニアをはじめとするアフリカ地域において発生しているが、それぞれ病原となるファイトプラズマは遺伝的に離れた系統である (Dickinson *et al.*, 2013)。南米を中心としてキャッサバに被害を及ぼしている **cassava frogskin** 病においても、コロンビア分離株とブラジル分離株とで遺伝的に異なる系統であることが示唆されている (De Souza *et al.*, 2014)。



Hogenhout *et al.*, 2008 より一部改変

図 1.5 ファイトプラズマ属の分類

16S rRNA 遺伝子に基づき近隣結合法にて作成したファイトプラズマ属の分子系統樹。*Acholoplasma laidlawii* をアウトグループとした。左から順に、各ファイトプラズマ系統名、暫定種名、グループ名を示す。カッコ内は GenBank アクセッション番号を示す。

さらにこれらの分類体系と並行して、ファイトプラズマ属の分類には 16S rRNA 遺伝子の RFLP パターンによる方法が広く利用されている (Dickinson *et al.*, 2013)。この方法はファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子配列の一部を PCR 反応によって増幅し、増幅産物を制限酵素で処理した切断パターンによってファイトプラズマを分類する方法である。RFLP による分類は、配列解読を必要としないため、実験設備が限られた環境でも利用可能である点で優れている。しかし塩基多型により切断パターンが変化する可能性を排除することができないことから、高次の分類には不向きであると考えられる (Fránová *et al.*, 2013)。

1.1.3. ファイトプラズマのゲノム構成

2004 年、ファイトプラズマ属最大の種である *P. asteris* (Gundersen *et al.*, 1996) に属するタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma; 以下、OY ファイトプラズマ) の全ゲノム配列が解読された (図 1.6) (Oshima *et al.*, 2004)。OY ファイトプラズマのゲノムは約 850 kbp の環状染色体および複数のプラスミドで構成される (Nishigawa *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Oshima *et al.*, 2001a)。染色体の GC 含量は 28 %と、他の *Mollicutes* 綱細菌と同様に低い値を示す。OY ファイトプラズマの染色体にコードされる遺伝子は、複製を開始するのに必要なタンパク質をコードする *dnaA* を遺伝子番号 1 番として、PAM (Phytoplasma asteris OY-M strain) 001 と定められた。OY ファイトプラズマのゲノム上には 754 個の遺伝子が見出されており、このうち 257 個は既知の遺伝子と相同性が認められない機能未知の遺伝子である (表 1.1)。2014 年 10 月現在、OY ファイトプラズマの他に *P. asteris* AY-WB 系統 (AY-WB)、*P. australiense* Australian 系統、*P. mali* AT 系統における全ゲノム配列の解読が終了している (表 1.2) (Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)。

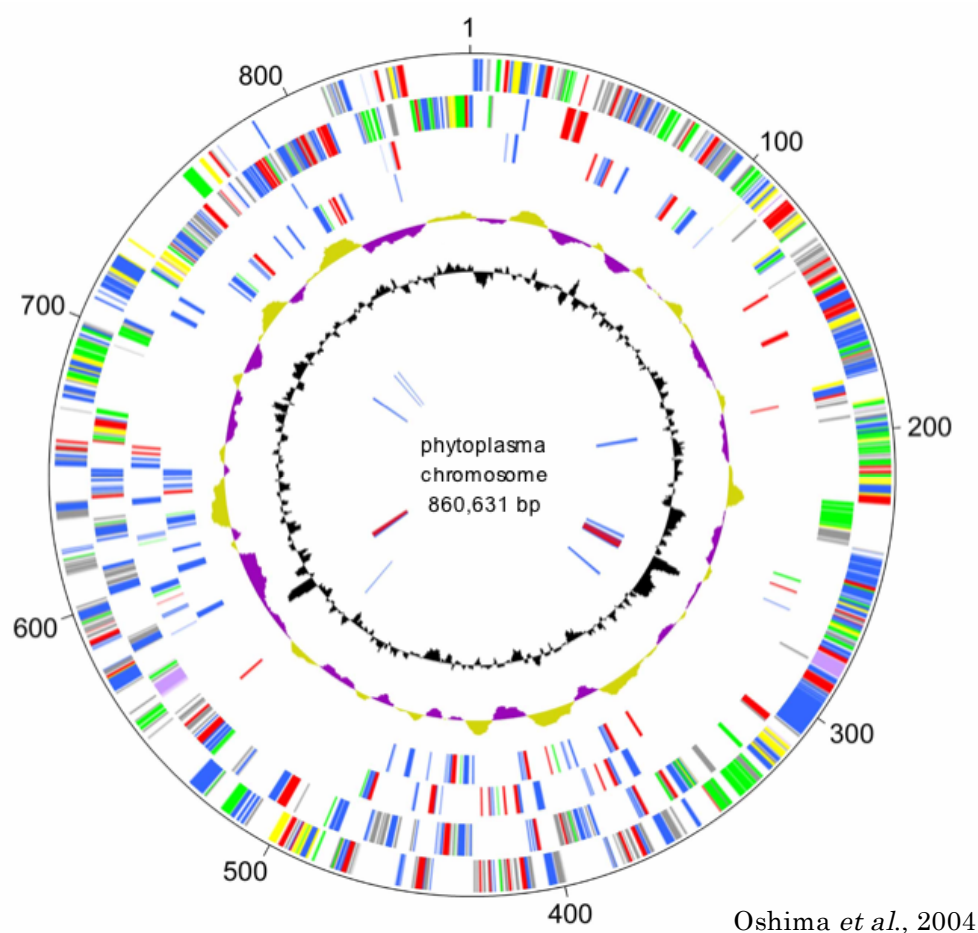


図 1.6 ファイトプラズマの染色体地図

OY ファイトプラズマの染色体地図。円の外側から、1; +鎖にコードされた遺伝子 (青; Information storage and processing、緑; Metabolism、紫; RNA、朱; Cellular processes、黄; Poorly characterized、灰; Others)、2; -鎖にコードされた遺伝子、3; +鎖にコードされた重複遺伝子、4; -鎖にコードされた重複遺伝子、5; GC skew 値 $\{(G-C)/(G+C)\}$ 、6; G+C 含量、7; +鎖にコードされた tRNA (青) および rRNA (赤)、8; -鎖にコードされた tRNA (青) および rRNA (赤) を示す。

表 1.1 OY-M ゲノムの構成

塩基長 (bp)	853,092
GC含量 (%)	28
タンパク質をコードする領域 (%)	73
タンパク質をコードする遺伝子	
既知遺伝子と相同性がある	446
ファイトプラズマで保存されている機能未知遺伝子	51
機能未知遺伝子	257
合計	754
タンパク質をコードする遺伝子の平均の長さ (bp)	785
tRNA	32
rRNAオペロン	2

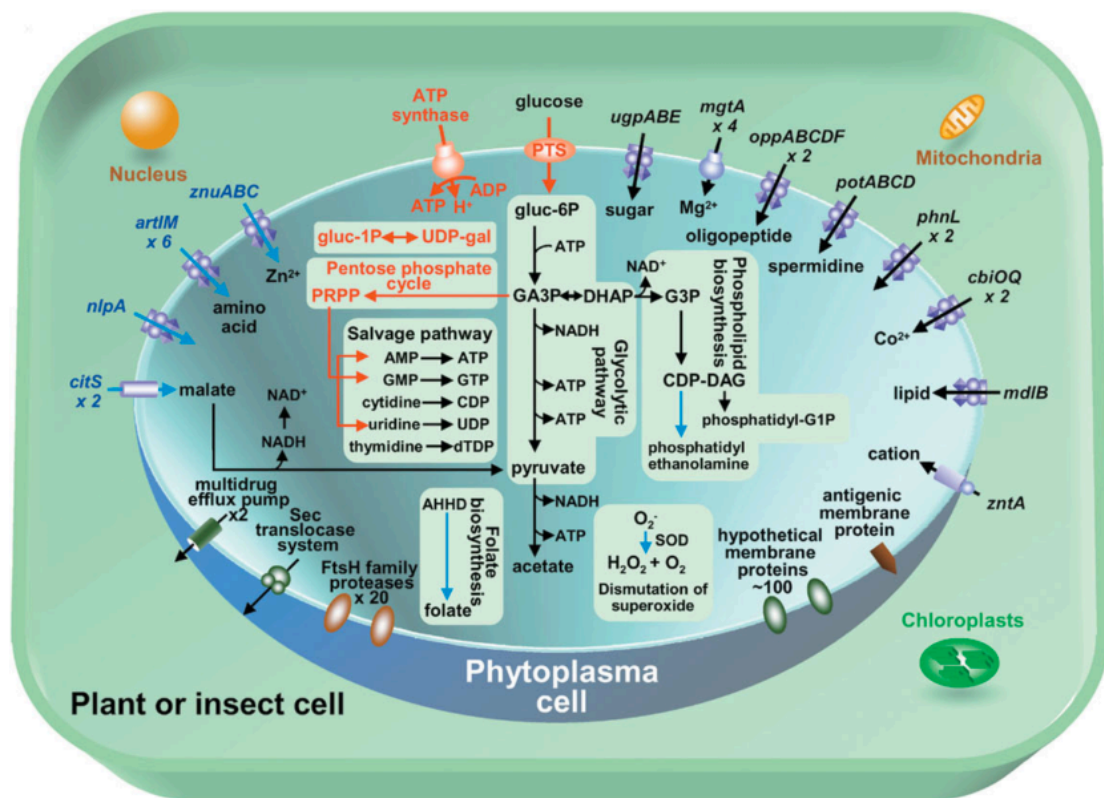
表 1.2 ファイトプラズマおよび近縁種 *Acholeplasma* 属細菌のゲノム構成

	<i>Acholeplasma</i>			<i>Ca. Phytoplasma</i>			
	<i>brassicae</i> O502	<i>palmae</i> J233	<i>laidlawii</i> PG-8A	<i>asteris</i> OY-M	<i>asteris</i> AY-WB	<i>australiense</i> Rp-A	<i>mali</i> AT
Chromosome organization	circular	circular	circular	circular	circular	circular	linear
Chromosome size, bp	1,877,792	1,554,229	1,496,992	853,092	706,569	879,959	601,943
G + C content, %	35.77	28.98	31.93	27.76	26.89	27.42	21.39
G + C % of protein coding genes ¹	36.15	29.20	32.23	29.09	28.54	28.72	22.58
Protein-coding genes ¹ , n	1,690 (14)	1,439 (2)	1,380	752	671	684 (155)	481 (16)
Protein coding, % ¹	90.3	90.6	90.7	73.1	73.7	64.1	76.3
Average ORF size ¹ , nt	1,003	979	984	829	776	825	955
Protein coding genes/kb ¹	0.899	0.925	0.921	0.881	0.949	0.777	0.799
rRNA operons (n genes)	4 (14) ²	2 (6)	2 (6)	2 (6)	2 (6)	2 (6)	2 (6)
G + C % of rRNA genes	49.31	48.64	48.57	45.95	46.14	46.37	44.32
tRNAs, n	45	35	34	32	31	35	32
G + C % of tRNA genes	56.12	56.56	56.97	53.61	53.64	54.11	52.41
Plasmids, n	–	–	–	2	4	1	–
Data source	FO681348 this study	FO681347 this study	CP000896.1 Lazarev et al., 2011	AP006628.2 Oshima et al., 2004	CP000061.1 Bai et al., 2006	AM422018.1 Tran-Nguyen et al., 2008	CU469464.1 ³ Kube et al., 2008

¹ Genes assigned as pseudogenes are not incorporated. ² *A. brassicae* encodes unusual rRNA operon structures including 5S-rRNA duplications. ³ CU469464 was recently updated.

Kube *et al.*, 2014

これらのファイトプラズマ属細菌のゲノム情報をもとに比較解析を行った結果、ファイトプラズマ属細菌は共通して、DNA 合成、転写・翻訳、細胞分裂、細胞膜合成、核酸合成、タンパク質の輸送に関わる基本的な遺伝子を保持している一方で、代謝系関連遺伝子の多くを欠損していることが明らかとなった (Kube *et al.*, 2012)。例えば、ファイトプラズマと同じ *Mollicutes* 綱に属する *Mycoplasma genitalium* は *Bacillus subtilis* に比べて TCA 回路、電子伝達系、アミノ酸合成、脂肪酸合成、コレステロール合成に関与する遺伝子を持っておらず、自律増殖する最少遺伝子の生物であるとしているが (Razin *et al.*, 1998)、ファイトプラズマは更に代謝関連遺伝子が少なく、ペントースリン酸回路、ホスホトランスフェラーゼシステム、加えてこれまで生命にとって必須と考えられていた FoF₁ 型 ATP 合成酵素のサブユニットをコードする遺伝子を保持していない (図 1.7)。その反面、膜輸送関連遺伝子を複数コピー保持している。このような特徴的なゲノム構成から、ファイトプラズマは宿主細胞への極度な寄生により多くの代謝系遺伝子を失う退行的進化を遂げたのと同時に、膜輸送系遺伝子を多数獲得し、自身の生存に必要な栄養を宿主からの取り込みに依存するようになったのではないかと考えられている (Oshima *et al.*, 2004)。



Oshima et al., 2004

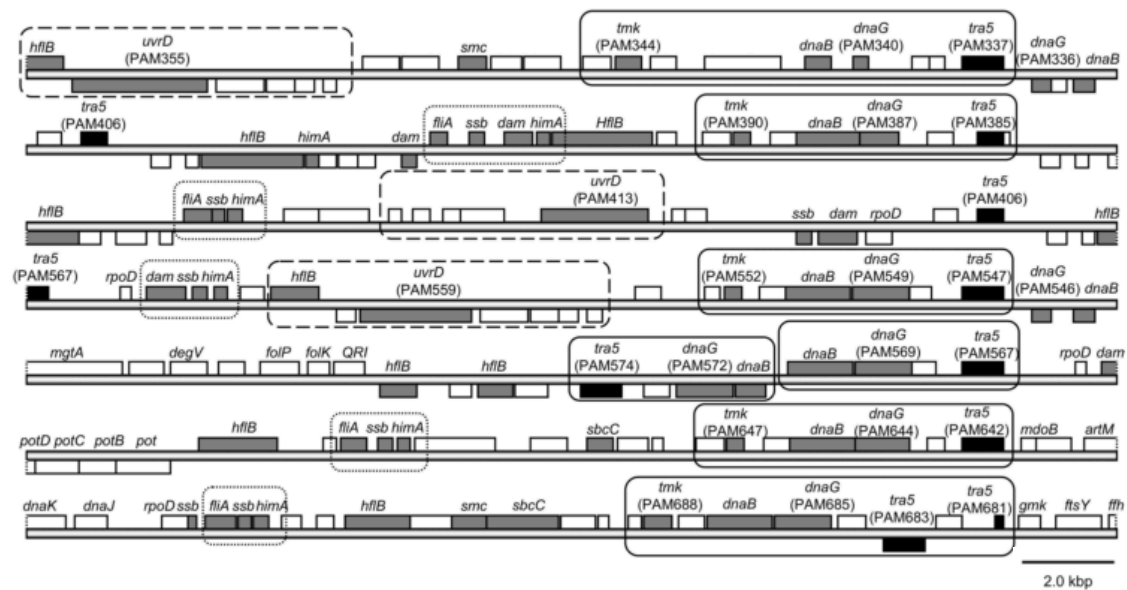
図 1.7 ファイトプラズマの代謝系および輸送系

青字はファイトプラズマゲノムにはコードされているが *Mycoplasma genitalium* には認められない膜輸送・代謝経路を示す。赤字は *M. genitalium* にコードされているがファイトプラズマには認められない代謝経路を示す。

さらに、ファイトプラズマ属のゲノムの特徴として、遺伝子の重複が多いことが挙げられる(表 1.3)。例えば他の細菌では通常 1 コピーしか認められない *dnaB*、*dnaG*、*tmk*、*uvrD*、*ssb* はゲノム上に複数コピーコードされており、OY ファイトプラズマではこれらの重複遺伝子が全遺伝子の 18 %、全ゲノム領域の 23 %に達することが明らかとなっている。重複遺伝子はファイトプラズマゲノム上の特定の領域に集中して存在し、OY ファイトプラズマでは主に 4 ヶ所の遺伝子重複領域が認められる。これらの遺伝子重複領域はある程度の規則性があり、5' - *fliA* - *ssb* - *himA* - *hflB* - *tmk* - *dnaB* - *dnaG* - *tra5* - 3' のような約 10-20 kbp の遺伝子クラスターを形成している場合が多い(図 1.8) (Arashida *et al.*, 2008)。このクラスターは DNA の複製に関わる遺伝子 *dnaB* や *dnaG* と転移酵素をコードする *tra5* を含むことから、複製しながらファイトプラズマのゲノム上を転移するトランスポゾン様の領域ではないかと推測され、転移性遺伝子クラスター (Potential Mobile Unit; PMU) と呼ばれている (Bai *et al.*, 2006; Arashida *et al.*, 2008)。PMU はこれまでにゲノム配列が解読された全てのファイトプラズマにおいてその存在が確認されている (Kube *et al.*, 2012)。

表 1.3 PMU に含まれる重複遺伝子

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



Arashida *et al.*, 2008

図 1.8 OY ファイトプラズマゲノム上に存在する転移性遺伝子クラスター (PMU)
OY ファイトプラズマのゲノム上に存在する 7 つの PMU を示す。保存された遺伝子構造のうち *tmk-dnaB-dnaG-tra5* を実線で、*hflB-uvrD* を破線で、*fliA-ssb-himA* を点線で囲んだ。

1.2. 細菌の遺伝子発現制御と感染戦略

1.2.1. 細菌の遺伝子発現

細菌は、自身の置かれた環境に応じて巧みに遺伝子の発現を制御している (Kazmierczak *et al.*, 2005)。細菌の遺伝子の転写には5種類のタンパク質のサブユニットから成るRNAポリメラーゼコア酵素と、RNAポリメラーゼコア酵素を特異的なプロモーターへと結合させるためのシグマ因子が必要である (Ishihama, 2000)。これらが複合体を形成した、RNAポリメラーゼホロ酵素が、細菌の基本的な転写装置としてゲノム上のプロモーター配列と強く結合し、直下流の転写開始点より mRNA の合成を開始する (図 1.9)。細菌はRNAポリメラーゼコア酵素を1種類、結合するプロモーター配列の異なるシグマ因子を複数種類保持している。

ファイトプラズマはRNAポリメラーゼコア酵素を1種類、シグマ因子を2種類保持している。環境中に遍在する *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* など自由生活性の細菌が数十種類のシグマ因子を有していることと比較すると、ファイトプラズマの持つシグマ因子の種類は非常に少ない。これはファイトプラズマと同じく宿主に寄生して生活する *Mycoplasma* 属細菌や *Wolbachia* 属細菌が保持するシグマ因子においても同様のことが報告されており、退行的進化を遂げた細菌に共通する特徴の一つと考えられる (表 1.4) (Mittenhuber, 2002)。

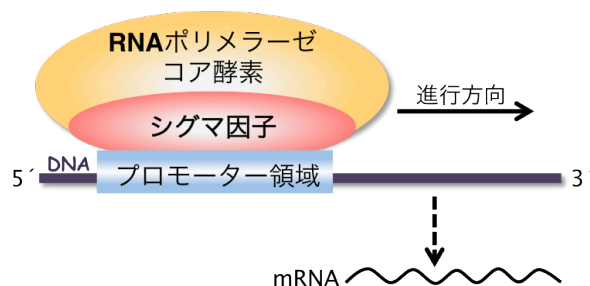


図 1.9 RNA ポリメラーゼによる細菌遺伝子の転写

細菌での mRNA 合成に必要な転写装置を示した。転写にはRNAポリメラーゼコア酵素 (橙色) とシグマ因子 (赤色) が結合した RNA ポリメラーゼホロ酵素が必要である。

表 1.4 細菌の系統学的、生育環境的特徴とシグマ因子

細菌	系統学的特徴	生息場所など	Free-living	ゲノムサイズ	シグマ因子 種数
<i>B. subtilis</i>	低GCグラム陽性細菌	土壌をはじめ環境中に遍在する。	Yes	4.2 Mbp	18
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Spirochaetales</i>	ダニ-動物細胞内に寄生する。	No	1.3 Mbp	3
<i>Buchnera</i> sp.	α -プロテオバクテリア	アブラムシに共生する。	No	640 kbp	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	ϵ -プロテオバクテリア	鶏肉などによる食中毒原因菌。腸炎を引き起こす。	No	1.64 Mbp	3
<i>Caulobacter crescentus</i>	α -プロテオバクテリア	負栄養で生育する水生細菌。	Yes	4.02 Mbp	17
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydiales</i>	マウス病原菌、肺炎を引き起こす。	No	1.04 Mbp	3
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	低GCグラム陽性細菌	土壌など。嫌気性芽胞菌。	Yes	3.94 Mbp	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Thermus/Deinococcus</i> グループ	極限環境細菌。	Yes	2.65 Mbp	2
<i>E. coli</i>	γ -プロテオバクテリア	腸内をはじめ環境中に遍在	Yes	4.6 Mbp	7
<i>Haemophilus influenzae</i>	γ -プロテオバクテリア	日和見菌。呼吸粘膜で生育。	No	1.83 Mbp	4
<i>Helicobacter pylori</i>	ϵ -プロテオバクテリア	胃に消化性潰瘍を引き起こす。	No	1.64 Mbp	3
<i>Lactococcus lactis</i>	低GCグラム陽性細菌	<i>Streptococcus</i> と近縁の乳酸菌。	Yes	2.37 Mbp	3
<i>Mesorhizobium loti</i>	α プロテオバクテリア	マメ科根粒菌。	Yes	7.04 Mbp	23
<i>Mycobacterium leprae</i>	高GCグラム陽性細菌	シユワソ細胞に感染する。ハンセン病の病原菌。	No	3.27 Mbp	4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	高GCグラム陽性細菌	結核の病原菌。	No	4.41 Mbp	13
<i>Mycoplasma genitalium</i>	低GCグラム陽性細菌	動物細胞内に寄生する。	No	580 kbp	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	β -プロテオバクテリア	口腔、鼻腔に定着し、髄膜炎を引き起こす。	No	2.18 Mbp	4
<i>Pasteurella multocida</i>	γ -プロテオバクテリア	人畜共通感染症パスツレラ症の原因菌。	No	2.26 Mbp	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ -プロテオバクテリア	環境中に遍在。	Yes	6.26 Mbp	24
<i>Richkettia prowazekii</i>	α -プロテオバクテリア	細胞内絶対寄生性細菌。	No	1.11 Mbp	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	低GCグラム陽性細菌	黄色ブドウ球菌。鼻腔、温血動物の皮膚。	No	2.81 Mbp	3
<i>Synechocystis</i> sp	<i>Cyanobacteria</i>	光合成細菌。グルコースがあれば従属栄養的に生育。	Yes	3.54 Mbp	8
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Thermotogales</i>	好熱菌。	Yes	1.86 Mbp	4
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Spirochaetales</i>	梅毒の原因菌。	No	1.14 Mbp	5
<i>Vibrio cholerae</i>	γ -プロテオバクテリア	コレラの原因菌。	Yes	4.03 Mbp	8
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	低GCグラム陽性細菌	ヒト前立腺炎を引き起こす。	No	750 kbp	1
<i>Xylella fastidiosa</i>	γ -プロテオバクテリア	ヨコバイ媒介性の植物病原細菌。植物の細胞外で生育。	No	2.68 Mbp	4
<i>Ca. Phytoplasma</i>	低GCグラム陽性細菌	植物細胞-昆虫細胞内に寄生する。	No	850 kbp	2

1.2.2. 細菌の発現制御機構

細胞内では様々な遺伝子が発現し機能しているが、それらの発現量は細胞周期や細胞の置かれた環境によって変化する。細菌においては、ゲノムから遺伝子が転写・翻訳され、タンパク質として機能するまでに、様々な段階でそれらの発現が制御されていることが明らかとなっている。それらの段階を大きく分けると3つに分けられる。それは、(1) DNA から mRNA が合成される転写の段階、(2) mRNA からタンパク質へ翻訳される段階、(3) 翻訳されたタンパク質が修飾、輸送を経て適切に機能するまでの段階である。

中でも (1) DNA から mRNA が合成される転写の段階は、発現制御の最初のステップとして重要であると考えられる。1.2.1.項において述べたシグマ因子は、細菌の転写制御において重要な役割を果たす因子の1つである。一般に細菌が保持する複数種類のシグマ因子は、細胞周期や周辺の環境により発現量が変化する。これにより RNA ポリメラーゼホロ酵素を構成するシグマ因子の種類が変わることで、転写される遺伝子セットが変化する。したがって、周辺環境に応答し、使用するシグマ因子を切り替えることは細菌にとって重要な生存戦略であると考えられる (Kazmierczak *et al.*, 2005)。

1.2.3. 細菌のシグナル伝達と発現制御

1.2.2.項で述べたように、細菌は周辺環境に応じて遺伝子発現を巧みに制御しているが、そのためには周辺環境を感知し、そのシグナルを細胞内に伝えるシステムが必要である。細菌のシグナル伝達系は大きく、リン酸化を介するシグナル伝達系と、必ずしもリン酸化を伴わないシグナル伝達系に分けられる。

リン酸化を介した情報伝達系としては、一成分制御系および二成分制御系が知られている。特に二成分制御系は真性細菌のみならず、古細菌やいくつかの真核生物においても報告されており、主要なシグナル伝達系として広く研究されている (Stock *et al.*, 2000)。このシグナル伝達系は環境シグナルを感知するヒスチジンキナーゼと、感知されたシグナルを細胞内に伝達するレスポンスレギュレーターから成る。これらのセンサーシステムにより、環境変化をリン酸化シグナルに置き換え、ヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーター間においてリン酸化のリレーが起こることで細胞内にシグナルを伝達する。*E. coli* では 30 種類のレスポンスレギュレーターが見つ

かっており、これらが温度変化、pH 変化、浸透圧変化、酸化ストレス、その他様々な化学物質などを感知していると考えられている (Falke *et al.*, 1997)。

もう一方のシグナル伝達系である、必ずしもリン酸化を伴わないシグナル伝達系としては、extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子を介したシグナル伝達系が挙げられる (Mascher, 2013; Staron *et al.*, 2009)。ECF シグマ因子は、環境応答性のシグマ因子の 1 種であり、普段は細胞膜に局在する抗シグマ因子の働きにより不活化されている (Mascher, 2013)。環境シグナル存在下においてこの抗シグマ因子が構造変化を引き起こすことにより、不活化されていた ECF シグマ因子が活性化され、その制御下にある遺伝子の転写を開始させる。例えば、メタノール資化性菌 *Methylobacterium extorquens* の ECF シグマ因子の 1 種である σ^{EdfG1} は、通常条件下では抗シグマ因子 NepR により不活化されている。*M. extorquens* が温度変化や酸化ストレスを受けると、 σ^{EdfG1} は NepR から解離し、 σ^{EdfG1} と RNA ポリメラーゼコア酵素が結合できるようになる (Francez-Charlot *et al.*, 2009)。これによりストレス応答性の遺伝子群の発現が活性化される。

1.3. 病原細菌の感染戦略

1.3.1. 細菌の遺伝子発現と病原性

これまでに述べた通り、細菌は環境に応答し、遺伝子発現を制御している。この制御機構は様々な病原細菌において宿主への病原性を発揮し、感染を成立させるために重要な役割を担っている。これらの遺伝子発現制御系を応用した感染メカニズムや病原性因子の発現制御は様々な病原性細菌において明らかにされている。

例えば、細胞間シグナル伝達機構であるクオラムセンシングはその一つである。クオラムセンシングは、周囲に存在する同種の細菌の密度を感知し、その密度が一定数に達すると特定の遺伝子の転写を抑制あるいは促進する機構である (Von Bodman *et al.*, 2003)。これにより細菌は同種の細菌群の集団行動を制御し、その増殖や生存を有利にすると考えられている。病原細菌の場合、毒素の放出などの病原性因子の発現がクオラムセンシング機構により制御されていることが明らかとなっている (Waters & Bassler, 2005)。植物病原細菌においても、このクオラムセンシング機構が病原性に重要な役割を果たす例が報告されている (Von Bodman *et al.*, 2003)。トウモロコシ萎凋細菌病の病原菌である *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* は、植物細胞の細胞間隙

や木部で増殖し、葉に水浸状の病斑を形成する。この病斑形成には、エフェクターや、エフェクター分泌装置などの病原性因子をコードする *hrp* 遺伝子群の発現が必要である (Frederick *et al.*, 2001)。クオラムセンシングシステムで機能する *esaI* を欠失させた *P. stewartii* 変異体では、*hrp* 遺伝子群の発現量が減少し、病原性が低下することが明らかとなっている (Von Bodman *et al.*, 2003)。同様の現象は野菜類軟腐病を引き起こす *Pectobacterium carotovora* においても報告されている (Whitehead *et al.*, 2002)。

