

博士論文

ファイトプラズマ感染による不稔症状を引き起こす
病原性因子に関する研究

湊 菜未

目次

緒言	i
図表目次	ii
第1章 緒論	1
1.1. ファイトプラズマに関する既往の研究	1
1.1.1. ファイトプラズマによる病害	1
1.1.2. ファイトプラズマの性状	4
1.1.3. ファイトプラズマの分類	11
1.1.4. ファイトプラズマによる病徴誘導機構	15
1.2. 植物病原体によって誘導される不稔症状	21
第2章 不稔症状を誘導するファイトプラズマの病原性因子の同定	25
2.1. 序文	25
2.1.1. OY ファイトプラズマの生殖生長への影響	25
2.1.2. シロイヌナズナの生殖	27
2.2. 材料と方法	30
2.2.1. 供試植物と生育条件	30
2.2.2. ファイトプラズマの虫媒接種	30
2.2.3. 走査型電子顕微鏡による観察	30
2.2.4. 人工交配	31
2.2.5. 莢長測定による稔性の判定	32
2.2.6. total RNA 抽出	32
2.2.7. 定量 RT-PCR	33
2.3. 結果	36
2.3.1. OY ファイトプラズマ感染植物は不稔症状を示す	36
2.3.2. TENGU は不稔症状を誘導する	40
2.3.3. TENGU による軽度の生育異常は雄性不稔である	43
2.3.4. 不稔症状の程度は TENGU の発現量依存的である	47
2.4. 考察	49

2.4.1. 花の成熟不全による不稔症状	49
第3章 TENGUによる不稔症状誘導機構の解析	52
3.1. 序文	52
3.1.1. シロイヌナズナの花器官の成熟に関わる遺伝子群	52
3.1.2. 花器官の成熟に関わる植物ホルモン	55
3.2. 材料と方法	56
3.2.1. 供試植物	56
3.2.2. ファイトプラズマの虫媒接種	57
3.2.3. total RNA 抽出	57
3.2.4. 定量 RT-PCR	57
3.2.5. ノーザンブロット解析	59
3.2.6. ホルモン分析	62
3.3. 結果	66
3.3.1. TENGUによる <i>ARF6</i> および <i>ARF8</i> 遺伝子の発現変動	66
3.3.2. TENGUによる花の成熟に関わる遺伝子の発現変動	69
3.3.3. TENGUによる植物ホルモンの内生量の減少	72
3.4. 考察	75
3.4.1. TENGUは <i>ARF6</i> および <i>ARF8</i> の発現を低下させる	75
3.4.2. TENGUは植物ホルモンの内生量に影響する	76
3.4.3. TENGUによる不稔症状誘導機構	77
第4章 総合考察	79
4.1. TENGUの作用機作	79
4.2. ジャスモン酸内生量減少の意義	80
4.3. エフェクターによるジャスモン酸の内生量減少誘導機構	81
4.4. TENGUによる植物ホルモンの減少はサリチル酸非依存的である	84
4.5. 不稔症状の生物学的意義	85
摘要	iv
謝辞	ix
引用文献	x
略語一覧	xxiv

緒言

人類にとって持続的な食料生産は恒久の課題である。特に穀類をはじめとする作物の生産は人類にとって必要不可欠であるが、植物病による減収は未だ世界各地で作物生産に大きな打撃を与え続けている。

菌類・細菌・ウイルスなどの病原微生物によって引き起こされる植物病は遥か昔より認知され、人類はその根絶に向けて様々な防除策を試みてきた。植物病がもたらす作物の減収は病害ロスと呼ばれ、雑草によるロスや家畜・害虫によるロスと並んで現代農業における作物の収量増加を妨げる原因の一つとされている。これらによる作物の被害を軽減すべくこれまでに多くの研究が為されてきたが、特に病害ロスについては現在の防除技術による削減に限界があることから、雑草害ロスや家畜虫害ロスと比べ更に効果の高い防除策の確立が熱望されている。したがって、病原微生物により作物が植物病に冒され収量の減少が引き起こされるメカニズムを解明し新たな防除技術確立の糧とすることは、持続的な作物生産の実現に非常に重要である。

本論文は、以上の考えのもと、病原細菌によって植物の種子生産が妨げられる事象を例とし、その発病機構について行った研究を纏めたものである。

図表目次

図 1-1	植物病原体による世界的な作物の減収	2
図 1-2	ファイトプラズマによる病害	3
図 1-3	ファイトプラズマの透過型電子顕微鏡写真	6
図 1-4	ファイトプラズマの全身移行	7
図 1-5	ファイトプラズマの分類	13
図 1-6	ファイトプラズマ属細菌の分類	14
図 1-7	ファイトプラズマによって引き起こされる病徴	16
図 1-8	植物病原細菌のエフェクタータンパク質	19
図 1-9	ファイトプラズマのエフェクターTENUGU の塩基・アミノ酸配列	19
図 1-10	ファイトプラズマのエフェクターの異所的発現による効果	20
図 1-11	TYLCCNV の β C1 による不稔症状の誘導	22
図 2-1	onion yellows (OY) ファイトプラズマの病徴と媒介昆虫	26
図 2-2	シロイヌナズナにおける生殖生長の過程	29
図 2-3	不完全花の形成と雌雄器官の発育停止	29
図 2-4	OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの病徴	37
図 2-5	OY ファイトプラズマ感染または TENUGU の発現により誘導される花器官の成熟不全	38
図 2-6	TENUGU 形質転換体に誘導される形態異常	42
図 2-7	TENUGU 形質転換シロイヌナズナのロゼット	42
図 2-8	TENUGU 形質転換シロイヌナズナの果実	45
図 2-9	TENUGU 形質転換シロイヌナズナの交配によって得られた果実	46
図 2-10	TENUGU 形質転換シロイヌナズナの花粉の走査型電子顕微鏡写真	46
図 2-11	TENUGU 形質転換シロイヌナズナにおける <i>tengu</i> 遺伝子の発現量	48
図 3-1	<i>ARF6</i> および <i>ARF8</i> の二重変異体の表現型	53
図 3-2	ARF および MYB のホルモン応答への寄与	54
図 3-3	OY ファイトプラズマ感染および TENUGU 形質転換シロイヌナズナにおける <i>ARF6/8</i> 遺伝子の発現量	67
図 3-4	OY ファイトプラズマ感染および TENUGU 形質転換シロイヌナズナにおける <i>miR167</i> の発現量	68
図 3-5	OY ファイトプラズマ感染および TENUGU 形質転換シロイヌナズナにおける <i>LOX2</i> 遺伝子の発現量	70
図 3-6	OY ファイトプラズマ感染および TENUGU 形質転換シロイヌナズナにおける <i>MYB21/24</i> 遺伝子の発現量	71

図 3-7	OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナにおけるホルモンの内生量	74
図 3-8	TENGU による不稔症状誘導モデル	78
図 4-1	近年提唱されている <i>ARF6/8</i> の発現制御機構	83
表 1-1	ファイトプラズマの媒介昆虫の分類	8
表 1-2	ファイトプラズマのエフェクターとその機能	20
表 2-1	本章で用いたプライマー	35
表 2-2	標準化プライマーの検討結果	35
表 2-3	OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナの病徴	37
表 2-4	TENGU 形質転換シロイヌナズナの稔実率	45
表 3-1	本章で用いたプライマー	58

第1章 緒論

1.1. ファイトプラズマに関する既往の研究

1.1.1. ファイトプラズマによる病害

植物を侵す微生物は菌類・細菌・ウイルスの三つに大別される。植物病原細菌は菌類と合わせて作物収量の9.9%の損失を生み出しており (Oerke and Dehne, 2004; 図 1-1 a)、特にアジア・アフリカ地域の発展途上国において克服が急務である (図 1-1 b)。

植物病原細菌の一つであるファイトプラズマ (phytoplasma) は、宿主植物に葉化をはじめとした独特の病徴 (1.1.4.項、後述) を引き起こすことで知られているが、実際には葉化・天狗巢などの形態異常の後に植物体が枯死に至る場合も多く、感染による損失は決して少なくない (図 1-2)。ファイトプラズマ病は日本を含む85か国以上での発生が確認されており (McCoy *et al.*, 1989)、その発生域は増え続けている。過去にファイトプラズマ病がもたらした歴史的な被害として、アメリカ東部とロシアで発生した peach yellows によって一千万本のモモの樹が枯死した例や、pear decline によりアメリカ合衆国の太平洋沿岸部、カナダ、ヨーロッパ諸国で数百万本のナシ樹が枯死した事例が挙げられる (Agrios, 2004)。またココヤシに発生する lethal yellowing は、中央アメリカ地域から北アメリカ地域へと感染を拡大しており、今後重大な損失を引き起こしうるファイトプラズマ病として動向が注視されている (Agrios, 2004)。

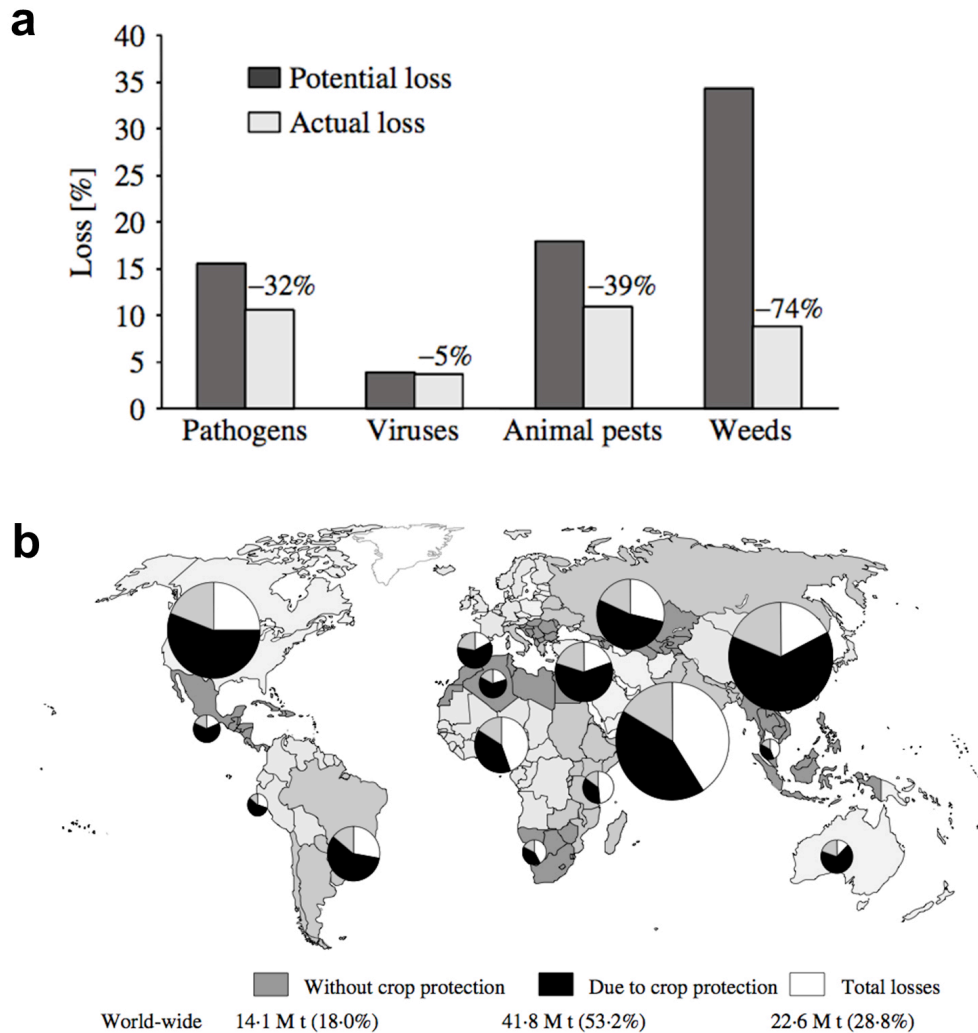


図 1-1 植物病原体による世界的な作物の減収 (Oerke, 2006)

- a) 様々な要因による主要作物収量の損失の割合。横軸左から順に、菌類および細菌による病害、植物ウイルスによる病害、家畜虫害、雑草害による減収率を表す。黒色は各害により想定される減収率、灰色は 2001-2003 年における実際の減収率を表す。またグラフ上の数値(%)は想定される減収のうち、現在の防除技術により克服される割合を示す。
- b) 世界各地域における綿花の収量の内訳。灰色は防除によらず得られる収量、黒色は防除により得られた収量、白色は各害による損失を表す。特に南アジアおよびアフリカ地域において、損失の割合が高くなっている。

a



b



図 1-2 ファイトプラズマによる病害

- a) ココヤシにおける lethal yellwing の被害 (Markham, 2014)。葉の黄化・褐変の後、樹木は枯死に至ることも多い。
- b) ナシ樹における pear decline の被害 (Giunchedi, 2012)。主に北アメリカ地域やヨーロッパにおいて発生している。奥に写る健全な樹木と比較して、pear decline phytoplasma に感染した樹では萎凋や枯死が認められる。

1.1.2. ファイトプラズマの性状

形態

1967年土居らがクワ萎縮病において初めてマイコプラズマ様微生物 (mycoplasma-like organisms: MLOs; 1994年にファイトプラズマと改められた) の存在を見出した際には、その形態について『大小多数の(80~800 ^{ミリマイクロン} m μ)球~不斉楕円形』の粒子であると報告している (Doi *et al.*, 1967)。最も多く観察される直径 200-800 nm の楕円形から卵形 (図 1-3; Bertaccini and Duduk, 2009; Lee *et al.*, 2000) に加え、感染初期には糸状のファイトプラズマが認められるとの報告もある (Haggis and Sinha, 1978; Lee *et al.*, 2000)。

またファイトプラズマは *Mollicutes* 綱に属する細菌であり (1.1.3.項)、本綱に属するスピロプラズマ (*Spiroplasma*) および マイコプラズマ (*Mycoplasma*) と同様に細胞壁をもたない (Razin, 2006)。現在植物病原細菌であることが認められている細菌のうち、細胞壁を持たないのは *Mollicutes* 綱に属するファイトプラズマとスピロプラズマのみである。さらに *Mollicutes* 綱に属する細菌のなかでもファイトプラズマにのみ認められる特徴として、既知の細胞骨格が存在しないことが挙げられる (Christensen *et al.*, 2005)。これまで解読されたファイトプラズマの全ゲノム配列 (1.1.2.項、後述) からは一般的な細菌が持つアクチンおよびチューブリン様タンパク質をコードする遺伝子は見出されておらず、その形態維持機構については知見が乏しい。

増殖と拡大

ファイトプラズマは感染植物からヨコバイやウンカをはじめとした半翅目昆虫 (表 1-1) によって媒介され植物間の感染を拡大することが知られており (Weintraub and

Beanland, 2006)、その宿主範囲は媒介昆虫に大きく依存する (Bertaccini and Duduk, 2009)。冬期において宿主植物が枯死する場合にはファイトプラズマは媒介昆虫体内または多年生植物体内で越冬すると考えられている (Lee *et al.*, 2000)。またファイトプラズマは、近縁な植物種間での接ぎ木や、ヒルガオ科ネナシカズラ属に属する寄生植物 (dodder; *Cuscuta* spp.) が宿主植物に接触し吸根を維管束に侵入させることによっても健全植物に伝搬されることが知られている (Kaminska and Korbin, 1999)。

ファイトプラズマは種子伝染しない病原体であると考えられており、宿主植物の種子においても胚からは検出されないのが一般的である (Hogenhout *et al.*, 2008; Faghihi *et al.*, 2011)。しかしながら近年ではマメ科の多年草であるムラサキウマゴヤシ (*Medicago sativa*: アルファルファ) において種子伝染を支持する報告が発表されたほか (Khan *et al.*, 2002)、ヤシ科の植物であるココヤシ (*Cocos nucifera*) においては胚からファイトプラズマが検出される例が報告されている (Cordova *et al.*, 2003; Nipah *et al.*, 2007)。

植物体内においてファイトプラズマは篩部および隣接する伴細胞に局在することが知られており (図 1-4)、特にフィラメント状のファイトプラズマは篩孔を通過できることが示されている (四方, 1972)。また、一般的に植物個体内ではシンク葉や根と比較して成熟したソース葉に多く存在することが報告されている (Bertaccini and Duduk, 2009)。

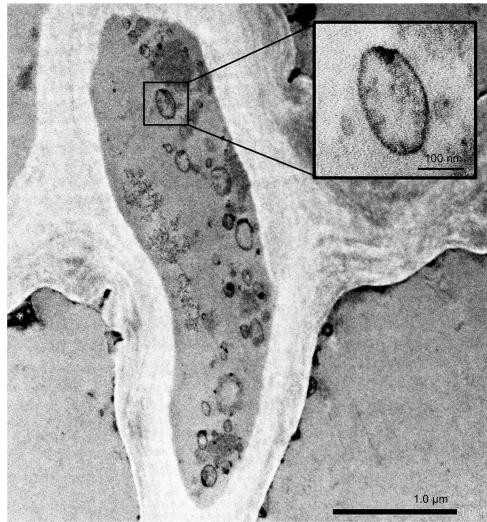


図 1-3 ファイトプラズマの透過型電子顕微鏡写真

OY ファイトプラズマに感染したシュンギクの篩部細胞。卵形の粒子がファイトプラズマである。右上にファイトプラズマの拡大写真を示した。

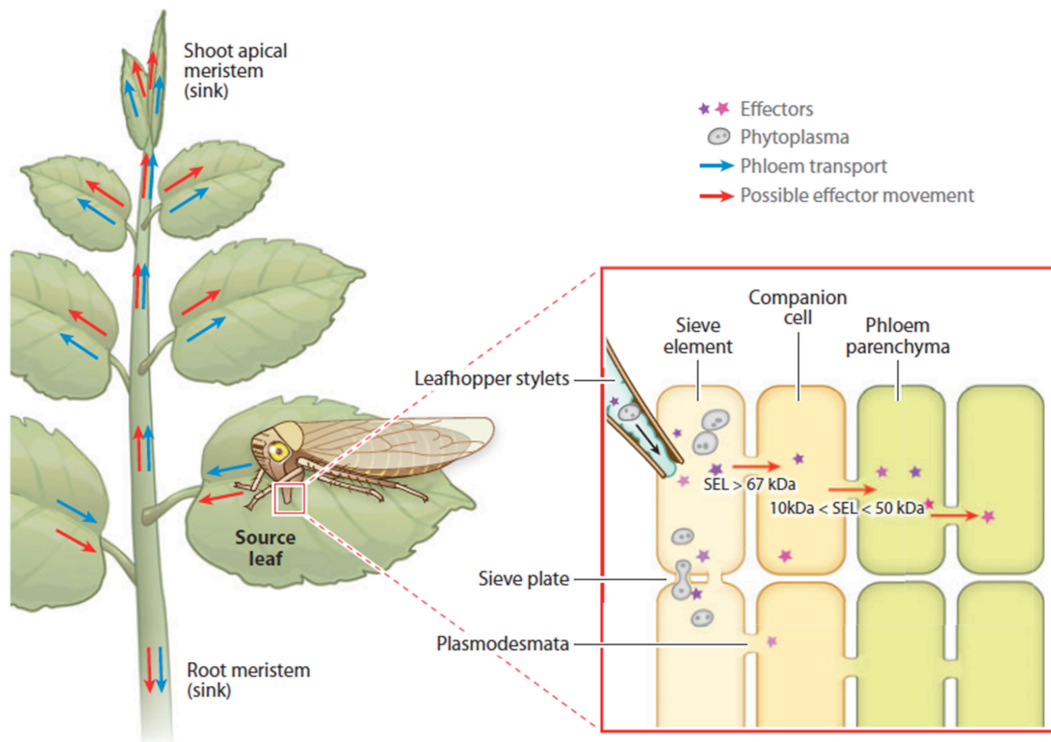


図 1-4 ファイトプラズマの全身移行 (Sugio *et al.*, 2011b)

媒介昆虫の吸汁により植物に感染したファイトプラズマ (灰色) は篩部転流によって全身へ移行する。また、ファイトプラズマが分泌するエフェクタータンパク質 (星印) はさらに広範囲に移行可能であると考えられている。

表 1-1 ファイトプラズマの媒介昆虫の分類

カメムシ目 (半翅目) HEMIPTERA	頸吻亜目 Auchenorrhyncha	セミ型下目 Cicadomorpha	ヨコバイ科 Cicadellidae
		ハゴロモ型下目 Fulgoromorpha	ヒシウンカ科 Cixiidae
			ウンカ科 Delphacidae
			ハネナガウンカ科 Derbidae
			アオバハゴロモ科 Flatidae
			キジラミ科 Psyllidae
	異翅亜目 Heteroptera	トコジラミ下目 Cimicomorpha	ゲンバイムシ科 Tingidae
	カメムシ下目 Pentatomomorpha	カメムシ科 Pentatomidae	

宿主範囲

ファイトプラズマは多様な植物に感染することのできる多犯性の病原細菌であるが、その宿主について網羅的な調査はほとんど為されていない。McCoyらは、1989年にマイコプラズマ様微生物 (MLOs) に感染した植物種を集約し、その宿主範囲が 98 科に及ぶことを発表した (McCoy *et al.*, 1989)。これを近年の分子系統解析を反映した植物の分類体系である APGII を基にした Mabberley の分類体系 (Mabberley, 2008; 大場, 2011) に基づいて分類し直すと、ファイトプラズマは少なくとも全ての科レベルの分類群のおよそ四分の一に当たる 101 科に及ぶ植物を宿主とすると考えられる。

ゲノム

2004 年にはタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: *Candidatus* Phytoplasma asteris OY strain: OY ファイトプラズマ) の全ゲノム配列が解読され (Oshima *et al.*, 2004)、その後 3 種のファイトプラズマ属細菌について全ゲノム配列が報告されている (Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2008)。これらのファイトプラズマのゲノムに共通した特徴として、一般的な細菌のゲノムと比べて GC 含量が 23-29 mol% と低いことが挙げられる (Razin, 2006; Oshima *et al.*, 2004)。さらにファイトプラズマのゲノムにコードされる一部のオペロンでは、同じ *Mollicutes* 綱に属するマイコプラズマよりも枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に類似した遺伝子構造を取ることが知られている (Oshima *et al.*, 2002)。また、OY 系統のファイトプラズマについては染色体のほかに 2 種類のプラスミドを持つことが分かっている (Oshima *et al.*, 2004)。

防除

ファイトプラズマはその生活環の大半を宿主植物に依存した多犯性の微小細菌であり、また昆虫媒介性であることから、ファイトプラズマ病に対する防除技術は未だ確立されていない。現在考えられているファイトプラズマ病の防除策としては、1) 媒介昆虫の制御および2) 植物からの病原体の排除の二つが挙げられる (Bertaccini and Duduk, 2009)。

媒介昆虫に着目したファイトプラズマの制御は、その昆虫の食性に依存するところが大きい。媒介昆虫が単食性 (monophagous) である場合には標的作物の栽培を一旦停止することにより容易に制御が可能であるが、多食性 (polyphagous) である場合には標的作物以外の雑草による保毒などによりファイトプラズマの拡散を食い止めることは困難である (Chaturvedi *et al.*, 2010)。

植物体からファイトプラズマを排除する方法の一つとしては、ファイトプラズマが植物体の茎頂に局在しないことを利用して、茎頂培養によりファイトプラズマフリーの植物を作出することが挙げられる。さらにシュンギクやニチニチソウなどの園芸作物においては、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ジベレリンなどの処理によりファイトプラズマによる発病の抑制が可能であることが報告されている (Ishie *et al.*, 1967; Chaturvedi *et al.*, 2010)。なお、同じく *Mollicutes* 綱に属する細菌であるスピロプラズマはテトラサイクリン系薬剤とエリスロマイシンによって防除が可能であることが知られているが (Chaturvedi *et al.*, 2010)、ファイトプラズマにはエリスロマイシンは無効とされる (四方, 1972)。この他に、植物体にファイトプラズマの主要膜タンパク質に対する抗体を発現させることで病徴を軽減させる方法も提唱されている (Le Gall *et al.*, 1998)。

1.1.3. ファイトプラズマの分類

方法

ファイトプラズマは発見当初から暫くの間、病徴と宿主範囲によって分類されていた（奥田、1972）。その後一般的な細菌と同様に 16S rRNA 遺伝子の restriction fragment length polymorphism (RFLP: 制限酵素断片長多型) 解析による分類が確立された後、16S rRNA 遺伝子の塩基配列による分子系統学的解析を反映した分類が可能になった（Namba *et al.*, 1993）。これらの 16S rRNA 遺伝子の全長塩基配列の比較に基づく分類は RFLP 解析による分類を裏付ける結果となった（難波、1996）。

