

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 24 年度博士課程進学

氏 名 三浦 千裕

指導教員名 難波 成任

論文題目 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

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）、突抜、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て、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。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。