また、1.2.3 項で述べた ECF シグマ因子も宿主への感染に重要な役割を果たしていることが報告されている。植物病原細菌の例ではないが、ダイズの根に根粒を形成して共生するダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) が持つ ECF シグマ因子の 1 種である EcfS は、正常な根粒形成に必要な因子であることが明らかとなっており、*ecfS* を欠損させた *B. japonicum* 変異株では、野生株と比較して様々なトランスポーター遺伝子を含む多くの遺伝子発現パターンが変化することが明らかとなっている (Stockwell *et al.*, 2012)。このことから、EcfS は何らかのシグナルを感知することで非共生状態から共生状態と遺伝子発現パターンをシフトさせ、植物への感染を成立させるために必要な因子として機能することが示唆されている。

その他にも近年、細菌の non-coding RNA を介した遺伝子発現制御による病原性誘導機構が明らかにされている (Caldelari *et al.*, 2013)。Schmidtke らはトマトやトウガラシに斑点細菌病を引き起こす植物病原細菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* のゲノムから発現する non-coding RNA である sX13 が、*X. campestris* の病原性に関与するエフェクターや、エフェクター分泌装置をコードする遺伝子の発現量に影響することを明らかにした (Schmidtke *et al.*, 2013)。

1.3.2. 細胞内寄生性細菌の感染戦略

細胞内寄生性細菌の宿主となる細胞の内部環境は、基本的に恒常的に保たれている。そのため細胞内寄生性細菌では、遺伝子発現パターンを変化させるような転写因子は退行的進化により、その多くが欠失していると考えられている。実際に、ファイトプラズマを含む *Mollicutes* 綱に属する細菌は 1 から 2 種類のシグマ因子のみを有している。その他にも、アブラムシの共生細菌である *Buchnera aphidicola* や、発疹チフスの病原菌である *Rickettsia prowazekii* が有するシグマ因子は 2 種類である (表 1.4) (Mittenhuber, 2002)。これらのことから、細胞内寄生性細菌の遺

伝子発現パターンは単純で簡素な仕組みであると考えられがちである。しかし、*Mycoplasma pneumoniae* を用いて行われたトランスクリプトーム解析では、様々な条件下で多くの遺伝子発現パターンが変化し、中にはアンチセンス RNA や小分子 RNA などの non-coding RNA も多く転写されていることが明らかとなっている (Güell *et al.*, 2009)。細胞内寄生性細菌における non-coding RNA の存在が病原性に影響するのかについては今後の解析が待たれるが、多くの遺伝子が欠失するような退行的進化を遂げた細菌が、数少ない遺伝子セットによって様々な環境に適応し、宿主への感染を成立させる仕組みについて興味を持たれている。

同じく細胞内寄生性であり、ダニなどの節足動物と動物細胞に交互に感染し、ヒトにライム病を引き起こす病原細菌 *Borrelia burgdorferi* では、それぞれの宿主において発現量が変化する遺伝子が明らかにされている。中でも、細胞膜表面に露出している膜タンパク質 outer surface protein A (OspA) および outer surface protein C (OspC) をコードする遺伝子は、ダニとマウス間の宿主転換において重要な役割を果たす可能性のある因子として着目されている (Samuels, 2011)。ospA はダニ感染時に発現量が増加し、マウス感染時には減少するのに対し、ospC は全く逆の発現パターンを示す。また OspA は、ダニ細胞内への定着や、中腸上皮への接着に必要な因子であることが明らかにされている (Pal *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004)。OspC は各宿主での特異的な機能は明らかにされていないが、ダニの唾液に含まれるタンパク質 Salp15 や、動物細胞に含まれるタンパク質分解酵素の前駆体プラスミノーゲンと結合することが明らかにされており、ダニから動物への伝搬に重要な因子であることが示唆されている (Ramamoorthi *et al.*, 2005; Lagal *et al.*, 2006)。これらの遺伝子発現パターンの変化がどのような環境シグナルにより引き起こされているのかについて決定的な証拠は得られていないものの、*Borrelia* 属細菌では pH、温度、浸透圧などの変化を原因として遺伝子発現パターンが変化することが明らかにされている (Samuels, 2011)。

1.3.3. ファイトプラズマの感染戦略

ファイトプラズマにはこれまでに報告されているような一成分制御系または二成分制御系のホモログ遺伝子は見つかっていない。また、ファイトプラズマは ECF シグマ因子と構造的に類似するシグマ因子を保持するものの、抗シグマ因子と考えられる因子はこれまで見つかっていない。したがってファイトプラズマのシグナル伝達機構については全く不明である。一方で膜に局

在するタンパク質や、菌体内から菌体外へ分泌される分泌タンパク質が環境認識や宿主への感染に非常に重要な役割を果たしている可能性は高いと考えられる。なぜならファイトプラズマはペプチドグリカンなどの細胞壁を持たず、宿主の細胞内に局在するという特性を持つことから、これらのタンパク質が宿主因子と直接的に相互作用する可能性が高いと考えられるためである。これまでにファイトプラズマの膜タンパク質や分泌タンパク質と宿主因子との相互作用についていくつかの知見が得られている。

ファイトプラズマの菌体表面に露出する主要な膜タンパク質は、immunodominant membrane protein (Imp)、immunodominant membrane protein A (IdpA)、antigenic membrane protein (Amp) の3種類に分類される (Berg *et al.*, 1999; Blomquist *et al.*, 2001; Barbara *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2003)。このうち OY ファイトプラズマの膜局在性タンパク質 Amp は媒介能をもつ昆虫のマイクロフィラメントとのみ結合することが明らかにされており、昆虫伝搬に重要な因子であると考えられている (Suzuki *et al.*, 2006)。また、P. mali の Imp は植物のアクチンと結合することが知られ、植物体内でのファイトプラズマの移行性に影響する可能性が示唆されている (Boonrod *et al.*, 2012)。

ファイトプラズマのトランスポーターには Sec システム、イオンチャネル、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの3種類が知られている (図 1.10)。Sec システムは、ファイトプラズマ自身のタンパク質を菌体外、すなわち宿主の細胞質へと分泌するシステムである。ファイトプラズマのゲノムには菌体外への分泌シグナルドメインを持つ遺伝子が多数コードされており、これらの遺伝子はタンパク質への翻訳された後 Sec システムへと移行し、Sec システムを通過してファイトプラズマ菌体外に分泌される (図 1.11)。イオンチャネルは、膜電位の変化、リガンドの結合、その他機械的な変形や力が加わることによりチャネルの開閉が行われ、膜電位を維持または変化させる。ABC 輸送体は、ATP のエネルギーを用いて物質の輸送を行う ATPase の1種で、糖やオリゴペプチド、薬剤などの輸送体が存在する。ファイトプラズマにとり、これらの膜輸送体は宿主との直接的な物質のやり取りを行うインターフェースであることから、宿主への感染を成立させるための欠かせない因子であると考えられる。

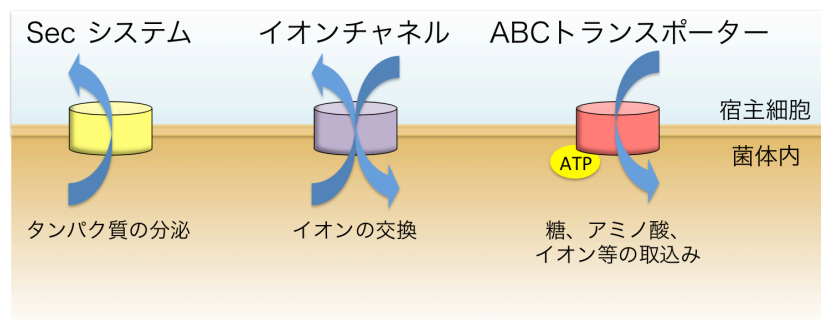


図 1.10 ファイトプラズマの輸送系

ファイトプラズマに存在する 3 種類の輸送系を示す。左からそれぞれ、菌体外へのタンパク質の分泌を担う Sec システム (黄色)、各種イオンの交換を行うイオンチャネル (紫色)、ATP 依存的に物質の取込みを行う ABC トランスポーター (赤色) を示す。

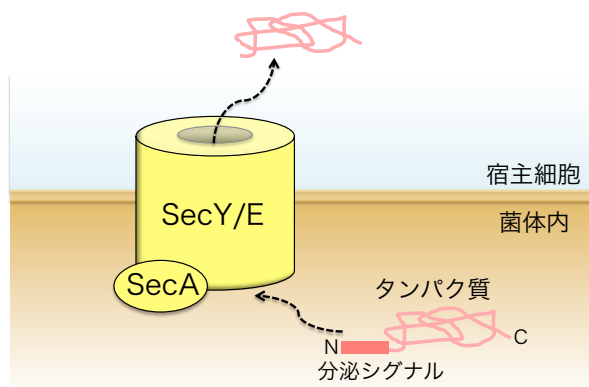


図 1.11 ファイトプラズマの Sec システムによるタンパク質の分泌

Sec システムは SecA、SecY、SecE の 3 つのタンパク質の複合体として機能し、分泌タンパク質をシグナルペプチドの切断に伴って細胞外へと分泌する。

ファイトプラズマのゲノムには菌体外への分泌シグナルドメインを持つ遺伝子が多数コードされている (Hoshi *et al.*, 2009)。これらの分泌タンパク質は、ファイトプラズマの細胞膜を通して物質の輸送を行う Sec システムを介して菌体外へ分泌される。ファイトプラズマは宿主細胞内に局在することから、菌体外に分泌されたタンパク質は宿主細胞内の因子と直接的に相互作用することが予想される。このことから、ファイトプラズマゲノムにコードされる分泌シグナルドメインを持つタンパク質は、宿主に病気を引き起こす病原性因子の最有力候補と考えられ、解析が進められている。これまでに OY ファイトプラズマでは分泌シグナルを持つタンパク質が 27 個推定されている (Hoshi *et al.*, 2009)。これらのほとんどは機能不明なタンパク質であるが、その中の 1 つである TENGU は植物に萎縮・叢生を引き起こす病原性因子として同定されている (Hoshi *et al.*, 2009)。また、AY-WB ファイトプラズマの叢生因子として同定された分泌タンパク質 SAP11 は核に局在し、宿主の転写因子と結合することにより、虫などの傷害応答として活性化されるジャスモン酸経路を抑制することが知られている (Sugio *et al.*, 2011)。さらに、AY-WB ファイトプラズマでは 2011 年に、OY ファイトプラズマでは 2014 年に、宿主植物の花を葉化させる原因となる因子「*phyllogen*」が同定された (MacLean *et al.*, 2011; Maejima *et al.*, 2014)。これらの他にもファイトプラズマゲノムには分泌シグナルドメインを持つ遺伝子が多数コードされているが、それらの多くは機能が明らかでない。

以上のように、これまで個々のファイトプラズマ遺伝子の発現や機能についていくつかの解析が進められ、植物宿主または昆虫宿主特異的に機能していることが示唆される因子が見つかった。したがってファイトプラズマは、周辺環境を認識し、全く異なる生物の細胞内環境に適応するためのメカニズムを有している可能性が考えられる。宿主転換メカニズムを解明し、それぞれの宿主細胞に感染するために重要な遺伝子を特定することは、ファイトプラズマの感染戦略を明らかにする上で重要であるのみならず、ファイトプラズマ病の防除法を確立するための有効な知見となり得る。しかしファイトプラズマは人工培養に成功しておらず、形質転換系も確立していないことから、これまでに宿主転換メカニズムに着目した研究例は非常に乏しかった。そこで宿主転換メカニズムを解明する一助とするため、植物および昆虫感染時におけるファイトプラズマ遺伝子の網羅的発現解析を行った。さらに、ファイトプラズマの感染成立に重要であると考えられる二つの遺伝子に着目し、その活性と機能について検証を行った。

第2章 ファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現の網羅的解析

2.1. 序文

2.1.1. 網羅的遺伝子発現解析法

近年ポストゲノム研究の柱として、全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析が盛んに行われている。特に細胞内の mRNA 量を網羅的に測定するトランスクリプトーム解析は、分子生物学研究において広く用いられるようになった。細胞内における mRNA の量は、その後に翻訳され機能するタンパク質量をほぼ規定すると考えられることから、トランスクリプトーム解析は生命現象の総合的解明に有効な手段であると考えられている。現在、トランスクリプトーム解析の手法としてはマイクロアレイ法および RNA シークエンシング法の 2 種類が主流となっている。マイクロアレイ法では、表面を特殊加工したスライドガラスなどの基盤上に多数の DNA プローブを固定し、そこに標識した核酸をハイブリダイズさせる。その後、各々のプローブからのシグナルを検出器で検出し、マイクロアレイ解析用のソフトウェアを用いて解析する。この方法では、2 つの異なるサンプルから調整した mRNA を異なる蛍光で標識し、1 つのマイクロアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションを行うことにより、2 種類のサンプルの遺伝子発現の差を検出することができる。これを二色蛍光標識法と言い、相対的な遺伝子発現の変化を見る系において極めて有効な方法である。一方の RNA シークエンシング法では、精製した mRNA を数百塩基程度に断片化し、各断片の両末端にアダプター配列を付加する。このアダプター配列を起点として、全ての核酸の塩基配列を次世代シーケンサーにより解読する。解読した配列を既知のゲノム上にマッピングし、リード数を定量することにより遺伝子発現量を解析することができる。どちらの遺伝子発現解析法も優れた解析法であるが、それぞれの長所および短所を理解した上で解析法を選択する必要がある。例えばマイクロアレイ法では、対象とする生物のゲノム情報が既知であれば、比較的簡便に解析を行うことができる。代表的なモデル生物では既にマイクロアレイが市販されており、データ解析ツールが充実している。しかし、プローブの設計を必要とするため、あらかじめ解析対象の塩基配列情報が必要とされること、またプローブが設計されていない遺伝子については解析できないことが短所として挙げられる。その点 RNA シークエンシング法は、ゲノム情報が未知の場合でも解析を行うことが可能である。しかし大量に得られたデータを解析

するツールが不十分なことから、データの扱いが難しい点や、ランニングコストがマイクロアレイ解析よりも比較的高価であることが短所として挙げられる。

ファイトプラズマは、宿主細胞内に寄生する難培養性細菌であることが大きな特徴の一つである。このことからファイトプラズマの mRNA のみを精製することは不可能であり、宿主に由来する RNA とファイトプラズマの mRNA が混合した状態で解析を行わなければならない。一般に RNA シークエンシング解析において、リボソーム RNA など多量に存在する RNA は発現量の少ない遺伝子の検出の妨げになると言われている。ファイトプラズマ由来の RNA 量は、宿主に由来する RNA 量と比較して非常に少ないことが想定されたことから、本章におけるファイトプラズマ遺伝子の網羅的遺伝子発現解析では、マイクロアレイ法を採用し、全ゲノム配列が解読されている OY ファイトプラズマ (Oshima *et al.*, 2004) を対象とすることとした。

2.1.2. 宿主転換する微生物とその遺伝子発現

病原微生物の中にはファイトプラズマと同様に 2 つの異なる宿主に寄生するものがある。例えば、マラリアの病原体であるマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) はハマダラカと、ヒトを含む脊椎動物の双方に感染する。ライム病の病原体である *B. burgdorferi* や、発疹チフスの病原体である *Rickettsia prowazekii* は、ダニなどの節足動物と、ヒトを含む動物細胞に交互に感染する。この他にも動植物を問わず重要な病原微生物において 2 つの異なる宿主に寄生する、すなわち宿主転換することによってライフサイクルを成り立たせる微生物が知られている。このような寄生性微生物は媒介者によって広いエリアに急速に伝搬されるため、世界中で問題となっている。ファイトプラズマもまた、植物と昆虫の間を宿主転換することによりライフサイクルを成立させ、感染を拡大する細胞内絶対寄生性細菌である。ファイトプラズマの宿主転換における最大の特徴は、分類学上「界」レベルで異なる生物である植物と昆虫へ感染し、増殖することである。植物細胞と昆虫細胞では細胞内環境や、病原菌の感染時に誘導される防御機構が大きく異なっていると考えられ、それらの相違に応じてファイトプラズマは大きく異なる感染戦略をとっていると考えられる。

多くの病原細菌は、自身の置かれた環境に応じ適切な遺伝子を発現させることで、宿主への感染を成立させ、病原性を発揮する (Kazmierczak *et al.*, 2005)。例えばダニとマウスとの間を交互に感染する *B. burgdorferi* は、宿主転換に伴い少なくとも 3 種類の膜タンパク質の発現が変化

することが知られており、この現象はそれぞれの宿主への感染に重要であるといわれている (Caimano *et al.*, 2007; Lybecker & Samuels, 2007; Samuels, 2011)。ファイトプラズマにおいてもいくつかの遺伝子について植物感染時と昆虫感染時とで発現量が変化していることが報告されている (Hoshi *et al.*, 2009; Toruño & Hogenhout, 2010)。例えば植物に萎縮や叢生を引き起こす病原性因子である TENGU 遺伝子は、昆虫感染時と比較して植物感染時に 5 倍発現が高いことがリアルタイム RT-PCR によって確認されている (Hoshi *et al.*, 2009)。また、ファイトプラズマのゲノムには PMU とよばれるファージ様の重複遺伝子群が存在し (Bai *et al.*, 2006; Arashida *et al.*, 2008)、OY ファイトプラズマと同じ AY グループに属する AY-WB では、この PMU に含まれる遺伝子の発現が昆虫感染時において高い傾向にあることが報告されている (Dickinson, 2010; Toruño *et al.*, 2010)。これらの結果から、TENGU や、PMU に由来する遺伝子産物は、ファイトプラズマがそれぞれの宿主へ感染するために重要な因子である可能性が示唆される。このようにファイトプラズマのゲノムには、それぞれの宿主細胞へ感染を成立させるための遺伝子セットが存在し、宿主転換に伴う環境の変化に応じて遺伝子の発現パターンを巧みに制御していると推察される。

以上のようにファイトプラズマは、多くの遺伝子を欠失した非常に小さなゲノムサイズの細菌でありながら、植物と昆虫という全く異なる宿主に交互に寄生する宿主転換というメカニズムを有し、感染を拡大させる。ファイトプラズマの宿主転換において鍵となる遺伝子を特定することは、ファイトプラズマの宿主転換メカニズムを解明し、その感染を制御するために重要であると考えられる。しかしファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現調節についてはほとんど明らかにされていない。そこで本章では、ファイトプラズマが植物と昆虫との間を宿主転換するために、どのような遺伝子を使い分けているのかを網羅的に解析することを目的とした。そのために、マイクロアレイ法によりそれぞれの宿主におけるファイトプラズマ遺伝子の発現変動を解析した。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫

本研究では、OY ファイトプラズマを供試ファイトプラズマとして使用した。OY ファイトプラズマは 1982 年に本邦においてタマネギから分離されたファイトプラズマで、感染植物では軽微な叢生症状が見られる (Kuboyama *et al.*, 1998; 塩見ら、1998; Oshima *et al.*, 2001b)。OY ファイトプラズマは媒介虫であるヒメフタテンヨコバイ (*Macrostelus striifrons*) (図 2.1) を介して宿主植物シュンギク (*Chrysanthemum coronarium*) (図 2.2) に接種した。接種は次のようにして行った。播種から 3 週間後の健全シュンギク 1 株をネット張りの円筒状のプラスチック筒で覆い、筒内に OY ファイトプラズマ保毒虫を 15 頭入れた。これを明期 16 時間、暗期 8 時間、25℃ の定常温室条件下で 3~4 週間維持し、接種吸汁させた。



Oshima *et al.*, 2011 より一部改変

図 2.1 OY ファイトプラズマ媒介昆虫

本研究で用いた OY ファイトプラズマ媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイ。体長は 1.5~2.0 mm。



Oshima *et al.*, 2001b より一部改変

図 2.2 健全シュンギク (左) および OY ファイトプラズマ感染シュンギク (右)

OY ファイトプラズマシュンギクでは叢生症状が認められる。

2.2.2. RNA 抽出

健全または OY ファイトプラズマ感染植物および昆虫から RNA を抽出した。植物サンプルは、ファイトプラズマ保毒昆虫による吸汁を始めてから約 1 ヶ月後の、よく病徴の出ている株から葉を採取した。サンプルは 1 個体から採取し、抽出した RNA を 1 反復とし、6 反復分用意した。また昆虫サンプルは、ファイトプラズマ感染植物を吸汁させてから 30 日後の昆虫を使用した。サンプルは感染植物 1 個体に由来する保毒昆虫約 30 匹を 1 反復とし、植物サンプルと同様に 6 反復分用意した。具体的な方法は以下に示す。

1. およそ 0.1 g の試料植物および昆虫に液体窒素を加え、乳鉢を用いて粉末状になるまで摩砕した。
2. 1 ml の ISOGEN 試薬（ニッポンジーン）を加え、溶液を 1.5 ml チューブに移した。
3. 12,000×g、4°C で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。
4. 200 µl のクロロホルムを添加し、よく攪拌した。
5. 12,000×g、4°C で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。
6. 500 µl のエタノールを添加し、転倒混和した。
7. -20°C に 30 分間静置した後、12,000×g、4°C で 15 分間遠心した。
8. 1 ml の 70%エタノールを加えて転倒混和した。
9. 12,000×g、4°C で 5 分間遠心し、沈澱を洗浄した。
10. 8-9 の洗浄行程をもう一度繰り返した。
11. 沈澱を滅菌水に溶解し、RNA サンプルとした。
12. RNA サンプルの純度および濃度を分光光度計で確認した。

2.2.3. DNase I 処理

抽出した RNA サンプル中に残存する DNA を除去するため、DNase I 処理を行った。

1. 以下の組成で試薬を混合し、37°C で 1 時間反応させた。

DNase I (RNase-free) (TaKaRa)	2.0 µl (10 U)
10 × DNase I 用 Buffer (TaKaRa)	2.0 µl

RNase inhibitor (TaKaRa)	0.5 μ l
RNA (10 μ g)	-
DW	up to 50.0 μ l
Total volume	50.0 μ l

- 150 μ l の滅菌水、100 μ l の酸性フェノール、100 μ l のクロロホルムを加えてよく攪拌した。
- 12,000 \times g、4°C で 10 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。
- 200 μ l のクロロホルムを加えてよく混合した。
- 12,000 \times g、4°C で 10 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに回収した。
- 2.2.2.項手順 6 から 10 に従い、エタノール沈澱を行った。
- 沈澱を適量の水で溶解し、再度 RNA の純度および濃度を分光光度計で確認した。

2.2.4. マイクロアレイ解析

2.2.2.および 2.2.3.項に従い、OY ファイトプラズマ感染植物 1 個体および感染昆虫 5 頭の組み合わせを 1 組として計 6 組の RNA サンプルを用意した。それらの RNA サンプルについて以下の手順でマイクロアレイ解析を行った。

- 10 μ g の RNA を鋳型として、300 pmol のランダムプライマーにより逆転写反応を行い、OY ファイトプラズマ感染植物には Cy3-dUTP、OY ファイトプラズマ感染昆虫には Cy5-dUTP を取り込ませ、標識した。
- IntelliGene chip (TaKaRa) によって作成した DNA チップを使用し、Cy3 および Cy5 で標識した cDNA をハイブリダイゼーション溶液 (6 \times SSC、0.2% SDS、5 \times Denhardt's 溶液、carrier DNA) 中で 65°C、14 時間反応させた。
- DNA チップを洗浄液 1 (2 \times SSC、0.2%SDS) で 55°C、10 分間洗浄した。この洗浄は 3 回繰り返した。さらに DNA チップを洗浄液 2 (0.05 \times SSC) 中で軽く洗浄した。
- Affymetrix 428 Array Scanner (Affymetrix) を用いて Cy3 および Cy5 それぞれの波長のシグナルを 2 段階の検出感度で測定した。
- BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2 (BioDiscovery) を用いてマイクロアレイデータの解析を行った。

2.2.5. リアルタイム RT-PCR 解析

2.2.2.および 2.2.3.項に従い抽出した OY ファイトプラズマ感染植物および昆虫の RNA サンプルを用い、以下の手順で OY ファイトプラズマ遺伝子のリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

1. 500 ng の RNA を鋳型とし、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行った。反応組成および反応条件は以下の通りである。

MultiScribe RT enzyme	0.5 μ l (25 U)		
10 \times RT Buffer	1.0 μ l		
25 \times dNTPs (100mM)	0.4 μ l	25°C	10:00
10 \times Random primers	1.0 μ l	37°C	2:00:00
Template RNA (500 ng)	-	4°C	∞
DW	up to 10.0 μ l		
Total volume	10.0 μ l		

2. 逆転写した cDNA を段階的な濃度に調整し、それらを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。用いたプライマーセットは表 2.1 に示す。反応組成および反応条件は以下の通りである。これにより検量線を作製した。

SYBR Green (TaKaRa)	10.0 μ l			
Primer Forward (5 μ M)	1.2 μ l	95°C	2:00	
Primer Reverse (5 μ M)	1.2 μ l	95°C	0:15	} \times 40 サイクル
Template cDNA	1.0 μ l	60°C	1:00	
DW	6.6 μ l	4°C	∞	
Total volume	20.0 μ l			

3. 続いて、各種サンプルを用いてリアルタイム RT-PCR を行った。反応条件および反応組成は上記の通りである。解析はそれぞれ 3 反復行った。内部標準として、翻訳伸長因子遺伝子 *tufB* の配列を用いた。

4. リアルタイム RT-PCR の結果をもとに相対定量比較を行った。まず、内部標準遺伝子として用いた *tufB* 遺伝子の結果を用いて、各サンプル間の遺伝子発現量を正規化した。続いて、その相対発現量の比率（植物／昆虫）を求めた。

表 2.1 リアルタイム RT-PCR 解析に用いたプライマー

プライマー	配列	目的
PAM028_F	5'-AGA AGA TGT TAA AGT TGC TTT GG-3'	PAM028のリアルタイムRT-PCR
PAM028_R	5'-AAA TCC TTG AAA TCT TTC TTT ACG-3'	PAM028のリアルタイムRT-PCR
PAM092_F	5'-GGT GAT GTG GCA GAA GAA GAA C-3'	PAM092のリアルタイムRT-PCR
PAM092_R	5'-GTG CGG ATC AAT TCC TAC TCC-3'	PAM092のリアルタイムRT-PCR
PAM096_F	5'-AGG GGT TTC TGA TCG AGA TAT TCA C-3'	PAM096のリアルタイムRT-PCR
PAM096_R	5'-GCC TTG CAA AGA AGC TGA TAT TAC C-3'	PAM096のリアルタイムRT-PCR
PAM122_F	5'-TGT TGC TTT AAT GTT TGT TGG CG-3'	PAM122のリアルタイムRT-PCR
PAM122_R	5'-AGC AGC AGT AAG TTC AAG AGC GTC-3'	PAM122のリアルタイムRT-PCR
PAM242_F	5'-TTT GGC ACC TTT GAA GTA AAA CAC-3'	PAM242のリアルタイムRT-PCR
PAM242_R	5'-TGA AAG TAG GAA CCT TTT TAG CTG G-3'	PAM242のリアルタイムRT-PCR
PAM266_F	5'-GTG TTG TCT TTA TGC AGC ATT TGG-3'	PAM266のリアルタイムRT-PCR
PAM266_R	5'-TTC GGT GTA ATC AAA ATG AAG TGC-3'	PAM266のリアルタイムRT-PCR
PAM271_R	5'-TAG AAG AAG AAT CTC CTC AAG GGT C-3'	PAM271のリアルタイムRT-PCR
PAM271_R	5'-GCT GGG TTT GGG TTT TGT G-3'	PAM271のリアルタイムRT-PCR
PAM289_R	5'-TTT GAA AGT GCA CCA AAT GAC-3'	PAM289のリアルタイムRT-PCR
PAM289_R	5'-AAA TCG TCT CCA ATA GAA AGA CC-3'	PAM289のリアルタイムRT-PCR
PAM485_F	5'-GTG CAA GAA GCT TTA GAC CAA TTG-3'	PAM485のリアルタイムRT-PCR
PAM485_R	5'-CAC CTG AAG GAG TTA AAG GAT TTT G-3'	PAM485のリアルタイムRT-PCR
PAM486_R	5'-CAC AAT CAC AAG GAC CAA AAT TAG AG-3'	PAM486のリアルタイムRT-PCR
PAM486_R	5'-GTA AGC CAC GCA AGA ACA TGA TAA-3	PAM486のリアルタイムRT-PCR
PAM600_F	5'-TTA TGC TTG TGG AAT TCC TGG C-3'	PAM600のリアルタイムRT-PCR
PAM600_R	5'-TTC GTT AAA GGC TTC TTG GGC-3'	PAM600のリアルタイムRT-PCR
PAM606_F	5'-GCA ACC AGG ACA AGT TAT TAA AGT G-3'	PAM606のリアルタイムRT-PCR
PAM606_R	5'-CAG TTT GGC GAA AAC TAT CTA CAT C-3'	PAM606のリアルタイムRT-PCR
PAM726_R	5'-CGT CTC AGC CAT GAT TTA GAA AAA C-3'	PAM726のリアルタイムRT-PCR
PAM726_R	5'-CAC ATG GAA TGA ATT GGG TTA TCT C-3'	PAM726のリアルタイムRT-PCR
PAM733_F	5'-TCT ATA TTT GCA TTC TCA CAA TTG C-3'	PAM733のリアルタイムRT-PCR
PAM733_R	5'-GAT AGC CGA TTA AAA ATA AAA GTG C-3'	PAM733のリアルタイムRT-PCR
PAM745_F	5'-GAG CTA CTG TAA GGC GCA TCG-3'	PAM745のリアルタイムRT-PCR
PAM745_R	5'-TGG GCG TAT AGA CAT GAT GAT AAT C-3'	PAM745のリアルタイムRT-PCR
tufB_F	5'-GAA CAC ATT TTA TTA GCG CGC C-3'	内部標準用 <i>tufB</i> のリアルタイムRT-PCR
tufB_R	5'-TGT CGT CTC CTG GGA AAT CG-3'	内部標準用 <i>tufB</i> のリアルタイムRT-PCR