学名

1994 年には国際マイコプラズマ学会（The International Organization for Mycoplasmaology: IOM）大会において、これまでのマイコプラズマ様微生物（MLOs）から暫定的な属名を *Phytoplasma* とし分類することが提案された（International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1995）。そのおよそ 10 年後、2004 年になって IRPCM において暫定的な学名として *Phytoplasma* 属が認められた（The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2004）。なおファイトプラズマは未だ人工培養に成功していない細菌であるため、*Candidatus*（主に遺伝情報のみが得られている原核生物）として扱われている（Murray *et al.*, 1994; 河村、2002）。

分類

ファイトプラズマは植物を侵す原核生物 prokryote のうち、*Mollicutes* 綱に分類されている (Johansson *et al.*, 1998; 図 1-5 a)。*Mollicutes* 綱に属する細菌の祖先は 600 万年前に *Streptococcus* (レンサ球菌) 属細菌と分岐し、その後現在の *Mollicutes* 綱に分類される *Acholeplasma*, *Anteroplasm*a, *Anaeroplasm*a が属するグループ (AAA グループ) と *Spiroplasma*, *Entomoplasm*a, *Mycoplasma* が属するグループ (SEM グループ) に分化したと考えられており、中でもファイトプラズマは同じく植物病原細菌であるスピロプラズマが属する SEM グループではなく AAA グループに系統的に近縁であることが示されている (図 1-5 b; Lee *et al.*, 2000; Maniloff, 2002)。

暫定的に *Phytoplasma* 属に分類される細菌は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が 97.5%未満である場合に別種として扱われている (図 1-6)。現在 *Ca. Phytoplasma* 属内細菌の分類は主に 16S rRNA 遺伝子の塩基配列比較を元に行われているが、この他にも伸長因子 *EF-Tu* (*tuŧ*) 遺伝子 (Kamla *et al.*, 1996) や熱ショックタンパク質遺伝子 *heat shock protein 70* (*hsp70*) (Falah and Gupta, 1997) など数種の保存性の高い遺伝子を用いた系統解析により分類が為され、16S rRNA 遺伝子を用いた場合の分類を支持することが示されている (Razin, 2006)。

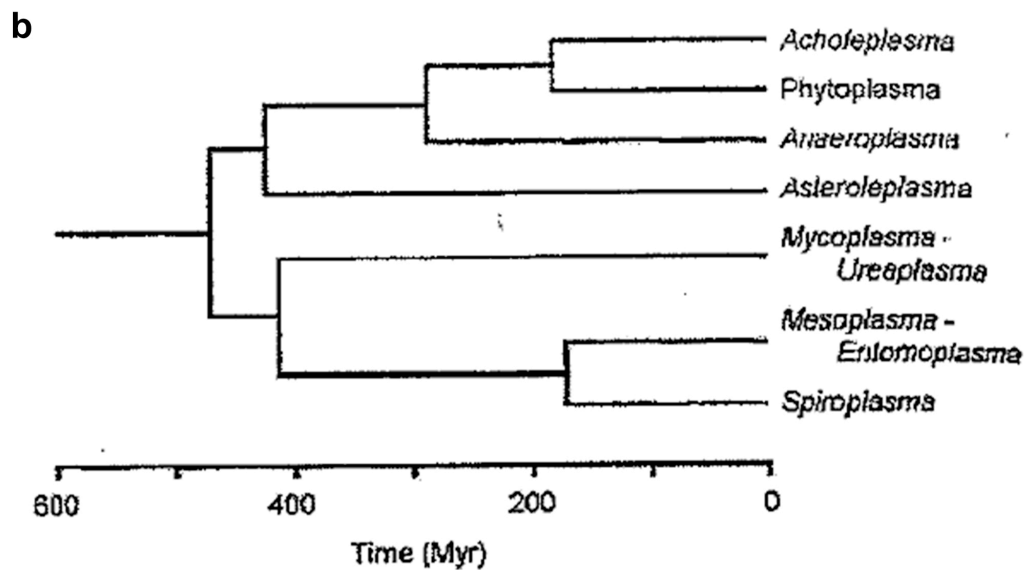
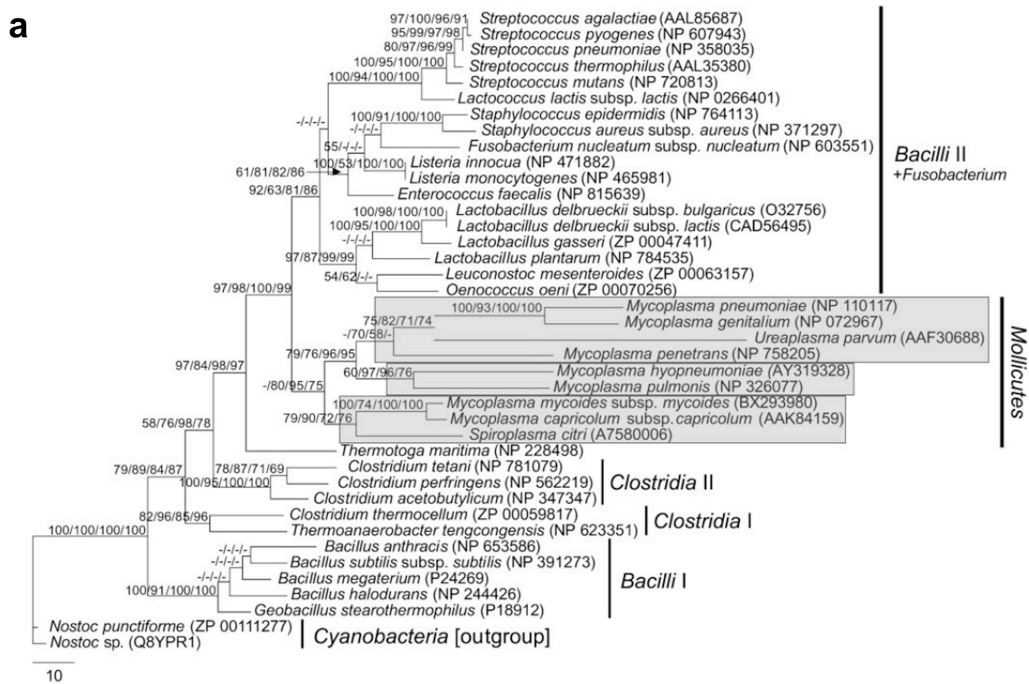


図 1-5 ファイトプラズマの分類

- a) *Mollicutes* 網を含む原核生物の系統樹 (Johansson *et al.*, 1998)。分枝上の数値はそれぞれ MP/ML/NJ/ NJ 法により算出したブートストラップ値を示す。
- b) *Mollicutes* 網に分類される細菌の系統樹 (Maniloff, 2002)。横軸は推定される分岐年代 (百万年)。ファイトプラズマは上部の AAA グループに属する。

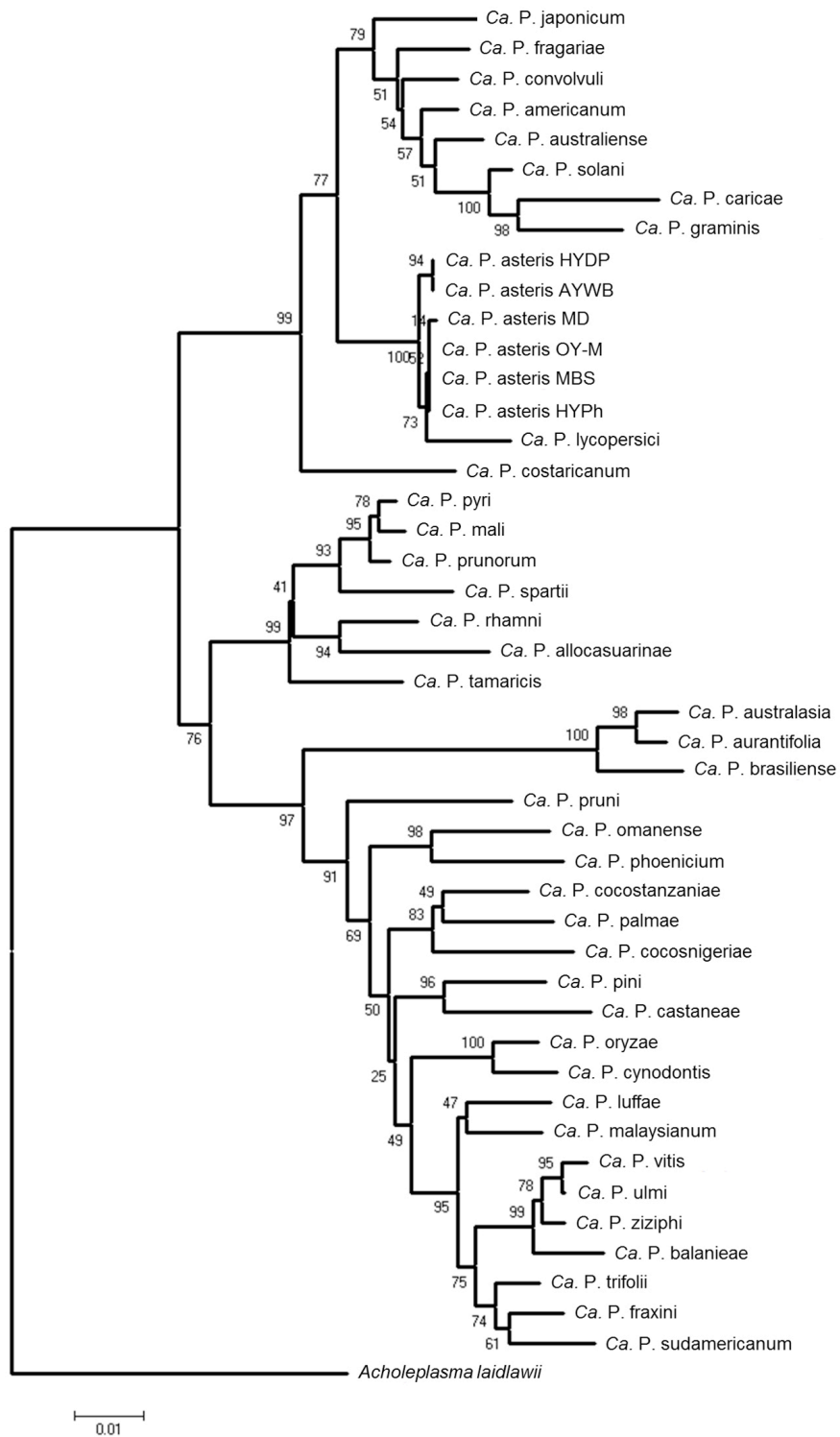


図 1-6 ファイトプラズマ属細菌の分類

16S rRNA 遺伝子によって分類されたファイトプラズマ属に属する種々のファイトプラズマの系統樹。外群には *Acholeplasma laidlawii* を用いた。Ca: *Candidatus*; P: *Phytoplasma*.

1.1.4. ファイトプラズマによる病徴誘導機構

植物宿主における病徴

ファイトプラズマは植物に感染すると多様な病徴を誘導する (図 1-7)。全身に現れる病徴としては、全身枯死や萎縮・叢生が挙げられる。そのほか図 1-7 に示したように、葉や花、果実などそれぞれの器官に特異的に認められる症状も多く報告されている。特に花および果実に見られる病徴には、いわゆる葉化などの「奇形」を伴う不稔症状 (図 1-7 f,g,h) とそのような形態異常を伴わない不稔症状 (図 1-7 i,l) の両方が存在する (1.2.節)。

分泌タンパク質による病徴誘導機構

一般的な植物病原細菌は植物の細胞外に存在しており、宿主の防御応答を抑制するために自身の細胞質から植物の細胞質へとエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌・注入する (Denance *et al.*, 2013; 図 1-8)。植物の細胞内に局在するファイトプラズマにおいても、菌体外へ分泌されるタンパク質がエフェクターとして機能することが報告されており、これまでにファイトプラズマのエフェクターとして 3 種類、4 つのタンパク質が同定されている (Hoshi *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011a; MacLean *et al.*, 2011; Maejima *et al.*, 2014; 後述)。

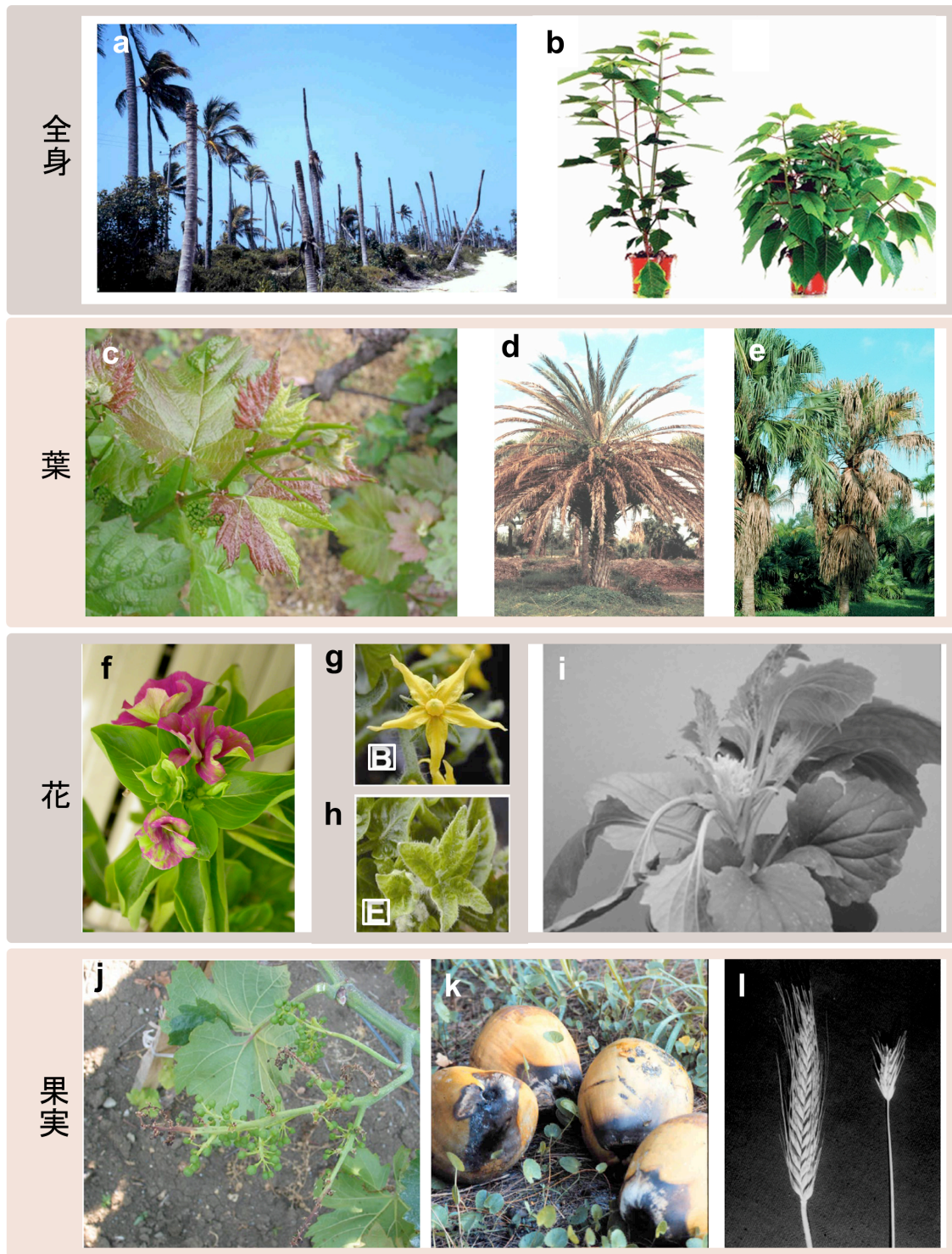


図 1-7 ファイトプラズマによって引き起こされる病徴
 注釈は次頁

図 1-7 ファイトプラズマによって引き起こされる病徴

部位毎、全身・葉・花・果実の順に主要な病徴を纏めた。

- a) ヤシ科植物における全身枯死 (Harrison and Elliott, 2007)。
- b) ファイトプラズマに感染した右側のポインセチアでは萎縮・叢生症状が認められる (Nicolaisen and Horvath, 2008)。
- c) ブドウの葉におけるフラボノイド色素の蓄積 (Bertaccini and Duduk, 2009)。
- d,e) ヤシ科植物における葉の褐変および黄化 (Harrison and Elliott, 2007)。進行すると枯死に至る。
- f) ニチニチソウにおける花の緑化 (Bertaccini and Duduk, 2009)。
- g,h) stolbur phytoplasma による奇形花の誘導 (Pracros *et al.*, 2006)。引用元の図番号は四角で囲んだ。g) ファイトプラズマ非感染トマト花、h) stolbur phytoplasma 感染トマト花。感染花では葉化・緑化や花器官の欠損が起こる。
- i) ファイトプラズマ感染によりアスターは葉化・緑化を伴わない不稔症状を呈する (Zhang *et al.*, 2004)。
- j) ブドウにおける果実の数量の減少 (Bertaccini and Duduk, 2009)。
- k) lethal yellowing により、ココヤシの果実が熟す前に落果する (Harrison and Elliott, 2007)。
- l) ムギ類における穂の矮小化 (Urbanaviciene *et al.*, 2004)。

ファイトプラズマのエフェクターTENGU

ファイトプラズマのエフェクターとして最初に報告されたタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: OY ファイトプラズマ) の分泌タンパク質 phytoplasma tenu-su inducer (TENGU) は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) およびベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) に萎縮 (dwarfism) および叢生 (witches' broom) による天狗巣症状を誘導する (Hoshi *et al.*, 2009)。TENGU は菌体外へ分泌される際に切断されるシグナル配列を除いて全長 38 アミノ酸のペプチドであり、植物体内では篩部およ

び茎頂分裂組織に局在することが報告されている(図 1-9; Hoshi *et al.*, 2009)。また、TENGU を 35S プロモーター下流で異所的に発現させた形質転換シロイヌナズナでは *Aux/IAA* 遺伝子ファミリー、*small auxin-up-regulated (SAUR)* 遺伝子ファミリーなどに属するオーキシンによって発現が誘導される遺伝子の発現が低下することがマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によって示されており、オーキシンの生合成または受容・応答に影響している可能性が示唆されていた (Hoshi *et al.*, 2009)。

TENGU の発見以降、これまでにファイトプラズマのエフェクターとしてその機能が報告された 3 種のタンパク質についてその特徴を表にまとめた (表 1-2)。OY ファイトプラズマと同じ暫定種 *Ca. Phytoplasma asteris* に属する *aster yellows strain witches' broom (AY-WB)* ファイトプラズマのエフェクターである *secreted AY-WB protein (SAP) 11* は、異所的発現によってシロイヌナズナにおいてジャスモン酸生合成経路を抑制することが示されている (Bai *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011a)。SAP11 形質転換体では鋸歯状の葉が観察されるほか抽苔後に叢生が誘導されることが報告されているが、草丈の萎縮が認められない点で TENGU の形質転換体と異なる (図 1-10; Sugio *et al.*, 2011a; Hoshi *et al.*, 2009)。また、*Ca. Phytoplasma asteris* に属する AY-WB ファイトプラズマの SAP54 およびその OY ファイトプラズマにおけるホモログである PHYL1 についてもその機能が詳細に解析され報告されている (MacLean *et al.*, 2011; Maejima *et al.*, 2014; MacLean *et al.*, 2014)。SAP54 や PHYL1 は、花器官ホメオティック遺伝子である MADS ファミリーに属する転写因子群を分解することによりその働きを阻害し、葉化および緑化症状を誘導するものと考えられている (図 1-10; MacLean *et al.*, 2014; Maejima *et al.*, 2014)。

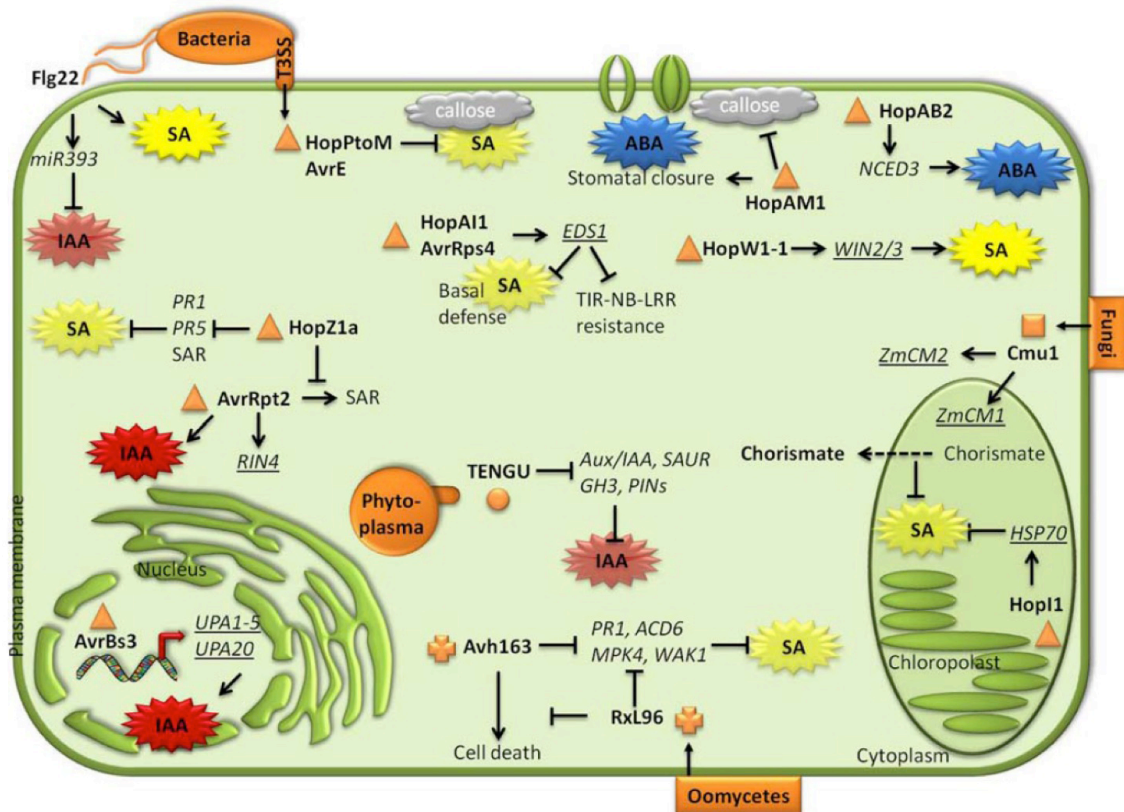


図 1-8 植物病原細菌のエフェクタータンパク質 (Denance *et al.*, 2013)

植物病原細菌 (左上部) は植物細胞内にエフェクタータンパク質 (橙色三角印) を注入し、植物側の防御応答に対抗する。細胞内局在であるファイトプラズマ (中央部) においても、一般的な細菌と同様に植物の細胞質側にエフェクタータンパク質 (橙色丸印) を分泌し、宿主植物のホルモンシグナル伝達経路などを攪乱すると考えられている。

```

1  ATGGTAAAACACTCAAAAAACATAAAGCAAAACTGTTAATATTTGCTGGCTTTTGGGCTATT
   M V K L K K H K A K L L I F A G F W A I
61  TTGCTATTTTTAAATCACAATTATTTAATTTTTGCTGACCAAGATGATGATATTGAAAAC
   L L F L N H N Y L I F A D Q D D D I E N
121 GTGATAACTCTAATTGAACTAAAGAGAATCAAACAGAACAATAAAAAATACAATGTCAA
   V I T L I E T K E N Q T E Q I K I Q C Q
181 GATTTATTGCAAAGGGCGAGAAAGATGCC
   D L L Q K G E K D A
  
```

図 1-9 ファイトプラズマのエフェクターTENGUの塩基・アミノ酸配列 (Hoshi *et al.*, 2009)

下線部はシグナル配列として菌体外に分泌される際に切断される予測配列を示す。

表 1-2 ファイトプラズマのエフェクターとその機能

	TENGU	SAP11	SAP54/PHYL1
全長アミノ酸と予測される分子量*	38 aa, 4.5 kDa ¹	121 aa ³ , ~9 kDa ⁴	124/125 aa ^{6,7} 10.7/10.6 kDa ^{6,7}
組織局在	篩部・柔組織・SAM ¹	葉肉細胞・トライコーム ³	不明
細胞内局在	細胞質 ¹	核 ^{3,5}	不明
影響するホルモン	オーキシン** ¹	ジャスモン酸 ⁴	不明
相互作用因子	不明	転写因子TCPs*** ⁴	転写因子MADSファミリー ^{7,8}
異所的発現の効果	節間の萎縮・叢生、葉序の乱れ、莢の発達不全 ^{1,2}	叢生 (脇芽の伸長)、鋸歯状の葉 ⁴	葉化・突き抜け ^{6,7,8}
ホモログの機能保存性	あり ²	不明	あり ⁷

*: 分泌シグナル配列切断後の分子量を表す。**: マイクロアレイ解析による示唆。

***: TEOSINTEBRANCHED, CYCLOIDEA, PROLIFERATION FACTOR 1 AND 2を指す。

References) 1: Hoshi *et al.*, 2009; 2: Sugawara *et al.*, 2013; 3: Bai *et al.*, 2009; 4: Sugio *et al.*, 2011a; 5: Sugio *et al.*, 2014; 6: MacLean *et al.*, 2011; 7: Maejima *et al.*, 2014; 8: MacLean *et al.*, 2014

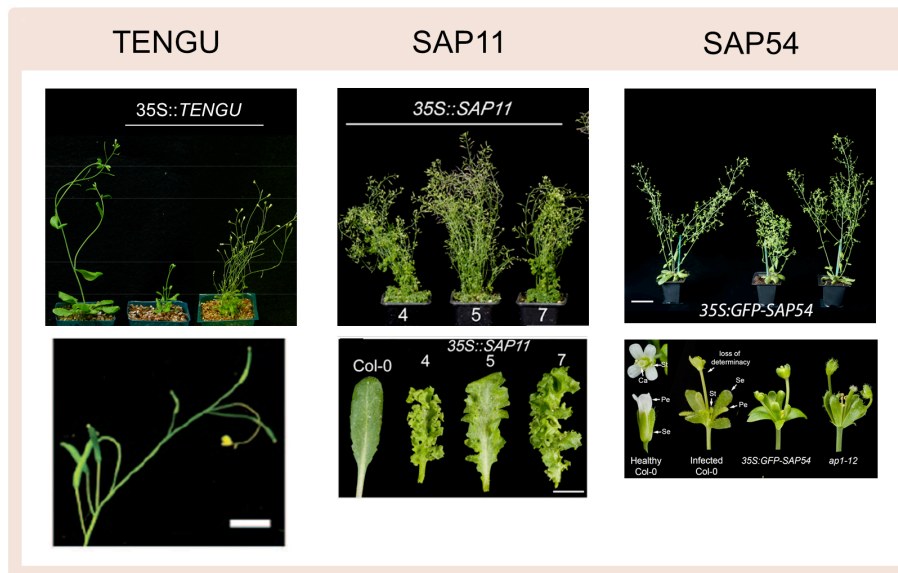


図 1-10 ファイトプラズマのエフェクターの異所的発現による効果

(左) TENGU の発現によりシロイヌナズナでは萎縮、叢生および葉序の乱れが起こる (Hoshi *et al.*, 2009、一部加筆)。(中央) SAP11 を異所的に発現するシロイヌナズナでは叢生が起こり、葉が鋸歯状になる (Sugio *et al.*, 2011a)。(右) SAP54 の発現によりシロイヌナズナでは葉化や緑化、突き抜けが起こる (MacLean *et al.*, 2014)。

1.2. 植物病原体によって誘導される不稔症状

1.1.4.項で述べたように、植物病原体はしばしば宿主植物の稔性にも大きな影響を与えている (Abramovitch *et al.*, 2006)。植物の不稔症状は、1794年に Plenck により発表された『*Physiologia et pathologia plantarum*』においても既に病原体により花に引き起こされる病徴の一つとして挙げられており (Plenck, 1794; Ainsworth, 1981)、病原体と宿主植物の攻防の結果として長らく観察されてきた。

このような不稔症状は篩部局在の細菌およびウイルスによって引き起こされると考えられている (Agrios, 2004)。植物を侵すウイルスにおいては、宿主の生殖に影響を与えるものが多く存在することが知られている。例えば、turnip yellow mosaic virus に感染したアブラナ科植物では莢および種子の産生が有意に減少することが報告されており (Maskell *et al.*, 1999)、また tobacco leaf curl virus はヒヨドリバナ (*Eupatorium makinoi*) に感染すると種子稔実率を低下させ、草丈の伸長を妨げることが明らかとなっている (Yahara and Oyama, 1993)。これらのウイルスによる不稔症状の誘導機構はほとんどの場合未解明であるが、tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV) においてはウイルスの持つ BC1 タンパク質が asymmetric leaves 1 (AS1) と結合して AS2 の機能を一部ミミックすることにより、幾つかのジャスモン酸応答遺伝子の発現を低下させ不稔花を誘導することが分かっている (図 1-11; Yang *et al.*, 2008)。

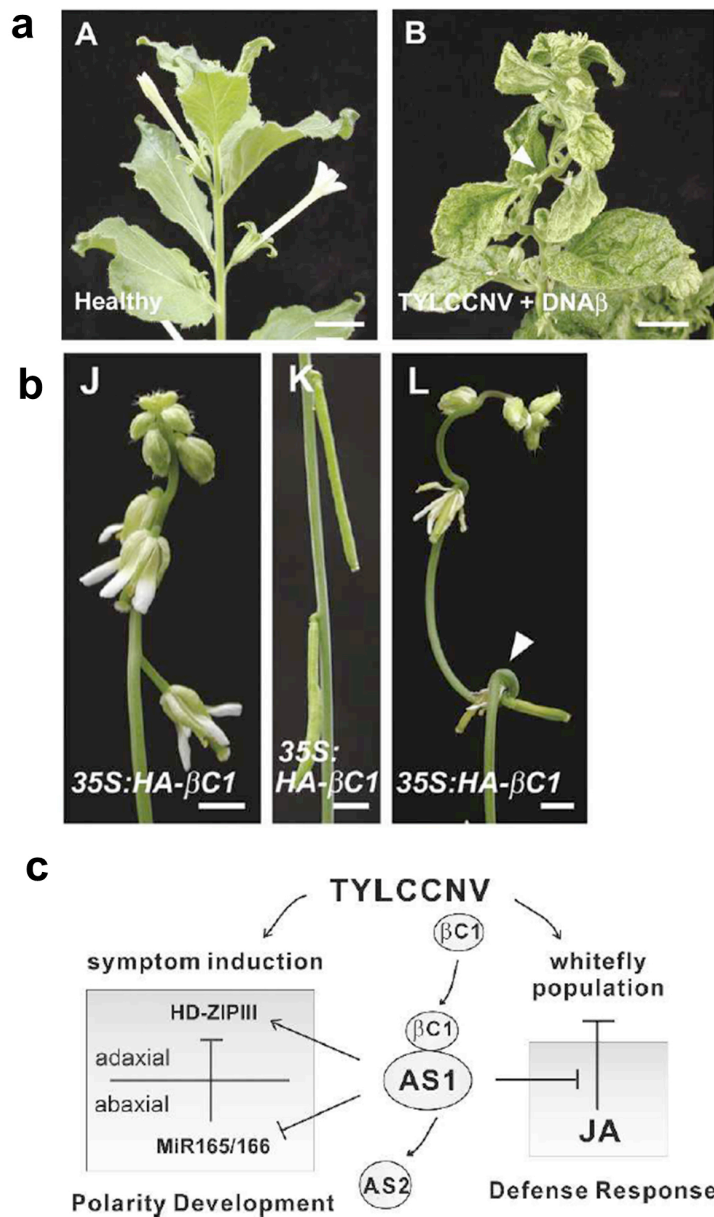


図 1-11 TYLCCNV の β C1 による不稔症状の誘導 (Yang *et al.*, 2008)

- a) ウイルス非感染ベンサミアナタバコ (左) および TYLCCNV に感染したベンサミアナタバコ (右)。矢頭は湾曲したシュートを示す。
- b) β C1 タンパク質を 35S プロモーター下で異所的に発現させたシロイヌナズナ。下向きの花序や莢が観察される。
- c) TYLCCNV 感染における β C1 タンパク質の機能モデル。ジャスモン酸 (JA) 生合成の抑制により媒介昆虫を正に制御すると考えられている。

ファイトプラズマ感染植物においても、不稔症状は重要な病徴である。これまでに、分子生物学的研究が最も良く進められている *Candidatus Phytoplasma asteris* のほか、*Ca. P. solani*、*Ca. P. aurantifolia*、*Ca. P. phoenicium*、*Ca. P. oryzae* といった多くのファイトプラズマ種が不稔症状を誘導することが報告されている (Jung *et al.*, 2003; Tesseme *et al.*, 2004; Pracros *et al.*, 2006; Salehi *et al.*, 2007; Esmailzadeh-Hosseini *et al.*, 2007; Alcantara-Mendoza *et al.*, 2010)。

これらのファイトプラズマの多くは葉化や緑化のような花器官の属性決定の異常を促すことで不稔症状を引き起こす。例えば、トマトを冒す *stolbur phytoplasma* は図 1-6 のように花器官の属性決定に異常を来すことで雌性不稔を引き起こすことが知られており、このとき花器官の属性決定を制御する花器官ホメオティック遺伝子の発現が変動していることが示されている (Pracros *et al.*, 2006)。

他方 *Ca. P. asteris* や *Ca. P. oryzae* に分類される一部のファイトプラズマは特定の宿主植物に花器官の属性決定に異常を伴わずに不稔症状を誘導する (図 1-6)。これらの不稔症状においては宿主植物の花に「奇形」と思しき異常が認められないにもかかわらず種子の稔実率が低下することから、ファイトプラズマによる病徴においても葉化・緑化と区別して考えられることが多い (Chaturvedi *et al.*, 2010)。

ファイトプラズマの誘導する葉化・緑化症状については近年その誘導因子としてエフェクターが同定されたほか (MacLean *et al.*, 2011)、MADS ファミリーに属する転写因子の分解による誘導機構が詳細に解明された (MacLean *et al.*, 2014; Maejima *et al.*, 2014)。一方奇形を伴わない不稔症状については、葉化・緑化症状と同様に作物の果実や種子の生産

を妨げるため農業上深刻な問題でありながら、これらの宿主植物に不稔症状が誘導されるメカニズムは未解明であり、またその誘導因子も不明であった。そこで本研究では、ファイトプラズマの感染によって引き起こされる不稔症状の発病機構に病原体側・宿主植物側の両面から迫ることを目的とした。

第2章 不稔症状を誘導するファイトプラズマの 病原性因子の同定

2.1. 序文

2.1.1. OY ファイトプラズマの生殖生長への影響

Candidatus Phytoplasma asteris はこれまでに最も良く研究されてきたファイトプラズマの一種で、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: *Candidatus Phytoplasma asteris* OY strain: OY ファイトプラズマ) および aster yellows strain witches' broom (AY-WB) ファイトプラズマといった盛んにそのエフェクターの機能解析が行われてきた系統はこの種に分類される。

OY ファイトプラズマはタマネギに黄化および叢生症状を引き起こすことからその名が付けられ (Miyahara *et al.*, 1982)、当研究室においてはシュンギク上でヒメフタテンヨコバイの媒介によって維持されている (図 2-1 a,b,f)。OY ファイトプラズマでは感染した宿主植物毎に生殖生長に及ぼす影響が異なっており、タマネギやシュンギクに感染した場合はほとんどの株が抽苔しないのに対して (Miyahara *et al.*, 1982; 図 2-1 a,b)、ペチュニアでは抽苔後に葉化・緑化が認められる (Himeno *et al.*, 2011; 図 2-1 c-e)。一方、シロイヌナズナでは OY ファイトプラズマ感染時に萎縮・叢生を呈することが示されていたものの (Hoshi *et al.*, 2009)、花に現れる病徴については詳細な観察が為されていなかった。

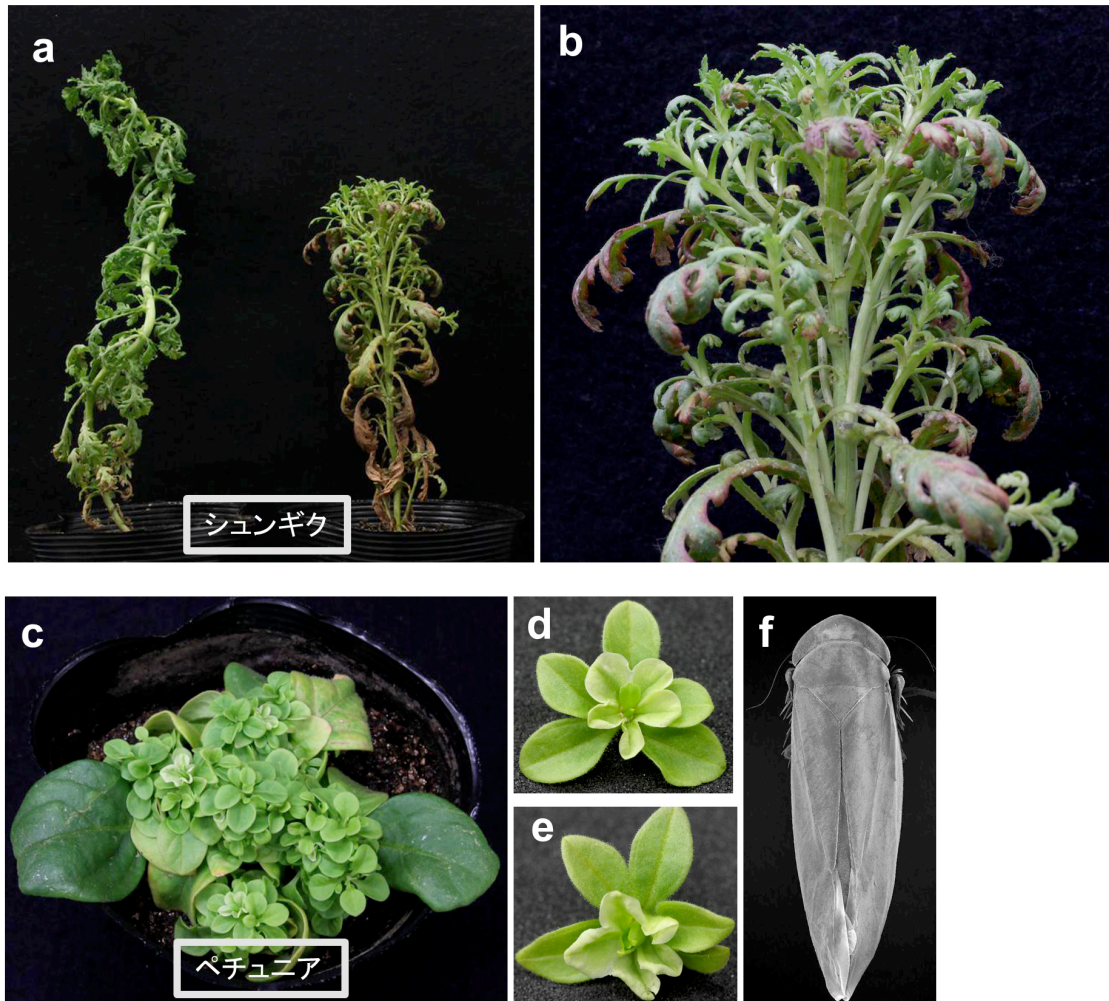


図 2-1 onion yellows (OY) ファイトプラズマの病徴と媒介昆虫

- a) OY ファイトプラズマ感染 (右) および非感染 (左) シュンギク。OY ファイトプラズマに感染したシュンギクでは黄化および萎縮・叢生症状が見られる。
- b) a に示した OY 感染シュンギクの茎頂付近を拡大した写真。
- c) OY ファイトプラズマに感染したペチュニア。
- d,e) c に示した植物個体で観察された葉化症状を呈した花。
- f) OY ファイトプラズマを媒介するヒメフタテンヨコバイの走査型電子顕微鏡写真。

2.1.2. シロイヌナズナの生殖

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を含む顕花植物において、有性生殖を行うためには花において雌雄の器官が形成・成熟が完遂され、雌雄配偶体が形成される環境が整っていることが必要である。顕花植物の生殖生長相は 1) 花序分裂組織の花芽分裂組織への分化と極性の決定、2) 花器官の数・位置・属性の決定、3) 花器官原基の分化、4) 花器官の成熟 の 4 段階に大別される (図 2-2; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010)。これらの過程を全て正常に完了して初めて、顕花植物は種子を生産することが出来る。

このうち 2) 花器官の属性の決定は花器官ホメオティック遺伝子によって制御されており、花のホメオティック変異体またはホメオティック遺伝子の異所的発現では図 2-3a のように花器官が別の花器官または葉へ転換することが示されている (日向, 2001; 伊藤, 2001; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010)。これらの変異体においては不完全花が形成されるため種子が産生されず、植物体は不稔性を示す。

また、花器官の分化・成熟に寄与する因子としてはオーキシンやジャスモン酸といった植物ホルモンのほか数多くの遺伝子が明らかになっており、その経路は非常に複雑である。花器官の成熟に障害が発生すると、シロイヌナズナでは図 2-3b のように植物体は次世代の正常な発生に至らず、不稔性を示す (Nagpal *et al.*, 2005)。

植物の「不稔性 (sterility)」は、種子が出来ないために次代の植物が得られぬ全ての場合を指し、その分類は過去多く試みられてきた (Crane and Lawrence, 1929; 志佐, 1937)。志佐 (1959) は、この不稔性を 1) 生殖器官の異常による不稔と 2) 不和合性の二つに分類している。このうち生殖器官の異常に依る不稔の原因は、i) 雌雄の器官の欠損などによる

「奇形」の不完全花の形成と ii) 雌雄の器官の発育停止に大別できる (安田、1951)。そこで本論文中では、前述のシロイヌナズナ変異体において見られた花器官の属性決定の異常による不稔 (図 2-3a) は不完全花の形成を、花器官の成熟不全による不稔 (図 2-3b) は雌雄器官の発育停止を原因とするものと便宜上定義する。

生殖生長は上述の通り複雑な経路に因って管理されており、顕花植物の種の存続にとって非常に重要であるが、1.2.節で述べたように植物病に冒された場合には生殖器官の正常な発達が阻害されることが多々ある。このような植物病原体によって引き起こされる不稔症状の克服は持続的な作物生産を実現する上で重要な課題である。そこで本章では不稔症状の誘導機構解明に向けた病原体側からのアプローチとして、シロイヌナズナに不稔症状を誘導するファイトプラズマの病原性因子の同定を試みた。

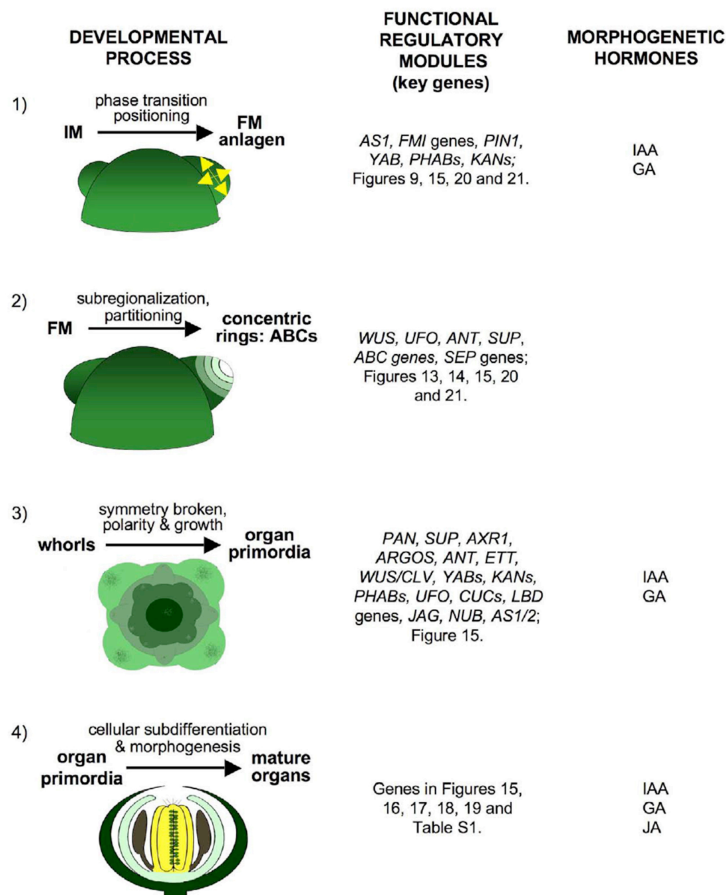


図 2-2 シロイヌナズナにおける生殖生長の過程 (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010)

シロイヌナズナの生殖生長相は 1) 花序分裂組織の花芽分裂組織への分化と極性の決定、2) 花器官の数・位置・属性の決定、3) 花器官原基の分化、4) 花器官の成熟 の 4 段階に大別される。

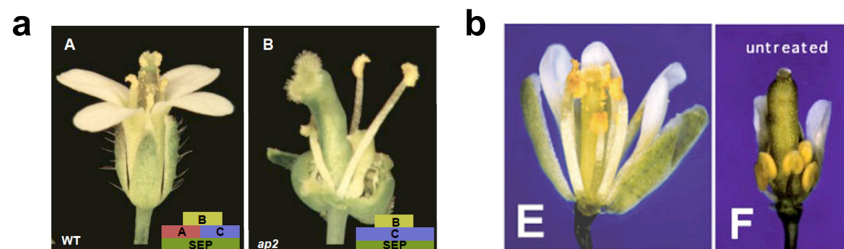


図 2-3 不完全花の形成と雌雄器官の発育停止

- a) 不完全花を形成するシロイヌナズナ変異体 (右; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010)。ホメオティック遺伝子の発現が抑制されると花器官の属性決定に異常が生じ不稔となる。
- b) 雌雄器官の発育が停止する表現型を示すシロイヌナズナ変異体 (右; Nagpal *et al.*, 2005)。花器官の成熟に関わる遺伝子の変異体においては花器官の数等には異常が見られないが、次世代が得られない不稔性を示す。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 供試植物と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* アクセション Col-0) およびその形質転換体は人工気象室において15時間明期/9時間暗期の白色光下で温度を23°Cに保って生育させた。*tengu* 形質転換体の表現型観察に当たってはバイナリーベクターpBI121に *TENGU* 遺伝子を組み込みカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター下で発現させた形質転換シロイヌナズナ (Hoshi *et al.*, 2009) の複数ラインを用いた。

2.2.2. ファイトプラズマの虫媒接種

シロイヌナズナへのファイトプラズマの接種には虫媒により行った。ファイトプラズマ菌株には当研究室が維持しており、全ゲノム配列が既知であるタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: *Candidatus* Phytoplasma asteris OY strain:

OYファイトプラズマ) 弱毒株 (塩見・田中、1996; Oshima *et al.*, 2004) を用いた。OYファイトプラズマの媒介昆虫であることが既知であるヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteleles striifrons*) はOYファイトプラズマに感染したシュンギク (*Glebionis coronaria*) 上で維持し、吸汁により保毒させた。

ロゼット葉4-5枚に生長した野生型のシロイヌナズナ (播種後24日程度) を直径7.5 cmのポリポットに一株ずつ移植して天面にネットを張った透明な円筒を被せ、保毒虫7匹を入れて一週間吸汁させた。接種は温度を25°Cに保った自然光型人工気象室において行った。保毒虫を取り除いた後、同じ自然光型人工気象室において25°Cで約5週間 (播種後約9週間まで) 生育させ、表現型の観察を行った。

2.2.3. 走査型電子顕微鏡による観察

野生型シロイヌナズナまたは35S::*tengu* 形質転換花の雌蕊および雄蕊を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy: SEM) を用いて観察するにあたっては、以下の手順で試料を作製した。試料の乾燥には臨界点乾燥法を用いた。なお、試料の作製に当たっては玉川大学農学部生物資源学科の渡辺京子教授にご指導を頂いた。

1. 4%グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences; 日新 EM) 溶液 (0.2 M リン酸緩衝液, pH7.2) を作製し、バイアル瓶に 3-5 ml の固定液と試料 (シロイヌナズナの花または蕾) を入れて真空デシケーター (Jeio Tech) を用いて脱気を行った。
2. 試料が沈み固定液が完全に浸透した後、遮光して 4°C で 24 時間静置した。
3. 試料を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて 2 回洗浄した。
4. エタノールシリーズにより脱水を行った。20, 40, 60, 80, 90, 95%エタノールにそれぞれ 15 分間ずつ試料を浸漬した。
5. モレキュラーシーブス (Wako) を用いて十分に脱水した 100%エタノールへ試料を 15 分間浸し、これを 3 回繰り返して完全な脱水を行った。
6. エタノールを酢酸イソアミルに置換するため、100%エタノール (nacalai tesque) : 酢酸イソアミル (関東化学) = 2 : 1、および 1 : 2 の混合液を作製し順に 15 分間浸漬した。
7. 100%酢酸イソアミルへの 15 分間の浸漬を 3 回繰り返し、完全な置換を行った。
8. 試料を濾紙を敷いた試料かごに入れ、ドライアイスまたは液化炭酸ガスを用いて臨界点乾燥装置 (JCPD-5; JEOL) により乾燥を行った。