2.3. 結果

2.3.1. 宿主転換に伴うファイトプラズマ遺伝子のマイクロアレイ解析

植物と昆虫という全く異なる細胞内に宿主転換しながら生活環を成り立たせるファイトプラズマが、植物-昆虫間宿主転換に伴いどれだけの遺伝子発現を変化させているのかを網羅的に解析するため、OY ファイトプラズマに感染した植物および昆虫から RNA を抽出し、二色蛍光標識法によるマイクロアレイ解析を行った。二色蛍光標識法は、同一スポット上で競合するハイブリダイゼーションシグナルを検出するため、相対的な変化を見るのに極めて有効である。解析にはファイトプラズマ遺伝子のうちおよそ 70%を網羅する 518 個のプローブを用いた。実験は 6 反復行い、感染植物-感染昆虫間でファイトプラズマの遺伝子発現を比較した。その結果、2 倍以上発現量に変化していた遺伝子は OY ファイトプラズマゲノムの約 33%に相当する計 248 遺伝子存在した。発現が変化していた 248 遺伝子のうち 135 遺伝子は植物宿主で、113 遺伝子は昆虫宿主で多く発現していた (表 2.2)。これらの遺伝子における植物-昆虫間の発現量差について t 検定を行ったところ、 p 値が 0.05 より小さいものは 46 遺伝子存在した。また発現が変動した 248 遺伝子のうち、植物感染時のみに発現が認められた遺伝子は 22 個、昆虫感染時のみに発現が認められた遺伝子は 7 個存在した。

表 2.2 2 倍以上発現が変動した遺伝子

PAM_No.	遺伝子	遺伝子産物	発現比 log2 (植物/昆虫)	p値
PAM003		Hypothetical protein	3.096	0.2144
PAM005	<i>pgpB</i>	Membrane-associated phospholipid phosphatase	†	–
PAM006		Hypothetical protein	2.865	–
PAM010	<i>ssb</i>	Single-stranded DNA-binding protein	–1.9	0.1667
PAM011	<i>rpsR</i>	Ribosomal protein S18	2.61	0.05333
PAM014	<i>prfA</i>	Protein chain release factor A	1.111	0.3989
PAM017		Predicted GTPases	–2.579	–
PAM019		Hypothetical protein	†	–
PAM022	<i>dppB</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components	1.534	–
PAM024	<i>argE</i>	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases	†	–
PAM025	<i>dppD</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	–1.956	–
PAM027	<i>degQ</i>	Trypsin-like serine proteases, typically periplasmic, contain C-terminal PDZ domain	1.21	0.4902
PAM028	<i>ibpA</i>	Molecular chaperone (small heat shock protein)	1.501	0.02087
PAM029		Hypothetical protein	1.768	0.0005001
PAM030	<i>mgtA1</i>	Cation transport ATPases	1.033	0.1344
PAM031	<i>P031</i>	Hypothetical protein	2.939	–
PAM033		Hypothetical protein	††	–
PAM037	<i>smc</i>	Chromosome segregation ATPases	†	–
PAM046		Hypothetical protein	1.601	0.06741
PAM054	<i>nrdA</i>	Ribonucleotide reductase alpha subunit	–1.339	0.161
PAM056		Hypothetical protein	–1.748	–
PAM058	<i>mscL</i>	Large-conductance mechanosensitive channel	2.374	0.01549
PAM059	<i>mdlB</i>	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system, ATPase component	3.07	0.09089
PAM060		Hypothetical protein	3.418	–
PAM061		Hypothetical protein	1.659	–
PAM064	<i>hflB1</i>	ATP-dependent Zn proteases	1.592	–
PAM065	<i>P065</i>	Hypothetical protein	2.497	0.0998
PAM070		Hypothetical protein	6.719	0.1928
PAM073		Hypothetical protein	1.665	0.02286
PAM077	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	†	–
PAM081	<i>rpsT</i>	Ribosomal protein S20	1.131	0.2673
PAM084		Hypothetical protein	1.566	0.1447
PAM085		Uncharacterized enzyme related to sulfotransferases	–2.729	–
PAM088	<i>rpmA</i>	Ribosomal protein L27	1.623	0.03485
PAM090	<i>gepA</i>	Uncharacterized phage-associated protein	†	–
PAM091	<i>P091</i>	Hypothetical protein	–1.406	0.3707
PAM092	<i>znuA</i>	ABC-type Mn/Zn transport system, periplasmic Mn/Zn-binding (lipo)protein (surface adhesin A)	–1.574	0.1713
PAM093	<i>znuC</i>	ABC-type Mn/Zn transport systems, ATPase component	–1.201	0.1973

表 2.2 続き

PAM094	<i>znuB</i>	ABC-type Mn2+/Zn2+ transport systems, permease components	-1.764	0.08479
PAM097	<i>nlpA</i>	ABC-type uncharacterized transport systems, periplasmic component	-1.057	0.1513
PAM098		Hypothetical protein	1.192	0.05914
PAM099		Hypothetical protein	†	-
PAM101		Predicted HD-superfamily hydrolase	1.64	0.2788
PAM102	<i>pcnB</i>	tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase	1.813	0.314
PAM108		Hypothetical protein	-1.023	-
PAM109		Hypothetical protein	1.51	0.4493
PAM110		Hypothetical protein	†	-
PAM112		Hypothetical protein	†	-
PAM113		Hypothetical protein	2.15	-
PAM116		Hypothetical protein	4.49	-
PAM118		Hypothetical protein	2.509	-
PAM123		Predicted amidohydrolase	1.793	0.05243
PAM129	<i>mesJ</i>	Predicted ATPase of the PP-loop superfamily implicated in cell cycle control	-1.397	0.2001
PAM132	<i>abc</i>	Uncharacterized ABC-type transport system ATPase component	2.574	0.3259
PAM133	<i>nlpA</i>	ABC-type uncharacterized transport systems, periplasmic component	2.645	0.4676
PAM134		Permease component of an uncharacterized ABC transporter	†	-
PAM137		Hypothetical protein	-1.793	0.1391
PAM140	<i>glnS</i>	Glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases	-1.578	0.4834
PAM142	<i>udk</i>	Uridine kinase	1.803	-
PAM145	<i>ppa</i>	Inorganic pyrophosphatase	1.643	-
PAM146	<i>smpB</i>	tmRNA-binding protein	2.784	0.2518
PAM147		Hypothetical protein	-1.619	0.01303
PAM151	<i>rbfA</i>	Ribosome-binding factor A	1.122	0.001074
PAM157		Hypothetical protein	-1.467	0.05757
PAM162		Hypothetical protein	-1.117	0.2902
PAM164	<i>dut</i>	dUTPase	-1.211	0.3271
PAM165	<i>rpsB</i>	Ribosomal protein S2	-1.293	0.2086
PAM166	<i>tsf</i>	Translation elongation factor Ts	-1.367	0.349
PAM167	<i>pyrH</i>	Uridylate kinase	-1.592	0.4157
PAM168	<i>frr</i>	Ribosome recycling factor	-2.424	0.04388
PAM177		Hypothetical protein	†	-
PAM180	<i>cbiQ</i>	ABC-type cobalt transport system, permease component CbiQ and related transporters	1.851	0.538
PAM181	<i>glyA</i>	Glycine hydroxymethyltransferase	-2.119	0.4378
PAM182		Predicted GTPases	1.786	0.05169
PAM183		Predicted GTPase	1.336	-
PAM186	<i>mgtA2</i>	Cation transport ATPases	1.115	0.4108
PAM189	<i>oppC</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components	1.377	0.1192
PAM193		ATPase components of various ABC-type transport systems, contain duplicated ATPase	††	-

表 2.2 続き

PAM194	Hypothetical protein	1.398	0.1837
PAM195	Hypothetical protein	1.717	0.0006177
PAM197	Hypothetical protein	-1.925	0.1231
PAM198	Ribosomal protein L32	1.112	0.03055
PAM200	<i>rpmF</i> Ribosomal protein L3	-2.005	0.3123
PAM201	<i>rpIC</i> Ribosomal protein L4	-3.019	0.2044
PAM202	<i>rpID</i> Ribosomal protein L23	-2.257	0.3035
PAM203	<i>rpIW</i> Ribosomal protein L2	-2.17	0.2286
PAM205	<i>rpIB</i> Ribosomal protein L22	-2.507	0.3802
PAM206	<i>rpIV</i> Ribosomal protein S3	-1.836	0.3526
PAM209	<i>rpcC</i> Ribosomal protein S17	-1.5	0.2318
PAM210	<i>rpcQ</i> Ribosomal protein L14	-2.124	0.3066
PAM211	<i>rpIN</i> Ribosomal protein L24	-2.787	0.3361
PAM212	<i>rpIX</i> Ribosomal protein L5	-1.322	0.3805
PAM213	<i>rpIE</i> Ribosomal protein L54	-1.153	0.2337
PAM215	<i>rpSN</i> Ribosomal protein L6	-1.607	0.2948
PAM216	<i>rpIF</i> Ribosomal protein L18	-3.15	0.09844
PAM217	<i>rpIR</i> Ribosomal protein S5	-2.914	0.01674
PAM218	<i>rpSE</i> Ribosomal protein L30/L7E	-2.189	0.1657
PAM219	<i>rpmD</i> Ribosomal protein L15	-2.326	0.2402
PAM220	<i>rpIO</i> Preprotein translocase subunit SecY	-1.985	0.2354
PAM221	<i>secY</i> Adenylate kinase and related kinases	-1.659	0.1816
PAM222	<i>adk</i> Methionine aminopeptidase	-1.725	0.2946
PAM224	<i>map</i> Ribosomal protein L36	-1.669	0.2111
PAM227	<i>rpmJ</i> DNA-directed RNA polymerase alpha subunit/40 kD subunit	-2.92	0.1144
PAM229	<i>rpoA</i> Pseudouridylyl transferase (tRNA psi55)	-1.687	0.4747
PAM233	<i>truA</i> Methionyl-tRNA synthetase	††	-
PAM235	<i>metG</i> Hypothetical protein	-2.181	0.4626
PAM240	Predicted GTPases	2.618	0.3644
PAM241	<i>gpsA</i> Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	-1.911	0.03589
PAM242	<i>himA</i> Bacterial nucleoid DNA-binding protein	1.48	0.0003456
PAM248	<i>rpmA</i> RNase P protein component	1.046	0.4679
PAM251	<i>pnp</i> Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase)	-2.304	0.2069
PAM252	<i>mgtA3</i> Cation transport ATPases	-1.443	0.1847
PAM253	<i>rpmG</i> Ribosomal protein L33	1.88	0.1386
PAM254	<i>secE</i> Preprotein translocase subunit SecE	-1.182	0.009216
PAM255	<i>nusG</i> Transcription antiterminator	-1.142	0.1804
PAM257	<i>rpIA</i> Ribosomal protein L1	-1.268	0.1799
PAM258	<i>rpJ</i> Ribosomal protein L10	-1.455	0.1055
PAM260	<i>rpoB</i> DNA-directed RNA polymerase beta subunit/140 kD subunit (split gene in Mjan, Mthe, Aful)	-1.907	0.05702
PAM262	<i>rpmL</i> Ribosomal protein S12	-1.047	0.5804

表 2.2 続き

PAM263	<i>rpsG</i>	Ribosomal protein S7	-1.213	0.4524
PAM266		Hypothetical protein	1.804	0.01058
PAM267	<i>gidB</i>	Predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved in bacterial cell division	1.332	0.1205
PAM268	<i>gidA</i>	NAD/FAD-utilizing enzyme apparently involved in cell division	-1.539	0.16
PAM272		Predicted HD superfamily hydrolase	-1.408	0.301
PAM282		Hypothetical protein	-1.874	-
PAM288		Hypothetical protein	-2.987	0.01296
PAM289		Hypothetical protein	-2.368	0.0006981
PAM294	<i>folA</i>	Dihydrofolate reductase	1.51	0.02875
PAM296	<i>osmC</i>	Predicted redox protein, regulator of disulfide bond formation	3.988	0.2541
PAM297		Hypothetical protein	1.636	0.0004044
PAM298		Uncharacterized BCR	1.309	0.03716
PAM306	<i>ksgA</i>	Dimethyladenosine transferase (rRNA methylation)	1.124	0.3527
PAM309	<i>lplA</i>	Lipoate-protein ligase A	1.868	0.05725
PAM312	<i>P312</i>	Hypothetical protein	-1.072	0.1756
PAM313	<i>P313</i>	Hypothetical protein	-1.18	0.152
PAM318	<i>damI</i>	Site-specific DNA methylase	1.085	0.1782
PAM322		Hypothetical protein	-1.506	0.5675
PAM337	<i>tra5a</i>	Putative transposase	-1.61	-
PAM344	<i>tnk2</i>	Thymidylate kinase	1.369	0.004924
PAM345		Hypothetical protein	1.612	0.08804
PAM347		Hypothetical protein	1.311	0.06898
PAM382		Hypothetical protein	††	-
PAM412		Hypothetical protein	2.617	0.4552
PAM418		Hypothetical protein	-2.272	-
PAM433	<i>uvrC</i>	Nuclease subunit of the excinuclease complex	-1.023	-
PAM437		Predicted membrane protein	1.469	0.4218
PAM439		Uncharacterized BCR	-1.306	0.4864
PAM443	<i>nusB</i>	Transcription termination factor	2.571	0.03021
PAM444		Hypothetical protein	-1.192	0.002078
PAM445	<i>lepA</i>	Membrane GTPase LepA	1.878	0.0006105
PAM446		Hypothetical protein	3.786	-
PAM447	<i>tidD</i>	Predicted Zn-dependent proteases and their inactivated homologs	2.678	0.06597
PAM449	<i>tig</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	-1.856	0.1627
PAM455	<i>argS</i>	Arginyl-tRNA synthetase	1.799	0.0001755
PAM457	<i>artI1</i>	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component	1.256	0.02936
PAM458		Hypothetical protein	1.766	0.009853
PAM465	<i>polC</i>	DNA polymerase III alpha subunit, the Gram-positive type	1.014	0.01365
PAM469	<i>tyrS</i>	Tyrosyl-tRNA synthetase	1.264	0.3156
PAM470	<i>rplS</i>	Ribosomal protein L19	-1.114	0.423
PAM477		Hypothetical protein	-1.153	0.4298

表 2.2 続き

PAM478		Hypothetical protein	†	–
PAM484		Hypothetical protein	1.304	0.08254
PAM485		Hypothetical protein	3.127	0.01777
PAM486		Hypothetical protein	6.643	1.388E-07
PAM488	<i>glnQ</i>	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	2.744	0.02205
PAM489	<i>artI</i>	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component	1.056	0.7562
PAM491		Hypothetical protein	†	–
PAM496		Hypothetical protein	–2.335	0.3197
PAM499	<i>gyrA</i>	DNA gyrase (topoisomerase II) A subunit	–1.047	0.1072
PAM517		Hypothetical protein	†	–
PAM518		Hypothetical protein	4.158	0.1416
PAM522		Hypothetical protein	–4.875	0.00000653
PAM539		Hypothetical protein	††	–
PAM555		Hypothetical protein	–1.605	0.05532
PAM558		Hypothetical protein	–1.812	0.008222
PAM562		Hypothetical protein	1.698	0.3254
PAM563	<i>himA3</i>	Bacterial nucleoid DNA-binding protein	1.058	0.09085
PAM564	<i>ssb2</i>	Single-stranded DNA-binding protein	1.519	0.2832
PAM565	<i>dam3</i>	Site-specific DNA methylase	2.1	0.09272
PAM577		Hypothetical protein	2.199	–
PAM579	<i>qR17</i>	Metal-dependent proteases with possible chaperone activity	1.846	0.65
PAM580	<i>folK</i>	7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase	2.366	0.2684
PAM583	<i>degV</i>	Uncharacterized BCR	–3.629	0.4734
PAM586	<i>rpsD</i>	Ribosomal protein S4 and related proteins	1.9	0.002013
PAM588	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	1.311	–
PAM590		Hypothetical protein	†	–
PAM592		Hypothetical protein	††	–
PAM596	<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	–1.44	–
PAM597	<i>arcI</i>	EMAP domain	–1.108	–
PAM600	<i>acoA</i>	Thiamine pyrophosphate-dependent dehydrogenases, E1 component alpha subunit	–2.631	0.008435
PAM601	<i>acoB</i>	Thiamine pyrophosphate-dependent dehydrogenases, E1 component beta subunit	–3.488	0.07551
PAM602	<i>aceF</i>	Dihydroipoamide acyltransferases	–1.512	0.3385
PAM605	<i>tatD</i>	Mg-dependent DNase	–1.428	0.01854
PAM606		Hypothetical protein	2.412	0.1543
PAM609		Hypothetical protein	–1.221	0.1784
PAM614		Hypothetical protein	–1.042	0.5334
PAM615		Uncharacterized BCR	††	–
PAM620	<i>glnS</i>	Glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases	†	–
PAM622		Hypothetical protein	†	–
PAM623	<i>rpsU</i>	Ribosomal protein S21	1.959	0.0003361
PAM624		Predicted metal-dependent hydrolase	1.086	0.1458

表 2.2 続き

	<i>era</i>	GTPases		
PAM625			-5.19	-
PAM628	<i>rpoD</i>	DNA-directed RNA polymerase sigma subunits (sigma70/sigma32)	-2.009	0.04457
PAM629		Predicted SAM-dependent methyltransferase	2.167	0.1122
PAM634	<i>cof</i>	Predicted hydrolases of the HAD superfamily	1.49	0.1545
PAM639	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	†	-
PAM641	<i>mdoB</i>	Phosphoglycerol transferase and related proteins, alkaline phosphatase superfamily	-4.507	-
PAM649		Hypothetical protein	1.296	0.3275
PAM657		Hypothetical protein	2.649	-
PAM661	<i>potC</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II	-1.322	0.173
PAM663		Hypothetical protein	-1.176	-
PAM664	<i>rPT1</i>	ATP-dependent 26S proteasome regulatory subunit	2.312	-
PAM669		Hypothetical protein	1.101	0.1545
PAM670		Hypothetical protein	2.181	0.1101
PAM671	<i>cspC</i>	Cold shock proteins	2.331	0.0002537
PAM672	<i>dnaB</i>	DNA replication protein	1.744	0.06844
PAM673	<i>dnaB</i>	Replication initiation/membrane attachment protein	1.457	0.0907
PAM674	<i>nei</i>	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1.142	0.3769
PAM675	<i>polA</i>	DNA polymerase I - 3'-5' exonuclease and polymerase domains	4.406	0.07055
PAM677	<i>spoVK</i>	ATPases of the AAA+ class	1.637	0.02793
PAM678	<i>ffh</i>	Signal recognition particle GTPase	1.309	0.03641
PAM679	<i>ftsY</i>	Signal recognition particle GTPase	2.854	0.2735
PAM680	<i>gmk</i>	Guanylate kinase	1.407	0.02734
PAM685	<i>dnaG2</i>	DNA primase (bacterial type)	†	-
PAM686	<i>dnaB2</i>	Replicative DNA helicase	-1.819	-
PAM688	<i>tmk3</i>	Thymidylate kinase	1.318	0.132
PAM690		Hypothetical protein	2.197	0.004772
PAM692	<i>sbcC</i>	ATPase involved in DNA repair	†	-
PAM695	<i>hflB2</i>	ATP-dependent Zn proteases	2.97	0.2768
PAM698	<i>himA4</i>	Bacterial nucleoid DNA-binding protein	†	-
PAM700	<i>flaA2</i>	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit	†	-
PAM701	<i>ssb5</i>	Single-stranded DNA-binding protein	1.407	-
PAM702	<i>rpoD</i>	DNA-directed RNA polymerase sigma subunits (sigma70/sigma32)	2.546	-
PAM703	<i>dnaJ</i>	Molecular chaperones (contain C-terminal Zn finger domain)	1.414	0.1543
PAM704	<i>dnaK</i>	Molecular chaperone	-2.659	0.03086
PAM707		Hypothetical protein	-1.863	0.1131
PAM709		Hypothetical protein	-1.026	0.3521
PAM710		Phosphatidylglycerophosphate synthase	-1.549	0.2516
PAM718	<i>pgsA</i>	Glycosidases	4.361	-
PAM723	<i>amyA</i>	HD superfamily phosphohydrolases	-1.052	0.01351
PAM730		Cation transport ATPases	-1.33	0.1216
PAM733	<i>zntA</i>		1.956	0.2965

表 2.2 続き

PAM738	<i>leuS</i>	Leucyl-tRNA synthetase	-2.503	0.2308
PAM742	<i>rplT</i>	Ribosomal protein L20	-2.273	0.2912
PAM745	<i>thrS</i>	Threonyl-tRNA synthetase	-2.538	0.1751
PAM746		Hypothetical protein	-1.156	0.01907
PAM748		Exopolyphosphatase-related proteins	-1.642	0.1083
PAM751	<i>ugpA</i>	ABC-type sugar transport systems, permease components	-2.046	0.1722

† ; 植物でのみ発現が確認された遺伝子、‡ ; 昆虫でのみ発現が確認された遺伝子

このマイクロアレイ解析結果をファイトプラズマの代謝経路図上に示した (図 2.3)。エネルギー生産系である主な解糖系関連遺伝子、具体的には、グルコースからピルビン酸が生成されるまでの過程で機能する酵素をコードする遺伝子群は植物感染時および昆虫感染時において同程度発現していた。一方でピルビン酸をアセチル CoA に変換する酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体をコードする遺伝子である *acoA* および *acoB* は、植物感染時と比較し昆虫感染時にそれぞれ 6.2 および 11 倍であることが明らかとなった。また、膜局在性のタンパク質をコードする遺伝子は植物感染時または昆虫感染時のどちらかにおいて多く発現しているものが見られた (表 2.3)。例えば膜輸送系遺伝子である多剤排出ポンプ (*mdlB*)、アミノ酸トランスポーター複合体 (*artI*, *artM*)、グルタミン酸トランスポーター (*glnQ*)、無機イオントランスポーター (*nlpA*)、機能未知 ABC トランスポーター (*abc*)、機械刺激受容チャネル (*mscL*) は植物感染時に、機能未知 ABC トランスポーター (*PAM193*)、糖トランスポーター (*ugpA*) は昆虫感染時にそれぞれ 4 倍以上の発現量を示した。

また、OY ファイトプラズマ遺伝子では 27 個の分泌タンパク質が予測されているが (Hoshi *et al.*, 2009)、プローブを設計した 18 個の分泌タンパク質遺伝子のうち 7 個は植物感染時に、6 個は昆虫感染時に発現量が 2 倍以上に増加していた (表 2.4)。特に分泌タンパク質 PAM486 をコードする遺伝子は、昆虫感染時と比較し植物感染時において発現量が 90 倍に増加していることが明らかとなった。これはマイクロアレイ解析を行ったファイトプラズマ遺伝子全体で 2 番目に大きい発現比であり、解析した分泌タンパク質の中では最も発現比が大きかった。

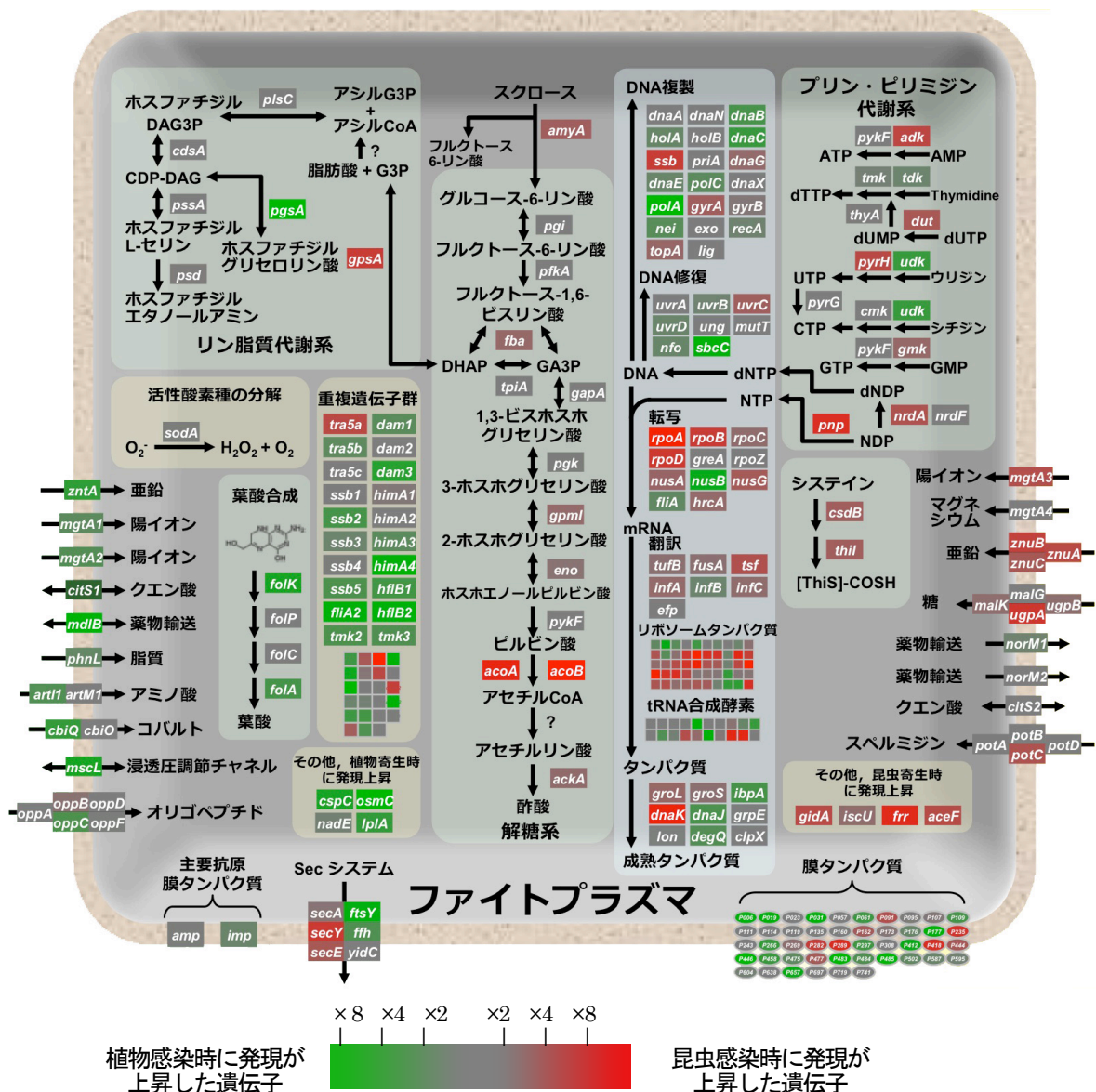


図 2.3 植物および昆虫におけるファイトプラスマの代謝系関連遺伝子の発現
 緑色は感染植物で発現が高かった遺伝子、赤色は感染昆虫で発現が高かった遺伝子を示す。

表 2.3 膜輸送体遺伝子の解析結果

PAM_No.	遺伝子	遺伝子産物	発現比 log2 (植物/昆虫)	p値
PAM020	<i>cbiO</i>	ABC-type cobalt transport system, ATPase component	-0.154	0.5967
PAM022	<i>dppB</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, permease component	1.534	-
PAM025	<i>dppD</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, ATPase component	-1.956	-
PAM026	<i>oppF</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, ATPase component	0.365	0.8435
PAM030	<i>mgfA</i>	cation transport ATPase	1.033	0.1344
PAM058	<i>mscL</i>	large-conductance mechanosensitive channel	2.374	0.01549
PAM059	<i>mdlB</i>	ABC-type multidrug/protein/lipid transport system, ATPase component	3.07	0.09089
PAM077	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	3	-
PAM078	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	-0.062	0.9571
PAM079	<i>glnQ</i>	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	-0.257	-
PAM092	<i>znuA</i>	ABC-type Mn/Zn transport system, periplasmic Mn/Zn-binding protein	-1.574	0.1713
PAM093	<i>znuC</i>	ABC-type Mn/Zn transport system, ATPase component	-1.201	0.1973
PAM094	<i>znuB</i>	ABC-type Mn/Zn transport system, permease component	-1.764	0.08479
PAM096	<i>phnL</i>	ABC-type transport system, involved in lipoprotein release, ATPase component	0.872	0.001995
PAM097	<i>nlpA</i>	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	-1.057	0.1513
PAM132	<i>abc</i>	uncharacterized ABC-type transport system ATPase component	2.574	0.3259
PAM133	<i>nlpA</i>	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	2.645	0.4676
PAM134		permease component of an uncharacterized ABC transporter	3	-
PAM179	<i>cbiO</i>	ABC-type cobalt transport system, ATPase component	0.268	0.7622
PAM180	<i>cbiQ</i>	ABC-type cobalt transport system, permease component	1.851	0.538
PAM186	<i>mgfA</i>	cation transport ATPase	1.115	0.4108
PAM189	<i>oppC</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide system, permease component	1.377	0.1192
PAM190	<i>oppB</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, permease component	-0.574	-