また、導電性処理および観察は以下の手順で行った。

1. 試料を導電性シール (SEM 用導電性丸形カーボンシール ϕ 12 mm; 日新 EM) を貼付けした試料台 (SEM 試料台 Type- HM ϕ 15x7 M4; 日新 EM) に載せた。
2. イオンスパッタ装置 (Hitachi E-1030; Hitachi) を用いてスパッタ時間 60-90 秒で試料表面に白金パラジウムコーティングを行った。
3. 走査型電子顕微鏡 (Hitachi S-4000; Hitachi) を用いて加速電圧 10 kV、ワーキングディスタンス 5-15 mm で観察を行った。

2.2.4. 人工交配

シロイヌナズナの人工交配実験は以下の手順により行った。

1. 母個体となるシロイヌナズナの脇芽を切除し、また主茎についている開花済みおよび開花直前の花と未発達である蕾、莢を取り除いた。
2. 実体顕微鏡下で萼片・花弁・雄蕊を全てピンセットで切除した。
3. 父親となる個体の開花済みである花から雄蕊をピンセットで摘み取り、実体顕微鏡下で 1-2 で準備した母個体の雌蕊柱頭に葯を引っかけて花粉を付加した。
4. 授粉させた雌蕊にラップを巻き、約 2 週間生育させ観察を行った。

2.2.5. 莢長測定による稔性の判定

シロイヌナズナの稔性の判定は、Vivian-Smithら(2001)の方法に従って行った。すなわち2.2.4.項で述べた人工交配による授粉2週間後の莢の長さを測定し、6.0 mm以上のものを稔性があるものと判断した。なお、自家受粉の場合においても同様の基準を採用し、稔性の判定を行った。

2.2.6. total RNA 抽出

植物体からの total RNA の抽出は、核酸抽出試薬 ISOGEN (Nippongene) を用い、RNase Free 条件下で以下の手順の通り行った。

1. シロイヌナズナの花序を液体窒素を用いて乳鉢・乳棒によって磨砕した。
2. ISOGEN 1 ml を加えてさらに磨り潰した。
3. 磨砕液を 1.5 ml チューブに移し、15,000 rpm、4°Cで12分間遠心した。
4. 上清を新しいチューブに移し、クロロホルム (nacalai tesque) 200 μ l を加えてよく攪拌し、15,000 rpm、4°Cで10分間遠心した。
5. 上清(水層)を新しいチューブに移し、2-プロパノール (nacalai tesque) を水層の7-10割程度(約500 μ l)加えてよく攪拌し、15,000 rpm、4°Cで30分間以上遠心した。
6. 上清を廃棄し、70%エタノール 1000 μ l を加えて15,000 rpm、4°Cで5分間遠心した。
7. 上清を廃棄し、20分間減圧乾燥機でRNAを乾燥させた。
8. RNase free water 約30 μ l および RNase inhibitor 0.2 μ l に得られた total RNA を溶解し、濃度を測定した後-80°Cで保存した。

さらに、total RNA の DNase 処理を以下の組成で行った。

組成	(\times 1)
rDNase I (TaKaRa)	2 μ l
10 \times reaction buffer for rDNase (TaKaRa)	10 μ l
100 mM CaCl ₂	1 μ l
DW + RNA 5-10 μ g	86 μ l
+ Ribonuclease inhibitor (PRI; TaKaRa)	1 μ l
total	100 μ l

この混合溶液を 37°C で 1.5-2 時間反応させた。DNA の分解はゲノミック PCR により確認した。

2.2.7. 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR は以下の手順で行った。

(1) RT-PCR による cDNA 合成

2.2.6. 項で得られた DNase 処理済みの RNA 500 ng を DW と合わせて計 5 μ l になるよう調整し、さらに High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い、以下の組成の反応液を加えて RT-PCR を行った。

組成	(\times 1)	反応時間	
10 \times buffer	1 μ l	25°C	10:00
25 \times dNTP	0.4 μ l	37°C	120:00
10 \times random primer	1 μ l	4°C	∞
DW	2.1 μ l		
+ RT 酵素	0.5 μ l		
total	5 μ l		

(2) リアルタイム PCR

(1) で得られた cDNA を用いて以下の組成・反応時間でリアルタイム PCR を行った。

反応には SYBR PreMix Ex Taq (TaKaRa) を用いた。

組成	(\times 1)	反応時間		
Primer F (5 μ M)	1.6 μ l	Hold	95°C	00:30
Primer Rv (5 μ M)	1.6 μ l	2 step PCR	95°C	00:05
SYBR PreMix Ex Taq	10 μ l		60°C	00:30
DW	1.8 μ l		95°C	00:15
+ cDNA	5 μ l	Dissociation	60°C	00:30
total	20 μ l		95°C	00:15

なお、本章で定量 RT-PCR に用いたプライマーは表 2-1 の通りである。

(3) 内部標準プライマーの検討

本章および第 3 章で行った定量 RT-PCR について OY ファイトプラズマ感染および 35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナで内部標準として用いることの出来る植物内在の遺伝子およびプライマーの検討を行った。

これまでにファイトプラズマ感染シロイヌナズナにおいては内在性のハウスキーピング遺伝子として *EF-1a* (*At5g60390*) が内部標準に用いられているほか (Cettul and Firrao, 2011; プライマー出典: Curaba *et al.*, 2004)、エフェクターの形質転換体において *U-box domain containing protein* (*At5g15400*) が用いられた例がある (Sugio *et al.*, 2011a)。本研究では、OY ファイトプラズマ感染および 35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナに内部標準として併用が可能である遺伝子を選定するため、感染および TENGU の異所的発現による発現変動を調べた。各候補遺伝子の発現安定性 (M_j) は Vandesompele ら (2002) の計算式に従って算出した。式は以下の通りである。

$$\begin{aligned} & (\forall j, k \in [1, n] \text{ and } j \neq k): \\ & A_{jk} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left(\frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (2) \\ & V_{jk} = \text{st.dev} (A_{jk}) \quad (3) \\ & M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1} \quad (4) \end{aligned}$$

(Vandesompele *et al.*, 2002)

既報において標準化遺伝子として用いられていた *EF-1a* および *U-box domain containing protein (UBQ)* のプライマーと、*Actin2* 遺伝子 (*At1g63130*) の配列特異的プライマー (千秋、博士論文, 2012; Okano *et al.*, 2014) の 3 種類のハウスキーピング遺伝子を標的としたプライマーを用いて定量 RT-PCR を行ったところ、表 2-2 に示したように *Actin2* 遺伝子の発現は OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換体で既報のプライマーと同程度の安定性を示した。したがって、以降の解析では内部標準としてシロイヌナズナ内在の *Actin2* 遺伝子を用いることとした。

表 2-1 本章で用いたプライマー

Name	Primer sequence (5'-3')	Gene target	References
qTENGU_F	TGATGATATTGAAAACGTGATAACT C	<i>phytoplasma tengu-su</i> <i>inducer (tengu;</i> <i>PAM765)</i>	Minato <i>et al.</i> (2014)
qTENGU_R	GCCCTTTTGCAATAAATCTTG		
Actin2-F	GCACCCTGTTCTTCTTACCG	<i>Actin2 (At1g63130)</i>	千秋 (2012); Okano <i>et al.</i> (2014)
Actin2-R	AACCCTCGTAGATTGGCACA		
qUBQF	TGCGCTGCCAGATAATACACTATT	<i>U-box domain-</i> <i>containing protein</i> <i>(At5g15400)</i>	Sugio <i>et al.</i> (2011)
qUBQR	TGCTGCCCAACATCAGGTT		
qEF-1αF	CCCAGGCTGATTGTGCTGT	<i>EF-1α (At5g60390)</i>	Curaba <i>et al.</i> (2004)
qEF-1αRv	GGGTAGTGGCATCCATCTTGT		

表 2-2 標準化プライマーの検討結果

	<i>AtActin2</i>	<i>AtUBQ</i>	<i>AtEF-1α</i>
<i>Mj</i>	0.692884556	0.612875866	0.626756806

2.3. 結果

2.3.1. OY ファイトプラズマ感染植物は不稔症状を示す

本研究ではまず植物の生育におけるファイトプラズマ感染の影響をさらに詳しく調べるため、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: OY ファイトプラズマ) を媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイ (*Macrostelus striifrons*) を用いて接種し観察を行った。その結果、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナはこれまで報告されていた萎縮および叢生といった形態異常に加えて花が蕾のまま開花しない生育異常 (severe-sterile) を示した (図 2-4)。このような OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナではその後種子の稔実が起こらず、不稔であった。このような不稔症状は野生型のシロイヌナズナ (アクセッション Col-0) ではほとんど見られないのに対し、ファイトプラズマに感染した植物では全ての個体に認められた (表 2-3 上段)。

そこで OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナで認められた、いつまでも開花せず種子を作らない蕾 (infertile closed buds) について詳細な観察を行った (図 2-5 e-h)。これらの蕾ではホメオティックな異常は認められず、花器官の数や配置は野生型と同様であったが、雄蕊の葯は裂開しておらず花粉の形成はほとんど認められなかった (図 2-5 g)。また、これらの蕾では雌蕊において柱頭の papillae が野生型と比べて短いことが観察された (図 2-5 h)。以上の結果から、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの花においては雌性器官および雄性器官の両方の生殖器官でその発達が停止し、成熟不全となっているものと考えられた。



図 2-4 OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの病徴

(左) ファイトプラズマ非感染の媒介昆虫に吸汁させたシロイヌナズナ。

(右) 媒介昆虫を用いて OY ファイトプラズマに感染させたシロイヌナズナ。

ともに 1 週間の吸汁ののち、5 週間育成した状態。OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナでは激しい萎縮が認められ、花器官の成熟不全が起こる。

表 2-3 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナの病徴

	<i>n</i>	severe sterile, %	mild sterile, %	no symptom, %
OY-infected	9	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
35S:: <i>tengu</i>	35	13 (37.1%)	20 (57.1%)	2 (5.7%)

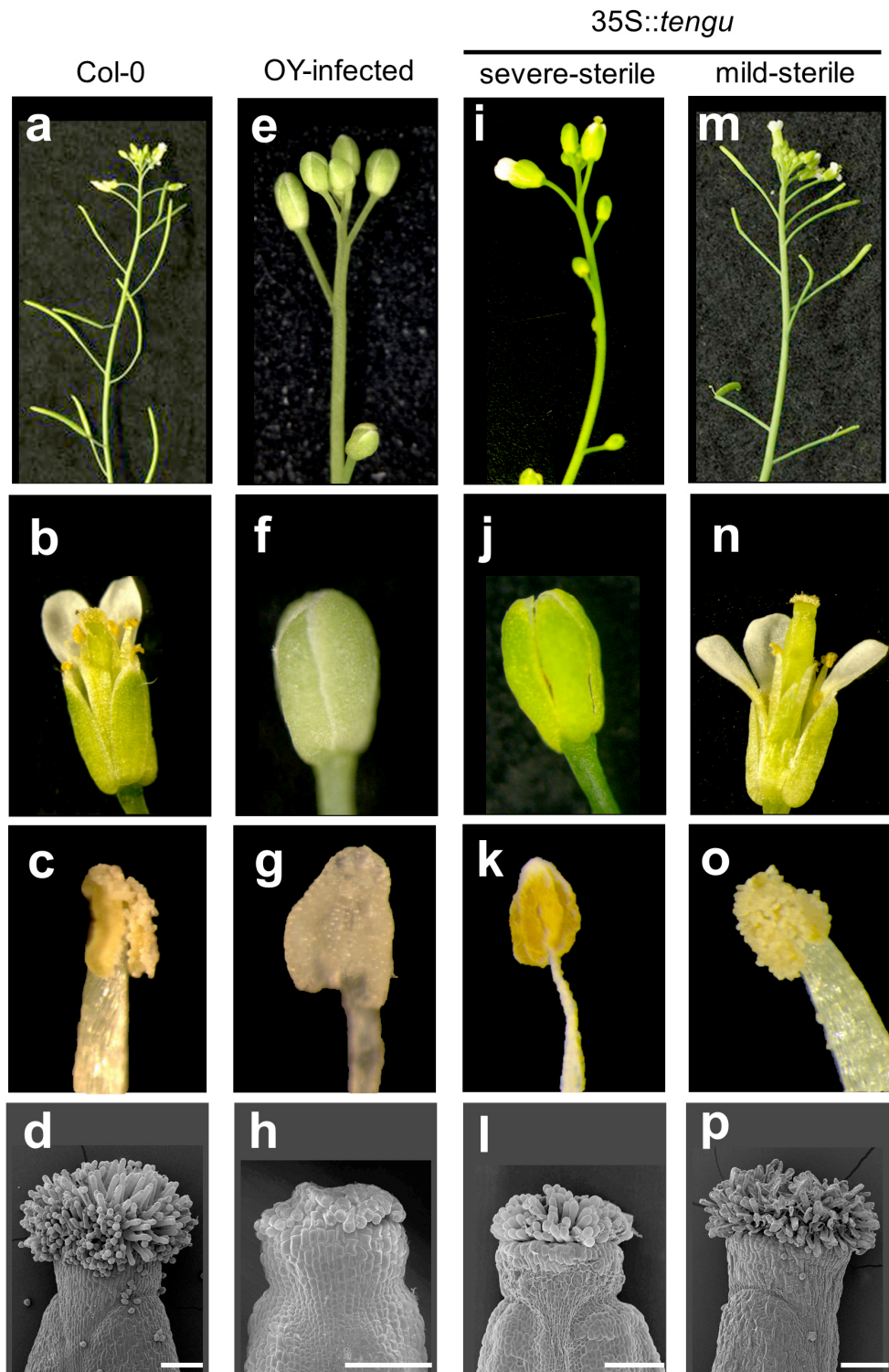


図 2-5 OY ファイトプラズマ感染または TENGU の発現により
誘導される花器官の成熟不全 (Minato *et al.*, 2014)

注釈は次頁

図 2-5 OY ファイトプラズマ感染または TENGU の発現により
誘導される花器官の成熟不全 (Minato *et al.*, 2014)

シロイヌナズナの a-d) 野生型 (Col-0)、e-h) OY ファイトプラズマ感染、i-l) 35S プロモーター下で *tengu* 遺伝子を異所的に発現させ重篤な生育異常が生じた (severe-sterile) 形質転換体、m-p) 35S プロモーター下で *tengu* 遺伝子を異所的に発現させ軽度の生育異常が生じた (mild-sterile) 形質転換体についてそれぞれの花序を観察した。

a,e,i,m) 花序全体、b,f,j,n) 花、c,g,k,o) 雄蕊、d,h,l,p) 雌蕊柱頭の走査型電子顕微鏡写真を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

2.3.2. TENGU は不稔症状を誘導する

OY ファイトプラズマの感染による不稔症状の誘導機構を調べるため、まずファイトプラズマによる誘導因子の同定を試みた。これまでに OY ファイトプラズマのエフェクターである TENGU を形質転換したシロイヌナズナにおいて萎縮および叢生症状が認められ、莢の発達が妨げられることが報告されている (Hoshi *et al.*, 2009; 図 2-6)。このことから、TENGU がシロイヌナズナに不稔症状を誘導する可能性が考えられた。

そこで TENGU を 35S プロモーターを用いて異所的に発現させたシロイヌナズナ (35S::*tengu*) を詳細に観察したところ、栄養生長期 (vegetative stage) のロゼット (叢葉) においては *tengu* 形質転換体は野生型の Col-0 と比べてほとんど生育に差が見られなかった (図 2-7)。しかしながら、*tengu* 形質転換体では抽苔後に蕾が開花しないままであり、種子が出来ない重度の生育異常 (severe sterility) を示す個体 (図 2-5 i-l) と、花が開花するものの莢が成長せず種子が得られない軽度の生育異常 (mild sterility) を示す個体 (図 2-5 m-p) が観察された(表 2-3 下段)。

重度の生育異常 (severe sterility) を示す *tengu* 形質転換花では、OY ファイトプラズマ感染花と同様に、ホメオティックな異常は認められず、花器官の数や配置は野生型と同様であった。また雌蕊の柱頭の papillae が短く、雄蕊の葯は裂開しておらず花粉の放出は認められなかった(図 2-5 k,l)。

これに対して、軽度の生育異常 (mild sterility) を示す *tengu* 形質転換体では花序に出来た多くの花は開花するが、莢の発達が不十分であった(図 2-5 m,n)。これらの花では雌蕊柱頭の papillae は野生型のシロイヌナズナと同程度の長さであった(図 2-5 p)。また雄蕊の葯は裂開しており、花粉の放出が見られた(図 2-5 o)。

これらの観察結果から、TENGU を異所的に発現するシロイヌナズナではこれまで報告されていた軽度の不稔症状 (**mild sterility**) に加えて、OY ファイトプラズマ感染時と同様の重篤な生育異常 (**severe sterility**) を示すことが明らかとなった。また、これらの重度の生育異常を示す OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換体の花では、花器官にホメオティックな異常は認められず分化が正常であったことから、これらの植物体に誘導される不稔症状は雌雄器官の成熟不全によるものと考えられた。

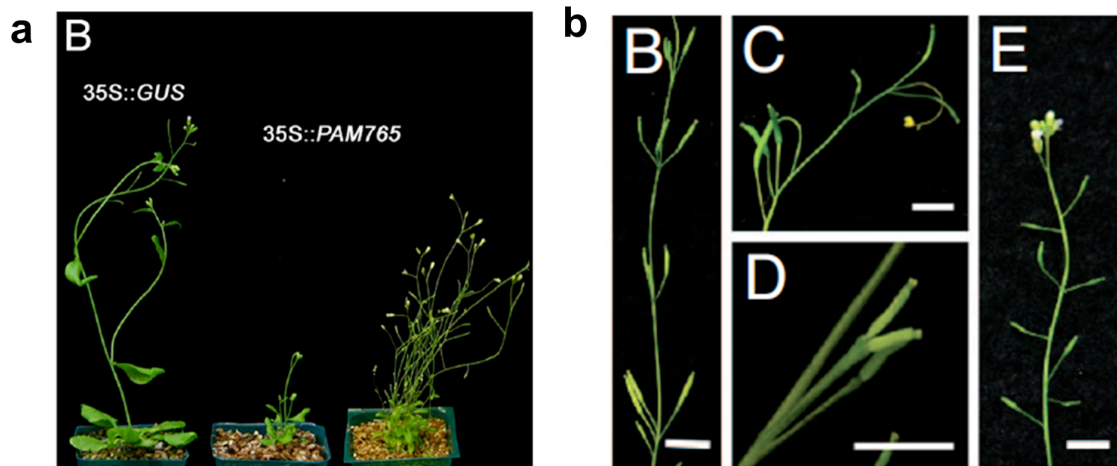


図 2-6 TENGU 形質転換体に誘導される形態異常 (Hoshi *et al.*, 2009)

- a) (左) 35S プロモーター下で *GUS* 遺伝子を異所的に発現させたシロイヌナズナ (対照区)、および (右) 35S プロモーター下で *tengu* (*PAM765*) 遺伝子を異所的に発現させたシロイヌナズナ。
- b) 35S プロモーター下で *tengu* (*PAM765*) 遺伝子を異所的に発現させたシロイヌナズナにおいては葉序の乱れ (C, D) や莢の発達不全 (E) が報告されている。スケールバーは 50 mm を示す。

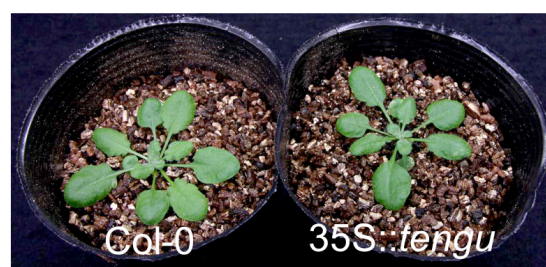


図 2-7 TENGU 形質転換シロイヌナズナのロゼット

(Minato *et al.*, 2014)

(左) 野生型のシロイヌナズナ (Col-0)、および (右) 35S プロモーター下で *tengu* 遺伝子を異所的に発現させたシロイヌナズナ。多くの個体では栄養生長期において形態に違いが見られない。

2.3.3. TENGU による軽度の生育異常は雄性不稔である

2.3.2.項に示したように、35S::*tengu* シロイヌナズナにおいて重度の生育異常 (severe sterility) を呈する場合雄蕊の葯は裂開せず雌蕊の柱頭にも異常が生じていることから (図 2-5 k,l)、このような個体は雌性および雄性不稔を併発しているものと考えられた。実際に、重度の不稔症状を呈する個体の花において自家受粉を試みたところ、莢の伸長は観察されず成熟しなかった (図 2-8 上段)。

これに対して、2.3.2.項において示した軽度の不稔症状を示す *tengu* 形質転換花では雄蕊および雌蕊において野生型との大きな違いは見出されなかった (図 2-5 o,p)。そこでこの軽度の不稔症状が雌側および雄側のどちらの生育異常に起因するかを調べるため、交配実験を行った。

まず軽度の不稔症状を呈する 35S::*tengu* の花において自家受粉による果実の形成を観察したところ、171 個中 108 個 (63.2%) で莢が伸長し稔性が認められたが、63 個 (36.8%) では莢が伸長せず稔性が認められなかった (表 2-4; 図 2-8 中段)。また、軽度の不稔症状を呈する個体の雌蕊および雄蕊を用いて野生型のシロイヌナズナ (Col-0) と人工交配を行ったところ、野生型の雌蕊に 35S::*tengu* の花粉を人為的に授粉させた場合は莢の伸長が見られなかったのに対し、35S::*tengu* の雌蕊に野生型の花粉を人工授粉させた場合には莢が伸長し、稔性が回復した (図 2-9)。このことから、35S::*tengu* における軽度の不稔症状は雄側の生育異常によるものである可能性が示唆された。

軽度の不稔症状を示す *tengu* 形質転換花においては葯からの花粉の放出が野生型と同様に認められたことから (図 2-5 o)、TENGU による生育異常は花粉粒の形成段階において起

こっている可能性が考えられた。そこで花粉の形態を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope: SEM) を用いて観察したところ、野生型と比較して花粉壁の外側の部分を構成するエキシンによる網目模様に乱れが見られた (図 2-10)。

これらの結果より、*tengu* 形質転換体において見られた軽度の不稔 (mild sterility) は花粉壁をはじめとする雄側の花器官の成熟不全に起因する雄性不稔であることが示された。

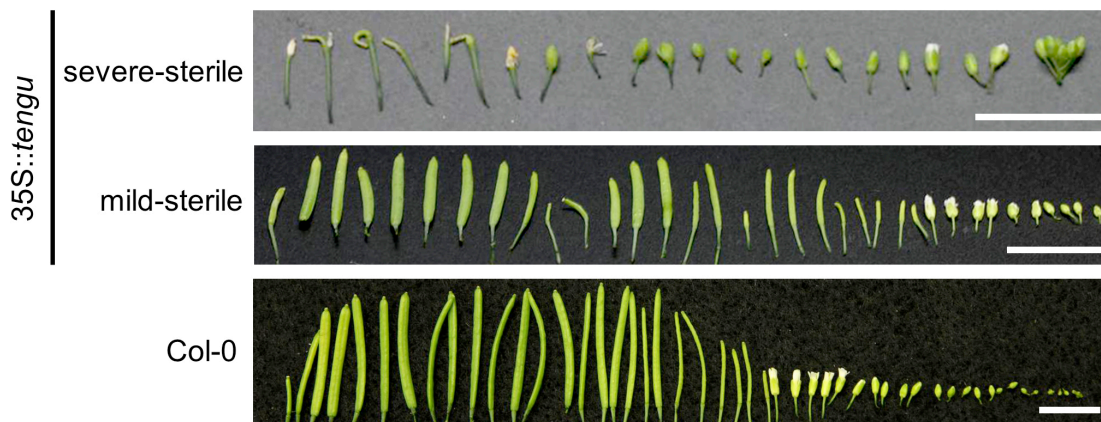


図 2-8 TENGU 形質転換シロイヌナズナの果実 (Minato *et al.*, 2014)

(上段) 35S プロモーター下で *tengu* 遺伝子を異所的に発現させ重篤な生育異常を呈したシロイヌナズナ (severe-sterile)、(中段) 軽度の生育異常を呈する (mild-sterile) 35S::*tengu* シロイヌナズナ、および(下段) 野生型のシロイヌナズナ (Col-0) の花序から得られた果実を古いものを左として順に並べた。軽度の生育異常を呈する 35S::*tengu* 形質転換体の花序ではところどころ莢の伸長が野生型と比べ不十分であり、重度の生育異常を呈する 35S::*tengu* 形質転換体では莢の伸長がほとんど認められない。スケールバーは全て 1 cm を表す。