表 2.3 続き

PAM191	<i>oppA</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, periplasmic component	0.089	0.966
PAM192	<i>oppD</i>	ABC-type dipeptide/oligopeptide transport system, ATPase component	0.069	0.8778
PAM193		ATPase components of various ABC-type transport systems	-3	-
PAM252	<i>mgfA</i>	cation transport ATPase	-1.443	0.1847
PAM280	<i>norM</i>	Na ⁺ -driven multidrug efflux pump	0.631	0.4719
PAM286	<i>cits</i>	malate/citrate symporter	0.89	0.8011
PAM457	<i>artJ</i>	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component	1.256	0.02936
PAM487	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	0.43	0.5185
PAM488	<i>glnQ</i>	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	2.744	0.02205
PAM489	<i>artJ</i>	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component	1.056	0.7562
PAM490	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	-0.766	-
PAM494	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	0.477	0.4335
PAM495	<i>artJ</i>	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component	-0.7	0.7334
PAM585	<i>mgfA</i>	cation transport ATPase	0.168	0.7148
PAM588	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	1.311	-
PAM599	<i>phnL</i>	ABC transporter, ATPase component	-0.624	-
PAM639	<i>artM</i>	ABC-type amino acid transport system, permease component	3	-
PAM659	<i>potA</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase component	0	-
PAM660	<i>potB</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component I	0	-
PAM661	<i>potC</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II	-1.322	0.173
PAM720	<i>cits</i>	malate/citrate symporter	-0.892	0.02451
PAM733	<i>zntA</i>	cation transport ATPase	1.956	0.2965
PAM734	<i>norM</i>	Na ⁺ -driven multidrug efflux pump	0.291	0.03511
PAM751	<i>ugpA</i>	ABC-type sugar transport system, permease component	-2.046	0.1722
PAM752	<i>malK</i>	ABC-type sugar transport system, ATPase component	-0.642	0.5153

表 2.4 分泌タンパク質遺伝子の解析結果

PAM_No.	成熟タンパク質 分子量 (kDa)	遺伝子産物	発現量 log2 (植物/昆虫)	p値
PAM029	13.6	hypothetical protein	1.768	0.0005
PAM068	25.4	hypothetical protein	nt	
PAM069	24	hypothetical protein	-0.51	-
PAM157	31.8	hypothetical protein	-1.467	0.05757
PAM277	24.8	hypothetical protein	0.591	0.8488
PAM288	41.5	hypothetical protein	-2.987	0.01296
PAM356	49.7	ATP-dependent Zn protease	nt	
PAM366	56.7	ATP-dependent Zn protease	nt	
PAM370	27.8	hypothetical protein	nt	
PAM371	18.8	hypothetical protein	nt	
PAM372	10.3	hypothetical protein	nt	
PAM393	86.8	ATP-dependent Zn protease	nt	
PAM419	27.6	hypothetical protein	0.936	0.08183
PAM486	17.7	hypothetical protein	6.643	1.4×10^{-07}
PAM540	10.8	hypothetical protein	nt	
PAM558	38.3	hypothetical protein	-1.812	0.00822
PAM562	17	hypothetical protein	1.698	0.3254
PAM575	25.2	hypothetical protein	1.542	0.00054
PAM582	19.9	hypothetical protein	-0.481	0.07115
PAM610	12.9	hypothetical protein	0.751	0.1669
PAM649	6.7	hypothetical protein	1.296	0.3275
PAM663	35.7	hypothetical protein	-1.176	-
PAM670	12	hypothetical protein	2.181	0.1101
PAM690	6.4	hypothetical protein	2.197	0.00477
PAM707	21.8	hypothetical protein	-1.863	0.1131
PAM710	14.5	hypothetical protein	-1.549	0.2516
PAM765	4.5	TENGU	nt	

nt ; not tested

ファージ様の重複遺伝子群である PMU に含まれる遺伝子群は総じて、植物感染時および昆虫感染時に同程度発現しており、発現量比の偏りは認められなかった (図 2.4)。しかし、重複する遺伝子を見分けるようなプローブを作成することができたものについて別個に比較すると、ホモログ間で遺伝子発現量が異なるものがいくつか存在した。例えばイオントランスポーターの 1 種である *mgtA* の重複遺伝子の発現は植物感染時に発現が 2.2 倍になるものから、昆虫感染時に発現が 2.7 倍になるものまで様々であった。

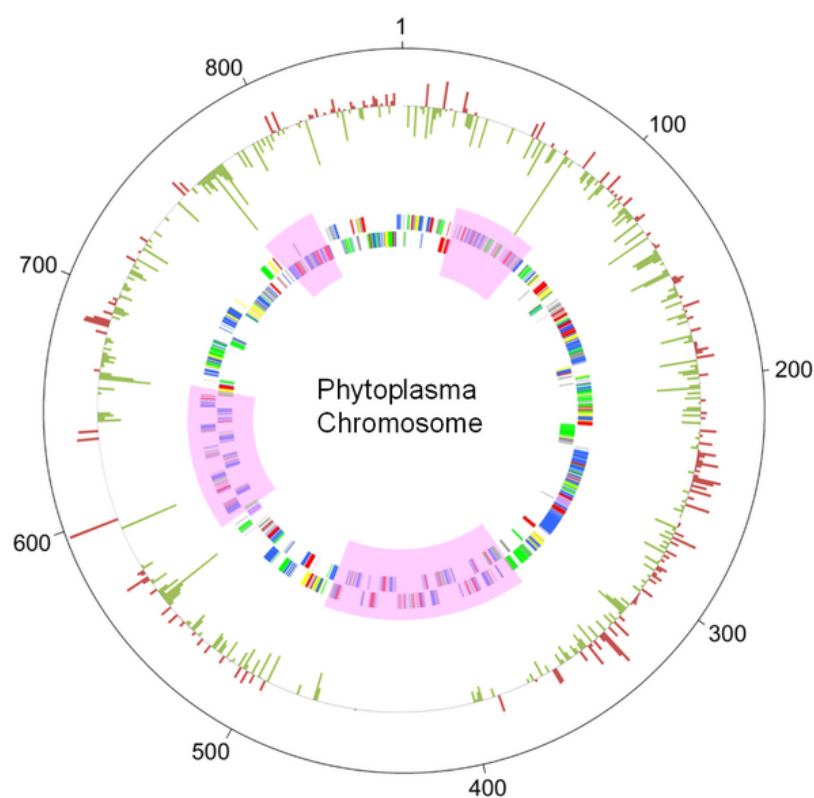


図 2.4 植物感染時および昆虫感染時における OY ファイトプラズマ遺伝子の発現比
 円の外側から、1; 昆虫で発現量が増加した遺伝子 (赤)、2; 植物で発現量が増加した遺伝子 (緑)、3; +鎖にコードされている遺伝子、4; -鎖にコードされている遺伝子。PMU を桃色で示す。外円の数字は OY ファイトプラズマの遺伝子番号を示す。

2.3.2. リアルタイム RT-PCR によるマイクロアレイ解析結果の検証

マイクロアレイ解析の結果について検証するため、発現が変化した遺伝子のうちランダムに選抜した 15 遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。内部標準にはファイトプラズマの翻訳伸長因子 EF-Tu をコードする *tufB* 遺伝子配列を内部標準として用いた。感染植物および感染昆虫における OY ファイトプラズマ遺伝子の発現量を *tufB* 遺伝子の発現量に対する相対値として求め、その相対発現量の比率（植物／昆虫）を求めた。実験は 3 反復以上行った。リアルタイム RT-PCR 解析により求めた相対発現量の比率がマイクロアレイ解析の結果と一致するかどうかを評価したところ、両者の結果はほぼ同様の傾向を示した（図 2.5）。

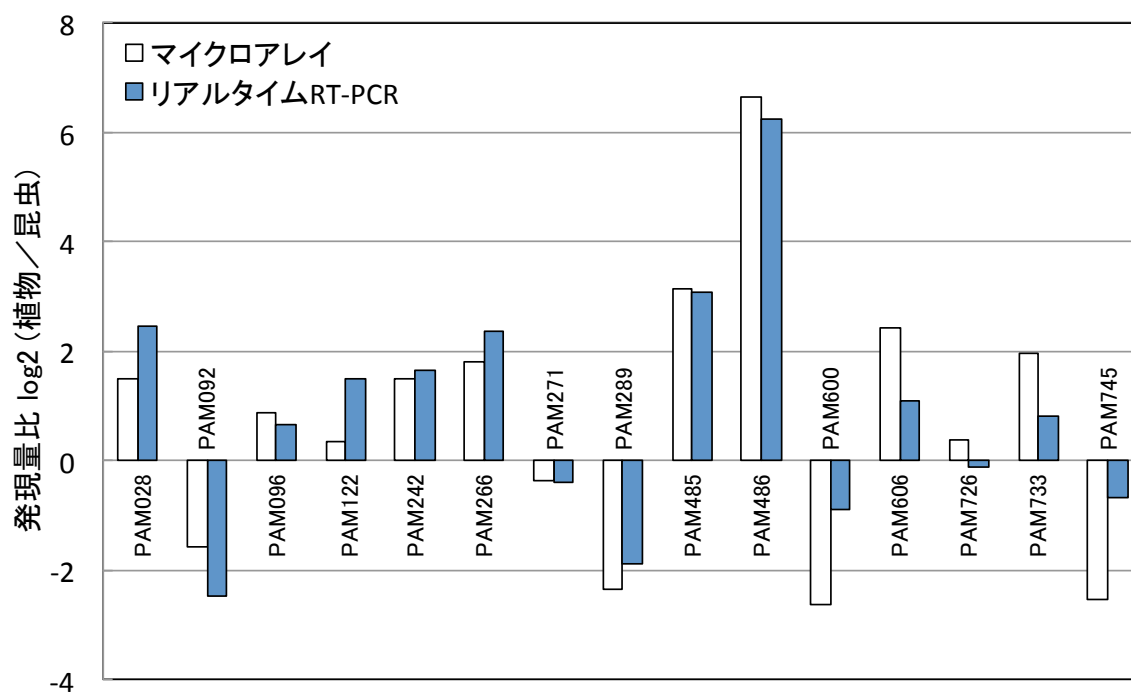


図 2.5 リアルタイム RT-PCR によるマイクロアレイ解析結果との比較

マイクロアレイ解析の結果（白）およびリアルタイム RT-PCR の結果（青）を \log_2 （植物感染時／昆虫感染時）の対数で示した。

2.4. 考察

2.4.1. 絶対寄生性細菌の遺伝子発現変動

ファイトプラズマの遺伝子発現が植物および昆虫それぞれの宿主細胞内でどのように変化しているのかを網羅的に解析するため、OY ファイトプラズマに感染した植物および昆虫から RNA を抽出し、ファイトプラズマ遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。その結果、OY ファイトプラズマゲノムにコードされる全遺伝子の約 33%に相当する 248 遺伝子の発現が変化しており、OY ファイトプラズマが植物および昆虫の 2 つの異なる宿主環境に応じて劇的に遺伝子発現を変化させていることが明らかとなった。また、その発現は宿主転換に伴い発現量が変化しない遺伝子から 100 倍以上に変化するものまで非常に広い変動幅を示した。

一般に退行的進化を遂げた細菌は自由生活性の細菌と比較して遺伝子発現制御を担う転写因子の種類が少ない。ファイトプラズマを含む *Mollicutes* 綱に属する細菌は、そのほとんどが退行的進化により多くの遺伝子を欠失しており、例えば自身の遺伝子発現に必要な転写因子であるシグマ因子は 1~2 種類しか保持していない。それに対し、自由生活性の細菌である *E. coli* や *B. subtilis* ではそれぞれ 7 および 18 種類のシグマ因子を使い分けている。これまでに、ファイトプラズマと同じく細胞内に絶対寄生する細菌で退行的進化を遂げたアブラムシの共生菌 *Buchnera aphidicola* では、熱ショックにより発現量が変化する遺伝子の発現変動幅が *E. coli* や *B. subtilis* と比較すると顕著に小さいことが示されている (Samuels, 2011)。このことから Samuels は、退行的進化を遂げた細菌が遺伝子発現制御の柔軟性を失っている可能性を指摘した。しかしその一方で、ファイトプラズマと同じ *Mollicutes* 綱に属する細菌である *M. pneumoniae* では、様々な条件下でおよそ 42%の遺伝子発現パターンが変化し、中にはアンチセンス RNA や小分子 RNA などの non-coding RNA も多く転写されていることが明らかとなっている (Güell *et al.*, 2009)。またダニなどの節足動物と、ヒトを含む動物細胞との間を宿主転換する細菌である *B. burgdorferi* では、ダニから哺乳類への宿主転換に伴い、転写因子、mRNA のステムループ構造、small non-coding RNA のはたらきにより遺伝子発現が非常に複雑に制御されていることが明らかにされつつある (Samuels, 2011)。このような現象がどのように病原性に影響するのかについては今後の解析が待たれるが、本章にて行ったマイクロアレイ解析の結果、ファイトプラズマは宿主転換に伴い多くの遺伝子を使い分けていることが明らかとなった。今後ファイトプラズマの

遺伝子発現を感染部位または接種後日数等に分けて段階的に解析することにより、多くの遺伝子が欠失するような退行的進化を遂げた細菌が数少ない遺伝子を駆使して宿主に感染を成立させるような仕組みをより詳細に明らかにすることができるかもしれない。

2.4.2. 代謝系関連遺伝子の発現変動

ファイトプラズマのエネルギー生産系である解糖系に関わる大多数の遺伝子は、両宿主において同程度発現していた。ファイトプラズマはF_oF₁型ATP合成酵素のサブユニットをコードする遺伝子を1つも有しておらず (Oshima *et al.*, 2004)、エネルギー生産を解糖系から生産されるATPに依存していると考えられることから、マイクロアレイ解析の結果は植物および昆虫どちらの宿主感染時においても解糖系に必要な酵素が必要とされていることを示唆している。一方で、*acoA* および *acoB* の発現は昆虫感染時に顕著に上昇した。したがって植物感染時と昆虫感染時とで解糖系の最終産物を変化させることがファイトプラズマの環境適応戦略の1つとなっているのかもしれない。

細菌の細胞膜はリン脂質から構成される。これらのリン脂質の構成は膜の屈曲性向、温度感受性、浸透圧感受性、抗生物質感受性を変化させる原因となることが知られている (Verheul *et al.*, 1997)。ファイトプラズマと同じ *Mollicutes* 綱に属する *Mycoplasma* 属細菌は、非常に小さなゲノムサイズにもかかわらず、様々なリン脂質により細胞膜が構成されていることが明らかとなっている (Kornspan & Rottem, 2012)。ファイトプラズマにおいては少なくとも両性リン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) および酸性リン脂質ホスファチジルグリセロール (PG) 合成経路が保存されている (図 2.6)。マイクロアレイ解析の結果、このうち PG 合成経路で機能する酵素をコードする遺伝子であるホスファチジルグリセリン酸合成酵素遺伝子 (*pgsA*) およびホスファチジルグリセロール合成酵素遺伝子 (*pgpB*) の発現量が植物感染時に増加することが明らかとなった。このことは、リン脂質膜の組成を変化させることがファイトプラズマの植物細胞および昆虫細胞への適応に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

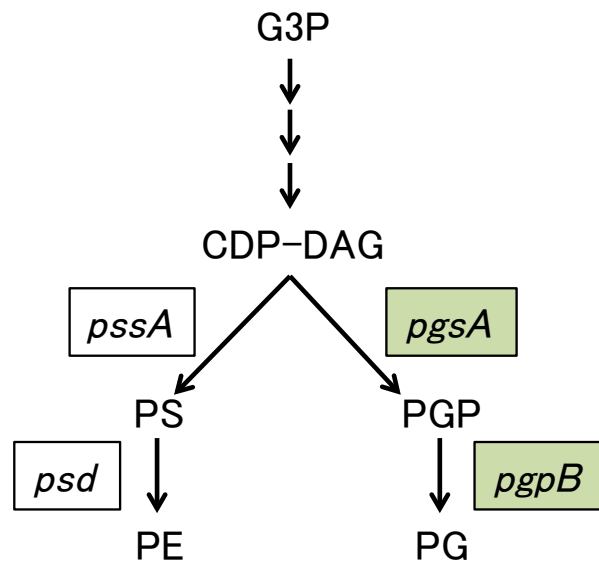


図 2.6 OY ファイトプラズマのリン脂質代謝経路

G3P; グリセロール 3 リン酸、CDP-DAG; シチジンニリン酸ジアシルグリセロール、PS; ホスファチジルセリン、PE; ホスファチジルエタノールアミン、PGP; ホスファチジルグリセロールリン酸、PG; ホスファチジルグリセロール。それぞれの経路で機能する酵素をコードする遺伝子名を四角で囲った。マイクロアレイ解析の結果、昆虫感染時と比較して植物感染時における *pgsA* の発現量は 20 倍、同じく植物感染時における *pgpB* の発現量は 8 倍であった。

植物感染時または昆虫感染時に発現が変動した代謝系関連遺伝子はそれぞれの宿主において特異的に機能する重要な遺伝子である可能性が高いが、一方で両宿主への感染時に発現量が変化しない遺伝子は、両方の宿主へ適応するために重要な因子として機能している可能性が高い。マイクロアレイ解析の結果、活性酸素種分解酵素 (*sod*) の発現量は両宿主感染時にほぼ変化しないことが明らかとなった。活性酸素種は、宿主の恒常的な代謝系から生じるのみならず、宿主の病原体に対する防御応答シグナルとして産生される。病原細菌が植物に感染すると、植物は NADPH oxidase を用いて活性酸素種の一種であるスーパーオキシドラジカル (O_2^-) を大量に発生させる (Lamb & Dixon, 1997; Moller, 2001; Imlay, 2003)。昆虫においても病原細菌の感染に対して活性酸素種が発生する現象が確認されている (Ha *et al.*, 2005)。ファイトプラズマが植物に感染した際にも活性酸素種が発生することが知られている (Musetti *et al.*, 2004; Musetti *et al.*, 2005; Sánchez-Rojó *et al.*, 2010)。これらのことから、ファイトプラズマの SOD は両宿主からの攻撃に対抗する手段として重要な働きを持つ可能性が示唆された。

2.4.3. 膜輸送体遺伝子の発現変動

膜輸送体遺伝子には、植物感染時または昆虫感染時において発現が変動しているものが多く存在した (表 2.3)。例えば、ファイトプラズマには ABC トランスポーターに分類される多剤排出ポンプが 3 種類コードされている。そのうちの一つである *mdlB* は昆虫感染時と比較して植物感染時に発現量が 8.4 倍に増加した。リンゴやナシなどに火傷病を引き起こす *Pectobacterium amylovora* やナス科植物をはじめ多くの植物に青枯病を引き起こす *Ralstonia solanacearum* では、植物が細菌の感染に対する防御物質として放出する抗菌性物質であるファイトアレキシンに対抗する手段として、多剤排出ポンプが重要な役割を担う (Burse *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007)。ファイトアレキシンは植物の防御応答としてサリチル酸の産生や活性酸素種の発生とともに産生される物質である (Lamb & Dixon, 1997; Dubreuil-Maurizi & Poinssot, 2012)。植物ではファイトプラズマの感染によりサリチル酸を介した防御応答経路が活性化されることや、活性酸素種が発生することが明らかにされている (Musetti *et al.*, 2004; Musetti *et al.*, 2005; Sánchez-Royo *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2014)。このことから植物はファイトプラズマへの防御手段として種々のファイトアレキシンを産生していると推測される。したがって *mdlB* はファイトアレキシンによる攻撃を回避し、植物への感染を成立させるために機能している可能性が示唆される。

亜鉛の取り込みを行うトランスポーター複合体をコードする *znuABC* は植物感染時と比較して昆虫感染時に発現量が 2.3~3.4 倍に増加した。一方で、同様に亜鉛の取り込みを行うと考えられる *zntA* は昆虫感染時と比較して植物感染時に発現量がおよそ 3.9 倍に増加した。亜鉛は多くの酵素の活性中心として機能していることから推察されるように、生物の生存に欠かせない金属元素である。動物細胞に寄生する *Salmonella enterica* (Ammendola *et al.*, 2007) や *Brucella abortus* (Kim *et al.*, 2004) の *znuABC* 遺伝子が欠損した変異株は、野生株と比較して増殖量が減少する。しかしその一方で真核細胞内における亜鉛元素は非常に微量であり、そのほとんどがタンパク質などに強く結合している (Cousins *et al.*, 2006)。このため細胞内に侵入した細菌にとって、亜鉛を獲得するためのメカニズムは非常に重要であると考えられる。ファイトプラズマは取込み難い亜鉛の輸送を効率的に行うため、それぞれの宿主に適したトランスポーターを使い分けているのかもしれない。またこれと類似した現象として、マグネシウムトランスポーターとして機能することが予測される P タイプ ATPase は OY ファイトプラズマゲノムに 4 コピー

(*mgtA1*~4) 存在するが、そのうち *mgtA1* および *mgtA2* は植物宿主内で、*mgtA3* は昆虫宿主内で発現が上昇していた。

ファイトプラズマは宿主への極度な寄生のため多くの代謝系遺伝子を失うと同時に、膜輸送系遺伝子を多数獲得し、自身の生存に必要な物質を宿主から取り込むようになったと考えられる。機能が重複する遺伝子間において遺伝子発現パターンを変化させる意義については今のところ不明であるが、一般に遺伝子重複は遺伝的多様性を高め、多様な環境に適応するために重要な役割を果たしていると言われている (Makino & Kawata, 2012; Magadum *et al.*, 2013)。したがってファイトプラズマは植物と昆虫という全く異なる宿主から効率的に物質を取り込むために、それぞれの宿主においてより適したトランスポーターを進化させている可能性が示唆される。

2.4.4. 分泌タンパク質遺伝子の発現変動

これまでに全ゲノムが決定されている OY ファイトプラズマのゲノム上には、分泌タンパク質をコードする遺伝子が 27 個推定されている (Hoshi *et al.*, 2009)。そのうちの 1 つである TENGU はわずか 38 アミノ酸から成る分子量 4.5 kDa のポリペプチドであり、これまでに昆虫感染時と比較して植物感染時に mRNA レベルで発現量が 5 倍に増加することが明らかにされている (Hoshi *et al.*, 2009)。本章にて行ったファイトプラズマ遺伝子のマイクロアレイ解析の結果、プローブを設計した 18 個の分泌タンパク質遺伝子のうち 7 個は植物感染時で、6 個は昆虫感染時で 2 倍以上発現量が増加していた (表 2.4)。特に分泌タンパク質 PAM486 をコードする遺伝子は、解析した分泌タンパク質の中で最も発現比が大きかった。このことから PAM486 は植物感染時に何らかの機能を果たすことが示唆される。ファイトプラズマは細胞内局在性の細菌であることから、ファイトプラズマ菌体内から分泌されたタンパク質は宿主細胞内の何らかの因子と直接的に相互作用する可能性が高い。このことからファイトプラズマの分泌タンパク質は病原性因子の最有力候補であると考えられている。これまでにファイトプラズマの分泌タンパク質では上述した TENGU をはじめ、いくつかのタンパク質についてその機能が解析されているが、それらは全て植物に萎縮、叢生、葉化などの病徴を引き起こす病原性因子である (Hoshi *et al.*, 2009)。これらの他にもファイトプラズマに特徴的な病徴を引き起こす因子がある可能性は否定できないものの、数ある分泌タンパク質の全てが病徴に関わる因子であるとは考え難い。

他の植物病原菌では、自身の感染を成立させるために様々な機能を持つ分泌タンパク質群を保持することが明らかにされている。例えばトマト葉かび病菌 (*Cladosporium fulvum*) から放出される分泌タンパク質の中には、自身の細胞壁を守る働きをするもの、宿主の防御応答を回避するものなどが報告されている (Van den Burg *et al.*, 2006; De Jonge *et al.*, 2010)。また、カンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas campestris*) では、宿主の核に局在し宿主の転写因子と結合することで、その転写因子の制御下にある防御関連遺伝子の発現を抑制する分泌タンパク質が知られている (Canonne *et al.*, 2011)。本章におけるマイクロアレイ解析によって宿主特異的な発現変動を示した分泌タンパク質の中には植物の核や葉緑体に局在するシグナルが予測されるものも存在することから、他の細菌での報告と同様に、それぞれの宿主細胞内環境に適応するために宿主因子と相互作用している可能性が示唆される。

第3章 ファイトプラズマにおける機械刺激受容チャネルの機能解析

3.1. 序文

3.1.1. 機械刺激受容チャネルを介した細菌の浸透圧調節

細菌を含むあらゆる細胞は、機械刺激という物理的な力により変形する。例えば浸透圧の変化により引き起こされる細胞の容積変化はその普遍的な例である。低浸透圧環境に曝された細胞では、細菌の機械刺激受容チャネル [mechansensitive (MS) channels] が開状態となり、イオンなどの浸透圧調節物質が細胞外へ放出される。この MS チャネルのはたらきにより細胞は溶菌などによる細胞の死滅を免れている (Kung *et al.*, 2010)。細菌の MS チャネルの機能は 1987 年に Martinac らにより大腸菌において初めて報告され (Martinac *et al.*, 1987)、その後コンダクタンスの違いにより 2 種類の MS チャネル、MscL および MscS が存在することが明らかとなった (Sukharev *et al.*, 1994; Levina *et al.*, 1999)。大腸菌の *m*scL および *m*scS 欠損変異体は、低張条件への急激な変化により細胞の溶解を引き起こすことが知られている (Booth & Louis, 1999; Levina *et al.*, 1999)。またこれまでに、*m*scL および *m*scS は、ストレス応答性のシグマ因子である σ^S と複合体を形成した RNA ポリメラーゼにより転写が制御されており、 σ^S が欠損した *E. coli* は低張条件感受性となることが明らかとなっている (Stokes *et al.*, 2003)。したがって MscL および MscS は環境応答性のチャネルであることが示唆されている。

3.1.2. 植物細胞および昆虫細胞の浸透圧

ファイトプラズマは媒介昆虫の細胞内で増殖した後、口針を通じて篩部細胞に侵入する。したがってファイトプラズマは、植物と昆虫という全く異なる生物の細胞内環境に曝されることとなる。篩部細胞と昆虫細胞とでは、病原体の感染によって引き起こされる防御応答のような、誘導される反応の違いの他に、細胞内のアミノ酸やイオンの組成や濃度、pH など、通常状態における細胞の性状も大きく異なっている。中でも、浸透圧の違いは細菌の感染にとって大きな問題となり得る。篩部細胞は、糖をはじめとする植物の有機栄養分を輸送する経路であることから、通

常の細胞よりも高浸透圧条件にある。実際に、篩部細胞の浸透圧は昆虫の血リンパの 2～5 倍であると言われている (Douglas, 2006)。

3.1.3. ファイトプラズマの機械刺激受容チャネル

ファイトプラズマは多くの代謝系遺伝子を欠失している一方で、膜輸送体遺伝子を複数コピー保持している。このことから、ファイトプラズマの膜輸送体は宿主細胞との物質的なやりとりを通じ、宿主との相互作用に重要な役割を果たしていると考えられる。第 2 章におけるマイクロアレイ解析の結果、多くの膜輸送体遺伝子が植物感染時または昆虫感染時において発現上昇していることが明らかとなった。中でも浸透圧調節に関わる *mscL* の発現量は昆虫感染時と比較して植物感染時で顕著に増加した。3.1.2. 項で述べたように、*mscL* は細菌の浸透圧調節に重要な役割を果たす。特にファイトプラズマを含む *Mollicutes* 綱細菌は細胞壁を持たないことから、外部の浸透圧環境への感受性が高いことが予想される。そこで、植物感染時に発現量が増加するファイトプラズマの *mscL* は篩部細胞内の浸透圧に適応するために重要な役割を果たしているという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、本章では植物および昆虫感染時における OY ファイトプラズマの *mscL* (OY-*mscL*) の発現を、リアルタイム RT-PCR 法により遺伝子レベルで確認した。さらに、OY-MscL の機能阻害物質である塩化ガドリニウムを与えた植物を用いて、ファイトプラズマの増殖量を評価した。これらの結果を、他の近縁な細菌における MscL の有無を含めて考察し、ファイトプラズマの生存における MscL の機能について検証した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫

本章における OY-MscL の機能解析では、2.2.1.項と同様の条件で接種および管理した OY ファイトプラズマ感染植物を使用した。

3.2.2. MscL の相同性比較

GenBank に登録されているファイトプラズマの MscL および他の細菌の MscL の配列を用いて相同性解析を行った。アミノ酸配列のアラインメントには CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) を、相同性解析には National Center for Biotechnology Information (NCBI) の protein BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) を用いた。解析に用いた種およびアクセッションナンバーは以下の通りである。

表 3.1 解析に用いた MscL ホモログ

生物名	アクセッション番号
Phytoplasma asteris OY-M	BAD04143
P. asteris AY-WB	ABC65144
P. australiense	CAM11448
P. mali AT	CAP18518
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AIR13720
<i>Staphylococcus aureus</i>	AIW26996
<i>Escherichia coli</i>	KHD51549
<i>Bacillus subtilis</i>	KFH32144
<i>Rhizobium etli</i>	AGS20433
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ABX80839

3.2.3. RNA 抽出

2.2.2.項に従い OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫から RNA を抽出した。

3.2.4. リアルタイム RT-PCR 解析

3.2.3.項に従い抽出した OY ファイトプラズマ感染植物および昆虫の RNA サンプルを用い、2.2.5.項と同様の手順で *OY-mscL* のリアルタイム RT-PCR 解析を行った。用いたプライマーを表 3.2 に示す。内部標準は 2.2.5 項と同様に *tufB* の配列を用いた。

表 3.2 *OY-mscL* の発現量解析に用いたプライマー

プライマー	配列	目的
PAM058_F	5'-TAG CTG TTG CAG TTG TAA TAG GAC A-3'	<i>OY-mscL</i> のリアルタイム RT-PCR
PAM058_R	5'-AAA CAA CAA AGA AAA AAG AGG CA-3'	<i>OY-mscL</i> のリアルタイム RT-PCR

3.2.5. 塩化ガドリニウム処理

OY ファイトプラズマ菌体増殖への影響を検証するため *MscL* の阻害剤として知られる塩化ガドリニウム (GdCl_3) (Berrier *et al.*, 1992) を処理した植物に OY ファイトプラズマを接種した。塩化ガドリニウム処理植物は 3 個体用意した。具体的な方法は以下に示す。

1. 播種から 3 週間後の健全植物に 1 mM の塩化ガドリニウムを含んだ水を底面給水により与えた。
2. 植物 1 個体につき 8 個体の OY 感染昆虫を接種した。
3. 7 日ごとに 3 枚の葉を採取した。採取は 28 日後まで計 4 回行った。

3.2.6. DNA 抽出

3.2.5.項にて塩化ガドリニウム処理を行ったファイトプラズマ感染植物、または塩化ガドリニウム無処理のファイトプラズマ感染植物から DNA を抽出した。具体的な方法を以下に示す。

1. およそ 0.1 g の試料植物および昆虫に液体窒素を加え、乳鉢を用いて粉末状になるまで摩砕した。
2. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてトータル DNA を精製した。はじめに、400 μl の Buffer AP1 と 4 μl の RNase A (100 mg/ml) を添加し、よく混和した。

3. 新しいエッペンチューブに手順 2 のサンプルを回収し、65°Cで 10 分間保温した。この間に数回転倒混和し、細胞を溶解させた。
4. 界面活性剤、タンパク質、多糖類を沈澱させるため、130 µl の Buffer P3 を添加し、混和した後、5 分間氷上で静置した。
5. 20,000×g、室温で 5 分間遠心し、2 ml コレクションチューブをセットした QIAshredder Mini Spin Column に上清を移した。
6. 20,000×g、室温で 2 分間遠心し、カラムを通過した清澄液を新しいエッペンチューブに回収した。
7. 675 µl の Buffer AW1 を添加し、ピペッティングにより混和した。
8. 新しい 2 ml コレクションチューブをセットした DNeasy Mini Spin Column に手順 7 のサンプルを添加した。
9. 6,000×g、室温で 1 分間遠心し、ろ液を廃棄した。
10. 500 µl の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000×g、室温で 2 分間遠心した。
11. カラムが完全に乾燥していることを確認し、新しいエッペンチューブを DNeasy Mini Spin Column にセットした。
12. 100 µl の Buffer AE をメンブレン上に直接添加し、室温で 5 分間静置した後、6,000×g、室温で 1 分間遠心し DNA を溶出した。
13. 手順 12 をもう一度繰り返し、計 200 µl のトータル DNA を得た。
14. DNA の純度および濃度を分光光度計で確認した。

3.2.7. リアルタイム PCR 解析

3.2.6.項にて抽出した DNA を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。検出には *tufB* の配列を用いた。プライマーセット (表 3.3) は既報のプライマー配列を使用した (Wei *et al.*, 2004)。リアルタイム PCR の反応組成およびサイクル数は 2.2.5 項に従った。

表 3.3 ファイトプラズマの菌体増殖量の測定に用いたプライマ

プライマー	配列	目的
tuf1	5'-GCT AAA ACT TGT CCA CGT TGT ACG-3'	ファイトプラズマのリアルタイムPCR
tuf2	5'-CGG AAA TAG AAT TGA GGA CGG T-3'	ファイトプラズマのリアルタイムPCR

3.3. 結果

3.3.1. MscL のアミノ酸配列相同性解析

OY-MscL のアミノ酸配列をゲノムが解読されている他の3種のファイトプラズマおよび他の細菌がもつ MscL と比較し、アミノ酸の配列保存性を検討した。その結果、OY-MscL は OY ファイトプラズマと近縁な AY-WB の MscL と最もよく似た配列を持ち、93%の相同性を示した。ゲノムが解読されているその他のファイトプラズマ種である *P. australiense* および *P. mali* の持つ MscL と、OY-MscL との間でのアミノ酸配列相同性は、それぞれ 57%、38% であった (図 3.1)。これまでに MscL には2箇所の膜貫通ドメイン TM1 および TM2 が存在し、それらはホモログ間でアミノ酸配列の保存性が高いことが知られている (Balleza and Gómez-Lagunas, 2009)。具体的には、TM1 : [VIML]-D-[LM]-A-[VI]-[GA]-[VI]-[IV]-I-G-[AG]-A-F-[GTS]-x-I-V-x-[SA]-[LFV]-[VT]-x-D-[IVL]-[ILVF]-[MNT]-P-x-[IVL] および TM2 : Y-G-x-F-[IL]-x(3)-[IVLF]-[ND]-F-[LVI]-[IL]-[IVL]-A-F-x-[IVL]-[FY] というコンセンサス配列が特定されている。下線を記した2箇所のアミノ酸は、ファイトプラズマ属においてそれぞれアスパラギンおよびロイシンが保存されていたものの、他のコンセンサス配列は TM1 および TM2 とともに比較的良好に保存されていた (図 3.1)。したがって、ファイトプラズマの MscL は他の細菌と同様の膜貫通性を持つことが示唆された。

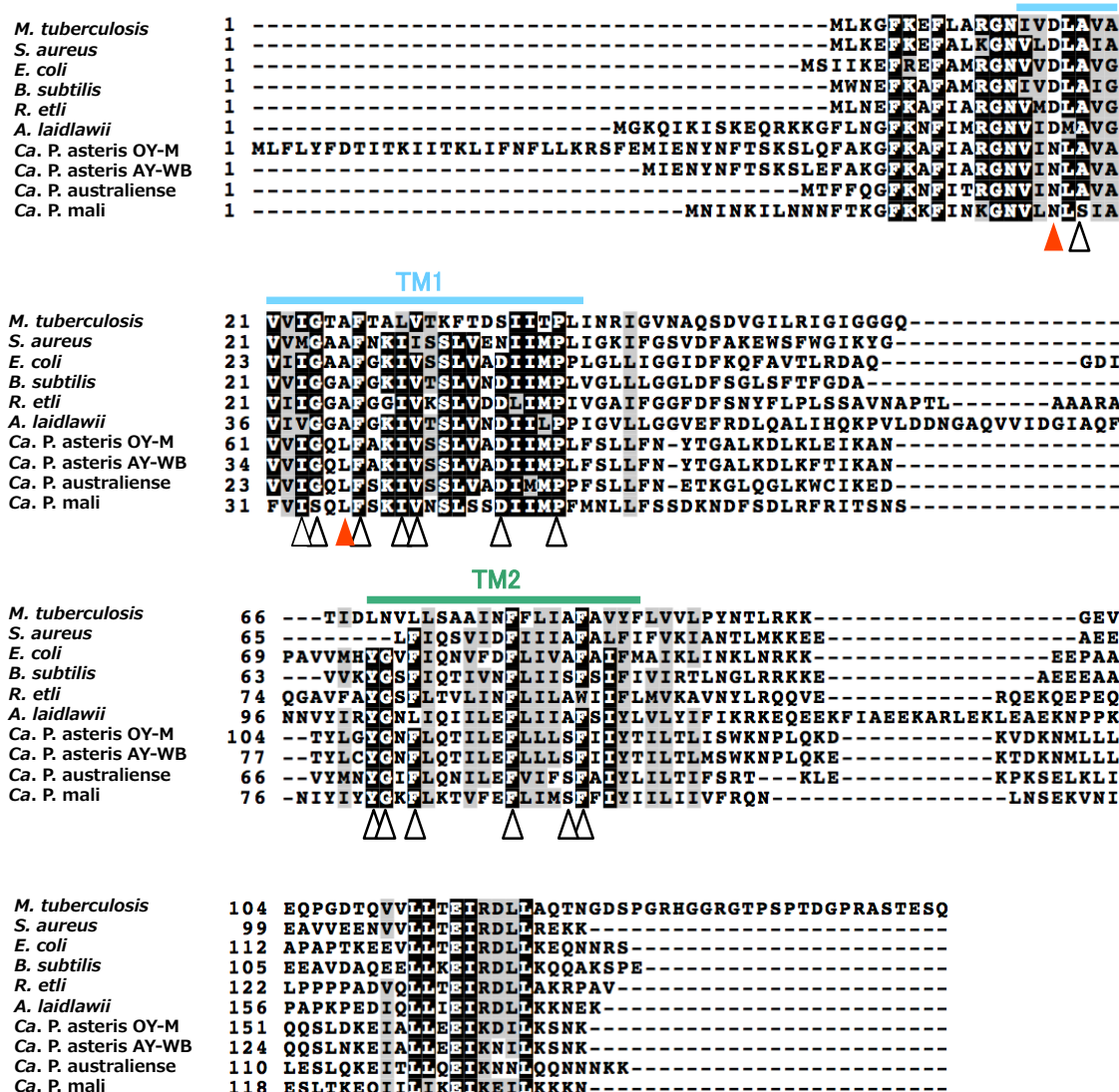


図 3.1 ファイトプラズマの MscL および他の細菌の MscL のアミノ酸配列

2 つの膜貫通ドメイン (TM1 および TM2) をそれぞれ青色と緑色で示した。保存性が高いとされるアミノ酸を矢頭で示した。そのうちファイトプラズマ属に特異的な配列を示した部位を赤色で示した。アライメント図に示した MscL を持つファイトプラズマ以外の細菌は *Mycobacterium tuberculosis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Rhizobium etli*、*Acholeplasma laidlawii* である。

3.3.2. *OY-mscL* の発現量解析

OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫から RNA を抽出し、逆転写を行って得られた cDNA を鋳型として、*OY-mscL* 遺伝子を増幅した。この検量線を用いて、抽出サンプルに含まれる初期 RNA 量を算出し、*OY-mscL* の相対的発現量を求めた。植物、昆虫それぞれについて 3 サンプルを用い、*tuf* 遺伝子を内部標準とした相対定量を行った結果、昆虫感染時と比較して植物感染時において有意に発現上昇しており、およそ 3 倍の発現量を示した (図 3.2)。

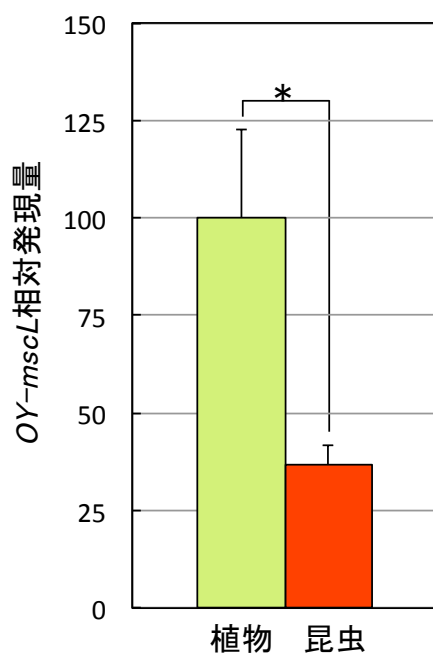


図 3.2 リアルタイム RT-PCR による *OY-mscL* 発現量の比較

植物感染時の *OY-mscL* 発現量を 100 としたときの相対発現量を示す。緑色は植物感染時、赤色は昆虫感染時の相対発現量を示す。内部標準には *tufB* を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。アスタリスクは有意水準 5% で有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$)。

3.3.3. 塩化ガドリニウム処理によるファイトプラズマ増殖量への影響

MscLの阻害剤である塩化ガドリニウムを植物体に処理しOYファイトプラズマを接種した際の、菌体増殖に与える影響を定量PCRによって調査した。実験は3反復行い、OYファイトプラズマの接種後4週間目まで7日ごとに葉を採取した。OYファイトプラズマ接種後4週間目の塩化ガドリニウム非処理区におけるOYファイトプラズマの菌体量を100として比較したところ、接種後3週間目において、塩化ガドリニウム非処理区におけるOYファイトプラズマの菌体量が50%にまで増加した一方、塩化ガドリニウム処理区におけるOYファイトプラズマの菌体量は18%となった(図3.3)。この差を t 検定によって検定したところ、 $p < 0.05$ で塩化ガドリニウム処理区におけるOYファイトプラズマの菌体量が有意に抑制されたことが示された。しかし、4週間目に採取した葉では、塩化ガドリニウム処理の有無に関わらずOYファイトプラズマの菌体量は同程度となった。

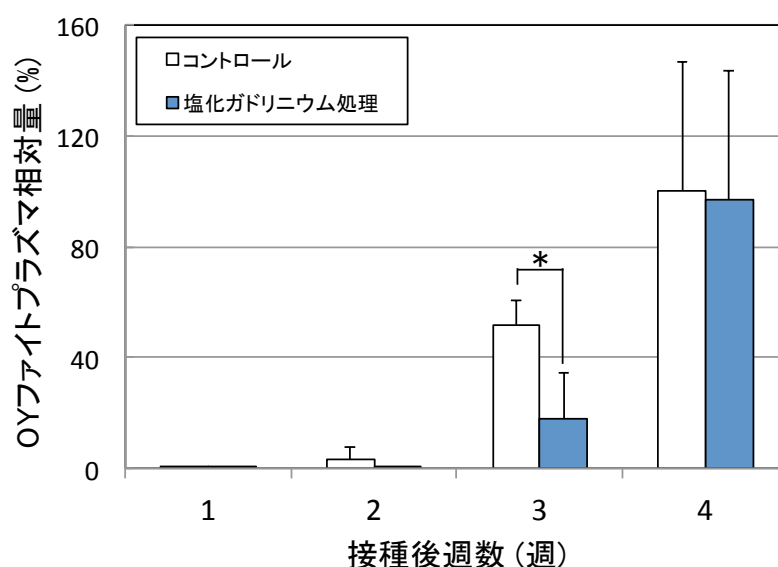


図 3.3 塩化ガドリニウム処理による植物内でのファイトプラズマ増殖への影響
白色はコントロール区 (DW)、青色は塩化ガドリニウム処理区におけるファイトプラズマ増殖量の相対値を示す。接種後4週間目の塩化ガドリニウム非処理区を100%とした。エラーバーは標準偏差を示す。アスタリスクは有意水準5%で有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$)。

3.4. 考察

3.4.1. ファイトプラズマにおける MscL の保存性

MscL は真性細菌の他、古細菌、糸状菌を含む広い生物種において保存されている (Balleza and Gómez-Lagunas, 2009)。 *Mollicutes* 綱に属するファイトプラズマにおいても、これまでにゲノムが解読されている 4 種のファイトプラズマには全て MscL が存在する (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)。またファイトプラズマと同じ *Mollicutes* 綱 *Acholeplasma* 目に属する *Acholeplasma laidlawii* のゲノムにも、MscL が存在する。したがって、退行的進化を遂げた *Mollicutes* 綱細菌の中でも、これまでにゲノム配列が解読されている全ての *Acholeplasma* 目細菌において MscL が確認されていることから、MscL は *Acholeplasma* 目細菌の生存に必要な因子として機能していることが示唆される。一方ファイトプラズマと同じく *Mollicutes* 綱に属するが目レベルで異なる *Entomoplasma* 目 *Spiroplasma* 属細菌では MscL を持つものは確認されていない。また同じく *Mollicutes* 綱に属する *Mycoplasma* 目の細菌では、MscL を持つものと持たないものが確認されている。例えば *Mycoplasma genitalium* は MscL を保持していない。しかし *M. genitalium* は浸透圧ストレスに曝されると多くの膜タンパク質をはじめとする遺伝子発現パターンが変化することから、MscL による浸透圧調節以外の機構によって浸透圧ストレスに適応していると考えられる (Zhang and Baseman, 2011)。

MscL は比較的アミノ酸配列が保存されている 2 箇所の膜貫通ドメインを持ち、ホモ 5 量体としてチャネルを形成する (Perozo, 2006)。OY ファイトプラズマを含む 4 種のファイトプラズマが保持する MscL のアミノ酸配列のアラインメントを行い、他の細菌の MscL 配列情報と比較したところ、保存性が高いとされるアミノ酸部位はおおむね保存されていたものの、ファイトプラズマ属に特異的な部位が 2 箇所存在していた (図 3.1)。本章における保存性の解析で得られた情報をもとに、今後 MscL の部位特異的な変異体を用いた活性解析を行うことにより、ファイトプラズマの生存における MscL の役割をさらに明らかにすることができるだろう。

3.4.2. ファイトプラズマにおける MscL の機能

自然環境下において細胞は、常に変化する温度や pH、浸透圧に適応しなければならない。そのため、環境の変化に適応するメカニズムは細菌の生存にとって重要である。MscL は膜の機械的な伸長を感知し、細菌が生育する環境の急激な浸透圧の低下から細胞を守るために欠かせない役割を果たしていると考えられている (Kung *et al.*, 2010)。例えば、*E. coli* における *mscL* の発現量は、浸透圧条件の急激な変化とともに変動する (Stokes *et al.*, 2003)。ファイトプラズマが局在する篩部細胞の浸透圧は昆虫の血リンパの 2~5 倍であると言われている (Douglas, 2006)。また篩部細胞における浸透圧の主要な構成要素である糖やアミノ酸窒素等の光合成産物は、ソース葉からシンク葉へと輸送されているほか、光合成産物の濃度は植物の生育段階やストレス応答に依存して劇的に変化することが知られている (Rolland *et al.*, 2006)。これらのことからファイトプラズマは宿主への感染過程において浸透圧の大きな変動に曝されていると考えられる。本章にて行ったリアルタイム RT-PCR 解析により、OY-*mscL* は昆虫感染時と比較し植物感染時において発現量が 3 倍に増加していることが明らかとなった。また、MscL を阻害するとファイトプラズマの感染初期における増殖が抑制されることが明らかとなった。したがってファイトプラズマは MscL の発現を制御し、機能させることにより、宿主細胞内環境の浸透圧に適応していることが示唆された。

3.4.3. MscL の発現とファイトプラズマの増殖

MscL の阻害剤である塩化ガドリニウム (Berrier *et al.*, 1992) を処理した植物におけるファイトプラズマの増殖量を経時的に調べたところ、接種 3 週間後における塩化ガドリニウム処理区での OY ファイトプラズマの増殖量が有意に抑制された (図 3.3)。また、有意差は無いものの、2 週間後においても OY ファイトプラズマの増殖量がコントロール区と比較して抑制される傾向が見られた。このことから OY-MscL は植物宿主細胞内での OY ファイトプラズマの初期増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。ただし接種 4 週間後では、OY ファイトプラズマの菌体量は塩化ガドリニウム非処理区の植物と処理区の植物とで同程度となった。これは塩化ガドリニウムがファイトプラズマの増殖を持続的に抑制することができないことを示している。この理由として、植物体内の塩化ガドリニウム濃度が一定でないこと、塩化ガドリニウムの投与量が

少なかったことが考えられる。つまり、接種3週間後まではファイトプラズマの存在量に対してガドリニウム投与量が十分であったために増殖を抑えることができたが、その後も与えたガドリニウム量は一定であったため、接種4週間以降増殖したファイトプラズマに対するガドリニウム量が相対的に減り、ファイトプラズマの増殖を抑制することができなくなったと考えられる。

今後、塩化ガドリニウム投与時期や濃度、塩化ガドリニウム投与時におけるファイトプラズマの植物内での局在について詳細に検討し、以上の可能性について解析を進めることで、ファイトプラズマの感染戦略を明らかにし、防除法の開発につなげることができると考えられる。

第4章 ファイトプラズマにおける活性酸素種分解酵素の活性解析

4.1. 序文

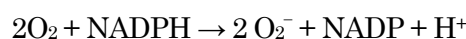
4.1.1. 活性酸素種の生成とその影響

酸素 (O_2) は安定な基底状態の分子であるが、部分的に還元された酸素を含み反応性に富む酸素種を活性酸素種 (reactive oxygen species) という。狭義にはスーパーオキシドラジカル (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2) を指す。活性酸素種は強い酸化力を持ち、酵素の失活や細胞の損傷を引き起こす。例えば O_2^- は、TCA 回路のアコニターゼ、フマラーゼなどの酵素の構成因子である鉄硫黄タンパク質と反応し、鉄イオンを奪う (Wang *et al.*, 2007)。また O_2^- から生じる H_2O_2 は、鉄イオンを触媒とするフェントン反応によって $\cdot OH$ を生成するが、この $\cdot OH$ は核酸などの生体分子に直接損傷を与えることが知られている (Imlay, 2003)。このように活性酸素種は強い細胞毒性を示すが、活性酸素種は好気呼吸の代謝系に含まれる脱水素酵素の自己酸化や、光合成に伴う過剰な還元力によっても生じることから (Asada, 1999)、好氣的な環境で生息する生物にとって、活性酸素種の産生は不可避である。

4.1.2. 活性酸素種を介した宿主と病原体の相互作用

活性酸素種は、恒常的な代謝系から生じるのみならず、病原体への防御応答としての機能も担う。病原細菌が感染した場合、宿主細胞は NADPH oxidase を用いて O_2^- を大量に発生させる (Lamb & Dixon, 1997; Moller, 2001; Imlay, 2003)。 O_2^- およびそれに由来する活性酸素種の大量放出は、oxidative burst と呼ばれる (Wojtaszek, 1997)。

動物における oxidative burst では、脊椎動物の好中球やマクロファージといった食作用をもつ細胞が細菌を取り込み、これらの細胞の NADPH oxidase が酸素を還元することによって O_2^- を産生する (Beutler, 2004)。NADPH oxidase による O_2^- の生成反応は以下の化学反応式によって表される。



非脊椎動物である昆虫の場合、血球が同様の機能を担い、活性酸素種によって病原体の感染に対抗する。非脊椎動物における活性酸素種産生メカニズムは、マラリア原虫 *Plasmodium berghei* の媒介昆虫であるガンビアハマダラカ *Anopheles gambiae* などを対象として研究が進められている。*A. gambiae* は、血リンパ中に活性酸素を蓄積させることによって *P. berghei* や病原細菌を攻撃すると考えられている (Molina-Cruz *et al.*, 2008)。

植物における oxidative burst は、原形質膜に存在する NADPH oxidase が、 O_2^- を産生することによって起こる (Doke, 1985; Doke & Miura, 1995)。細菌など病原体の侵入を受けた植物は、病原体の細胞壁を構成する糖質や、病原体のもつ非病原遺伝子産物を認識する。病原体の侵入を認識した植物細胞では、リン酸化反応によって NADPH oxidase へとシグナルが伝達され、 O_2^- が産生される。 O_2^- は病原体に直接的な損傷を与えうが (Doke *et al.*, 1996)、さらに抵抗性反応を誘導するシグナルとしても機能する。 O_2^- 由来のシグナルを受容した細胞では、感染時特異的 (pathogen-related, PR) タンパク質の発現誘導や、抗菌性物質であるファイトアレキシンの蓄積、架橋構造の形成による細胞壁の強化、過敏細胞死等の抵抗性反応が誘導される。特に過敏細胞死は、 H_2O_2 処理によっては誘導されず、 O_2^- によってのみ誘導されることが知られており、 O_2^- はより強力なシグナルであることを示す例と言える (Levine *et al.*, 1994)。

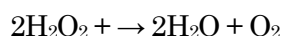
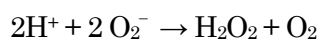
4.1.3. 活性酸素種分解酵素の役割

活性酸素種を分解する酵素は細胞を活性酸素種による損傷から保護する機能をもち、多くの生物が活性酸素種分解酵素を保持している。4.1.1.項の通り、昆虫や植物等の真核生物だけでなく、原核生物である細菌の場合も、好気的な環境に生息する限り、呼吸関連の代謝系に由来する活性酸素種の産生を免れ得ない。特に病原細菌の場合、自らの代謝系の副産物として生じる活性酸素種だけでなく、宿主の防御応答によって外的に発生する活性酸素種にも対処する必要がある。そのため、活性酸素種分解酵素は、病原微生物の生存や病原性にとって非常に重要である (Halliwell, 1974)。

そこで、活性酸素種による損傷から自身を保護するため、多くの生物は細胞内で発生した活性酸素種を分解する酵素を備えている。活性酸素種分解酵素には、superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、peroxidase (POX) などが代表的な活性酸素種分解酵素であり、幅広い生物種に

存在する (Michiels *et al.*, 1994)。また、アスコルビン酸、トコフェロールといった各種ビタミンや、グルタチオンのような化学物質も、活性酸素種から生体物質を保護する機能を果たすことが知られている。これらの物質と活性酸素種分解酵素を総称して、抗酸化物質と呼ばれる。

これらの抗酸化物質のうち SOD は O_2^- を分解し、毒性の低い活性酸素種である H_2O_2 を生成する酵素である (Fridovich, 1995)。分解産物として生じる H_2O_2 も活性酸素種の一つであり、CAT と POX がこれを水と酸素に分解し、完全に無毒化する。一連の反応は以下の式によって表される。



SOD は活性中心に金属イオンを配位して機能する。中心金属には Mn、Fe、Cu/Zn、Ni が発見されており、それぞれ Mn-SOD、Fe-SOD、Cu/Zn-SOD、Ni-SOD と呼称される (Rosen, 1993; DiDonato *et al.*, 2003; Majoor-Krakauer *et al.*, 2003; Andersen, 2006; Wang *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2010)。ヒトの場合、細胞質に Mn-SOD をもち、ミトコンドリアに Cu/Zn-SOD をもつ。植物はこれに加え、葉緑体に Fe-SOD をもつ。細菌の中にも、複数種類の SOD をもつものが存在し、例えば大腸菌の場合、Mn-SOD、Fe-SOD、Cu/Zn-SOD の3種を備えている。大腸菌においては、細胞内局在や遺伝子発現調節の違いから、これらの SOD はそれぞれ異なった機能を担っていると考えられている (Imlay & Imlay, 1996)。

病原細菌の SOD がもつ機能については、動物病原細菌を用いて研究が進められており、*Salmonella enterica* の Cu/Zn-SOD が細菌の病原性に関与することが知られている (Fang *et al.*, 1999)。一方で、植物病原細菌において SOD が宿主の攻撃を回避する例としては、*Agrobacterium tumefaciens* の Fe-SOD がある。*A. tumefaciens* の *sodBI* がコードする Fe-SOD は、活性酸素種が存在する環境下で細菌の生存率を高め、宿主植物に腫瘍を形成させるためにも必要であることが明らかとなっている (Saenkham *et al.*, 2007)。

4.1.4. ファイトプラズマの SOD

他の病原細菌と同様に、ファイトプラズマも宿主からの防御応答を受けると考えられる。特に

ファイトプラズマは、細胞壁を持たず宿主細胞内に寄生するため、宿主由来の活性酸素種による直接的な損傷を受けやすい環境にあり、この損傷を回避することは感染の成立に重要であると考えられる。

SOD をコードする遺伝子はこれまでゲノムが解読されている 4 系統のファイトプラズマ全てにおいて存在が確認されている (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008)。そのため、SOD はファイトプラズマに共通した重要な機能を担っている可能性が高いと考えられる。OY ファイトプラズマが保持する *sod* (OY-*sodA*) の病原性や増殖への関与は未知であるが、OY ファイトプラズマは OY-SOD を用いて O_2^- を分解することで、宿主細胞内という絶えず活性酸素種に曝される環境での生存を可能にしている可能性が推察される。

本章では、OY-SOD が宿主体内で活性酸素種分解酵素として機能するかどうかを明らかにすることを目的とした。そのため、植物および昆虫感染時における OY-SOD の発現を、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで確認した。さらに、大腸菌を用いて大量発現し、精製した OY-SOD タンパク質を用いて *in vitro* における活性酸素種分解酵素活性を解析した。これらの結果を、他の近縁な細菌における SOD の有無と、それらの活性酸素種への対抗戦略に関する知見と比較、考察し、ファイトプラズマの生存における SOD の寄与について検証した。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 供試ファイトプラズマ、植物、昆虫

本章における SOD の機能解析では、2.2.1.項と同様の条件で接種および管理した OY ファイトプラズマ感染植物および昆虫を使用した。

4.2.2. SOD の相同性比較

GenBank に登録されているファイトプラズマの SOD ホモログおよび他の細菌の SOD の配列を用いて相同性解析を行った。アミノ酸配列のアラインメントおよび相同性解析は 3.2.2.項に従った。解析に用いた種およびアクセッションナンバーは以下の通りである。