表 2-4 TENGU 形質転換シロイヌナズナの稔実率

Self-fertilized parent	<i>n</i>	Fecund, %	Infertile, %
Col-0	227	223 (98.2%)	4 (1.8%)
35S:: <i>tengu</i>	171	108 (63.1%)	63 (38.9%)

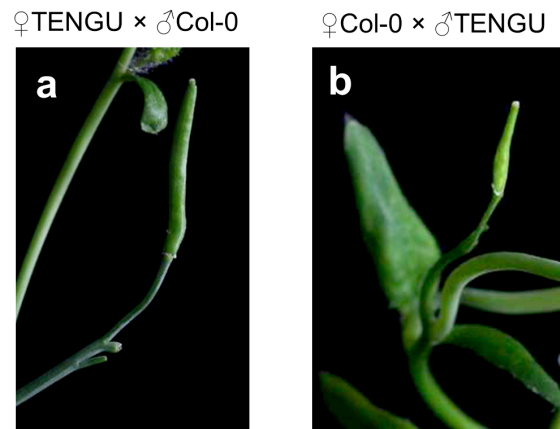


図 2-9 TENGU 形質転換シロイヌナズナの交配によって得られた果実

- a) 軽度の生育異常を呈する (mild-sterile) 35S::*tengu* シロイヌナズナの雌蕊に野生型のシロイヌナズナ (Col-0) の花から得られた花粉を授粉させた果実。莢は野生型の自家受粉時と同程度の 1.0-1.2 cm に伸長している。
- b) 野生型のシロイヌナズナ (Col-0) の雌蕊に軽度の生育異常を呈する 35S::*tengu* シロイヌナズナの花から得られた花粉を授粉させた果実。莢の伸長が野生型と比べ不十分で 6.0 mm に達さず、稔実しない。

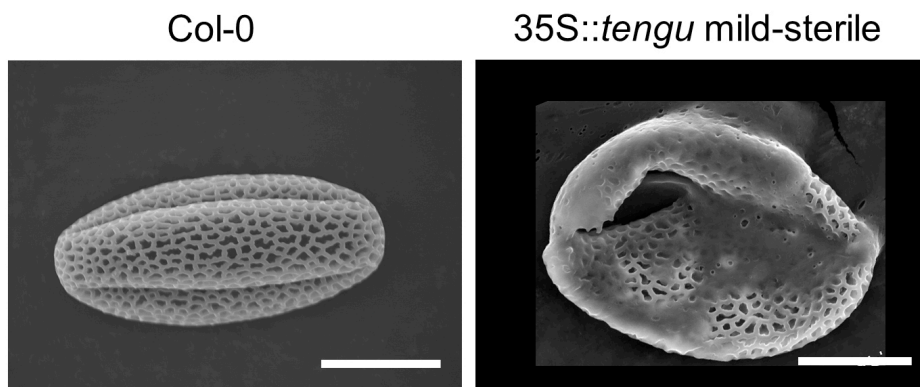


図 2-10 TENGU 形質転換シロイヌナズナの花粉の走査型電子顕微鏡写真

(Minato *et al.*, 2014)

(左) 野生型シロイヌナズナ (Col-0)の花粉、(右) 軽度の生育異常を呈する (mild-sterile) 35S::*tengu* シロイヌナズナの花粉。形質転換体では花粉壁の網目構造に乱れが見られる。スケールバーは 10 μ m を表す。

2.3.4. 不稔症状の程度は TENGU の発現量依存的である

TENGU を異所的に発現するシロイヌナズナが二段階の不稔症状を呈することから (2.3.2.項)、これらの表現型の違いが生じる原因を調べるため、雄性不稔または重度の生育異常により不稔症状を呈するシロイヌナズナ個体における *tengu* 遺伝子の転写産物の量を定量 RT-PCR (qRT-PCR) 法により比較した。

その結果、TENGU を 35S プロモーターを用いて異所的に発現させたシロイヌナズナ (35S::*tengu*) における *tengu* 遺伝子の発現量は、重度の生育異常により不稔症状 (severe-sterile) を呈する個体において雄性不稔 (mild-sterile) の個体よりも有意に多いことが示された(図 2-11)。このことから、TENGU の形質転換体においては *tengu* の発現量依存的に不稔症状の程度が変化しているものと考えられた。

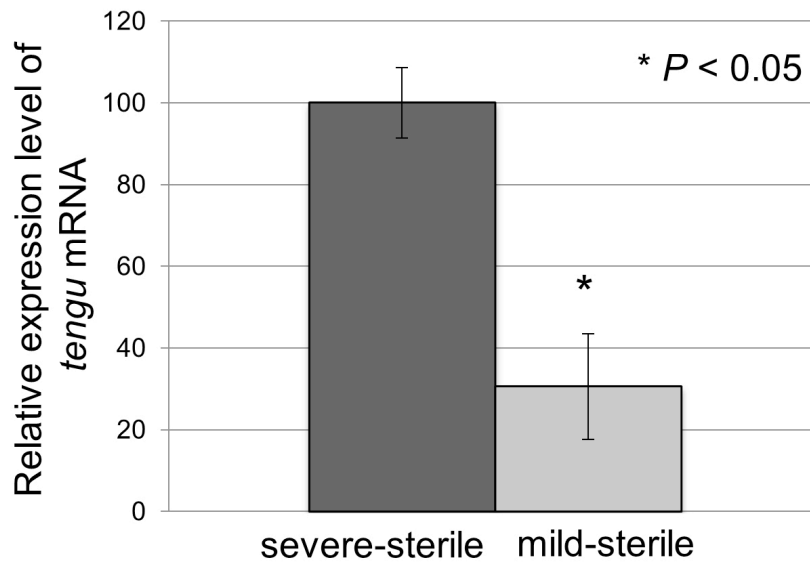


図2-11 TENGU 形質転換シロイヌナズナにおける *tengu* 遺伝子の発現量
(Minato *et al.*, 2014)

TENGU を 35S プロモーターを用いて異所的に発現させたシロイヌナズナ (35S::*tengu*) における *tengu* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により解析した。標準化にはシロイヌナズナの *Actin2* 遺伝子を用いた。

tengu 遺伝子の発現量は、重度の生育異常により不稔症状 (severe-sterile) を呈する個体において雄性不稔 (mild-sterile) の個体よりも多い (Student's *t*-test; * $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差を示す。

2.4. 考察

2.4.1. 花の成熟不全による不稔症状

本章では、1) OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの花が蕾のままで開花せず不稔性を示すこと (図 2-4)、および 2) TENGU を異所的に発現するシロイヌナズナでは OY ファイトプラズマ感染時と同様の不稔性が認められることを示した (図 2-5)。OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換体の花では花器官にホメオティックな異常が認められなかったことから (図 2-5)、TENGU はシロイヌナズナにおいて雌性器官および雄性器官の成熟不全を引き起こし、これにより不稔性が生じているものと考えられた。

ファイトプラズマ病における不稔症状について、2006 年に Pracros らは stolbur phytoplasma の感染によりトマトに雌性不稔が誘導されることを報告している (Pracros *et al.*, 2006)。stolbur phytoplasma に感染したトマトの花においては、花卉をはじめ花器官の欠失が認められることから (図 1-7; Pracros *et al.*, 2006)、これは不完全花の形成による不稔性であると考えられる。これに対して本章で明らかとなった OY ファイトプラズマの感染および TENGU の異所的発現によって誘導される不稔症状は、花器官にホメオティックな異常が誘導されない点において stolbur phytoplasma の感染により誘導される雌性不稔と異なっていると考えられた。

OY ファイトプラズマおよび TENGU によって誘導される不稔症状は雌雄器官の発育停止によるものであると考えられることから、その誘導機構についても不完全花の形成による不稔性とは異なるものと考えられる。stolbur phytoplasma に感染したトマトの花 (stage

9) においては、花器官ホメオティック遺伝子より前段階で花芽分裂組織の分化に働く遺伝子 (*WUSCHEL: WUS*) の発現が低下することが示されている (Pracros *et al.*, 2006)。また、potato purple top phytoplasma (*Ca. P. trifolii*) が引き起こす "big bud" と呼ばれる形態異常では4つの whorl 全てが発達不全となるが、この big bud 症状を示すトマトの花芽でも *WUS* 遺伝子の発現が低下することが示唆されている (Wei *et al.*, 2013)。stolbur phytoplasma はトマトに感染して葉化・緑化による雌性不稔症状と big bud 症状の両方を誘導することから、これらの症状は同一の経路上で連続的に引き起こされるものと考えられている。

OY ファイトプラズマに感染したペチュニアは葉化症状を呈することが知られているが、この感染植物の花芽分裂組織において *WUS* 遺伝子の発現が低下することが示されている (Himeno *et al.*, 2011)。また、OY ファイトプラズマ感染ペチュニアでは一部の花器官で花器官ホメオティック遺伝子の発現が低下することが示されており (Himeno *et al.*, 2011)、Italian Clover Phyllody (ICPh) phytoplasma に感染し葉化症状を呈したシロイヌナズナにおいても一部の花器官ホメオティック遺伝子の発現が低下することが報告されている (Cettul and Firrao, 2011)。一方、近年葉化症状を誘導するエフェクターとして報告された SAP54 や PHYL1 は花器官ホメオティック遺伝子である MADS ファミリーの転写因子群を分解することによりタンパク質レベルでその働きを阻害するものと考えられている (MacLean *et al.*, 2014; Maejima *et al.*, 2014)。特に PHYL1 においてはこれらの転写因子群の mRNA 量はその異所的発現により変動しないことが示されており (Maejima *et al.*, 2014)、必ずしもファイトプラズマ感染植物における報告とは一致しない。しかしながら、ファイトプラズマ感染時およびエフェクター発現時のどちらにおいても花器官ホメオティ

ック遺伝子の働きを抑制することがこれまでに共通して報告されており、このことが葉化症状の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。

本章において OY ファイトプラズマ感染および TENGU を異所的に発現するシロイヌナズナにおいて見られた不稔症状には、**big bud** 症状または葉化・緑化症状は随伴しておらず、また花器官にホメオティックな異常も誘導されなかった (図 2-4; 図 2-5)。したがって、TENGU はシロイヌナズナの生殖生長期において花器官ホメオティック遺伝子が機能する花器官の属性決定よりも後の段階に影響することで、雌雄器官の発育停止による不稔症状を誘導するものと考えられた。

また、本章ではシロイヌナズナにおいてエフェクターである TENGU の量依存的に 1) 雄性不稔 (**mild sterility**) または 2) 雌性及び雄性不稔 (**severe sterility**) の二段階の不稔症状が誘導されることが明らかとなった (図 2-5; 図 2-8)。これらの二段階の不稔症状は同一の誘導経路に TENGU が量依存的に影響することで起こるものと考えられた。OY ファイトプラズマ感染植物と重度の生育異常を示した *tengu* 形質転換体は同程度の不稔性を示しており、感染植物における TENGU の発現量はこの *tengu* 形質転換個体と同程度であることから (data not shown)、OY ファイトプラズマ感染植物における不稔症状の誘導には TENGU が大きく影響しているものと考えられた。

そこで本章での解析結果をふまえ、第 3 章では TENGU の発現による重度の生育異常 (**severe sterility**) により引き起こされる不稔症状の誘導機構に迫るべく植物因子側から解析を行った。

第3章 TENGUによる不稔症状誘導機構の解析

3.1. 序文

3.1.1. シロイヌナズナの花器官の成熟に関わる遺伝子群

オーキシン応答に関わる転写因子 *auxin response factor (ARF) 6 (At1g30330)* およびそのパラログである *ARF8 (At5g37020)* は雌性配偶体および雄性配偶体の成熟に働く重要な遺伝子で、これらの遺伝子の二重変異体では花器官が蕾のまま成熟が止まる表現型が観察される (図 3-1; Vivian-Smith *et al.*, 2001; Nagpal *et al.*, 2005)。 *ARF6* および *ARF8* 遺伝子はオーキシン応答における転写の活性化因子としての役割を持つほか (図 3-2 a)、近年ジャスモン酸 (*jasmonic acid: JA*) 生合成経路に影響していることが示唆されており興味を持たれている (Reeves *et al.*, 2012)。

ARF6 および *ARF8* 遺伝子の発現を直接制御する因子については *microRNA* による転写産物の切断のほか明らかとなっていないが (Wu *et al.*, 2006)、下流で働く遺伝子としては幾つかの遺伝子が報告されている (Reeves *et al.*, 2012)。ジャスモン酸生合成経路において、リノレン酸等の多価不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加しジャスモン酸などの過酸化脂質 (オキシピリン) の生成を開始させる酵素である *lipoxygenase 2 (LOX2: At3g45140)* はその一つであり (小柴ら, 2010)、*ARF6* および *ARF8* 遺伝子の二重変異体 (*arf6-2 arf8-3*) においては *LOX2* の mRNA 量が野生型の半分程度に低下することが示されている (Reeves *et al.*, 2012)。

MYB21 (At3g27180) および *MYB24 (At5g40350)* は *jasmonate-ZIM domain proteins (JAZs)* と結合するタンパク質の探索によって得られた *R2R3* 転写因子であり、ジャスモン

酸に応答して JAZ が分解され結合が解消されるとジャスモン酸初期応答遺伝子の発現を活性化することが明らかとなっている (図 3-2 b; Song *et al.*, 2011)。変異体を用いた研究により、*MYB21* および *MYB24* 遺伝子はジャスモン酸を介した *ARF6* および *ARF8* 遺伝子による間接的な発現制御を受けることが分かっている (Reeves *et al.*, 2012)。

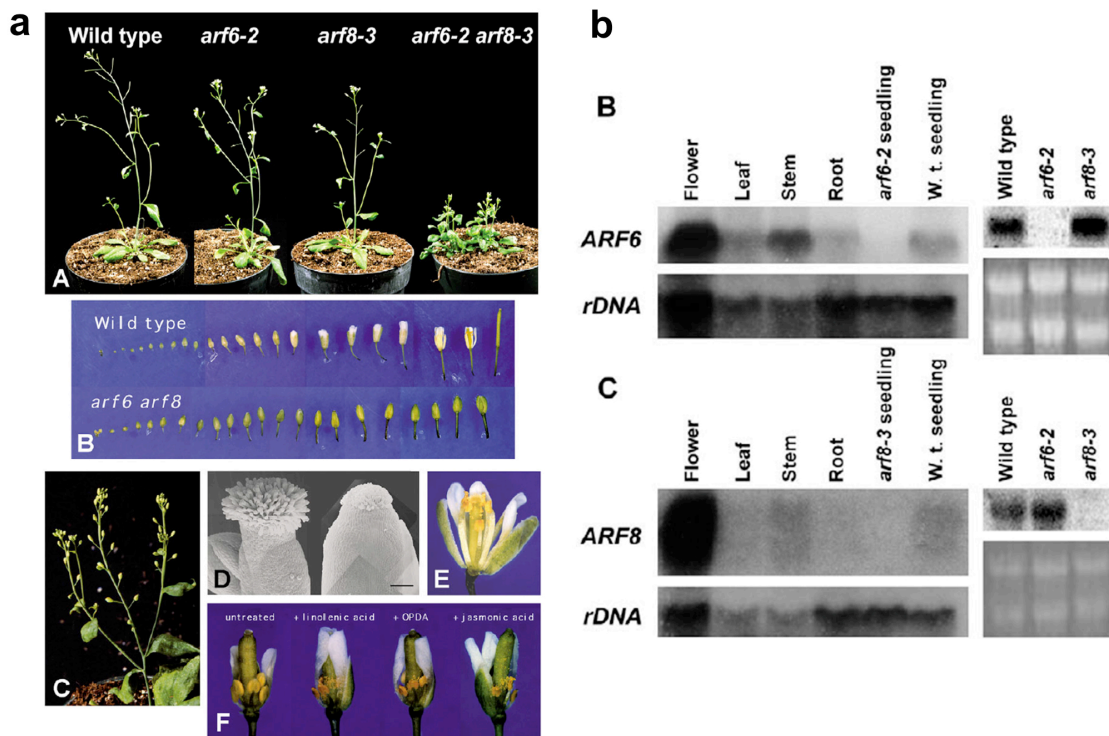


図 3-1 *ARF6* および *ARF8* の二重変異体の表現型 (Nagpal *et al.*, 2005)

- a) *ARF6* および *ARF8* の二重変異体 (*arf6-2 arf8-3*) では蕾のまま開花しない生育異常が観察される。
- b) シロイヌナズナにおける *ARF6* (上段 B) および *ARF8* (下段 C) 遺伝子の発現器官解析。特に花において多く発現している。

a Molecular Biology of THE CELL 5th Edition
©2010 Newton Press / ©2008 Garland Science

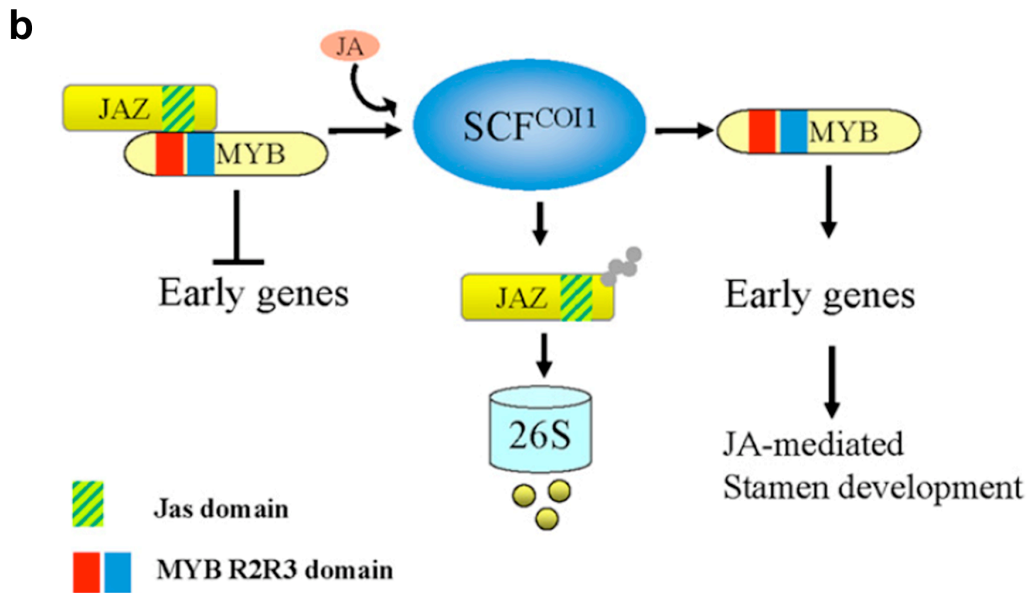
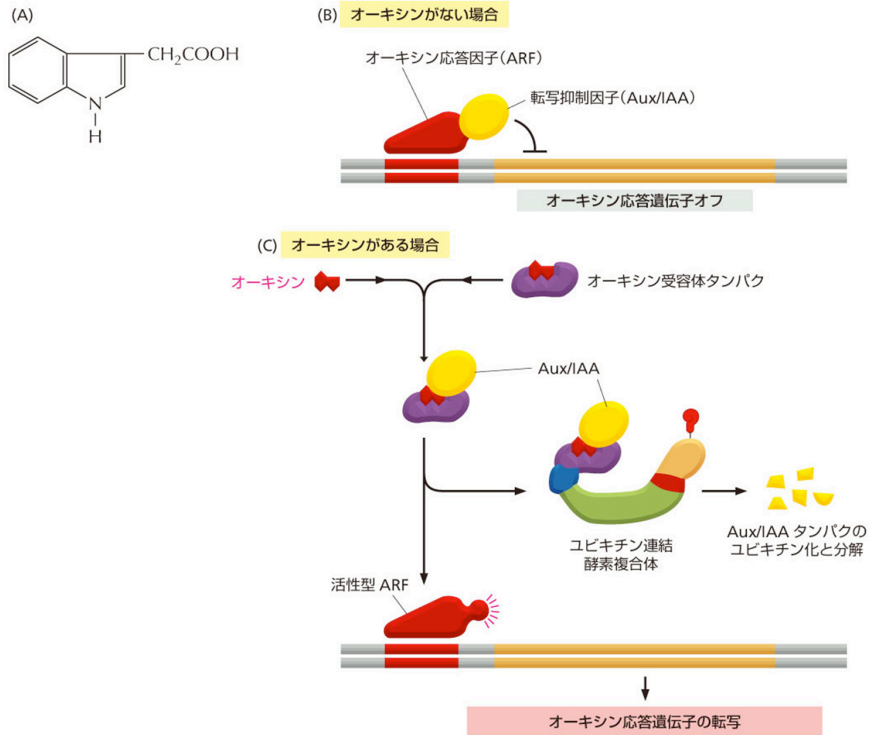


図 3-2 ARF および MYB のホルモン応答への寄与

- a) オーキシシンのシグナル伝達経路 (Alberts *et al.*, 2010)。オーキシシン応答因子 (ARF) は初期応答遺伝子の転写を制御する。
- b) ジャスモン酸 (JA) による初期応答遺伝子の発現経路 (Song *et al.*, 2011)。MYB 転写因子 (黄色楕円) が関与することが示されている。

3.1.2. 花器官の成熟に関わる植物ホルモン

2.1.2.項で述べたように、花器官の成熟における時空間の制御には植物ホルモンを介した適切な情報伝達が不可欠である（小柴ら、2010; 図 2-1）。例えばオーキシンについてはシロイヌナズナの変異体を用いた解析から、2.1.2.項で述べた生殖生長の過程全てにオーキシンの極性移動が重要な役割を果たすことが示唆されており（小柴ら、2010）、実際にタバコやランにおいてオーキシンが雌雄の配偶体形成に関わることが示されている（Spena *et al.*, 1992; Zhang and O'Neil, 1993）。また、ジャスモン酸については特に雄側の器官の発達に関わっていることが知られており、内在性のジャスモン酸量が著しく減少したシロイヌナズナの突然変異体においては雄性不稔が誘導されることが示されている（小柴ら、2010）。

第2章において、1) OY ファイトプラズマが花器官の成熟不全により不稔症状を誘導すること、および2) TENGU の形質転換体においては二段階の不稔症状が認められ、*tengu* の発現量依存的に雄性不稔（mild sterility）と雌性・雄性の両方の花器官の成熟不全による不稔症状（severe sterility）が誘導されることが明らかとなった。本章では、3.1.1.で述べた *ARF6* と *ARF8* の二重変異体が *tengu* 形質転換体とよく似た表現型を示すことに着目し（図 2-5 および図 3-1）、OY ファイトプラズマ感染および severe sterile である *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて *ARF6* と *ARF8* およびその下流で働く遺伝子の発現と植物ホルモンの内生量を調べ、宿主植物側から不稔症状の誘導機構に迫ることとした。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 供試植物

本章では 2.2.1.項と同様の方法で生育させたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* アクセッション Col-0) および *TENGU* 遺伝子を 35S プロモーター下で発現させた形質転換体を用いた。

また、3.3.3.項で示したホルモン分析に用いたシロイヌナズナの芽生え (seedlings) は以下の組成で作製した固形培地に無菌播種を行い、人工気象室において 15 時間明期/9 時間暗期の白色光下で温度を 23°C に保って生育させた。

ビタミンストック組成

nicotinic acid (Gibco)	50 mg	
pyrodoxin HCl (Wako)	50 mg	
thiamine HCl (Wako)	40 mg	
milliQ	up to 10 ml	フィルター滅菌して分注

2×MS ストック組成

植物培養用培地ムラシゲ・スクーグ培地用 混合塩類 1L 用 (日本製薬株式会社)	1 袋	
milliQ	500 ml	
ビタミンストック	1 ml	

固形培地組成

2×MS ストック	100 ml	
milliQ	100 ml	
sucrose (nacalai tesque)	4 g	pH5.7 に合わせる
植物培地用 Agar Powder (Wako)	3 g	

培地はオートクレーブ滅菌した後 1 枚当たり約 20 ml を深型シャーレに入れて冷やし固めて 4°C で保存した。またシロイヌナズナ種子の滅菌処理は 70%エタノール (nacalai tesque) を用いて行い、これをオートクレーブ滅菌水で 4 回洗浄してから播種を行った。

3.2.2. ファイトプラズマの虫媒接種

シロイヌナズナへのファイトプラズマの接種は 2.2.2.項と同様にヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) を用いた虫媒により行った。ファイトプラズマ菌株にはタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: *Candidatus Phytoplasma asteris* OY strain: OY ファイトプラズマ) 弱毒株 (塩見・田中、1996; Oshima *et al.*, 2004) を用いた。

3.2.3. total RNA 抽出

total RNA の抽出には野生型、OY ファイトプラズマ感染、35S::*tengu* 形質転換体のシロイヌナズナの花序をそれぞれ用い、2.2.6.項に示した方法に従って RNA 抽出後 DNase 処理を行った。