表 4.1 解析に用いた SOD ホモログ

生物名	アクセッション番号
Phytoplasma asteris OY-M	BAD04527
P. asteris OY-W	BAM66624
P. asteris AY-WB	ABC65443
P. australiense	CAM12170
P. mali AT	CAP18655
<i>Escherichia coli</i> Mn-SOD	AAC76890
<i>Escherichia coli</i> Fe-SOD	AAC74728
<i>Escherichia coli</i> Cu/Zn-SOD	AAC74718
<i>Xylella fastidiosa</i>	AAF84727
<i>Lactococcus lactis</i>	KGF76448
<i>Streptococcus pyogenes</i>	EZN34550
<i>Bacillus subtilis</i>	KFH36845
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ABX80924

4.2.3. RNA 抽出

2.2.2.項に従い OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫から RNA を抽出した。

4.2.4. リアルタイム RT-PCR 解析

4.2.3.項にて抽出した RNA を用いて 2.2.5.項に従い *OY-sod* のリアルタイム RT-PCR 解析を

行った。用いたプライマーを表 4.2 に示す。内部標準には 2.2.5 項と同様に *tufB* の配列を用いた。

表 4.2 *OY-sod* の発現量解析に用いたプライマー

プライマー	配列	目的
OY-sodA-RTF	5'-TAA TGG TGG CGG ACA TTT TAA TC-3'	<i>OY-sod</i> のリアルタイム RT-PCR
OY-sodA-RTR	5'-TAT AGA ACC AAA TTC GCA GTC AAT C-3'	<i>OY-sod</i> のリアルタイム RT-PCR

4.2.5. DNA 抽出

3.2.6. 項に従い OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫から DNA を抽出した。

4.2.6. SOD 発現ベクターの構築

OY-SOD の全長または一部を PCR 増幅し、大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。大腸菌での遺伝子発現ベクターとしては、目的タンパク質の C 末端側に 6 個のヒスチジンタグ (His-tag) を付加し、37°C で発現させる pET30a (+) を使用した。本ベクターはラクトースリプレッサーによる転写制御系を利用したタンパク質発現ベクターであり、目的タンパク質の転写には転写能力の強い T7 ファージ由来の RNA Polymerase を用いていることから、目的タンパク質の高発現に適している。具体的な方法は以下の通りである。

1. OY-SOD の全長および部分長を増幅するプライマーセットを設計した (表 4.3)。プライマーにはそれぞれ *NdeI* と *XhoI* の制限酵素認識サイトを付加した。
2. 3.2.6. と同様の手順で抽出した DNA をテンプレートとし、手順 1 で設計したプライマーセットを用いて OY-SOD を PCR 増幅した。PCR 反応溶液の組成およびサイクル数を以下に示す。

KOD (東洋紡)	3 μ l			
KOD PCR 用 10 \times PCR Buffer (東洋紡)	5 μ l	94°C	2:00	
Primer Foward (5 μ M)	3 μ l	94°C	0:15	} \times 35 サイクル
Primer Reverse (5 μ M)	3 μ l	55°C	1:00	
Template DNA	2 μ l	68°C	1:00	
10 mM dNTP	5 μ l	68°C	7:00	
MgSO ₄	3 μ l	4°C	∞	
DW	26 μ l			
Total volume	50.0 μ l			

- PCR 産物をフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈澱を行った。
- 適当量の滅菌水で溶解した。
- 増幅断片を *Nde*I および *Xho*I の両酵素により切断した。
- 1.7%アガロースゲルで電気泳動し、EtBr で染色後、UV 照射下で目的のサイズのバンドを切り出した。
- 切り出したゲルから Ultra Clean Gel DNA Extraction Kit (MO-BIO) を用いて DNA 断片を精製し、インサートとした。精製プロトコルは付属のマニュアルに従った。
- 同様に pET30a ベクターを *Nde*I および *Xho*I の両酵素により切断してゲル精製を行った。
- 精製したインサートとベクターを Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて 16°C、5 分間ライゲーションさせた。
- ライゲーション後のサンプルに 100 μ l の *E. coli* DH5 α コンピテントセル (TaKaRa) を氷上で混合し、30 分間静置した。
- 42°C で 45 秒間熱ショックを与えた。
- 氷上で 5 分間静置した後、SOC 培地 [1000 ml 当たりの組成: 0.5 g NaCl、20 g Bacto-tryptone、5 g Yeast extract、終濃度 2.5 mM KCl、終濃度 10 mM MgCl₂、終濃度 10 mM MgSO₄、終濃度 20 mM glucose (pH7.0)] を 1 ml 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。
- 大腸菌を LB プレート培地 (1000 ml 当たりの組成: 10 g Bacto-tryptone、5 g Yeast extract、

- 10 g NaCl、15 g Agarose、100 µg/ml Ampicillin) に塗布して 37°C で 1 晩静置した。
14. いくつかのコロニーを YT/Ampicillin 液体培地 (1000 ml 当たりの組成 : 16 g Bacto-tryptone、10 g Yeast extract、5 g NaCl、100 µg/ml Ampicillin) にて 37°C で 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。
- プラスミドを *NdeI* および *XhoI* で切断し、インサートのチェックを行った。
15. 目的のインサートが挿入されていると考えられたクローンをいくつか選抜し、シーケンスにより配列を確認した。シーケンスには pET シーケンス用プライマーセットを用いた (表 4.2)。シーケンスリアクション反応溶液の組成およびサイクル数は以下の通りである。

PreMix (Applied Biosystems)	0.05 µl	96°C	3:00	} ×25 サイクル
5 × Seq Buffer (Applied Biosystems)	1.0 µl	96°C	0:15	
Primer (5µM)	0.8 µl	50°C	0:05	
Template DNA	50-250 ng	60°C	4:00	
DW	up to 10 µl	4°C	∞	
Total volume	10.0 µl			

- リアクション後のサンプルは Sephadex G-50 SuperFine (Applied Biosystems) によりカラム精製し、乾燥させた後 15 µl のホルムアミドに溶解し、PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて配列の解読を行った。
16. 目的の配列が挿入されていたクローンを選び、*E. coli* BL21 (DE3) コンピテントセルに形質転換した。形成したコロニーを 5 ml の YT/Ampicillin 培地にて 37°C で 16 時間振盪培養し、50%グリセロールと菌培養液を 1:1 で混合したものをグリセロールストックとして -80°C に保存した。以後これを実験に用いた。

表 4.3 OY-SOD のクローニングおよび配列確認に用いたプライマー

プライマー	配列	目的
OY-sodA-F	5'-AGA ATT CCA TAT GAA CTT TAC TCT ACT TTC TCT-3'	全長および部分長OY-SODの発現
OY-sodA-R1	5'-TGA GCT CGA GTT TTA ATG CTT GAG TAA GGT TAT-3'	全長OY-SODの発現
OY-sodA-R2	5'-TGA GCT CGA GTC CTT GGT TTA GAA CTA CAT CTT G-3'	部分長OY-SODの発現
T7 promoter primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'	インサートの配列確認
T7 terminator primer	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'	インサートの配列確認

下線は制限酵素サイトおよびその付加配列を示す。

4.2.7. SOD の大量発現および精製

2.2.4.項で構築した OY-SOD 発現ベクターを導入した大腸菌株を用いて OY-SOD の大量発現および His-tag 精製を行った。OY-SOD は不溶性画分に多く存在することが確認されたことから、精製には不溶性画分を用いた。具体的な方法は以下の通りである。

1. OY-SOD 全長および部分長をコードする領域が挿入された pET30a ベクターを持つ BL21 株のグリセロールストックをそれぞれ 5 ml の YT/Ampicillin 液体培地に植え継ぎ、前培養として 37°C で一晩振盪培養した。
2. 新しい 100 ml の YT/Ampicillin 液体培地に、前培養した培養液を 1 ml 加え、37°C で振盪培養した。
3. OD₆₀₀ = 0.7 付近になるまで培養した。
4. IPTG を終濃度 1 mM となるように加え、37°C で 3 時間振盪培養した。
5. 全ての培養液を 50 ml チューブに回収し、3,000×g、4°C で 15 分間遠心した。
6. 上清を除去し、沈殿した菌体に 50 ml の培養液あたり 8 ml の Binding buffer [500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM imidazole] を加えて懸濁した。
7. 超音波ホモジナイザーを出力 30%、パルス ON 10 秒、パルス OFF 30 秒に設定し、氷上で菌体を破碎した。
8. 破碎液を 12,000×g、4°C で 15 分間遠心し、不溶性画分（沈澱）を回収した。
9. 不溶性画分を 10 ml の Binding buffer で再懸濁した。
10. 懸濁液を 12,000×g、4°C で 15 分間遠心し、上清を捨て、不溶性画分を回収した。
11. 不溶性画分に 6 M Urea を含む Binding buffer を 5 ml 加え、よく懸濁した後、4°C で 1 時間静置した。
12. Empty Disposable PD-10 Columns (GE ヘルスケア) に Ni-NTA Agarose (Qiagen) を 2 ml 入れ、カラムを作製した。
13. アガロース担体を 3 ml の滅菌水で洗浄した。
14. アガロース担体に 5 ml の Charge buffer (50 mM NiSO₄) を送液し、担体にニッケルイオンを結合させた。
15. 3 ml の Binding buffer を送液し、カラムを平衡化した。
16. 手順 11 で調整した不溶性画分のタンパク質溶液をカラムに送液した。多くのタンパク質をカラムへ結合させるため、素通り画分を再度カラムに送液した。これを計 3 回繰り返した。

17. 10 ml の Binding buffer を送液してカラムを洗浄した。
18. 6 ml の Wash buffer [500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、60 mM imidazole] を送液し、カラムを洗浄した。
19. 6 ml の Elution buffer [500 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、1 M imidazole] を送液して His-tag が付加された RpoDoy を溶出した。
溶出したサンプルを SDS-PAGE 法および CBB 染色法により検出し、精製の可否を確認した。

4.2.8. 抗 SOD 抗体作製

SOD は真核生物にも広く保存されていることから、OY-SOD 全長配列を抗体として用いた場合、ファイトプラズマの宿主であるシュンギクおよびヨコバイの保持する SOD が反応する可能性が想定された。そこで保存性の高い C 末端側を除いた OY-SOD 部分長を抗体として用いることとした。精製した部分長 OY-SOD を家兎に免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清から Protein A column (Bio-Rad) を用いて IgG を精製した。具体的な手順は以下の通りである。

1. Protein A カラムを室温に戻し、Protein A カラム内に入っているバッファーを溶出させ、Running buffer [50 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Sodium Azide] を 10 ml 流し、平衡化した。
2. 抗血清 1 ml と Running buffer 1 ml とを混ぜたサンプルをカラムにアプライし、Running buffer を 10 ml×2 回流し、カラムを洗浄したのち Eluting buffer (100 mM Glycine-HCl、pH 3.0) を 12 ml 流し、抗体を溶出させる。このとき、溶出画分を 1 ml ずつ fractionation した。
3. 溶出した画分の O.D.₂₈₀ を分光光度計でそれぞれ測定し、下に示したように IgG タンパク質濃度を測定した。
4. IgG が多量に含まれていた画分に Neutralizing buffer (1 M Tris-HCl、pH 9.0) を加えて、pH を 7~8 に合わせ、Running buffer を 20 ml×2 回流し、カラムを洗浄したのち、カラムに Running buffer を溜めて、4°C に保存した。
5. 分光光度計で 280 nm の吸収を測定した。紫外吸光法による IgG タンパク質濃度の計算は以下の通りである。

Sample 5 µl + Eluting buffer 45 µl (Blank は Eluting buffer)

$$\text{IgG} = \frac{\text{O.D. 280 nm の値}}{1.445} \times 10 \text{ (mg/ml)}$$

4.2.9. タンパク質抽出

OY ファイトプラズマ感染植物、健全植物、感染昆虫、健全昆虫それぞれ 0.3 g を液体窒素で摩砕し、1 ml の sample buffer (60mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% SDS, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 6% 2-mercaptoethanol) を加え、さらに摩砕した。5 分間超音波処理を行った後、12,000×g、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を回収し、可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析に供試した。

4.2.10. 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行った。分子マーカーとして、Prestained SDS-PAGE Standards (BIO-RAD) を用いた。ウェスタンブロット解析の具体的な方法は以下の通りである。

1. 電気泳動槽にポリアクリルアミドゲル [Stacking ゲル; 4.5%ポリアクリルアミド、124 mM Tris-HCl (pH 6.8)、0.1% SDS; Running ゲル; 15%ポリアクリルアミド、373 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.1% SDS] をセットし、泳動バッファー (25 mM Tris、190 mM glycine、0.1% SDS) を満たした。
2. ゲル 1 レーンあたり 20 µl の調整サンプルをロードし約 15-20 V/cm となるよう 25mA/ゲルの固定電流で 70 分泳動した。
3. SDS-PAGE 後の泳動ゲルを、Blotting buffer (100 mM Tris、192 mM Glycine、20% (v/v) Methanol) に浸した。
4. SDS-PAGE の泳動ゲルとほぼ同じ大きさに切った厚手の濾紙を、同様に Blotting buffer に浸した。
5. SDS-PAGE の泳動ゲルとほぼ同じ大きさに切った polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) を、100% Methanol に 1 分間浸し、続いて Blotting buffer に浸した。
6. セミドライ式のブロッキング装置 (BIO-RAD) に、濾紙、メンブレン、ゲル、濾紙を重ねた。
7. 電極を定電圧にセットし、10 V 30 分間に続いて、15 V 30 分間のブロッキングを行った。

8. ブロッキングの終わったメンブレンを Blocking buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Tween20、5% (v/v)] スキムミルクに浸けて室温で1時間振盪し、タンパク質がブロッキングされていないメンブレン表面にスキムミルクを結合させてブロッキングを行った。
9. ブロッキング後のメンブレンを TBST [20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% (v/v)] で軽くすすいだ。
10. 1次抗体溶液 (TBST に、30 μ g/ml 抗体、および0.5% (v/v) スキムミルクを加えたもの) にメンブレンを浸し、25°C で1時間ゆるやかに振盪した。
11. メンブレンを TBST で3回洗った。
12. 2次抗体溶液 (2次抗体を TBST で 1/5,000 に希釈したもの) にメンブレンを浸し、25°C で1時間ゆるやかに振盪した。2次抗体は、horseradish peroxidase で標識された抗ウサギ抗体 (Amersham Biosciences) を用いた。
13. メンブレンを TBST で3回洗った。
14. メンブレンを ECL Western Blotting Reagent Pack (Amersham Pharmacia Biotech) に浸けた後、ハイブリバックに封じた。
15. LAS-1000 (FUJIFILM 社) システムを用いてシグナルを検出した。

4.2.11. SOD の酵素活性測定

SOD の基質となる O_2^- は非常に不安定であることから、SOD 活性を直接測定するのは困難である。そこで、nitroblue tetrazolium (NBT) の還元反応を利用して間接的に SOD 活性を測定する NBT 法が知られている (図 4.1) (Beauchamp & Fridovich, 1971)。xanthine と O_2 が存在する反応系に xanthine oxidase を加えると、xanthine が酸化されて uric acid と H_2O_2 および O_2^- が生成される。この反応系では一定期間 O_2^- が生成されるが、NBT が混在して存在する場合、 O_2^- によって NBT が還元されて blue formazan が生成される。本来、この混合液は NBT に由来して薄黄色を呈するが、この還元反応の結果、blue formazan (吸収極大 560 nm) の濃青色を呈色する。しかし、上記混合液に SOD 活性を持つ物質が含有されていると、生成された O_2^- は H_2O_2 と O_2 に分解されるために NBT は還元されず、結果として混合液の呈色が抑えられる。この呈色の抑制程度を計測することで間接的に SOD 活性を測定することが可能となる。

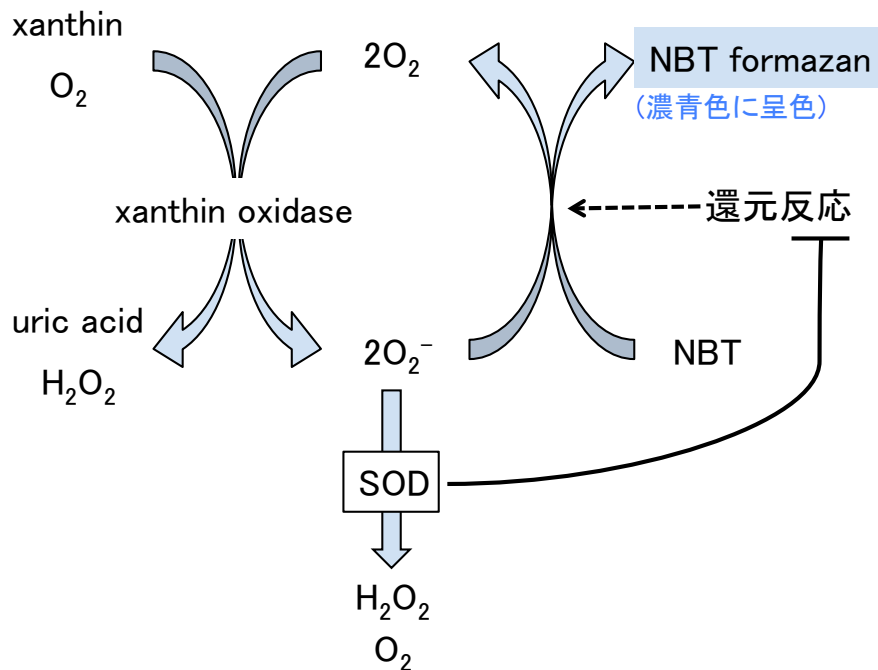


図 4.1 NBT 法による SOD 活性測定の原理

xanthine oxidase により生成される O_2^- が NBT を還元して濃青色を呈する NBT formazan となる条件下において、SOD がその還元反応を抑制する度合いを呈色反応で評価することにより、SOD 活性を測定する。

具体的な方法を以下に示す。

1. NBT 試験用反応液 (2.5×10^{-5} M nitroblue tetrazolium, 1×10^{-4} M EDTA, 0.05 M Na_2CO_3 , pH 10.2) を調整し、1 ml ずつ分注した。
2. 反応液にサンプル (総量 0.5 ml 以下) を加え、DW で 1.5 ml にメスアップした。
3. 反応液をウォーターバスで $25^\circ C$ に保った。この時点での $O.D._{560}$ を計測し Blank とした (A_1)。
4. 反応液に $25^\circ C$ に保った xanthine oxidase (SIGMA) を 10 μ l 添加した。
5. xanthine oxidase 添加 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6 min 後にそれぞれ $O.D._{560}$ を

計測した。計測は1サンプルにつき3反復行った。

2、3、4、6 分後における O.D.₅₆₀測定値の平均を A₂ とし、測定された A₁ 及び A₂ の値から O.D.₅₆₀ の変化量 ΔA を算出した。

$$\Delta A (\text{Abs}_{560}) = A_2 - A_1$$

サンプルの ΔA を、サンプルを加えず DW のみを用いて測定した場合の ΔA（これを ΔA₀ とする）と比較することによって、NBT 還元 の抑制率 (inhibitory rate, IR) を算出した。

$$\text{IR} (\%) = (1 - \Delta A / \Delta A_0) \times 100$$

本項で示した条件下で、抑制率 50%となる SOD 量を 1 unit と定め、IR 及びサンプルのタンパク質濃度 (Conc.) を以下の式に代入することにより、サンプル中のタンパク質 1 mg あたりの SOD 活性 (U) を決定した。

$$U (\text{unit/mg}) = \text{IR} / [50 \times 1.5 (\text{ml}) \times \text{Conc.} (\text{mg/ml})]$$

4.2.12. SOD の酵素活性阻害

SOD は、その活性中心となる金属によってシアン化カリウム (KCN) や H₂O₂ 等の阻害剤に対する反応性が異なる。例えば KCN は Cu/Zn-SOD の活性を阻害するが、Mn-SOD の活性を阻害しない (Fridovich, 1975)。また H₂O₂ は Cu/Zn-SOD および Fe-SOD の活性を阻害するが、Mn-SOD の活性を阻害しない (Dos Santos *et al.*, 2000)。したがって NBT 試験反応液にこれらの阻害剤を加えたときの SOD の活性に与える影響を比較することにより、未知の活性中心金属を判別することが可能である。そこで、4.2.11.項にて行った NBT 法において xanthine oxidase を投入する前に KCN および H₂O₂ をそれぞれ終濃度 1 mM、5 mM となるように加える試験区を設定し、4.2.11 項と同様の方法で OY-SOD の活性を測定した。コントロールとして *Bacillus* 属細菌由来の Mn-SOD、*E. coli* 由来の Fe-SOD、*Homo sapiens* 由来の Cu/Zn-SOD を用いた (Sigma-Aldrich)。

4.3. 結果

4.3.1. SOD の相同性比較解析

OY ファイトプラズマの SOD のアミノ酸配列を、ゲノムが解読されている他のファイトプラズマ及び他の細菌がもつ SOD のものと比較し、保存性を検討した。はじめに、OY ファイトプラズマの 2 つの分離株である OY-W と OY-M において SOD のアミノ酸配列を比較したところ、99%の相同性を示した。本章では今後 OY ファイトプラズマとして OY-W 分離株の配列を使用し、解析を行った。同様に OY-SOD に対する AY-WB、*P. australiense*、*P. mali* における SOD のアミノ酸配列を比較したところ、それぞれ 92%、73%、64%であり、OY ファイトプラズマと同じ種に属する AY-WB と高い配列同一性を示した (図 4.2)。

SOD の活性中心金属は大きく Mn、Fe、Cu/Zn に分類されるが、OY-SOD はこれらのうちのどの型の SOD と最も類似するかを調べるため、*E. coli* の保持する Mn-SOD、Fe-SOD、Cu/Zn-SOD と配列を比較した。その結果、OY-SOD は Mn-SOD とは 48.2%、Fe-SOD とは 41.5%、Cu/Zn-SOD とは 12.7%の配列同一性を示した。したがって OY-SOD は Mn-SOD と最も類似することが示された。一般に、Mn-SOD が Mn を結合するためには 3 つの His と 1 つの Asp が必須であり、この 4 アミノ酸は各生物種の Mn-SOD 間で高度に保存されている (Bannister *et al.*, 1987)。また、Mn-SOD に保存された配列の特徴として、C 末端側の 10 アミノ酸 Leu-Asp-Val-Trp-Glu-His- Ala-Tyr-Tyr-Leu が保存されていることが報告されている (Wong-Vega *et al.*, 1991)。今回アミノ酸配列を比較した、OY ファイトプラズマと他の 4 系統のファイトプラズマの持つ全ての SOD ではこれらの配列が保存されていた (図 4.2)。

4.3.2. *sod* のリアルタイム RT-PCR 解析

OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫から RNA を抽出し、逆転写を行って得られた cDNA を鋳型として、*OY-sodA* 遺伝子を増幅した。この検量線を用いて、抽出サンプルに含まれる初期 RNA 量を算出し、*OY-sodA* の相対的発現量を求めた。植物、昆虫それぞれについて、3 サンプルを用い、*tuf* 遺伝子を内部標準とした相対定量を行った結果、植物感染時において昆虫感染時よりも発現量が多くなる傾向を示したものの、有意な差は見られなかった (図 4.3)。したがって、*OY-sodA* は植物宿主内においても昆虫宿主内においてもほぼ同程度発現しており、OY-SOD は宿主を問わず発現し機能していることが示唆された。

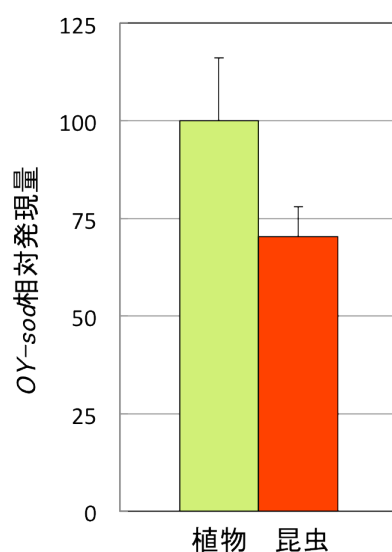


図 4.3 リアルタイム RT-PCR 解析による *OY-sod* の発現量の比較

植物感染時の *OY-sod* 発現量を 100 としたときの相対発現量を示す。緑色は植物感染時、赤色は昆虫感染時の相対発現量を示す。内部標準には *tufB* を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

4.3.3. SOD 発現ベクターの構築、発現、精製

OY ファイトプラズマ由来の *sodA* 遺伝子の全長を His-tag との融合タンパク質として、大腸菌で大量発現させたところ、そのほとんどが不溶性画分で検出された (図 4.4)。そこで不溶性画分を Ni^{2+} カラムによりアフィニティー精製を行うことで、OY-SOD タンパク質の精製を行った。カラムに通した後のサンプルを SDS-PAGE により分離した (図 4.5)。その結果、OY-SOD タンパク質の推定分子量と同じ 23 kDa 付近に単一のバンドが検出されたため、全長 OY-SOD タンパク質が精製されたものと考えられた。得られた全長 OY-SOD は、NBT 法による酵素活性測定に用いた。

同様の方法で、抗 OY-SOD 抗体作製のための部分長 OY-SOD を得た。Mn-SOD は真核生物においても広く存在するため、ファイトプラズマの宿主であるシュンギクおよびヨコバイもそれぞれ Mn-SOD を保持している可能性がある。OY-SOD の 126 番目より C 末端側のアミノ酸配列には、Mn-SOD ホモログ間で保存性の高いドメインが存在する。そのため、上述の全長 OY-SOD に対するポリクローナル抗体を作製した場合、抗体が宿主の発現する Mn-SOD と反応する可能性が想定された。そこで、OY-SOD の全長から、C 末端側の保存領域を除いた部分 (図 4.2) を大腸菌で大量発現させ、精製した。その後、精製した部分長 OY-SOD タンパク質を家兎に免疫し、抗 OY-SOD ポリクローナル抗血清を得た。抗血清から Protein A カラムを用いて IgG 画分を精製し、これをウェスタンブロット解析に用いた。

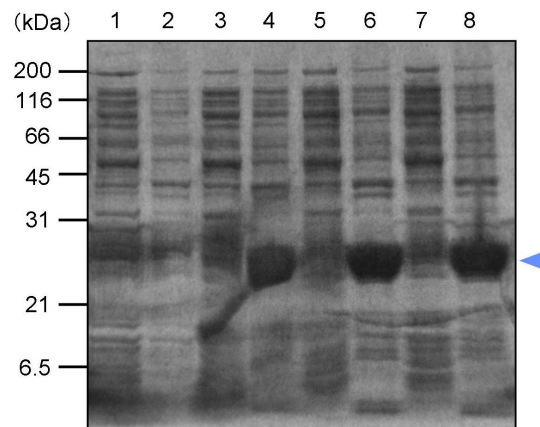


図 4.4 OY-SOD の大量発現

各レーンのサンプルは左から 1; IPTG 添加前可溶性画分、2; IPTG 添加前不溶性画分、3; IPTG 添加 1 時間後可溶性画分、4; IPTG 添加 1 時間後不溶性画分、5; IPTG 添加 2 時間後可溶性画分、6; IPTG 添加 2 時間後不溶性画分、7; IPTG 添加 3 時間後可溶性画分、8; IPTG 添加 3 時間後不溶性画分を示す。矢頭は発現したタンパク質（およそ 23 kDa）を示す。

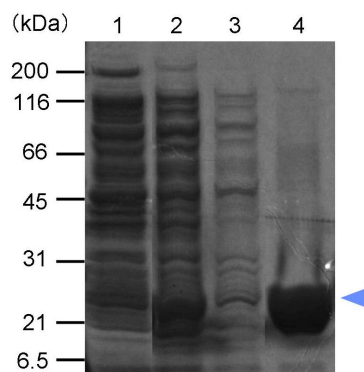


図 4.5 OY-SOD の精製

各レーンのサンプルは左から 1; 精製前、2; フロースルー、3; Wash buffer、4; Elute buffer を示す。矢頭は発現したタンパク質（およそ 23 kDa）を示す。

4.3.4. SOD のウェスタンブロット解析

OY ファイトプラズマ感染植物および健全植物、また OY ファイトプラズマ感染昆虫および健全昆虫から抽出した粗タンパク質を抗原として、抗 OY-SOD 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。ファイトプラズマ感染の有無は、ファイトプラズマが恒常的に発現している主要抗原膜タンパク質 (Amp) に対する抗体を用いたウェスタンブロットを同時に行うことで確認した。抗 OY-SOD 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、OY ファイトプラズマ感染植物および感染昆虫において、OY-SOD のアミノ酸配列から予想される約 23 kDa の位置にバンドが確認された (図 4.6)。これにより、OY ファイトプラズマは植物感染時および昆虫感染時において、OY-SOD を発現していることが確認された。OY-SOD と推定されるバンドの他に比較的薄い複数のバンドが検出されたが、これらはいずれも、感染宿主だけでなく健全宿主においても検出されたため、宿主タンパク質への非特異的な反応の結果検出されたタンパク質であると考えられた。