3.2.4. 定量 RT-PCR

定量 RT-PCR は 3.2.3.項で抽出、DNase 処理を施した RNA を用いて 2.2.7.項の方法で行った。本章で定量 RT-PCR に用いたプライマーは表 3-1 に示した。標準化には 2.2.7.項で適切な内部標準であることが示された *Actin2* 遺伝子 (*At1g63130*) を用いた。

表 3-1 本章で用いたプライマー

Name	Primer sequence (5'-3')	Gene target	References
qTENGU_F	TGATGATATTGAAAACGTGATAACT C	<i>phytoplasma tengu-su inducer (tengu; PAM765)</i>	Minato <i>et al.</i> (2014)
qTENGU_R	GCCCTTTTGCAATAAATCTTG		
Actin2-F	GCACCCTGTTCTTCTTACCG	<i>Actin2 (At1g63130)</i>	千秋 (2012); Okano <i>et al.</i> (2014)
Actin2-R	AACCCTCGTAGATTGGCACA		
qAtARF6_F	GTGGGATCGAGGACTCCAATC	<i>Auxin response factor 6 (ARF6; At1g30330)</i>	Minato <i>et al.</i> (2014)
qAtARF6_R	CCCACGTATCAAGTCTCGG		
qAtARF8_F	TCAAGAAGCTGATTGCAAGGGATC	<i>Auxin response factor 8 (ARF8; At5g37020)</i>	Minato <i>et al.</i> (2014)
qAtARF8_R	GAGATGCCGTTTGGGCTG		
LOX2 qRT F	AACAGGCGACCCTAGTGATG	<i>Lipoxygenase2 (LOX2; At3g45140)</i>	Reeves <i>et al.</i> (2012)
LOX2 qRT R	TGGAGCTTGCCTTTGAATCT		
MYB21 qRT F	TGATTGATCGGTGGACAAAA	<i>MYB domain protein 21 (MYB21; At3g27810)</i>	Reeves <i>et al.</i> (2012)
MYB21 qRT R	CCCCAAACCTCTACAACGAG		
MYB24 qRT F	CGTATCAACATGCCAGCAAT	<i>MYB domain protein 24 (MYB24; At5g40350)</i>	Reeves <i>et al.</i> (2012)
MYB24 qRT R	AAAGATCATCGACGCTCCAA		

3.2.5. ノーザンブロット解析

microRNA の発現量を調べるため、small RNA のノーザンブロット解析を以下の手順で行った。

(1) RNA の分画

1. 2.2.6.項の方法に従って抽出した total RNA (DNase 未処理) に 70%エタノール (nacalai tesque) 1000 μ l を加えて 15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。
2. 上清を廃棄し、RNase free water 200 μ l に RNA を溶解した。
3. 8M LiCl 200 μ l を加えてよく攪拌し、氷上で 30 分から 1 時間静置した。
4. 15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、上清 (低分子画分) を新しい 1.5 ml チューブに移した。
5. 4.で得られた上清に 100%エタノール 1000 μ l を加えてよく攪拌し、15,000 rpm、4°C で 30 分間以上遠心した。
6. 上清を廃棄し、沈殿を減圧乾燥機で乾燥させた後 RNase free water 11 μ l に溶解した。

(2) 泳動

1. 泳動槽にゲル (Novex TBE-Urea Gel 15%, 10-well; Invitrogen) を取り付け、1×に希釈した泳動バッファー (5× Novex TBE Running Buffer; Invitrogen) を約 800 ml 注いだ。
2. (1)で得られた低分子 RNA 分画 20 μ g と DW を合わせて 10 μ l とし、これに 2× Loading Dye (Novex TBE Urea Sample Buffer 2×; Invitrogen) を加えた計 20 μ l を 95°C で 4 分間熱処理し、氷上で急冷した後 65°C で 10 分間静置した。
3. 2.で処理した RNA サンプルをウェルにアプライし、180V で 70 分間泳動した。このとき、マーカーとして microRNA Marker (New England BioLabs) を合わせて泳動した。

(3) ブロットニング

1. (2)で泳動したゲルをゲル板から外し、ゲルの必要な部分のみを切り出した。このとき、loading control として rRNA を検出するため、残りのゲルは 10,000 倍希釈した SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) に 3 時間程度浸し、染色を行った。
2. ファイバーパッド、濾紙、切り出したゲル、メンブレン (Nylon membranes positively charged; Roche Diagnostics)、濾紙、ファイバーパッドの順に重ねて Trans-Blot cell

(Bio-Rad) にセットし、cell に 0.5× に希釈した泳動バッファー (5× Novex TBE Running Buffer; Invitrogen) を約 200 ml 注いだ。

3. cell の外側に 4°C で冷やしておいた milliQ 水を注ぎ、泳動槽に蓋をして 30V で 1 時間ブロッキングを行った。

(4) ハイブリダイゼーション

1. (3) で転写したメンブレンを十分量の 2× Saline Sodium Citrate (SSC) buffer に浸し、1-2 分間室温で振盪させた。
2. メンブレンの水気を切り、UV クロスリンクを 3 分間行った。
3. ハイブリバッグ (ハイブリ・バッグ ハード; コスモ・バイオ株式会社) にメンブレンと 50°C に温めた Hybridization Buffer (Roche Diagnostics) を 2 ml 入れて密封し、50°C で 15-30 分プレハイブリダイゼーションを行った。
4. ハイブリバッグにプローブ液 (Hybridization Buffer 1 ml とプローブ 3 μl を混合し、プローブの最終濃度が 1,000 倍希釈になるよう調整したもの) を加え、42°C で 36 時間ハイブリダイゼーションを行った。なお、検出に用いたプローブの配列と作製方法は(6) に示した。

(5) 検出

1. (4) でハイブリダイズしたメンブレンを Wash1 液に浸して 10 分間室温で振盪し、これを 3 回繰り返して洗浄を行った。なお、Wash1 液の組成は手順の最後に示してある。
2. さらにメンブレンを Wash2 液に浸して 50°C で 15 分間激しく振盪し、これを 3 回繰り返して洗浄を行った。なお、Wash2 液の組成は手順の最後に示してある。
3. Washing Buffer (Roche Diagnostics) に室温で浸した。
4. ブロッキング液 (Roche Diagnostics; Maleic acid buffer : Blocking Solution : 水 = 1 : 1 : 8 で混合したもの) にメンブレンを浸し、室温で 30 分間ゆっくりと振盪した。
5. alkaline phosphatase (AP) 標識抗 digoxigenin (DIG) 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment; Roche Diagnostics) を 10,000 倍希釈になるように加え、室温で 30 分間ゆっくりと振盪してメンブレン上の DIG ラベルに抗体を結合させた。
6. メンブレンを Washing Buffer (Roche Diagnostics) に浸して室温 15 分間振盪し、これを 3 回繰り返して洗浄を行った。
7. 化学発光試薬 CDP-*Star* (New England BioLabs) 10 μl および 25× CDP-*Star* Dilution Buffer (New England BioLabs) 40 μl と水 950 μl をよく混合してから 15,000 rpm、4°C で 10 分間以上遠心した。

8. メンブレンを 1×に希釈した Detection Buffer (Roche Diagnostics) に浸して静置し、平衡化した。
9. 7.で作製した CDP-*Star* 液をラップ状に滴下し、その上からメンブレンを置いてよく馴染ませた後 LAS-4000 mini (FUJIFILM) を用いて感光し検出を行った。
10. 得られたバンドはフリーソフト Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて数値化し、発現量の比較を行った。

Wash1 組成	
20× SSC	100 ml
10% ラウリル硫酸ナトリウム (Sodium Lauryl Sulfate: SDS) 溶液	10 ml
milliQ	up to 1000 ml

Wash2 組成	
20× SSC	10 ml
10% SDS	10 ml
milliQ	up to 1000 ml

(6) プローブの作製

microRNA を検出するため、DIG ラベルされたハイブリダイゼーション用プローブを DIG Oligonucleotide Tailing Kit 2nd Generation (Roche Diagnostics) を用いて作製した。*miR167* プローブ作製に用いたプライマー配列は 5'-TAGATCATGCTGGCAGCTTCA-3' である。このプライマーを以下のような組成で試薬と混合し、37°C で 15 分間反応させ 3' 末端に DIG-dUTP および dATP のテールを付加した。

組成	(×1)
Reaction buffer	4 μl
CaCl ₂ Solution	4 μl
DIG dUTP	1 μl
dATP	1 μl
Terminal Transferase	1 μl
DW	8 μl
+ Primer (100 μM)	1 μl

total

20 μ l

その後氷上で冷却した後に 0.2 M エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 溶液 (pH8.0) を 2 μ l 加えて -20°C で保存した。

3.2.6. ホルモン分析

植物ホルモン量の測定は独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター生長制御グループ (現 環境資源科学研究センター生産機能研究グループ) の方々にご協力頂き、共同研究にて行った。詳細な手順は以下に示す通りである。

(1) 植物サンプルの準備・抽出

- シロイヌナズナの芽生え (seedlings) は MS 固形培地からピンセットで取り出した後すぐに 10 個体ずつを 1 サンプルとして 2 ml チューブに入れて液体窒素を用いて冷凍し保存した。凍結乾燥機 (VD-800R; TAITEC) を用いて凍結乾燥したのち乾燥重量 (dry weight: dw) を測定した。また、buds については 10 buds を 1 サンプルとして 2 ml チューブに入れ、液体窒素を用いて冷凍し保存した。
- 内部標準として放射性同位体によりラベルしたホルモン (Is-Mix) を加えた抽出液を製した。使用した Is-Mix の組成は以下の通りである。

Is-Mix concentration for flower 組成

D ₂ -GA1	}	1 pg/ μ l
D ₅ -tZ		
D ₃ -DHZ		
D ₆ -iP		
D ₄ -CS		
D ₂ -GA4		5 pg/ μ l
¹³ C ₆ -(-)-JA-Ile (Jikumaru <i>et al.</i> , 2004 に従って合成)		10 pg/ μ l
D ₂ -IAA (Sigma-Aldrich)	}	100 pg/ μ l
D ₆ -ABA		
D ₂ -JA (Tokyo Kasei)		
D ₆ -SA		
D ₄ -BL		0.2 pg/ μ l

Is-Mix concentration for leaf 組成	
D ₂ -GA1	} 1 pg/ μl
D ₅ -tZ	
D ₅ -tZR	
D ₃ -DHZ	
D ₃ -DHZR	
D ₆ -iP	
D ₆ -iPR	
D ₄ -CS	
D ₂ -GA4	
¹³ C ₆ (-)-JA-Ile (Jikumaru <i>et al.</i> , 2004 に従って合成)	
D ₂ -IAA (Sigma-Aldrich)	} 20 pg/ μl
D ₆ -ABA	
D ₂ -JA (Tokyo Kasei)	
D ₆ -SA	200 pg/ μl
D ₄ -BL	0.2 pg/ μl

抽出液の組成は以下に示す通りである。抽出液は 1 サンプル当たり 1 ml を添加した。

抽出液 組成	(×5)
Acetonitrile (MeCN; 関東化学)	4 ml
蒸留水 (関東化学)	995 μl
Is-Mix	5 μl
Acetic Acid (AcOH; 関東化学)	50 μl

なお、本測定に当たっては Is-Mix に代わり放射性同位体ラベルした目的のホルモンのみを混合して用いた。

- チューブに 3 mm ジルコニアビーズ (CERAMICS YTZ ボール 3φ; ニッカトー) を 2 粒ずつ入れ、Tissue Lyser (Qiagen) を用いて速さ 27/ s² で 3 分間サンプルを破碎した。
- Tissue Lyser からチューブを取り出して室温で 1 時間以上静置した後、14,800 rpm、室温で 10 分間遠心した。

5. ガラスチューブ (12×75 mm; IWAKI) に上清を回収した。さらに 2 mm チューブに残った沈殿に 1% AcOH/ 80% MeCN (関東化学) を 1 ml 添加してよく攪拌した後、室温で 10 分間静置してから再び 14,800 rpm、室温で 10 分間遠心した。
6. 5. で使用したガラスチューブにさらに 2 mm チューブから上清を移し、1% AcOH/ water 1 ml を添加した。
7. ガラスチューブを減圧乾燥機 (Speed Vac CVE-200D; EYELA) にセットし、速さ「7」、40°C で 45-60 分間減圧乾燥を行ってアセトニトリル (MeCN) を揮発させた。

(2) 逆相 HLB カラム

1. HLB カラム (Oasis シリーズ HLB 1 cc, 30 mg, ポリマーベース; Water) に 1 ml の MeCN (関東化学) および 1 ml のメタノール (Methanol: MeOH; 関東化学) を順に添加し、樹脂の洗浄を行った。
2. 1% AcOH/ water (関東化学) を 1 ml 添加し、カラムの平衡化を行った。
3. 2. で平衡化したカラムに(1)で得られた抽出液をロードした。
4. 1% AcOH/ water (関東化学) を 1 ml 添加し、洗浄を行った。
5. 1% AcOH/ 80% MeCN (関東化学) を 2 ml 添加して中・酸性抽出液の溶出を行い、新しいガラスチューブに回収した。
6. 中・酸性抽出液に 1% AcOH/ water (関東化学) を 1 ml 添加し、減圧乾燥機 (Speed Vac CVE-200D; EYELA) にセットして速さ「7」、40°C で 45-60 分間減圧乾燥を行ってアセトニトリル (MeCN) を揮発させた。

(3) 弱陰イオン交換 WAX カラム

1. WAX カラム (Oasis シリーズ Wax 1 cc, 30 mg, 30 μm; Water) に 1 ml の MeCN (関東化学) および 1 ml の MeOH (関東化学) を順に添加し、樹脂の洗浄を行った。
2. 0.1 M KOH を 500 μl 添加しカラムの活性化を行った。
3. 1% AcOH/ water (関東化学) を 1 ml 添加し、カラムの平衡化を行った。
4. (2)で濃縮した中・酸性抽出液をロードし、1% AcOH/ water (関東化学) を 1 ml 添加した。
5. 80% MeCN (関東化学) を 2 ml 添加して中性液の排出を行った。
6. 1% AcOH/ 80% MeCN (関東化学) を 2 ml 添加して酸性抽出液の溶出を行い、新しいガラスチューブに回収した。

(4) 測定・分析

1. (3)で得られた2 mlの酸性抽出液を減圧乾燥機 (Speed Vac CVE-200D; EYELA) にセットして速さ「7」、40°Cで約90分間減圧乾燥を行い、完全に乾燥させた。
2. 100% MeOH を100 μ l 添加し、15秒間 vortex を行ってホルモンを溶解させ、溶液をプレートに移した。
3. 乾燥機 (Speed Vac SPD111V; Thermo) にセットして40°Cで約30分間乾燥を行い、完全に乾燥させた。
4. 1% AcOH/ water (関東化学) を30 μ l 添加し、蓋を閉めてスピンドウンした後、Agilent Tech 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) を用いてエレクトロスプレーイオン化タンデム型質量分析(liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry : LC/ESI/MS/MS) を行った。
5. 定量は MassHunter vB.03.01 spectrometer software (Agilent Technologies) を用いて行った。

3.3. 結果

3.3.1. TENGU による *ARF6* および *ARF8* 遺伝子の発現変動

2.3.1. および 2.3.2. 項で述べた OY ファイトプラズマが感染したシロイヌナズナおよび TENGU を異所的に発現させたシロイヌナズナ (*35S::tengu*) において見られた重度の生育異常による不稔症状 (*severe sterility*) は、*ARF6* および *ARF8* の二重変異体 *arf6-2 arf8-3* の表現型と類似していたことから (図 2-5 および図 3-1)、これらの植物体の花序において *ARF6* および *ARF8* の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した。

その結果、OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナと *35S::tengu* 形質転換体のどちらの花序においても *ARF6* および *ARF8* の発現は有意に低下していた ($P < 0.01$; 図 3-3)。

これまでに *ARF6* および *ARF8* は *microRNA167* (*miR167*) によって転写産物が切断され発現が負に制御されることが報告されている (Wu *et al.*, 2006)。そこで、OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナおよび *35S::tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて *miR167* の発現量をノーザンブロット解析により調べたところ、*miR167* はどちらの花序においても発現が上昇していることが示された (図 3-4)。

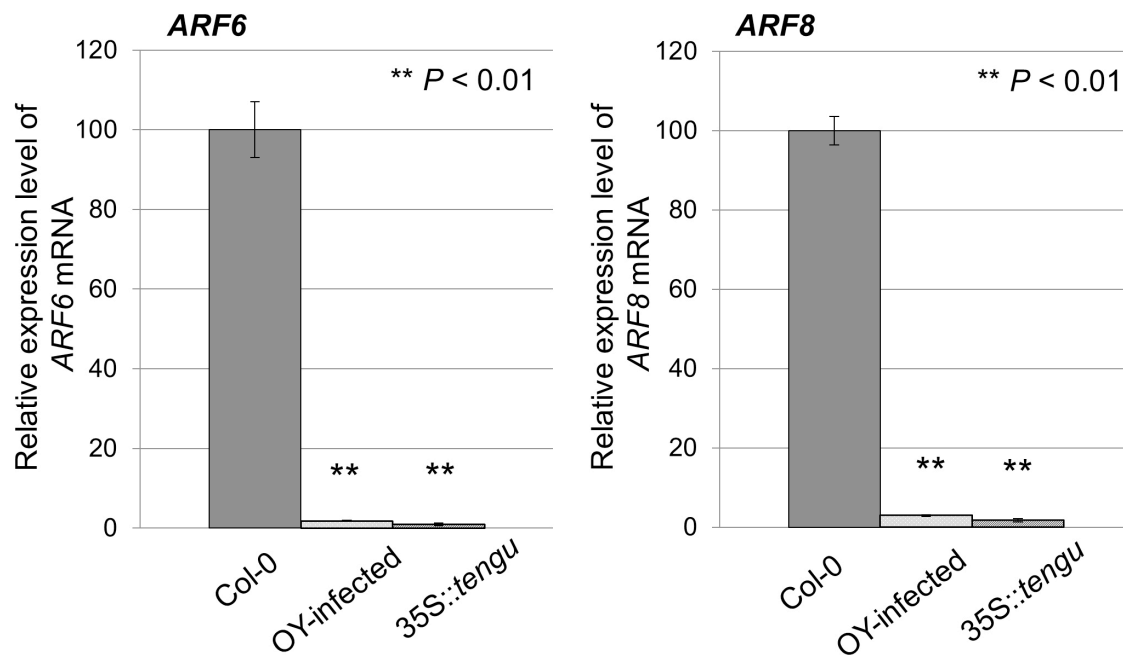


図 3-3 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換

シロイヌナズナにおける *ARF6/8* 遺伝子の発現量 (Minato *et al.*, 2014)

OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナ (*35S::tengu*) における *ARF6/8* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により解析した。標準化にはシロイヌナズナの *Actin2* 遺伝子を用いた。

ARF6/8 遺伝子の発現は、OY ファイトプラズマ感染および *35S::tengu* 個体において野生型と比べて有意に低下していた (Student's *t*-test; ** $P < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。

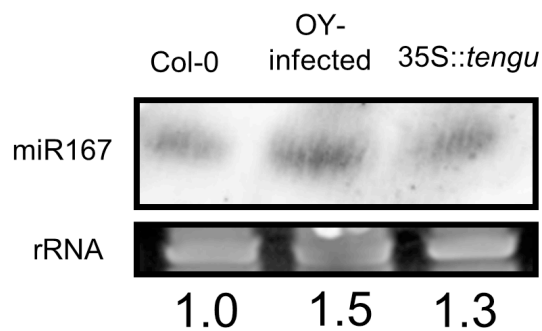


図 3-4 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換
シロイヌナズナにおける *miR167* の発現量 (Minato *et al.*, 2014)

OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナ (35S::*tengu*) における *miR167* の発現量をノーザンブロットにより解析した。下段にコントロールとして rRNA を示す。

3.3.2. TENGU による花の成熟に関わる遺伝子の発現変動

3.1.1.項で述べたように、既報において ARF6 および ARF8 は JA 生合成経路に影響して転写因子 MYB21 および MYB24 の発現を正に制御しており、ARF6 または ARF8 の一重変異体では花においてジャスモン酸生合成に関与する酵素である LOX2 の発現が低下することが示されている(Reeves *et al.*, 2012)。

3.3.1.項より、TENGU を異所的に発現させた 35S::*tengu* 形質転換体の花序においては ARF6 および ARF8 の発現が低下していたことから、その下流に位置する遺伝子である LOX2 の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析したところ、LOX2 の発現は *tengu* 形質転換体において野生型と比べて有意に低下していた ($P < 0.01$; 図 3-5)。OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナにおいても LOX2 の発現量は低下する傾向が見られたが、こちらは個体間のばらつきが大きく野生型と比べて有意な差は認められなかった (図 3-5)。なお、Tabata ら (2010) によって ARF6/8 との関連が示唆されているジャスモン酸生合成酵素である *defective in anther dehiscence1 (DAD1)* および *allene oxide synthase (AOS)* の転写量は、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナのいずれにおいても野生型と同程度であった (data not shown)。

次に、MYB21 および MYB24 の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析したところ、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナおよび *tengu* 形質転換体の花序においては MYB21 および MYB24 の発現はともに有意に低下していた (図 3-6)。

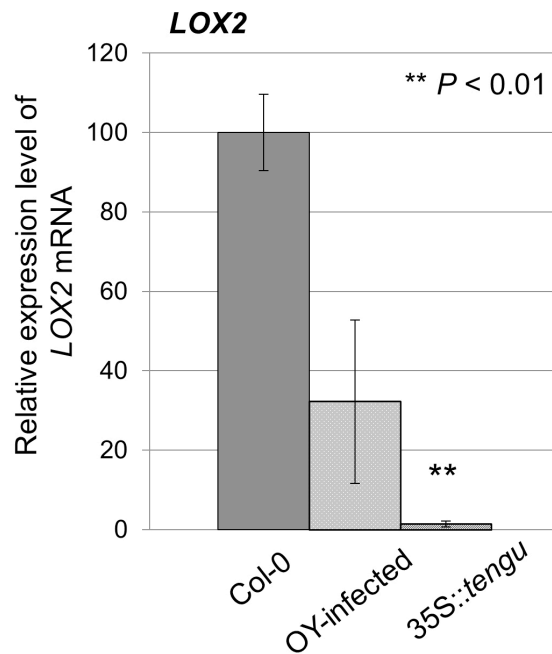


図 3-5 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナにおける *LOX2* 遺伝子の発現量 (Minato *et al.*, 2014)

OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナ (*35S::tengu*) における *ARF6/8* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により解析した。標準化にはシロイヌナズナの *Actin2* 遺伝子を用いた。

ARF6/8 遺伝子の発現は、OY ファイトプラズマ感染および *35S::tengu* 個体において野生型と比べて有意に低下していた (Student's *t*-test; ** $P < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。

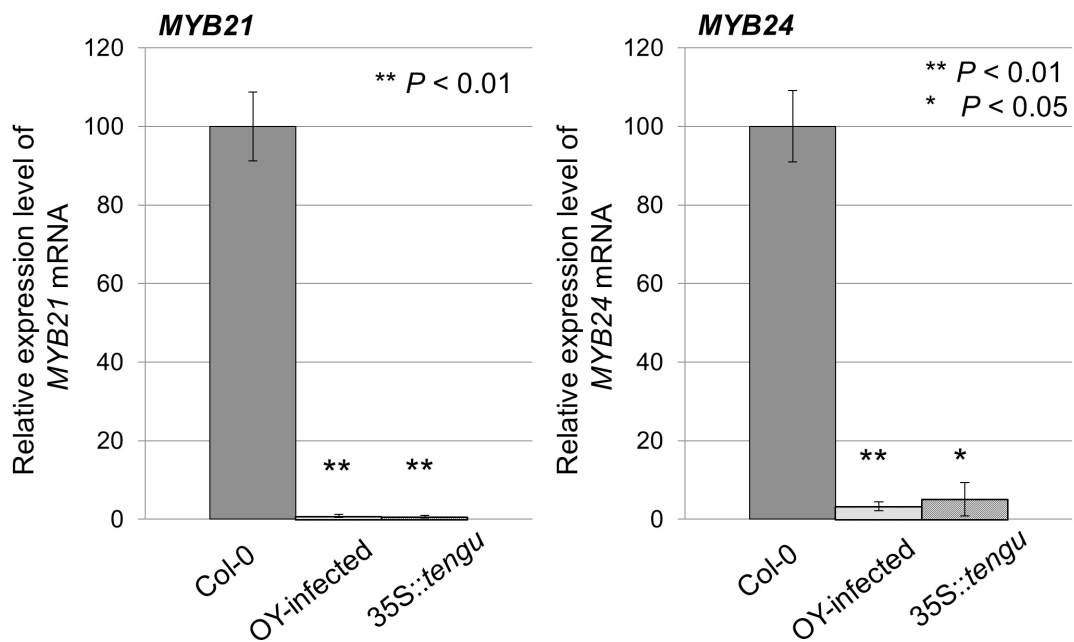


図 3-6 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナにおける *MYB21/24* の発現量 (Minato *et al.*, 2014)

OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換シロイヌナズナ (35S::tengu) における *ARF6/8* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により解析した。標準化にはシロイヌナズナの *Actin2* 遺伝子を用いた。

ARF6/8 遺伝子の発現は、OY ファイトプラズマ感染および 35S::tengu 個体において野生型と比べて有意に低下していた (Student's *t*-test; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差を示す。

3.3.3. TENGU による植物ホルモンの内生量の減少

ジャスモン酸

ARF6 および *ARF8* の二重変異体 *arf6-2 arf8-3* (バックグラウンド Columbia) および *arf6-101 arf8-1* (バックグラウンド Wassilewskija) では、ジャスモン酸内生量が著しく減少していることが報告されている (Nagpal *et al.*, 2005; Tabata *et al.*, 2010; Reeves *et al.*, 2012)。3.3.1. および 3.3.2. 項において、TENGU を異所的に発現させた 35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナの花序では、*ARF6* と *ARF8* およびその下流の遺伝子発現が低下していたことから、ジャスモン酸内生量が減少している可能性が考えられた。そこで本項では 35S::*tengu* の花芽における内生のジャスモン酸 ((+)-7-iso-jasmonic acid: *cis*-JA) およびそのアミノ酸縮合体であるジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) を LC/ESI/MS/MS により定量した。

35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナの花序から花器官の成熟が不完全である蕾を回収し凍結乾燥させたのち、蕾 10 個当たりの *cis*-JA および JA-Ile (pg/ 10buds) を定量したところ、野生型と比べてどちらも 35S::*tengu* で内生量が有意に減少していた (図 3-7 a,b)。対照的に、35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナの芽生え (seedling) を凍結乾燥させ乾燥重量当たりの *cis*-JA および JA-Ile (pg/ mgdw) を定量したところ、これらのホルモンの内生量は野生型と同程度であった (図 3-7 d,e)。このことから、TENGU によってシロイヌナズナの花序におけるジャスモン酸の内生量が減少していることが示唆された。

オーキシシン

TENGU は、その異所的発現シロイヌナズナにおけるマイクロアレイ解析の結果からオーキシシンのシグナル伝達又は生合成経路を阻害することが示唆されている (Hoshi *et al.*, 2009)。さらに、*ARF6* および *ARF8* の転写量とオーキシシンの関係については知見が乏しいものの、オーキシシン生合成酵素を失った変異体においては *ARF6* および *ARF8* の二重変異体のような生育異常が認められる場合がある (Mashiguchi *et al.*, 2011)。そこで TENGU がシロイヌナズナのオーキシシン内生量に影響するかを調べるため、植物が産生する主要なオーキシシンであるインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid: IAA) を定量した。

ジャスモン酸内生量の定量と同様に、*35S::tengu* 形質転換シロイヌナズナの花序から花器官の成熟が不完全である蕾を回収し、蕾 10 個当たりの IAA (pg/ 10buds) を定量したところ、野生型と比べて *35S::tengu* で内生量が有意に減少していた (図 3-7 c)。このことから、TENGU がシロイヌナズナの花序におけるオーキシシン内生量の減少にも寄与することが示唆された。

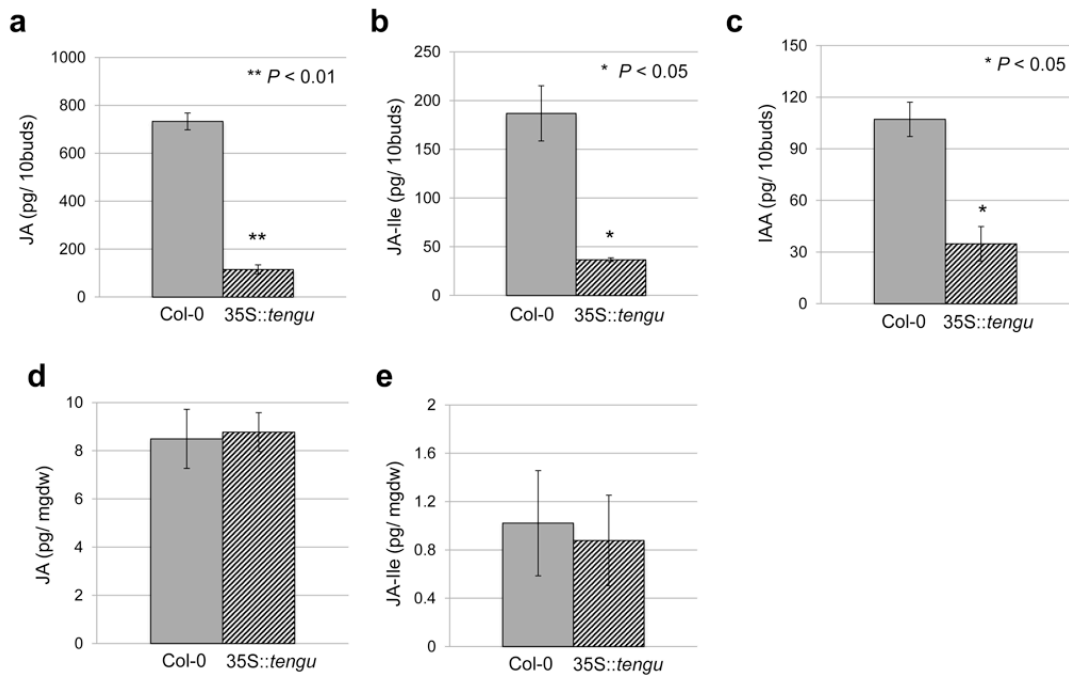


図 3-7 OY ファイトプラズマ感染および TENGU 形質転換
シロイヌナズナにおけるホルモンの内生量 (Minato *et al.*, 2014)

TENGU 形質転換シロイヌナズナ (*35S::tengu*) における植物ホルモンの内生量を定量した。a,d) ジャスモン酸 (*cis*-JA); b,d) ジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile); c) IAA の内生量を示す。また、a-c は蕾 10 個当たりのホルモンを、d,e は芽生えにおける乾燥重量当たりのホルモンを測定している。

35S::tengu の蕾において各ホルモンの内生量は野生型と比べて有意に低下していた (Student's *t*-test; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差を示す。

3.4. 考察

3.4.1. TENGU は *ARF6* および *ARF8* の発現を低下させる

本章において、OY ファイトプラズマ感染および 35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナの花序において *ARF6* および *ARF8* の発現は有意に低下していることが明らかとなった (図 3-3)。このことから、TENGU は *ARF6* および *ARF8* の発現を負に制御することが示唆された。

ARF6 および *ARF8* の発現を制御する上流の経路はほとんど未解明であるが、*microRNA167* の転写制御を受けることが示されている (Wu *et al.*, 2006)。しかしながら 3.3.1.項で示した通り、OY ファイトプラズマ感染植物および *tengu* 形質転換体において *miR167* の発現は予想に反してドラスティックな上昇を示しておらず (図 3-4)、このことから *ARF6* および *ARF8* の発現量の低下は *miR167* とは異なる制御に因っている可能性が示唆された。

また、*ARF6* および *ARF8* のの下流で働くと考えられている *LOX2* の発現は 35S::*tengu* 形質転換体において野生型と比べて有意に低下していた ($P < 0.01$; 図 3-5)。さらに、OY ファイトプラズマ感染および 35S::*tengu* 形質転換体においては *MYB21* および *MYB24* の発現はともに有意に低下していた (図 3-6)。これらの結果は、3.3.1.項で示したように OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナおよび 35S::*tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて *ARF6* および *ARF8* の発現が低下していたことと一致していた。

3.4.2. TENGU は植物ホルモンの内生量に影響する

図 3-7 で示したように、*tengu* 形質転換シロイヌナズナの花芽においては、*cis*-JA および JA-Ile の内生量が有意に低下していた。*ARF6* および *ARF8* は花芽において特に多く発現することが示されており (Pitaksaringkarn *et al.*, 2014)、また *ARF6* および *ARF8* の二重変異体の花芽ではジャスモン酸の内生量が野生型と比べて有意に減少することから (Nagpal *et al.*, 2005)、*ARF6* および *ARF8* を介した花芽におけるホルモンバランスの変化が TENGU による病徴発現に重要である可能性が示唆された。

既報において TENGU の形質転換体では栄養生長期にオーキシン初期応答遺伝子の発現が低下していることが示唆されている (Hoshi *et al.*, 2009)。本章において行ったホルモン定量の結果、ジャスモン酸と同様に、*tengu* 形質転換シロイヌナズナの花芽においては植物の主要なオーキシンである IAA の内生量が有意に低下していた (図 3-7)。3.1.2.項で述べたようにオーキシンは一般に植物の生殖生長過程において重要な役割を果たすと考えられている。特にシロイヌナズナにおいて、オーキシンの生合成に関わる遺伝子の変異体では *ARF6* および *ARF8* の二重変異体や *tengu* 形質転換体と同様の蕾のまま花が咲かない表現型が認められることから (Mashiguchi *et al.*, 2011)、TENGU によるオーキシン応答の抑制が不稔症状の誘導に寄与する可能性が考えられた。

また、既報の *tengu* 形質転換体を用いたマイクロアレイ解析により発現低下が示されていた *small auxin-up RNA (SAUR)* ファミリーに属する *SAUR63 (At1g29440)*、*SAUR64 (At1g29450)*、*SAUR65 (At1g29460)*、および *SAUR67 (At1g29510)* の 4 つ遺伝子は *ARF6* および *ARF8* の二重変異体の花芽においても野生型と比べて有意に発現が低下していたこ

とが示されている (Nagpal *et al.*, 2005; Hoshi *et al.*, 2009)。しかしながら、既報のマイクロアレイでは *tengu* 形質転換シロイヌナズナのロゼットにおいてその遺伝子発現が網羅的に解析されており、栄養生長期におけるオーキシン応答について ARF6 および ARF8 との関連は不明である。

3.4.3. TENGU による不稔症状誘導機構

本章では、TENGU を異所的に発現するシロイヌナズナにおいて見られる不稔症状が ARF6 および ARF8 の二重変異体の表現型と類似していることから、これら 2 つの遺伝子に着目して不稔症状誘導機構の解析を行った。その結果、*tengu* 形質転換体においては ARF6 および ARF8 とその下流ではたらく遺伝子の発現が著しく低下し、花芽における *cis*-JA、JA-Ile および IAA 内生量が減少していることが明らかとなった (図 3-3,5,6,7)。従って本章で得られた結果から、TENGU は少なくとも 2 つ以上の宿主の植物ホルモンに多面的な影響を与えているものと考えられた。

第 2 章と本章の結果を合わせて考えると、ファイトプラズマによる不稔症状は図 3-8 のような機構で誘導されるものと予想された。すなわち、ファイトプラズマが分泌するエフェクター TENGU は直接的または間接的に ARF6 および ARF8 の転写を負に制御し、その下流の遺伝子発現を低下させ内生の植物ホルモン量を減少させており、この結果花器官の成熟不全が起こって不稔症状が誘導されるものと考えられた。

Wild-type

tengu-transgenic

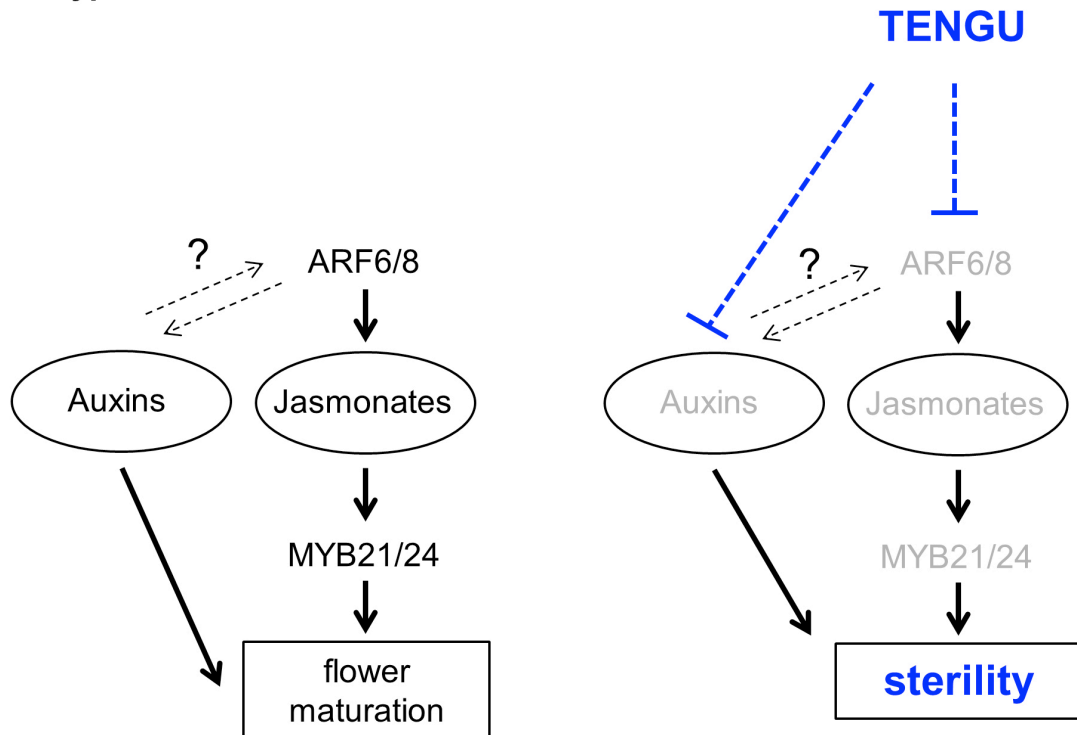


図 3-8 TENGU による不稔症状誘導モデル (Minato *et al.*, 2014)

- (左) 野生型シロイヌナズナにおける花器官の成熟に関わる経路。ARF6 および ARF8 のはたらきによりジャスモン酸合成が促進され、下流の転写因子 MYB21 および MYB24 などを経て花器官の成熟が完遂される。また、この花器官の成熟にはオーキシンも重要な役割を果たすことが分かっているが、ARF6/8 との制御関係については明らかとなっていない。
- (右) 想定される TENGU の異所的発現による不稔症状 (sterility) の誘導機構。TENGU ペプチド存在下においては、ARF6/8 とその下流にあたる MYB21/24 の発現が著しく低下し、ジャスモン酸およびオーキシンの内生量が減少する。TENGU ペプチドのターゲットは不明であるが、ARF6/8 の上流にあたる制御因子またはオーキシン内生量に負の影響を与えているものと考えられる。

第4章 総合考察

4.1. TENGU の作用機作

本研究は、植物病原細菌ファイトプラズマの感染によって宿主植物に誘導される不稔症状の発現機構を明らかにすることを目的として行った。第2章では *Candidatus Phytoplasma asteris* に属する OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナは生殖成長期において花器官の成熟不全による不稔症状を呈することを示し (図 2-4,5)、病原体側から誘導因子の同定を試みた。その結果、既報において萎縮・叢生を誘導する OY ファイトプラズマのエフェクターとして同定された TENGU ペプチドが、シロイヌナズナにファイトプラズマ感染時と同様の不稔症状を誘導する機能を持つことが示された (図 2-5)。また、第3章では OY ファイトプラズマ感染および TENGU の異所的発現によって引き起こされる不稔症状が *ARF6* および *ARF8* の二重変異体の表現型と類似していることから、これら2つの遺伝子に着目して不稔症状誘導機構の解析を行った。その結果、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいては *ARF6* および *ARF8* とその下流ではたらく遺伝子の発現が著しく低下しており、特に *tengu* 形質転換体の花芽においては *cis*-JA、JA-Ile および IAA 内生量が減少していることが明らかとなった (図 3-3,5,6,7)。したがって、ファイトプラズマの感染によって宿主植物に誘導される不稔症状は、ファイトプラズマが分泌するエフェクター TENGU が直接的または間接的に *ARF6* および *ARF8* の転写を負に制御し、その下流の遺伝子発現を低下させて内生のジャスモン酸やオーキシシンといった植物ホルモン量を減少させることによって花器官の成熟が停止し引き起こされるものと考えられた (図 3-8)。

不稔はファイトプラズマが感染した様々な植物において長らく観察されてきた病徴であるが、花の奇形・形態異常を伴う不稔症状がユニークな病徴として注目を集める一方、形態異常を随伴しない不稔症状の誘導機構についてはほとんど研究が為されてこなかった。しかしながら、多犯性であるファイトプラズマでは感染した宿主植物毎に異なる病徴を誘導することが非常に多く、実際には多くのファイトプラズマ種において形態異常を伴わない不稔症状の誘導が報告されている。本研究ではこのような不稔症状が OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナで認められることから、シロイヌナズナにおける誘導機構を解析しその一端を明らかにした。TENGU ペプチドの直接の相互作用因子は未だ不明であることから、不稔症状を誘導する TENGU のもう一つの機能である萎縮・叢生症状の誘導について、その機作の重なりに興味を持たれる。

4.2. ジャスモン酸内生量減少の意義

3.3.3.項において、TENGU の異所的発現はシロイヌナズナの蕾において *cis*-JA および JA-Ile の内生量を減少させることが示された (図 3-7)。植物において、ジャスモン酸シグナル伝達経路は昆虫に対する防御応答の中核を担う (De Vos *et al.*, 2007)。この機構を利用して植物病原体は、宿主植物のジャスモン酸内生量を調節することで媒介昆虫の繁殖を促しているものと考えられている。実際に植物ウイルスである TYLCCNV においては、ウイルスの BC1 タンパク質がジャスモン酸応答遺伝子の発現を抑制することで自身の媒介昆虫であるタバココナジラミ (*Bemisia tabaci* type B) の個体数を増加させることが示唆されている (図 1-11; Yang *et al.*, 2008)。また植物病原細菌であるファイトプラズマにおいても、AY-WB ファイトプラズマのエフェクターである SAP11 はジャスモン酸の生合成を抑制す

ることによってAY-WBの媒介昆虫であるフタテンヨコバイ (*Macrosteles quadrilineatus*) の定着を促すことが示唆されている (Sugio *et al.*, 2011a)。本研究で示されたように、TENGU を発現する植物においてもジャスモン酸の内生量が減少していたことから、ファイトプラズマは分泌したエフェクターを介して宿主植物のジャスモン酸内生量を減少させることで媒介昆虫を誘引し、自身の感染拡大を図っている可能性が考えられた。

4.3. エフェクターによるジャスモン酸の内生量減少誘導機構

SAP11 はAY-WB ファイトプラズマのエフェクターであり、その異所的発現によってシロイヌナズナのジャスモン酸生合成経路を抑制することが示されている (Bai *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011a)。本研究により、ファイトプラズマの2つのエフェクターTENGU と SAP11 はいずれもシロイヌナズナのジャスモン酸内生量を減少させる機能を持つことが示された (3.3.3.項; Sugio *et al.*, 2011a)。SAP11 は転写因子 TCP4 と結合しその分解を誘導することでジャスモン酸生合成酵素である *LOX2* の発現を低下させ、ジャスモン酸の生合成を抑制していると考えられている (Sugio *et al.*, 2011a)。一方ジャスモン酸の内生量が減少している TENGU の形質転換体においては、*ARF6* および *ARF8* の発現が低下しており、また TCP の発現抑制によって生じる鋸歯状の葉が認められなかった (表 1-2; 図 1-10; 図 3-3)。

Reeves らは、*ARF6* および *ARF8* の二重変異体において *LOX2* に加えてその発現を制御する *TCP4* の発現が低下していたことから、*ARF6* および *ARF8* によるジャスモン酸内生量の制御に *TCP4* が関わる可能性を議論している (Reeves *et al.*, 2012)。また、近年 *ARF6*

および *ARF8* の発現を制御する *miR167* の発現が TCP4-MYB33 複合体によって促される
ことが報告された (図 4-1; Rubio-Somoza *et al.*, 2013)。本研究において 3.3.1.項で示した
ように、*tengu* 形質転換体では *miR167* の発現量は上昇しており、*ARF6* および *ARF8* の
発現量は著しく低下していた (図 3-3,4)。もし TENGU が TCP4 を分解したりその転写を
抑制する機能を持つならば、*tengu* 形質転換体では *miR167* の発現が低下し *ARF6* および
ARF8 の発現が上昇することが推測されるが、本研究においてこのような発現変動は認めら
れなかった。この結果を支持するように、栄養成長期の *tengu* 形質転換体におけるマイク
ロアレイ解析では TCP の発現は野生型と同程度であることが示されている (Hoshi *et al.*,
2009)。したがって、TENGU は TCP4 の挙動とは独立に *ARF6* および *ARF8* の発現を制
御しているものと考えられた。なお、*tengu* 形質転換体で見られたジャスモン酸の内生量の
減少における TCP4 の関わりについては未だ示唆は得られていない。

さらに SAP11 を異所的に発現するシロイヌナズナでは有傷時にのみ野生型よりも葉にお
けるジャスモン酸量の増加が妨げられており、無傷では内在のジャスモン酸量に差が無い
ことが報告されている (Sugio *et al.*, 2011a)。これに対して、TENGU を異所的に発現する
シロイヌナズナでは無傷の状態ではジャスモン酸の内生量が野生型と比べて少なく、ジャス
モン酸量の減少が傷害応答に関わらず起こっていることが示唆された (図 3-7)。

1.2.節で述べたように、不稔症状を誘導する植物ウイルス TYLCCNV の BC1 タンパク質
は asymmetric leaves 2 (AS2) の機能を一部ミミックすることによりジャスモン酸応答遺
伝子の発現を低下させることが示されている (Yang *et al.*, 2008)。したがって本研究の結果
を併せて考えると、3つの異なる植物病原体のエフェクター BC1、SAP11 および TENGU

は、それぞれ異なるメカニズムによりジャスモン酸内生量を減少させているものと考えられた。

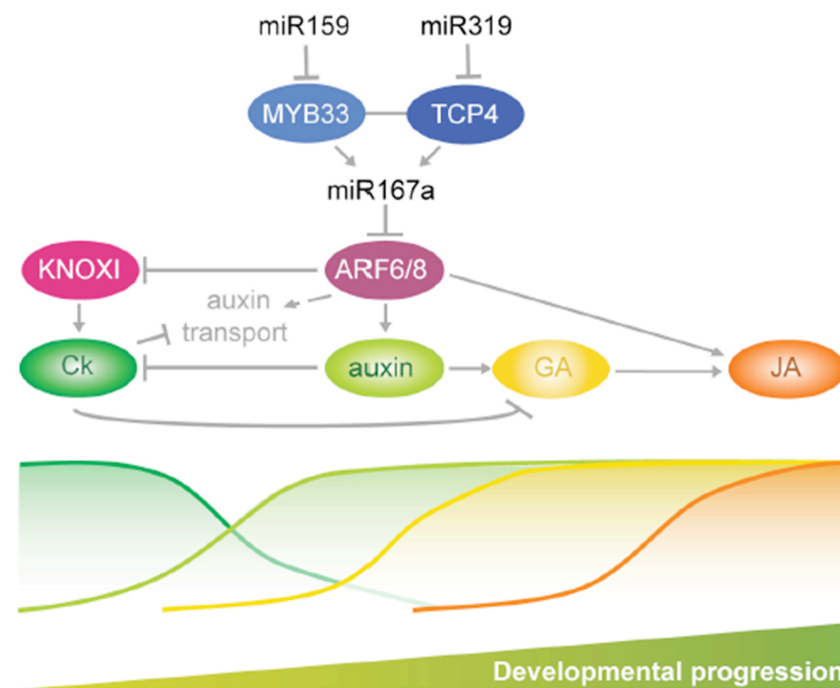


図 4-1 近年提唱されている *ARF6/8* の発現制御機構

(Rubio-Somoza *et al.*, 2013)

TCP4 は MYB33 と結合して複合体を形成し、*miR167* の発現を促すことにより *ARF6* および *ARF8* の発現制御に影響することが示唆されている。