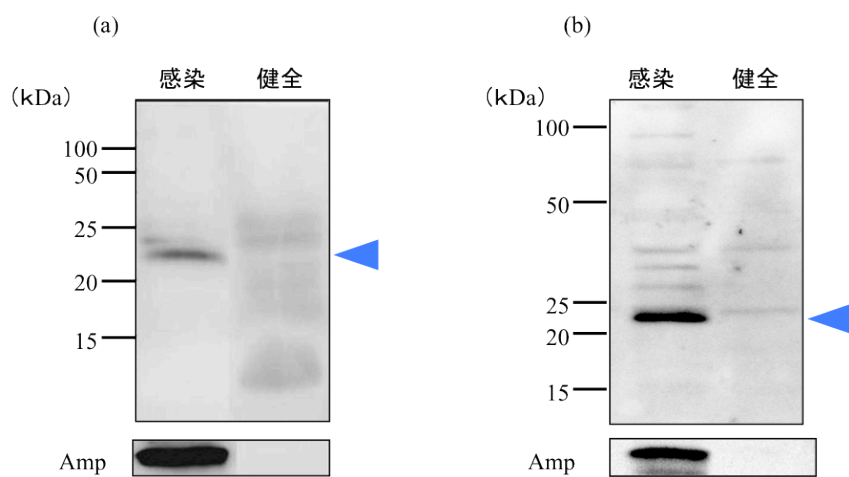


図 4.6 OY-SOD 抗体を用いたウェスタンブロット解析

植物感染時 (a) および昆虫感染時 (b) における OY-SOD をウェスタンブロット解析によって検出した。宿主へのファイトプラズマ感染は、抗 Amp 抗体を用いたウェスタンブロットによって確認した。矢頭は発現したタンパク質 (およそ 23 kDa) を示す。

4.3.5. SOD の酵素活性

SOD は O_2^- を H_2O_2 と O_2 に分解する機能をもつが、基質となる O_2^- が非常に不安定であるため、SOD の活性を直接測定するのは難しい。そこで OY-SOD の酵素活性測定には、 O_2^- による NBT の還元反応を利用する間接的な方法を用いた (Beauchamp & Fridovich, 1971)。完全長の OY-SOD を大量発現、精製し、SOD 活性を NBT 法によって測定した。まず、xanthine oxidase 添加後、0.5・6 分後において、NBT の還元によって生じる blue formazan の呈色を測定した。O.D.₅₆₀ を計測した結果、SOD の有無にかかわらず、添加 2 分以降は吸光度に変化が見られず、平衡状態に達することが明らかとなった (図 4.7)。

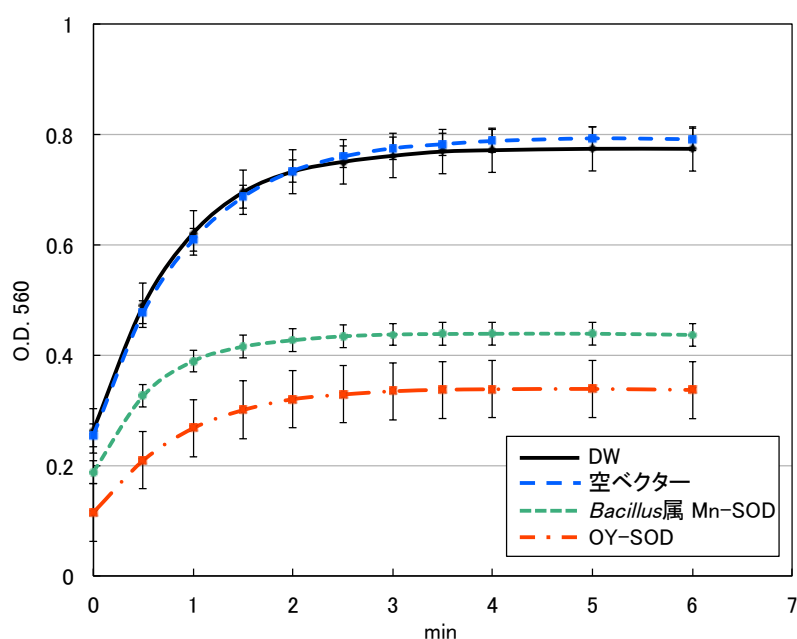


図 4.7 xanthine oxidase 添加に伴う吸光度変化

黒: ネガティブコントロール (DW)、青: ネガティブコントロール (空ベクター)、緑: ポジティブコントロール (*Bacillus* 属細菌由来 Mn-SOD)、赤: OY-SOD

そこで、xanthin oxidase 添加後 2、3、4、6 分後の O.D.₅₆₀測定値の平均を取り、添加後の吸光度 (A₂) とすることに定め、4.2.11.項に示した方法で SOD 活性を算出した。NBT の還元を 50%阻害する SOD の量を 1 unit として SOD の活性を測定した。その結果、OY-SOD 精製タンパク質は 586.8 unit/mg の SOD 活性を示した (図 4.8)。

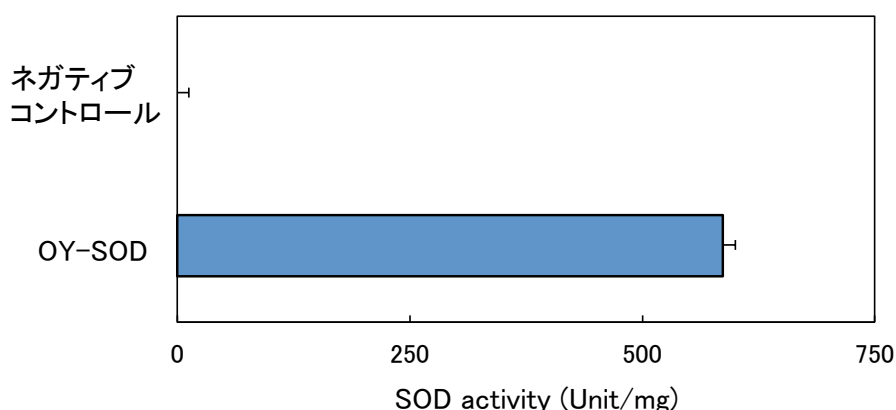


図 4.8 NBT 法による酵素活性測定

規定した条件下で NBT の還元を 50%阻害する SOD の量を 1 unit として SOD の活性を測定した。ネガティブコントロールには空ベクターを用いた。

4.3.6. SOD の活性阻害による活性中心金属の特定

4.3.5.項にて行った SOD 活性測定試験において、阻害剤が存在する条件下での SOD 活性を測定することにより SOD が活性中心に持つ金属を特定することが可能である (Fridovich, 1975; Dos Santos *et al.*, 2000)。そこで、4.2.12.項に示した手法に従い SOD の活性を測定した。その結果、コントロールとして用いた Mn-SOD は KCN および H₂O₂ 存在下でそれぞれ 82.6 ± 2.6%、109.2 ± 4.0% の活性を示したのに対して、同じくコントロールとして用いた Fe-SOD はそれぞれ 104.7 ± 1.0%、50.3 ± 1.3% の活性を示し、H₂O₂ 存在下で活性が強く阻害された。またもう一

つのコントロールである Cu/Zn-SOD はそれぞれ $8.8 \pm 2.8\%$ 、 $51.3 \pm 2.4\%$ の活性を示し、KCN および H_2O_2 のどちらの阻害剤存在下においても活性が強く阻害された。OY-SOD はそれぞれ $90.2 \pm 4.7\%$ 、 $101.9 \pm 0.9\%$ の活性を示し、3 種類のコントロールのうち Mn-SOD と最も近い活性パターンを示した。

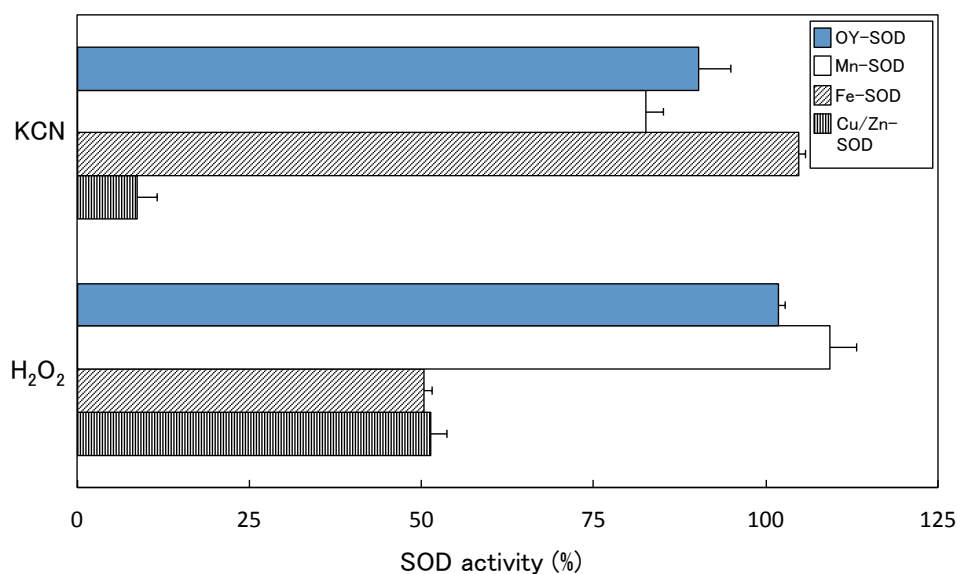


図 4.9 阻害剤添加による SOD 酵素活性の測定

阻害剤添加時における SOD の活性を、阻害剤のない条件下での SOD の活性との相対値で示した。コントロールとして *Bacillus* 属細菌由来の Mn-SOD、*E. coli* 由来の Fe-SOD、*H. sapiens* 由来の Cu/Zn-SOD を用いた。

4.4. 考察

4.4.1. ファイトプラズマにおける SOD の保存性

本章では、ファイトプラズマの生存にとって Mn-SOD が重要な意義をもっている可能性を検証するため、異なるファイトプラズマ系統間における SOD の保存性を解析した。OY ファイトプラズマを含む 4 系統のファイトプラズマ SOD のアミノ酸配列のアラインメントを行い、既報の Mn-SOD に関する配列情報と比較したところ、Mn との結合に必須な 4 アミノ酸や Mn-SOD に特徴的な配列が保存されていることが明らかとなった (図 4.2)。SOD は好気的な環境に生息する生物が広く保持する酵素の一つであるが、ファイトプラズマの属する *Mollicutes* 綱細菌には、SOD を持たないものが含まれることが知られている (表 4.4) (Meier & Habermehl, 1990)。これまで、ファイトプラズマの他 3 目にわたる 25 系統の *Mollicutes* 綱細菌のゲノムが解読されているが、*Mycoplasma* 目、*Entomoplasma* 目の細菌では、Mn-SOD 型の SOD 遺伝子を持つものは確認されていない。これに対して、ファイトプラズマと同じ *Acholeplasma* 目に属する *Acholeplasma laidlawii* のゲノムには、Mn-SOD 型と推測される SOD 遺伝子が存在することが確認されている。そのため、Mn-SOD は *Mollicutes* 綱の中で、*Acholeplasma* 目に特徴的な酵素であると考えられる。これらのことは、*Acholeplasma* 目細菌の生存に Mn-SOD が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

表 4.4 *Mollicutes* 綱細菌における *sod* の有無

目	生物名	アクセッション番号	<i>sod</i> の有無
<i>Acholeplasmatales</i>	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris'	AP006628	+
	Onion yellows phytoplasma OY-M		
	' <i>Ca. P. asteris</i> ' Aster yellows	CP000061	+
	witches'-bloom phytoplasma		
	' <i>Ca. P. australiense</i> '	AM422018	+
	' <i>Ca. P. mal</i> ' AT	CU469464	+
	<i>Acholeplasma laidlawii</i> PG-8A	CP000896	+
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37	L43967	—
	<i>M. pneumoniae</i> M129	U00089.2	—
	<i>M. pulmonis</i> UAB CTIP	AL445566	—
	<i>M. penetrans</i> HF-2	BA000026	—
	<i>M. gallisepticum</i> strain R (low)	AE015450	—
	<i>M. mobile</i> 163K	AE017308	—
	<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i>	BX293980.2	—
	<i>M. hyopneumoniae</i> 232	AE017332	—
	<i>M. synoviae</i> 53	AE017245	—
	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	CP000123	—
	<i>M. agalactiae</i> PG2	CU179680	—
	<i>M. arthritidis</i> 158L3-1	CP001047	—
	<i>M. conjunctivae</i> HRC/581	FM864216.2	—
	<i>M. hominis</i>	FP236530	—
	<i>M. hyorhinae</i> HUB-1	CP002170	—
	<i>M. crocodyli</i> MP145	CP001991	—
	<i>M. fermentans</i> JER	CP001995	—
	<i>Ureaplasma parvum</i>	AF222894	—
	<i>U. urealyticum</i>	CP001184	—
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Mesoplasma florum</i> L1	AE017263	—

4.4.2. 植物宿主内および昆虫宿主内における OY-SOD の発現

植物と昆虫のうち、いずれの宿主に感染する際に OY-SOD の働きが重要であるのかはファイトプラズマの生存戦略を明らかにするうえで興味深い。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、*OY-sodA* は、植物宿主感染時において昆虫宿主感染時よりも発現量が多い傾向を示したものの、有意な差は見られなかった (図 4.3)。また、OY-SOD は両宿主においてタンパク質レベルで発現していることが確認された (図 4.6)。このことは、OY-SOD が植物および昆虫の両宿主内においてファイトプラズマの生存に必要であることを示唆している。

ファイトプラズマはほとんどの場合、植物と昆虫に感染する水平伝搬経路によって生活環を成立させている。したがって、植物と昆虫の両宿主環境への適応は、ファイトプラズマにとって重要であると言える。宿主植物および宿主昆虫は、それぞれ活性酸素種による病原体への抵抗性機構を備えており、ファイトプラズマはいずれの宿主に感染している場合も、活性酸素種による損傷の危険性にさらされている。そのため、ファイトプラズマは宿主を問わず OY-SOD を発現し、自らを守る必要があると考えられる。

4.4.3. ファイトプラズマにおける SOD の重要性

O₂⁻および、それに由来する活性酸素種を用いた oxidative burst は、宿主が病原体を攻撃するための手段である。ファイトプラズマに感染した宿主は、活性酸素種を用いてファイトプラズマを攻撃している可能性があり、OY-SOD は宿主からの攻撃に対するファイトプラズマの自己防御機構として重要であると推測される。前述の *S. enterica* の他 (Fang *et al.*, 1999)、*Brucella abortus* や *Haemophilus ducreyi* などのグラム陰性細菌は、ペリプラズムに SOD を局在させ、宿主から加えられる活性酸素種の分解を行い、自らの細胞を守ることが知られている (Tatum *et al.*, 1992; San Mateo *et al.*, 1998)。

一般に、O₂⁻の膜透過性は高くないと言われている (Takahashi & Asada, 1983)。そのため、細菌の SOD が果たす機能を解明する際には、酵素の局在が有用な情報となる。菌体内に存在する SOD は、細菌自身の代謝系から生じる O₂⁻の分解に寄与し、菌体外に分泌される SOD は外的に加えられた O₂⁻を除去するために機能すると考えることが合理的である。アミノ酸配列および活性試験の結果から、OY-SOD は Mn を中心金属にもつと推測された。細菌の Mn-SOD は細胞

質に局在するものが多いと言われており (Regelsberger *et al.*, 2002)、OY-SOD も細胞質に局在するとすれば、ファイトプラズマ自身の代謝系から生じる O_2^- を分解している可能性は十分に想定される。しかしファイトプラズマは好気呼吸に伴う O_2^- の主要な発生源であると考えられる TCA 回路を含む大部分の呼吸代謝経路を欠いている。つまりファイトプラズマは TCA 回路をもたないため、呼吸に関する代謝系から O_2^- が多量に発生する可能性は低い。ファイトプラズマのゲノムにおいて、NADH oxidase が存在することは確認されているが、その発現や酵素活性について検証した例はこれまでになく、ファイトプラズマの NADH oxidase が、既知の何らかの代謝経路の一端を担っているという報告もない。このことから考えて、ファイトプラズマにおいて自らの代謝系から生じる O_2^- の量は、他の好気呼吸を行う細菌に比べて少ないことが予想される。したがって、ファイトプラズマが、自身の産生する O_2^- のみを分解するために SOD を保持しているとは考えにくい。むしろ OY-SOD は、ファイトプラズマの産生する O_2^- だけでなく、宿主が産生した O_2^- を分解するためにも機能すると考えられる。

また、OY-SOD が Mn-SOD 型であることも、宿主からファイトプラズマに加えられる外的な O_2^- の分解に対して、OY-SOD が寄与する可能性を棄却しないと考えられる。その理由の一つは、ファイトプラズマが細胞壁やペリプラズムを備えていないためである。 O_2^- の膜透過性は低いと言われているものの、宿主細胞内に寄生し、細胞膜以外の膜構造を菌体表面にもたないファイトプラズマの場合、宿主から加えられた活性酸素種が、細菌の表面および内部に直接的な損傷を与える危険性は、他の細菌に比べて高いと予想される。OY-SOD が細胞質内に留まっているとしても、一部ファイトプラズマ細胞膜を透過して細胞質内に侵入した宿主由来の O_2^- を OY-SOD が除去している可能性が考えられる。実際に、ラットの細胞を用いた研究では、細胞外に加えられた活性酸素による損傷を、細胞内の SOD が緩和する事例が報告されている (Hiraishi *et al.*, 1994)。また二つ目の理由として、細菌の Mn-SOD が必ずしも細胞内局在しないことも挙げられる。*Anabaena* 属細菌からは原形質膜に局在する Mn-SOD が見つかっており (Regelsberger *et al.*, 2002)、*Bacillus* 属細菌では分泌シグナルをもたない Mn-SOD が、菌体外で機能している例が報告されている (Gohar *et al.*, 2005)。今後ファイトプラズマ細胞内における OY-SOD の局在を解析する必要性は残されているものの、OY-SOD が宿主由来の O_2^- に対する防御機能を担っている可能性は十分に考えられる。

4.4.4. ファイトプラズマの活性酸素種分解機構

前述のように、ファイトプラズマは宿主細胞内という環境に生息するため、宿主由来の活性酸素種による損傷は避けられない。ファイトプラズマの生存にとって、外的な活性酸素種を分解するメカニズムは必須であると考えられるが、OY-SOD の他に、その機能を担うことのできる酵素は現在のところ見つかっていない。大腸菌など多くの細菌が複数種類の SOD を備えており、これらの細菌は由来の異なる活性酸素種に対して異なる種類の SOD を用いている (Korshunov & Imlay, 2006)。しかし、退行的進化によってゲノムサイズを縮小してきたファイトプラズマの場合、OY-SOD という単独の酵素がそのような機能を兼ねることが、保持する遺伝子のレパートリーを減少させるという生存戦略に適合しているのかもしれない。

一般的な活性酸素種の分解経路では、SOD による O_2^- の分解から生じた H_2O_2 を、さらに peroxidase (POX) や catalase (CAT) が分解し、無毒化する (Michiels *et al.*, 1994)。しかし、全ゲノムが解読されているファイトプラズマのうち、いずれにおいても SOD 以外の活性酸素種の分解に関わる酵素は見つかっていない。ファイトプラズマが SOD のみを持ち、POX や CAT をもっていないことは、既知の活性酸素種無毒化経路とは異なった経路が存在する可能性を示唆している。また一方で、*Acholeplasma* 目以外の *Mollicutes* 綱細菌は SOD を保持していないが、その中には好氣的な環境に生息するにもかかわらず、SOD、POX、CAT のいずれももたない細菌が存在する。これらの細菌の生存を可能にするメカニズムについて興味をもたれ、研究が進められている。近年、マイコプラズマにおいて、SOD や POX、CAT とは異なる活性酸素種分解酵素の存在が報告されている。例えば、*Mycoplasma gallisepticum* の MGA1142 遺伝子および *Mycoplasma genitalium* の MG_454 遺伝子にコードされるタンパク質が、有機過酸化還元酵素 organic hydroperoxide reductase (Ohr) として機能するとの報告や、*Mycoplasma hyopneumoniae* の peroxiredoxin として見つかった Mhtpx が H_2O_2 の無毒化に効果を示すとの報告がある (表 4.5) (Jenkins *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009; Saikolappan *et al.*, 2009)。

表 4.5 *Mycoplasma* 属細菌から見つかった活性酸素種分解酵素

生物名	活性酸素種分解酵素	参照
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	organic hydroperoxide reductase (Ohr)	Jenkins <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycoplasma genitalium</i>	organic hydroperoxide reductase (Ohr)	Saikolappan <i>et al.</i> , 2009
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	peroxiredoxin (Mhtpx)	Machado <i>et al.</i> , 2009

これらの事例から、ファイトプラズマを含む *Acholeplasma* 目細菌にも SOD の分解産物をさらに無毒化するための酵素がある可能性も想定される。OY ファイトプラズマゲノムにコードされる PAM296 遺伝子は機能未知の遺伝子であるものの、酸化還元に関わるドメインが予測されている。今後このような遺伝子を対象として活性酸素種分解メカニズムを解析することにより、他の細菌や真核細胞のものとは異なる新奇の活性酸素種無毒化経路が明らかになる可能性があり興味深い。活性酸素種分解経路は、病原細菌の生存と増殖に重要なメカニズムであり、病原性に関与している事例も多く存在する (Andersen *et al.*, 1991; De Groote *et al.*, 1997; Saenkham *et al.*, 2007)。将来的に、OY-SOD のさらなる機能解析と、ファイトプラズマゲノムに存在する未知の活性酸素種分解酵素の探索により、病原細菌の新規な活性酸素種分解機構が明らかとなれば、ファイトプラズマの生存・感染戦略の解明のみならず細菌病の防除も含めた幅広い応用が期待できる。

第5章 総合考察

5.1. ファイトプラズマの防除法の確立に向けて

世界の人口はすでに70億人を超え、2050年までに90億人を越えると予測されている (World Population Prospects, 2010)。国連食糧農業機関の調査では現時点で世界の飢餓人口は8億人を越えるとされており、食糧問題の解決は喫緊の課題であると言える。一方で食糧生産を支える利用可能な耕地面積は限られており、単位面積当たりの収穫量を高める技術が求められている。しかし、現状として世界の栽培作物における実生産額は可能作物生産額の60~70%に留まり、多くの作物が微生物病や生理病、害虫病、雑草害により失われている (Cramer, 1967)。したがって植物病による被害を抑えることは食糧生産効率を高める主要な方策として期待される。

ファイトプラズマ属菌の宿主範囲は非常に広く、多くの植物において世界中で被害が報告されている (Brown *et al.*, 2006; Sawayanagi *et al.*, 1996; Strauss, 2009; Takinami *et al.*, 2013)。しかしこれまでにファイトプラズマ病を防除する有効な技術は確立されていない。その原因の一つとして、ファイトプラズマは宿主細胞に極度に依存した寄生生活の結果、代謝系遺伝子をはじめとする多くの遺伝子を欠失していることが挙げられる。一般に細菌病の防除に用いられる農薬は、細菌の代謝経路を阻害することで殺菌効果を示すものが多いことから、ファイトプラズマでは農薬の標的候補が少なく、防除法の確立を困難にしている。

本研究では、第2章にて行ったファイトプラズマ遺伝子のマイクロアレイ解析の結果をもとに、植物感染時に発現量が顕著に増加する機械刺激受容チャネル遺伝子 *mscL* に着目した。MscLの阻害剤である塩化ガドリニウムを植物に与えることにより、ファイトプラズマの増殖量を経時的に評価したところ、感染初期におけるファイトプラズマの菌体量が抑えられるという結果が得られた。この結果はファイトプラズマの防除に向けた、農薬の新たな戦略として利用できる可能性がある。しかし、本実験においてはファイトプラズマの増殖を完全に抑制できないという課題も残された。本研究におけるマイクロアレイ解析の結果では、*mscL* の他にも非常に多くの膜タンパク質やトランスポーターをコードする遺伝子の発現量が植物感染時に顕著に増加することが明らかになった。これらの中には他の細菌にも相同性の見られないような遺伝子も存在することから、これらの因子の機能を明らかにし、標的とすることによりファイトプラズマを選択的に防除する農薬の開発が可能となることが期待される。

5.2. 難培養性細菌の遺伝子機能解析

環境中には非常に多くの微生物が存在し、例えば土壌 1 g 中には 10^9 個もの細菌が含まれている (Whitman *et al.*, 1998)。しかし、そのうち培養することが可能である細菌は非常に少なく、全菌数のうち寒天培地上に生育する細菌は土壌では 0.3%、海水では 0.1% にも満たない (Amann *et al.*, 1995)。したがって、環境中に存在するほとんどの細菌は培養することが困難な難培養性細菌であると考えられる。微生物学は、寒天培地上で容易に培養できる微生物により基礎が築かれてきたが、生物圏においてそのような微生物はごく少数であると言える。

近年、分子生物学的手法の導入と発展により自然界に存在する難培養性細菌のような生物の多様性が着目されつつある。それらの研究の主流はメタゲノム解析やシングルセル・ゲノミクスによる大規模解析であり、得られた情報をもとに生理機能や生態学的役割が議論されている (Edwards *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2004)。その中には有用な生物資源としての利用が期待されている生物も少なくない。これらのゲノミクスのアプローチは、培養が困難な微生物の解析手法として有効であるものの、一方でその遺伝子が微生物体内でどのように機能しているのかについて、直接的な証明を行うことができない。そのため、生菌を用いた *in vivo* 解析を行う必要があるものの、培養できないという前提条件がある以上、形質転換などの手法を用いることは非常に困難であり、難培養性細菌の実態はほとんど明らかにされていないのが現状である。

そこで本研究では、難培養性細菌ファイトプラズマの遺伝子発現とタンパク質の活性について、トランスクリプトーム解析および *in vitro* 解析により明らかにし、その機能を考察することにより、ファイトプラズマの宿主転換における感染戦略の解明を試みた。トランスクリプトーム解析は、細胞内の転写産物 (RNA) を網羅的に解読する手法である。本手法は遺伝子発現の全体像を把握する *in vivo* 解析法として有効である。特に極限環境に生息する難培養性細菌では、あらゆる環境に適応するための新たなメカニズムが得られる可能性のある手法として期待されている (Sorek & Cossart, 2010)。第 2 章において行ったマイクロアレイ解析により、ファイトプラズマ遺伝子の発現パターンは植物感染時と昆虫感染時とで劇的に変化することが明らかになった。この結果はファイトプラズマが周辺環境を認識し、自身の置かれた環境に合わせて遺伝子発現を制御していることを示唆し、トランスクリプトーム解析が難培養性細菌のポストゲノミクス研究として有効な解析法であることを示した。今回のマイクロアレイ解析では、ファイトプラズマのライフサイクルにおいて環境が大きく変化する植物—昆虫間の宿主転換に着目したが、恐らくファ

イトプラズマはそれぞれの宿主細胞内で増殖するために、感染初期から感染後期にかけて乗り越えなければならないいくつかの障壁をクリアしている。例えば昆虫感染時においてファイトプラズマは、口針を通過したのち中腸上皮細胞へ接着、侵入し、血リンパに乗って全身へ移行する。その後唾腺へと侵入し、再び口針から植物細胞へ侵入する。ファイトプラズマが昆虫への感染を成立させるためには、その過程において中腸上皮細胞への接着・侵入、および唾腺への侵入を成功させる必要がある (Purcell *et al.*, 1981)。植物感染時においてはこれまでに感染段階における障壁は示唆されていない。しかし第3章にて行った塩化ガドリニウム処理による MscL 阻害条件下でのファイトプラズマ増殖量の解析実験において、接種後3週~4週目にかけて急激に菌体量が増加したことは、ファイトプラズマの感染段階により遺伝子発現が変化する可能性を示唆している。したがって今後、接種後経時的または感染部位特異的にトランスクリプトーム解析を行うことにより、難培養性細菌ファイトプラズマの遺伝子発現制御機構に関する新たな知見を得られるかもしれない。

本研究ではファイトプラズマの感染戦略を明らかにするもう一つのアプローチとして、*in vitro* 解析法を用いた。これにより第4章にて OY ファイトプラズマの SOD が活性酸素種を分解する活性を持つことを証明した。これまでのファイトプラズマ研究において、*in vitro* 解析法を用いた代謝経路の活性試験は非常に限られているが、近年ファイトプラズマにおいて、リンゴ酸をピルビン酸に変換するリンゴ酸酵素、およびアセチル CoA をアセチルリン酸に変換するリン酸アセチル基転移酵素の活性を測定し、その酵素活性を評価した研究が報告されている (Saigo *et al.*, 2014)。本研究および Saigo らによって示されたように、このような *in vitro* 解析系は、難培養性細菌の代謝経路を解析する上で非常に有効なツールであると考えられる。今後、ファイトプラズマのゲノム情報やトランスクリプトーム解析から得られた情報と合わせ、*in vitro* 解析系を駆使することにより、培養に必要な成分や条件を検討することも可能であると考えられ、難培養性細菌の研究を進める上で有効なアプローチである。

摘要

ファイトプラズマは、昆虫によって媒介される微小な植物病原細菌であり、700 種以上の植物に感染する。ファイトプラズマが感染した植物はてんぐ巢（萎縮・叢生）、突拔、黄化、葉化、緑化などの症状を呈するため、農作物においては収量の減少や品質の低下を引き起こし重要な問題となる。しかしこれまでにファイトプラズマ病を直接防除する有効な方法は確立されておらず、防除が非常に困難である。

ファイトプラズマは植物の篩部細胞内に局在し増殖する。媒介昆虫がこの感染植物の篩管を吸汁することにより昆虫の口針を通して昆虫の中腸に到達する。昆虫感染時には、昆虫の腸壁から血体腔内に侵入し昆虫の全身に感染する。さらにファイトプラズマを保毒した昆虫が新たに健全な植物を吸汁すると、菌体が唾液とともに植物篩管内に放出され、新たな植物への感染が成立する。このようにファイトプラズマは分類学上「界」レベルで異なる生物である植物と昆虫へ交互に宿主を転換することによって感染を成立させる。ファイトプラズマの宿主転換において鍵となる遺伝子を特定することは、ファイトプラズマの宿主転換メカニズムを解明し、その感染を制御する方法を確立するために重要であると考えられる。しかしこれまでにファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現調節について明らかにされた例はごくわずかであった。そこで宿主転換メカニズムを解明する一助とするため、植物および昆虫感染時におけるファイトプラズマ遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。さらに、ファイトプラズマの感染成立に重要であると考えられる二つの遺伝子に着目し、その活性と機能について検証を行った。

1. ファイトプラズマの宿主転換に伴う遺伝子発現の網羅的解析

ファイトプラズマが、植物-昆虫間宿主転換に伴いどれだけの遺伝子発現を変化させているのかを網羅的に解析するため、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ（‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ OY strain; 以下 OY ファイトプラズマ）に感染したシュンギク（*Chrysanthemum coronarium*）および媒介昆虫であるヒメフタテンヨコバイ（*Macrostelus striifrons*）から RNA を抽出し、二色蛍光標識法によるマイクロアレイ解析を行った。その結果、OY ファイトプラズマゲノムの約 33% に相当する計 248 遺伝子の発現が 2 倍以上変化していた。発現が変化していた 248 遺伝子のうち 135 遺伝子は植物宿主で、113 遺伝子は昆虫宿主で多く発現していた。これらの遺伝子にはファ

イトプラズマが宿主から栄養などを取り込むために機能していると考えられる膜輸送体遺伝子や、ファイトプラズマ菌体内から菌体外へ分泌されることが予測されている分泌タンパク質をコードする遺伝子が多く含まれた。以上のことから、OY ファイトプラズマは植物および昆虫という2つの異なる宿主の細胞内環境に応じて劇的に遺伝子発現を変化させていることが明らかとなった。

2. 機械刺激受容チャネルの機能解析

マイクロアレイ解析の結果、多くの膜輸送体遺伝子が植物感染時または昆虫感染時で発現が上昇していることが明らかとなった。中でも浸透圧調節に関わる機械刺激受容チャネル (*mscL*) の発現量は昆虫感染時と比較して植物感染時において顕著に増加した。*mscL* は細菌の浸透圧調節に重要な役割を果たす。特にファイトプラズマは細胞壁を持たないことから、外部の浸透圧環境への感受性が高いことが予想される。そこで、植物感染時に発現量が増加するファイトプラズマの *mscL* は篩部細胞内の浸透圧に適応し、感染を成立させるために重要な役割を果たしているという仮説を立てた。

この仮説を検証するために、MscL の阻害剤である塩化ガドリニウムを植物体に処理し OY ファイトプラズマを接種した際の、増殖量に与える影響を定量 PCR によって経時的に調査した。その結果、接種3週間後における塩化ガドリニウム処理区での OY ファイトプラズマの増殖量は有意に抑制された。また、有意差は無いものの、2週間後においても OY ファイトプラズマの増殖量がコントロール区と比較して抑制される傾向が見られた。このことから OY-MscL は植物宿主細胞内での OY ファイトプラズマの初期増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし接種4週間後では、OY ファイトプラズマの菌体量は塩化ガドリニウム非処理区の植物と処理区の植物とで同程度となった。これは塩化ガドリニウムがファイトプラズマの増殖を持続的に抑制することができないことを示している。この理由として、植物体内の塩化ガドリニウム濃度が一定でないこと、塩化ガドリニウムの投与量が少なかったことが考えられる。今後、塩化ガドリニウム投与時期や濃度、塩化ガドリニウム投与時におけるファイトプラズマの植物内での局在について詳細に検討することで、ファイトプラズマの防除法の開発につなげることができると考えられる。

3. 活性酸素種分解酵素の活性解析

病原体の感染に対し、動物、植物、昆虫を含む多くの生物は防御応答として活性酸素種を産生する。活性酸素種は強い酸化力を持ち、タンパク質や核酸等の生体分子に直接損傷を与えることが知られている。ファイトプラズマが宿主細胞へ感染する際にも、他の病原細菌と同様に宿主細胞から活性酸素種が発生する。特にファイトプラズマは、細胞壁を持たないため、宿主由来の活性酸素種による直接的な損傷を受けやすい環境にあると考えられる。病原体はこの損傷を回避し、感染を成立させる手段の一つとして、活性酸素種分解酵素 (superoxide dismutase; SOD) を保持している。OY ファイトプラズマゲノム中にも SOD と推定される遺伝子 *OY-sodA* が見つかっており、これが活性酸素種を分解することで、絶えず活性酸素種に曝される宿主細胞内環境での生存を可能にしている可能性があると考えられる。マイクロアレイ解析の結果、*OY-sod* の発現量は植物感染時および昆虫感染時においてほぼ変化しないことが明らかとなった。したがってファイトプラズマの SOD は両方の宿主へ適応するために重要な因子として機能している可能性が高いと考えた。そこで、OY-SOD が活性酸素種分解酵素活性を持つかについて検証を行った。

SOD の基質となる活性酸素種は非常に不安定であることから、SOD 活性を直接測定するのは困難である。そこで、nitroblue tetrazolium (NBT) の還元反応を利用して間接的に SOD 活性を測定する NBT 法により、SOD 活性を測定した。この方法では、SOD 非存在下においては NBT が青色に呈色するが、SOD が存在することでその呈色が抑えられる。この呈色反応を利用し、NBT の呈色が 50%阻害される SOD の量を 1 unit として SOD の活性を測定した。その結果、ネガティブコントロールでは活性が検出されなかったのに対し、OY-SOD 精製タンパク質は 586.8 unit/mg の活性を示した。

活性酸素種は好気呼吸の代謝経路においても恒常的に生じることから、好気的な環境で生息する生物にとって、活性酸素種の産生は不可避である。したがって OY-SOD がファイトプラズマ自身に由来する活性酸素種を分解するために機能している可能性は否定できない。しかし、ファイトプラズマは活性酸素種の主要な発生源であると考えられる TCA 回路を含む大部分の呼吸代謝経路関連遺伝子を保持していない。このことから OY-SOD は、ファイトプラズマに由来する活性酸素種というよりはむしろ、宿主が産生した活性酸素種を分解するために重要な役割を果た

していると考えられる。

本研究の結果、ファイトプラズマは宿主転換に伴い多くの遺伝子の発現パターンを変化させ、各々の宿主に適応していることが示唆された。中でも、浸透圧を調節するチャネルである **MscL** は植物感染初期における **OY** ファイトプラズマの増殖を抑制し、植物への感染において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、ファイトプラズマゲノムにコードされる活性酸素種分解酵素 **SOD** は、活性酸素種を分解する活性を有し、宿主の防御応答に伴う活性酸素種の産生に対抗する手段として機能していることが示唆された。今後、本研究により得られた結果をもとに遺伝子機能の検証を進めることで、ファイトプラズマの宿主転換機構を明らかにするとともに、これらの結果がファイトプラズマの防除に向けた農薬の新たな標的候補として利用できる可能性が期待される。

引用文献

- Ahmad, J.N., Renaudin, J., Eveillard, S. (2013). Expression of defence genes in stolbur phytoplasma infected tomatoes, and effect of defence stimulators on disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 139 (1), 39-51.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-69.
- Ammendola, S., Pasquali, P., Pistoia, C., Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G., Battistoni, A. (2007). High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 75(12), 5867-76.
- Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., Heron, I. (1991). Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infection and Immunity*, 59 (6), 1905-10.
- Andersen, P. M. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 6(1), 37-46.
- Arashida, R., Kakizawa, S., Hoshi, A., Ishii, Y., Jung, H.Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S. (2008). Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA and Cell Biology*, 27(4), 209-17.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601-639.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V, Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. Hogenhout, S.A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188 (10), 3682-96.
- Balleza, D., Gómez-Lagunas, F. (2009). Conserved motifs in mechanosensitive channels MscL and MscS. *European biophysics journal*. 38(7), 1013-1027.
- Bannister, J. V, Bannister, W. H., Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22(2), 111-80.
- Barbara, D. J., Morton, A., Clark, M. F., Davies, D. L. (2002). Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phylloxy) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 1), 157-67.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-87.
- Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., Seemüller, 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 (Reading, England)*, 145 (Pt 8), 1937-43.

- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M., Ghazi, A. (1992). Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 206(2), 559–65.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular immunology*, 40(12), 845–859.
- Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., Kirkpatrick, B. C. (2001). An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 3), 571–80.
- Boonrod, K., Munteanu, B., Jarausch, B., Jarausch, W., Krczal, G. (2012). An immunodominant membrane protein (Imp) of “*Candidatus Phytoplasma mali*” binds to plant actin. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 25(7), 889–95.
- Booth, I. R., Louis, P. (1999). Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 166–9.
- Brown, D.G., Swanson, J.K., Allen, C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2777–86.
- Brown, S.E., Been, B.O., McLaughlin, W.A. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group (16Sr IV) phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Annals of Applied Biology*, 149(1), 53–62.
- Burse, A., Weingart, H., Ullrich, M.S. (2004). The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 17(1), 43–54.
- Caimano, M.J., Iyer, R., Eggers, C.H., Gonzalez, C., Morton, E.A., Gilbert, M.A., Schwartz, I., Radolf, J.D. (2007). Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1193–217.
- Caldelari, I., Chao, Y., Romby, P., Vogel, J. (2013). RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(9), a010298.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Roby, D., Rivas, S. (2011). The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *The Plant Cell*, 23(9), 3498–511.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts, *Trends in plant science*, 10(11) 526–35.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P., Lichten, L.A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24085–9.
- Cramer, H.H. (1967). Plant Protection and World Crop Production. *Experimental Agriculture*, 5(1), 82–83.

- De Groote, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., McCord, J.M., Dinauer, M.C., Libby, S.J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Fang, F.C. (1997). Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (25), 13997–4001.
- De Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 329 (5994), 953–5.
- de Souza, A.N., da Silva, F.N., Bedendo, I.P., Carvalho, C.M. (2014). A Phytoplasma Belonging to a 16SrIII-A Subgroup and dsRNA Virus Associated with Cassava Frogskin Disease in Brazil. *Plant Disease*, 98 (6), 771–779.
- Dickinson, M. (2010). Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. *Molecular Microbiology*, 77 (6), 1351–3.
- Dickinson, M., Tuffen, M., Hodgetts, J. (2013). Phytoplasma, 938, 1–14.
- DiDonato, M., Craig, L., Huff, M. E., Thayer, M. M., Cardoso, R. M. F., Kassmann, C. J., Lo, T.P., Bruns, C.K., Powers, E.T., Kelly, J.W., Getzoff, E.D., Tainer, J.A. (2003). ALS mutants of human superoxide dismutase form fibrous aggregates via framework destabilization. *Journal of Molecular Biology*, 332 (3), 601–15.
- Doke, N. (1985). NADPH-dependent O₂⁻ generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, 27, 311–22.
- Doke, N., Miura, Y. (1995). *In vitro* activation of NADPH-dependent O₂⁻ generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H. J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence—a review. *Gene*, 179 (1), 45–51.
- Dos Santos, W.G., Pacheco, I., Liu, M.Y., Teixeira, M., Xavier, A.V., LeGall, J. (2000). Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Journal of bacteriology*. 182 (3), 796-804.
- Douglas, A.E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *Journal of Experimental Botany*, 57 (4), 747–54.
- Dubreuil-Maurizi, C., Poinssot, B. (2012). Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant signaling & behavior*, 7 (2), 210-212.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D.M., Saar, M.O., Alexander, S., Alexander, E.C., Rohwer, F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*, 7, 57.
- Falke, J.J., Bass, R.B., Butler, S.L., Chervitz, S.A., Danielson, M.A. (1997). The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 457–512.

- Fang, F.C., DeGroote, M.A., Foster, J.W., Bäuml, A.J., Ochsner, U., Testerman, T., Bearson, S., Giárd, J.C., Xu, Y., Campbell, G., Laessig, T. (1999). Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7502–7.
- Francez-Charlot, A., Frunzke, J., Reichen, C., Ebner, J. Z., Gourion, B., Vorholt, J.A. (2009). Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3467–72.
- Fránová, J., Ludvíková, H., Paprštein, F., Bertaccini, A. (2013). Genetic diversity of Czech '*Candidatus* Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 136(4), 675–688.
- Frederick, R.D., Ahmad, M., Majerczak, D.R., Arroyo-Rodríguez, A.S., Manulis, S., Coplin, D.L. (2001). Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 14(10), 1213–22.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 44, 147–159.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64 (III), 97–112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V., Lereclus, D. (2005). A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*, 5(14), 3696–711.
- Güell, M., van Noort, V., Yus, E., Chen, W.-H., Leigh-Bell, J., Michalodimitrakis, K., Yamada, T., Arumugam, M., Doerks, T., Kühner, S., Rode, M., Suyama, M., Schmidt, S., Gavin, A., Bork, P., Serrano, L. (2009). Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1268–71.
- Gundersen, D.E., Lee, I., Harrison, N.A. Chang, C.J., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1996). Genomic Diversity and Differentiation among Phytoplasma Strains in 16S rRNA Groups I (Aster Yellows and Related Phytoplasmas) and II (X-Disease and Related Phytoplasmas), 46(1), 64–75.
- Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y. S., Lee, W.-J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5749), 847–50.
- Halliwell, B. (1974). SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE: SOLUTIONS TO THE PROBLEMS OF LIVING WITH OXYGEN. *New Phytologist*, 73, 1075–1086.
- He, X., Chang, W., Pierce, D.L., Seib, L.O., Wagner, J., Fuqua, C. (2003). Quorum Sensing in *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Regulates Conjugal Transfer (*tra*) Gene Expression and Influences Growth Rate. *Journal of Bacteriology*. 185(3), 809–822.
- Hiraishi, H., Terano, A., Sugimoto, T., Harada, T., Razandi, M., Ivey, K. J. (1994). Protective role of intracellular superoxide dismutase against extracellular oxidants in cultured rat gastric cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(1), 331–8.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 403–23.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6416–21.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395–418.
- Imlay, K.R., Imlay, J.A. (1996). Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2564–71.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annual Review of Microbiology*, 54(4), 499–518.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Geary, S.J., Djordjevic, S. P. (2008). Structural and functional characterization of an organic hydroperoxide resistance protein from *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2206–16.
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 69(4), 527–43.
- Khan, A.J., Botti, S., Al-Subhi, A.M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. F. (2002). Molecular Identification of a New Phytoplasma Associated with Alfalfa Witches' Broom in Oman. *Phytopathology*, 92(10), 1038-47.
- Kim, S., Watanabe, K., Shirahata, T., Watarai, M. (2004). Zinc uptake system (*znuA* locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 66(9), 1059–63.
- Kornspan, J.D., Rottem, S. (2012). The phospholipid profile of mycoplasmas. *Journal of Lipids*, 2012, 640762.
- Korshunov, S., Imlay, J. a. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6326–34.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., Seemüller, E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 185942.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma "*Candidatus Phytoplasma mali*". *BMC Genomics*, 9, 306.
- Kube, M., Siewert, C., Migdoll, A.M., Duduk, B., Holz, S., Rabus, R., Seemüller, E., Mitrovic, J., Müller, I., Büttner, C., Reinhardt, R. (2014). Analysis of the complete genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and their comparison to the obligate parasites from '*Candidatus Phytoplasma*'. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 24(1) 19-36.
- Kuboyama, T., Huang, C.C., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, S. (1998). A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 11(11), 1031–7.

- Kung, C., Martinac, B., Sukharev, S. (2010). Mechanosensitive channels in microbes. *Annual Review of Microbiology*, 64, 313–29.
- Lagal, V., Portnoi, D., Faure, G., Postic, D., Baranton, G. (2006). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 8(3), 645–52.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). the Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251–275.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Hiruki, C. (1991). Genetic Interrelatedness among Clover Proliferation Mycoplasma-like Organisms (MLOs) and Other MLOs Investigated by Nucleic Acid Hybridization and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Applied and environmental microbiology*, 57(12), 3565–3569.
- Levina, N., To, S., Stokes, N. R., Louis, P., Jones, M. A., Booth, I. R. (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity, 18(7), 1730–1737.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583–93.
- Lybecker, M. C., Samuels, D. S. (2007). Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 64(4), 1075–89.
- Machado, C. X., Pinto, P. M., Zaha, A., Ferreira, H. B. (2009). A peroxiredoxin from *Mycoplasma hyopneumoniae* with a possible role in H₂O₂ detoxification. *Microbiology*, 155(Pt 10), 3411–9.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M., Hogenhout, S.A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 157(2), 831–41.
- Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., Ishikawa, K., Fukuoka, M., Minato, N., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S. (2014). Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *The Plant Journal*, 78(4), 541–54.
- Maejima, K., Oshima, K., Namba, S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 210–221.
- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., Ravikesavan, R. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics*, 98(1), 155–161.
- Majoor-Krakauer, D., Willems, P.J., Hofman, A. (2003). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Genetics*, 63(2), 83–101.
- Makino, T., Kawata, M. (2012). Habitat variability correlates with duplicate content of *Drosophila* genomes. *Molecular biology and evolution*, 29(10), 3169–3179.
- Martinac, B., Buechner, M., Delcour, A.H., Adler, J., Kung, C. (1987). Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8), 2297–301.

- Mascher, T. (2013). Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) factors. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 148–55.
- Meier, B., Habermehl, G.G. (1990). Evidence for superoxide dismutase and catalase in mollicutes and release of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277(1), 74–9.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248.
- Mittenhuber, G. (2002). An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 77–91.
- Molina-Cruz, A., DeJong, R. J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C. (2008). Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3217–23.
- Moller, I. M. (2001). PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561–591.
- Morton, A., Davies, D. L., Blomquist, C. L., Barbara, D. J. (2003). Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology*, 4(2), 109–14.
- Musetti, R., di Toppi, L.S., Ermacora, P., Favali, M.A. (2004). Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, 94(2), 203–8.
- Musetti, R., di Toppi, L. S., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M. A., Osler, R. (2005). Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology*, 112(1), 53–61.
- Nackerdien, Z.E., Keynan, A., Bassler, B.L., Lederberg, J., Thaler, D.S. (2008). Quorum sensing influences *Vibrio harveyi* growth rates in a manner not fully accounted for by the marker effect of bioluminescence. *PloS one*. 3(2) e1671.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., Tsuchizaki, T. (1993a). Detection and Differentiation of Plant-Pathogenic Mycoplasma-like Organisms Using Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 83(7), 786–791.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., Tsuchizaki, T. (1993b). Phylogenetic Diversity of Phytopathogenic Mycoplasma-like Organisms *International journal of systematic bacteriology*, 32(3), 461–467.
- Nipah, J. O., Jones, P., Dickinson, M. J. (2007). Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. *Plant Pathology*, 56(5), 777–784.
- Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I. (2001). In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins, 507–513.

- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2002a). Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma?. *Microbiology*, 148(Pt-5), 1389–1396.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2002b). A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene*, 298(2), 195–201.
- Oshima, K., Ishii, 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(8), e23242.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H., 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. *Nature Genetics*, 36(1), 27–9.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2001a). A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like domains: clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination? *Virology*, 285(2), 270–7.
- Oshima, K., Maejima, K., Namba, S. (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in microbiology*. 4. 230.
- Oshima, K., Shiomi, T., Kuboyama, T., Sawayanagi, T., Nishigawa, H., Kakizawa, S., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2001b). Isolation and Characterization of Derivative Lines of the Onion Yellows Phytoplasma that Do Not Cause Stunting or Phloem Hyperplasia. *Phytopathology*, 91(11), 1024-1029.
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R.R., Ramamoorthi, N., Desilva, A.M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F.S., Telford, S., Anderson, J.F., Fikrig, E. (2004). TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi. *Cell*, 119(4), 457–68.
- Paralanov, V., Lu, J., Duffy, L.B., Crabb, D.M., Shrivastava, S., Methé, B.A., Inman, J., Yooseph, S., Xiao, L., Cassell, G.H., Waites, K.B., Glass, J. I. (2012). Comparative genome analysis of 19 Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum strains. *BMC Microbiology*, 12, 88.
- Perozo, E. (2006). Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), 109-119.
- Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D., Tainer, J.A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 245–62.
- Purcell, A.H., Richardson, J., Finlay, A. (1981). Multiplication of the agent of X-disease in a non-vector leafhopper Macrosteles fascifrons. *Ann Appl Biol*, 99, 283–289.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436(7050), 573–7.

- Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62 (4), 1094–156.
- Regelsberger, G., Atzenhofer, W., Ruker, F., Peschek, G.A., Jakopitsch, C., Paumann, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2002). Biochemical characterization of a membrane-bound manganese-containing superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (46), 43615–22.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 675–709.
- Rosen, D.R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 364 (6435), 362.
- Saenkham, P., Eiamphungporn, W., Farrand, S.K., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S. (2007). Multiple superoxide dismutases in *Agrobacterium tumefaciens*: functional analysis, gene regulation, and influence on tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 189 (24), 8807–17.
- Saigo, M., Golic, A., Alvarez, C.E., Andreo, C.S., Hogenhout, S.A., Mussi, M.A., Drincovich, M.F. (2014). Metabolic regulation of phytoplasma malic enzyme and phosphotransacetylase supports the use of malate as energy source in these plant-pathogens. *Microbiology*, in press.
- Saikolappan, S., Sasindran, S.J., Yu, H.D., Baseman, J.B., Dhandayuthapani, S. (2009). The *Mycoplasma genitalium* MG_454 gene product resists killing by organic hydroperoxides. *Journal of Bacteriology*, 191 (21), 6675–82.
- Samuels, D.S. (2011). Gene regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annual Review of Microbiology*, 65, 479–99.
- San Mateo, L.R., Hobbs, M.M., Kawula, T.H. (1998). Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase protects *Haemophilus ducreyi* from exogenous superoxide. *Molecular Microbiology*, 27 (2), 391–404.
- Sánchez-Rojo, S., López-Delgado, H.A., Mora-Herrera, M.E., Almeyda-León, H.I., Zavaleta-Mancera, H.A., Espinosa-Victoria, D. (2010). Salicylic Acid Protects Potato Plants from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. *American Journal of Potato Research*, 88 (2), 175–183.
- Sawayanagi, T., Horikoshi, N., Kanehira, T., Shinohara, M., Bertaccini, A., Cousin, M.T., Hiruki, C., Namba, S. (1999). '*Candidatus* phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International journal of systematic bacteriology*, 49 (Pt-3), 1275-85.
- Schmidtke, C., Abendroth, U., Brock, J., Serrania, J., Becker, A., Bonas, U. (2013). Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*. *PLoS Pathogens*, 9 (9), e1003626.
- Sorek, R., Cossart, P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature Reviews. Genetics*, 11 (1), 9–16.
- Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Molecular Microbiology*, 74 (3), 557–81.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183–215.

- Stockwell, S.B., Reutimann, L., Guerinot, M.L. (2012). A role for *Bradyrhizobium japonicum* ECF16 sigma factor EcfS in the formation of a functional symbiosis with soybean. *MPMI*, 25(1), 119–28.
- Stokes, N.R., Murray, H.D., Subramaniam, C., Gourse, R.L., Louis, P., Bartlett, W., Miller, S., Booth, I.R. (2003). A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15959–64.
- Strauss, E. (2009). Microbiology. Phytoplasma research begins to bloom. *Science*, 325(5939), 388–90.
- 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 Physiology*, 162(4), 2005–14.
- Sugio, A., Kingdom, H.N., MacLean, A.M., Grieve, V.M., Hogenhout, S.A. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), E1254–63.
- Sukharev, S.I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F.R., Kung, C. (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by mscL alone. *Nature*, 368(6468), 265–8.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4252–7.
- Takahashi, M.A., Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226(2), 558–66.
- Takinami, Y., Maejima, K., Takahashi, A., Keima, T., Shiraishi, T., Okano, Y., Komatsu, K., Oshima, K., Namba, S. (2013). First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ infecting hydrangea showing phyllody in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 79(3), 209–213.
- Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M., Halling, S.M. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infection and Immunity*, 60(7), 2863–9.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–80.
- Toruño, T.Y., Musić, M.S., Simi, S., Nicolaisen, M., Hogenhout, S.A. (2010). Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1406–15.
- Tran-Nguyen, L.T.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K.S. (2008). Comparative genome analysis of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ Strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3979–91.

- Tully, J.G., Bove, J.M., Laigret, F., Whitcomb, R.F. (1993). Revised Taxonomy of the Class *Mollicutes*: Proposed Elevation of a Monophyletic Cluster of Arthropod-Associated Mollicutes to Ordinal Rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with Provision for Familial Rank To Separate Species with Nonhelical Morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from Helical Species (*Spiroplasmataceae*), and Emended Descriptions of the Order *Mycoplasmatales*, Family *Mycoplasmataceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (2), 378–385.
- United Nations (2013). World Population Prospects 2012.
- Van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J., de Wit, P.J.G.M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *MPMI*, 19 (12), 1420–30.
- Vega, N.M., Gore, J. (2014). Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current Opinion in Microbiology*, 21C, 28–34.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y., Smith, H.O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304 (5667), 66–74.
- Verheul, A., Russell, N.J., Van't Hof, R., Rombouts, F.M., Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (9), 3451–7.
- Von Bodman, S.B., Bauer, W.D., Coplin, D.L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 455–82.
- Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H.y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., Namba, S. (2004). In plant dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*, 94 (3), 244–250.
- Wang, Q., Johnson, J.L., Agar, N.Y. R., Agar, J.N. (2008). Protein aggregation and protein instability govern familial amyotrophic lateral sclerosis patient survival. *PLoS Biology*, 6(7), e170.
- Wong-Vega, L., Burke, J.J., Allen, R.D. (1991). Isolation and sequence analysis of a cDNA that encodes pea manganese superoxide dismutase. *Plant molecular biology*, 17(6), 1271–1274.
- Wang, Y., Wang, H., Yang, C.H., Wang, Q., Mei, R. (2007). Two distinct manganese-containing superoxide dismutase genes in *Bacillus cereus*: their physiological characterizations and roles in surviving in wheat rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 272 (2), 206–13.
- Waters, C.M., Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319–46.
- Whitehead, N.A., Byers, J.T., Commander, P., Corbett, M.J., Coulthurst, S.J., Everson, L., Harris, A.K.P., Pemberton, C.L., Simpson, N.J.L., Slater, H., Smith, D.S., Welch, M., Williamson, N., Salmond, G.P.C. (2002). The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1–4), 223–31.

- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (12), 6578–83.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical Journal*, 322 (Pt-3), 681–92.
- Yang, X.F., Pal, U., Alani, S.M., Fikrig, E., Norgard, M.V. (2004). Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *The Journal of Experimental Medicine*, 199 (5), 641–8.
- Yue, H.N., Wu, Y.F., Shi, Y.Z., Wu, K.K., Li, Y.R. (2008). First Report of Paulownia Witches'-Broom Phytoplasma in China. *Plant disease*, 92 (7), 1134.
- Zhang, W., Baseman, J.B. (2011). Transcriptional response of *Mycoplasma genitalium* to osmotic stress. *Microbiology*, 157 (Pt-2), 548-56.
- 塩見敏樹、田中穰、植松清次、脇部秀彦、中村宏子 (1999). ヒメフタテンヨコバイ媒介性ファイトプラズマによるスターチステんぐ巢病の発生. *日植病報*, 65, 87-90.
- 塩見敏樹、田中穰、澤柳利実、山本伸一、土崎常男、難波成任 (1998). 継代保存中に生じたタマネギ萎黄病ファイトプラズマの病徴変異株. *日植病報*, 64, 501-505.
- 土居養二、寺中理明、與良清、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節節に見出された mycoplasma 様 (あるいは PLT 様) 微生物について. *日植病報*, 33, 259–266.

謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室 難波成任教授には、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りましたことに衷心より感謝申し上げます。また、同研究室の大島研郎准教授 (現 法政大学 生命科学部 応用植物科学科 植物医科学専修 教授)、山次康幸准教授、小松健特任助教 (現 東京農工大学 農学研究院 応用生物科学科 植物病理学研究室テニユアトラック特任准教授)、前島健作特任助教、柿澤茂行研究員 (現 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 生物資源情報基盤研究グループ主任研究員)、石井佳子博士研究員 (現 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 生物共生進化機構研究グループ研究員)、姫野未紗子博士研究員 (現 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 植物医科学研究室博士研究員) には平素の研究の遂行ならびに本稿の執筆にあたり、重要なお助言を賜りました。謹んで感謝申し上げます。さらに、同期の白石拓也さん、煉谷裕太郎さん、湊菜未さんには研究において重要なアドバイスを頂いたのみならず、日々の学生生活において幾度となく私の至らない点を補っていただきました。改めて感謝の意を表します。植物病理学研究室ならびに植物医科学研究室の博士研究員、学生の皆様、卒業生の皆様、技術補佐員の皆様、非常勤職員の皆様には研究生活並びに学生生活の様々な面でご支援をいただきました。心よりお礼申し上げます。