4.4. TENGU による植物ホルモンの減少はサリチル酸非依存的である

サリチル酸 (salicylic acid: SA) は植物の防御シグナル物質として誘導される植物ホルモンである (高橋、2010)。ファイトプラズマ感染時には、サリチル酸シグナル伝達経路で働く代表的な遺伝子の一つである pathogenesis-related proteins 1 (*PR-1*) の発現が強く誘導されることがブドウでのマイクロアレイ解析により示されており、サリチル酸がファイトプラズマに対する防御応答に関与する可能性が示唆されていた (Albertazzi *et al.*, 2009)。しかしながら、*tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて行われたマイクロアレイ解析においては *PR-1* 遺伝子の発現上昇は認められなかったことから (Hoshi *et al.*, 2009)、本研究において得られた *tengu* 形質転換体におけるジャスモン酸の内生量低下はサリチル酸シグナル伝達経路の活性化によるものではないと考えられた。これは近年のジャスモン酸とサリチル酸のシグナル伝達経路が必ずしも拮抗していないという報告を支持する可能性がある (Kang *et al.*, 2008; Kidd *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2011)。

エフェクター研究が盛んに行われている病原細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) においては、宿主植物が細菌の分泌するエフェクターを認識してオーキシン受容体の発現を制御する *miR393* の発現量を上昇させることで basal defense を担うオーキシン応答を負に制御し、細菌の生育を抑制することが知られている (Navarro *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008)。これに対して、3.3.1.項で述べた通りファイトプラズマのエフェクターである TENGU は *miR167* の発現を著しく上昇させることはな

く、*ARF6*および*ARF8*の発現は*miR167*に因らない機構で負に制御されジャスモン酸内生量が減少しているものと考えられた。

本研究においては、*TENGU*を発現するシロイヌナズナではジャスモン酸に加えてオーキシン内生量も減少していることが示された。これは *Hoshi* らによるマイクロアレイ解析で示されたオーキシン初期応答遺伝子の発現低下を支持するものであった。*Pto DC3000* が感染したシロイヌナズナにおいては、オーキシシンシグナル伝達経路の活性低下により拮抗するサリチル酸シグナル伝達経路が活性化することで *Pto DC3000* に対する様々な防御応答が誘導されると考えられている (*Delaney et al., 1999*)。しかしながら、既に述べたように *tengu* 形質転換体においてはサリチル酸シグナル伝達経路の活性化が認められていないことから (*Hoshi et al., 2009*)、*TENGU* によるオーキシシンの内生量低下はサリチル酸シグナル伝達経路の活性化によるものではないと考えられた。したがって、*TENGU* はサリチル酸シグナル伝達経路とは独立にジャスモン酸とオーキシシンの 2 つの植物ホルモンの内生量を制御しているものと考えられた。

4.5. 不稔症状の生物学的意義

これまでに研究されてきたファイトプラズマのほとんどの種は、葉化 (*phyllody*) や緑化 (*virescence*)、またはこれらを伴わない花器官の成熟不全のいずれかを引き起こすことで最終的に宿主植物に種子が作られない不稔症状 (*sterility*) を誘導する。第 3 章で示したように、ファイトプラズマの分泌するエフェクター *TENGU* はジャスモン酸およびオーキシシンの内生量を減少させることから、第 2 章で示した *OY* ファイトプラズマによる不稔症状に

においてもこれらのホルモンの内生量の変化が病徴誘導に重要な役割を果たす可能性が示唆された。4.2.節で述べたように、宿主植物体内におけるジャスモン酸内生量の減少はファイトプラズマにとって媒介昆虫を誘引し自身の感染拡大を進めるために有益であると考えられる。第2章で示したように、ジャスモン酸内生量の減少は同時に花器官の正常な発達を妨げ不稔症状を誘導するが、1.1.2.項で述べた通りファイトプラズマは種子伝染しない病原体であり、宿主植物の種子生産量の減少はファイトプラズマの生存戦略にとって必ずしも大きな負の影響を及ぼすとは限らない。

OY ファイトプラズマや TYLCCNV のエフェクターはシロイヌナズナにおいてジャスモン酸内生量を低下させ、花器官のホメオティックな異常を伴わない不稔症状を誘導する (Minato *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2008)。興味深いことに、花器官のホメオティックな変化による不稔症状である葉化を誘導するエフェクターSAP54 (1.1.4.項) は、シロイヌナズナにおける異所的発現により昆虫を多く誘引することが示されており (MacLean *et al.*, 2014)、昆虫の誘引はこれまでに明らかとなっているファイトプラズマのエフェクターに共通した機能の一つである可能性がある。なお、SAP54により分解を受ける転写因子の一つである *APETALA1* (*API*) を発現しない変異体においては、SAP54 形質転換体と同様の葉化を伴う表現型が認められるにもかかわらず昆虫の誘引能は野生型と同等であることが示されており、エフェクターSAP54 が葉化症状の誘導そのものだけでなく植物ホルモンに影響して昆虫を誘引している可能性について議論が為されている (MacLean *et al.*, 2014)。

SAP54 および *PHYL1* は *MADS* ファミリーに属する転写因子を分解して生殖生長の第二段階である「花器官の属性の決定」を乱し、ホメオティックな変異を誘導すると考えられている (MacLean *et al.*, 2014)。これに対して *TENGU* は生殖生長の最終段階である「花

器官の成熟」を阻害し稔実を妨げていた (Minato *et al.*, 2014)。このようにファイトプラズマは植物の生殖生長の多段階に作用し、自身の繁殖に有利な環境をエフェクターを用いて作り出すよう努力しているようである。

しかしながら、植物病原体が宿主植物にもたらす形態異常等の病徴自体が必ずしも病原体の増殖を含めた病原性に寄与するかについては議論の余地がある。2011年に Jay らは、植物ウイルスである turnip mosaic virus のもつサイレンシングサプレッサーが *miR167* の *misregulation* を行うことにより *ARF8* が異所的に蓄積し形態異常を誘導することを示した (Jay *et al.*, 2011)。人為的に *ARF8* の発現を抑えたシロイヌナズナの変異体 *arf8-6* にはウイルス感染時に誘導される葉の形態異常がほとんど認められなかったにも関わらず、宿主植物体内におけるウイルスの蓄積量および退緑症状の程度は野生型と同程度であったことから、形態異常とウイルスの病原性が結びつかない可能性が示唆されている (Jay *et al.*, 2011)。したがって、植物病原体が宿主植物に誘導する病徴の生物学的意義については慎重な解析が求められる。ファイトプラズマが感染によって宿主植物の生殖生長に影響を与え種子生産を妨げる例は枚挙に遑がないが、栄養成長期において多様な病徴を誘導することもまた事実である。OY ファイトプラズマにおける不稔症状の生物学的意義についても、不稔症状が副次的に誘導される可能性も含め、今後宿主植物に併せて誘導される萎縮・叢生症状との関わりを解析することにより重要な示唆が得られるものと考えられる。

摘要

植物病原体はしばしば宿主植物の稔性にも大きな影響を与えており、植物の不稔症状は病原体と宿主植物の攻防の結果として長らく観察されてきた。植物病原細菌ファイトプラズマについても、多くの種が宿主植物に不稔を誘導することが報告されている。これらのファイトプラズマの多くは花器官が葉に転換する葉化のような花器官の属性決定の異常を促すことで不完全花の形成に依る不稔症状を引き起こすことが知られているが、一部のファイトプラズマは特定の宿主植物に花器官の属性決定に異常を伴わずに不稔症状を誘導する。これらの不稔症状においては宿主植物の花に「奇形」と思しき異常が認められないにもかかわらず種子の稔実率が低下する。ファイトプラズマの誘導する葉化症状については近年その誘導機構が詳細に解明されたのに対し、葉化のような奇形を伴わない不稔症状についてはその誘導機構は未解明であり、またその誘導因子も不明であった。そこで本研究では、ファイトプラズマの感染によって引き起こされる不稔症状の発病機構に病原体側・宿主植物側の両面から迫ることを目的とした。

1. 不稔症状を誘導するファイトプラズマの病原性因子の同定

当研究室が維持するタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (onion yellows phytoplasma: OYファイトプラズマ) はその宿主植物毎に生殖生長に異なる影響を及ぼすことが知られており、タマネギやシュンギクに感染した場合はほとんどの株が抽苔しないのに対して、感染ペチュニアでは抽苔後に葉化が認められる。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にお

いては、OY ファイトプラズマ感染により萎縮・叢生が誘導されることが示されていたものの、花に現れる病徴については詳細な報告が為されていなかった。

本研究ではまずシロイヌナズナの生殖生長期における OY ファイトプラズマ感染の影響を調べるため、OY ファイトプラズマを媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) を用いてシロイヌナズナに接種し観察を行った。その結果、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナは、これまで報告されていた萎縮および叢生といった形態異常に加えて花が蕾のまま開花しない生育異常を示した。このような OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナではその後種子の稔実が起こらず、不稔であった。また、OY ファイトプラズマ感染植物の蕾ではホメオティックな異常は認められず花器官の数や配置は野生型と同様であった。一方、雌蕊においては柱頭の *papillae* が野生型と比べて短いこと、および雄蕊の葯が裂開しないことが観察された。以上の結果から、OY ファイトプラズマに感染したシロイヌナズナの花においては雌性器官および雄性器官の両方の生殖器官でその発達が停止し、成熟不全となっているものと考えられた。

次に OY ファイトプラズマの感染による不稔症状の誘導機構を調べるため、その誘導因子の同定を試みた。既報により、OY ファイトプラズマにおいて萎縮および叢生による天狗巣症状を誘導する分泌タンパク質として報告されている *phytoplasma tengu-su inducer* (TENGU) を 35S プロモーターを用いて異所的に発現させたシロイヌナズナにおいては、莢の発達が妨げられることが示されている。そこで *tengu* 形質転換体の生殖生長期を詳細に観察したところ、OY ファイトプラズマ感染時と同様に抽苔後蕾が開花しないままの重度の生育異常を示す個体と、花が開花するものの莢が成長せず種子が得られない軽度の生育異常を示す個体が認められた。重度の生育異常を示す *tengu* 形質転換花では OY ファイトプラズマ感染花と同様に花器官にホメオティックな異常は認められなかった。また雌蕊の

柱頭の *papillae* が若干短く、雄蕊の葯は裂開しておらず花粉の放出は認められなかったことから、このような *tengu* 形質転換花においては OY ファイトプラズマ感染花と同様に雌性器官および雄性器官の両方が成熟不全となっているものと考えられた。これに対して、軽度の生育異常を示す *tengu* 形質転換体の花序では、多くの花は開花するが莢の発達が不十分であり、これは既報と同様の病徴であると考えられた。これらの花では花器官にホメオティックな異常は認められず、雌蕊柱頭の *papillae* は野生型のシロイヌナズナと同程度の長さであり、また雄蕊の葯は裂開しており花粉の放出が見られたが、走査型電子顕微鏡観察により花粉壁の構造に異常が生じていることが示された。野生型シロイヌナズナとの交配により、この *tengu* 形質転換体は雄性不稔であることが示唆された。以上の観察結果から、**TENGU** ペプチドはシロイヌナズナにおいてこれまで報告されていた軽度の不稔症状に加えて、OY ファイトプラズマ感染時と同様の不稔症状を誘導することが明らかとなった。また、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換花では花器官にホメオティックな異常は認められず分化が正常であったことから、これらの植物体に誘導される不稔症状は雌性器官および雄性器官の成熟不全によるものと考えられた。

さらに、*tengu* 形質転換シロイヌナズナが 1) 雄性不稔と 2) 雌性及び雄性器官の成熟不全による不稔の二段階の不稔症状を呈することから、これらの表現型の違いが生じる原因を調べるため *tengu* 遺伝子の転写産物量を定量 RT-PCR 法により比較した。その結果 *tengu* 遺伝子の発現量は、雌性及び雄性不稔を呈する個体において雄性不稔の個体よりも有意に多いことが示された。このことから、*tengu* の発現量依存的に不稔症状の程度が変化している可能性が示唆された。

2. **TENGU** による不稔症状誘導機構の解析

オーキシン応答に関わる転写因子 *auxin response factor (ARF) 6 (At1g30330)* およびそのパラログである *ARF8 (At5g37020)* は雌性配偶体および雄性配偶体の成熟に働く遺伝子で、これらの遺伝子の二重変異体では蕾のまま花器官の成熟が止まる表現型が観察される。本研究では、*ARF6* と *ARF8* の二重変異体が *tengu* 形質転換体とよく似た表現型を示すことに着目し、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいて *ARF6* と *ARF8* およびその下流で働く遺伝子の発現と植物ホルモンの内生量を調べ、宿主植物側から不稔症状の誘導機構に迫ることとした。

まず *ARF6* および *ARF8* の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した結果、OY ファイトプラズマ感染シロイヌナズナと *tengu* 形質転換体のどちらの花序においてもこれらの遺伝子発現は有意に低下していた。さらに、*ARF6* および *ARF8* の下流で働くことが知られている *MYB21 (At3g27180)* および *MYB24 (At5g40350)* の発現量を解析したところ、OY ファイトプラズマ感染および *tengu* 形質転換シロイヌナズナにおいてこれらの発現はともに有意に低下していた。これらの結果から、*TENGU* はその異所的発現によりシロイヌナズナの花序において *ARF6* と *ARF8* およびその下流の遺伝子発現を低下させることが示唆された。

ARF6 および *ARF8* の二重変異体においてはそのジャスモン酸内生量が著しく減少することが報告されており、*tengu* 形質転換体においても *ARF6* および *ARF8* の発現低下によりジャスモン酸内生量が減少している可能性が考えられた。そこで *tengu* 形質転換体の花芽における内生のジャスモン酸 (*cis*-JA) およびそのアミノ酸縮合体であるジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) を定量したところ、これらの花芽では野生型と比べ *cis*-JA および JA-Ile の内生量が有意に低下していることが示された。さらに、既報のマイクロアレイ解析により *TENGU* がオーキシンのシグナル伝達または生合成経路を阻害する可能性が示唆

されていることから、植物が産生する主要なオーキシシンであるインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid: IAA) を *tengu* 形質転換体の花芽において定量したところ、IAA 内生量は野生型と比べて *tengu* 形質転換体で有意に減少していた。したがって、TENGU はシロイヌナズナの花序におけるオーキシシン内生量の減少にも寄与することが示唆された。以上の結果から、*tengu* 形質転換体においては *ARF6* および *ARF8* とその下流ではたらく遺伝子の発現が著しく低下し、植物体内の *cis*-JA、JA-Ile および IAA 内生量が減少していることが明らかとなった。

以上を要するに、本研究では OY ファイトプラズマの分泌タンパク質 TENGU がシロイヌナズナに不稔症状を誘導することを明らかにし、その不稔症状誘導機構に関する詳細な解析を行った。ファイトプラズマが分泌するエフェクター TENGU は、直接的または間接的に *ARF6* および *ARF8* の転写を負に制御し、その下流の遺伝子発現を低下させ内生の植物ホルモン量を減少させており、この結果花器官の成熟不全が起こって不稔症状が誘導されているものと考えられた。

謝辞

本論文を結ぶにあたり、本研究を遂行する上で御指導御鞭撻を頂いた皆様に感謝の意を表します。

東京大学大学院農学生命科学研究科 難波成任教授には5年間懇切丁寧な御指導と御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、法政大学生命科学部応用植物科学科 大島研郎教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 山次康幸准教授、東京農工大学大学院応用生物科学科 小松健准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 姫野未紗子特別研究員には修士課程以降様々な御指導や御助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

植物ホルモンの定量に当たっては、理化学研究所植物科学研究センター 神谷勇治博士(当時グループディレクター)、同環境資源科学センター 笠原博幸上級研究員、および同センターテクニカルスタッフ 竹林裕美子氏に多大な御協力と御支援を賜りました。また同植物科学研究センター 真籠洋博士(当時研究員)、軸丸裕介博士(当時客員研究員)より貴重な御意見を頂きました。いつも温かい御支援を頂いた神谷グループの皆様に、心より感謝申し上げます。電子顕微鏡観察に当たっては、玉川大学農学部生物資源学科 渡辺京子教授に丁寧な御指導と貴重な御助言を賜りました。有り難く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 植物病理学研究室卒業生の星朱香博士には本研究の礎を築く御指導を頂きました。また同 千秋博子博士、同 菅原杏子博士をはじめとする先輩方には在学中多くの御指導を頂きました。ここに感謝申し上げます。また、研究生生活を送るに当たり植物病理学研究室の皆様にも多くの御支援を頂きましたことに謹んで御礼申し上げます。

最後に、進学後も研究者としての姿勢をご教示頂いた筑波大学 柿嶋眞名誉教授、筑波大学 奥野員俊博士、新潟大学自然科学研究科 長谷川英夫准教授の御支援によって本研究が成立していることを銘記し、深く感謝申し上げます。

引用文献

Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. & Martin, G. B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 601-611 (2006).

Agrios, G. N. *Plant pathology* 5th ed. (Elsevier Academic Press, Burlington, 2004)

Ainsworth, G. C. *Introduction to the history of plant pathology* (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1981)

Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E. & Pecchioni, N. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant. Sci.* **176**, 792-804 (2009).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. [15. 細胞の情報伝達] 細胞の分子生物学 第5版 [中村桂子・松原謙一監訳] [Garland Science, NY, NY, USA, 2010]

Alcantara-Mendoza S., Teliz-Ortiz, D., Leon, C. D., Cardenas-Soriano, E., Hernandez-Anguiano, A. M., Mejia-Sanchez, D., & Torre-Almaraz, R. D. L. Detection and evaluation of Maize Bushy Stunt phytoplasma in the state of Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de fitopatologia* **28**, 34-43 (2010).

Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Cador, Á. C., de Folter, S., de Buen, A. G., Garay-Arroyo, A., Garcia-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Perez-Ruiz, R. V., Pineyro-Nelson, A. & Sanchez-Corrales, Y. E. Flower development. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists.* **8**, e0127 (2010).

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A., Schevchenko, D., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W. & Hogenhout, S. A. Living with genome

instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.* **188**, 3682-3696 (2006).

Bai, X., Correa, V. R., Toruño, T. Y., Ammar, E. D., Kamoun, S. & Hogenhout, S. A. AY-WB Phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 18-30 (2009).

Bertaccini, A. & Duduk, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* **48**, 355-378 (2009).

Cettul, E. & Firrao, G. Development of phytoplasma-induced flower symptoms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **76**, 204-211 (2011).

Chaturvedi, Y., Rao, G. P., Tiwari, A. K., Duduk, B. & Bertaccini, A. Review Article: Phytoplasma on ornamentals: Detection, diversity and management. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **45**, 31-69 (2010).

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. & Schulz, A. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* **10**, 526-535 (2005).

Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A. & Oropeza, C. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 99-108 (2003).

Crane, M. B. & Lawrence, W. J. C. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *J. Pomol. Hortic. Sci.* **7**, 276-301 (1929).

Curaba J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M. & Vachon, G. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON2* and *FUSCA3* in *Arabidopsis*. *Plant J.* **136**, 3660-3669 (2004).

- De Vos M., Kim J. H. & Jander G. Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis–aphid interactions. *Bioessays* **29**, 871-883 (2007).
- Delaney, T. P., Friedrich, L. & Ryals, J. A. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6602-6606 (1999).
- Denance, N., Sanchez-Vallet, A., Goffner, D. & Molina, A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers Plant Sci.* **4**, 155 (2013).
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. & Asuyama, H. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with Mulberry dwarf, Potato witches' broom, Aster yellows, or Paulonia witches' broom. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **33**, 259-266 (1967).
- Esmailzadeh-Hosseini, S. A., Mirzaie, A., Jafari-Nodooshan, A. & Rahimian, H. The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by *Orosius albicinctus* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes* **2**, 33-34 (2007).
- Faghihi, M. M., Bagheri, A. N., Bahrami, H. R., Hasanzadeh, H., Rezazadeh, R., Siampour, M., Samavi, S., Salehi, M. & Izadpanah, K. Witches'-broom disease of lime affects seed germination and seedling growth but is not seed transmissible. *Plant Dis.* **95**, 419-422 (2011).
- Falah, M. & Gupta, R. S. (1997). Phylogenetic analysis of mycoplasmas based on Hsp70 sequences: cloning of the *dnaK* (*hsp70*) gene region of *Mycoplasma capricolum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 38-45 (1997).
- Giunchedi, L., EPPO-Pear decline phytoplasma (2012) Available at: https://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Pear_decline/PHYPPY_images.htm (Accessed: 3rd December 2014)

Haggis, G. H. & Sinha, R. C. Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology* **68**, 677-680 (1978).

Harrison, N. A. & Elliott, M. L. Lethal Yellowing (LY) of Palm1. Fact Sheet PP-222, one of a series of the Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

Himeno, M., Neriya, Y., Minato, N., Miura, C., Sugawara, K., Ishii, Y., Yamaji, Y., Kakizawa, S., Oshima, K. & Namba, S. Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *Plant J.* **67**, 971-979 (2011).

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N. & Namba, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 403-423 (2008).

Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. & Namba, S. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6416-6421 (2009).

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Minutes of the Interim Meeting, 17 and 26 July 1994. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 415-417 (1995).

Ishie, T., Doi, Y., Yora, K. & Asuyama, H. Suppressive effects of antibiotics of Tetracycline group on symptom development of Mulberry dwarf disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **33**, 267-275 (1967).

Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Tacconat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J. P. & Voinnet, O. Misregulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR 8* underlies the developmental

abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002035 (2011).

Jikumaru Y., Asami, T., Seto, H., Yoshida, S., Yokoyama, T., Obara, N., Hasegawa, M., Kodama, O., Nishiyama, M., Okada, K., Nojiri, H. & Yamane, H. Preparation and biological activity of molecular probes to identify and analyze jasmonic acid-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1461-1466 (2004).

Johansson, K. E., Heldtander, M. U. K. & Pettersson, B. [Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers.] *Methods in Molecular Biology, Mycoplasma Protocols*, vol. 104 [Miles, R. J. & Nicholas, R. A. J. (ed.)] [145-165] (Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1998)

Jung, H. Y., Sawayanagi, T., Wongkaew, P., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Oshima, K., Miyata, S. I., Ugaki, M., Hibi, T. & Namba, S. 'Candidatus Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1925-1929 (2003).

Kaminska, M. & Korbin, M. Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta physiologiae plantarum* **21**, 21-26 (1999).

Kamla, V., Henrich, B. & Hadding, U. Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA. *Gene* **171**, 83-87 (1996).

Kang, L., Wang, Y. S., Uppalapati, S. R., Wang, K., Tang, Y., Vadapalli, V., Venables, B. J., Chapman, K. D., Blancaflor, E. B. & Mysore, K. S. Overexpression of a fatty acid amide hydrolase compromises innate immunity in Arabidopsis. *Plant J.* **56**, 336-349 (2008).

Khan, A. J., Botti, S., Al-Subhi, A. M., Gundersen-Rindal, D. E. & Bertaccini, A. F. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. *Phytopathology* **92**, 1038-1047 (2002).

Kidd, B. N., Edgar, C. I., Kumar, K. K., Aitken, E. A., Schenk, P. M., Manners, J. M. & Kazan, K. The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2237-2252 (2009).

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M. & Seemüller, E. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus* Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* **9**, 306 (2008).

Le Gall, F., Bové, J. M. & Garnier, M. Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4566-4572 (1998).

Lee, I. M., Davis, R. E. & Gundersen-Rindal, D. E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes 1. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 221-255 (2000).

Mabberley, D. J. Mabberley's Plant-book 3rd ed. (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2008)

MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M. & Hogenhout, S. A. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* **157**, 831-841 (2011).

MacLean, A. M., Orlovskis, Z., Kowitwanich, K., Zdziarska, A. M., Angenent, G. C., Immink, R. G. & Hogenhout, S. A. Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* **12**, e1001835 (2014).

Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., Ishikawa, K., Fukuoka, M., Minato, N., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. Recognition of floral homeotic MADS-domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *Plant J.* **78**, 541-554 (2014).

Maniloff, J. [Phylogeny and evolution.] Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [Razin, S. & Herrmann, R. (ed.)] [31-43] (Springer, New York, NY, USA, 2002)

Markham, R., The official blog from the Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) (2014) Available at:
<http://aciarblog.blogspot.jp/2014/07/researchers-rally-round-to-save-tree-of.html>
(Accessed: 3rd December 2014)

Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K. I. & Kasahara, H. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 18512-18517 (2011).

Maskell, L. C., Raybould, A. F., Cooper, J. I., Edwards, M. L. & Gray, A. J. Effects of turnip mosaic virus and turnip yellow mosaic virus on the survival, growth and reproduction of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Ann. Appl. Biol.* **135**, 401-407 (1999).

McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chlykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., de Leeuw, T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M. & Seemuller, E. [Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms.] The Mycoplasmas, vol. 5 [Whitcomb R. F. & Tully J. G. (ed.)] [545-640] (Academic Press, San Diego, CA, USA, 1989)

Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, K., Kamiya, Y. & Namba S. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports* **4**, 7399 (2014).

Miyahara, K., Matsuzaki, M., Tanaka, K. & Sako, N. A new disease of onion caused by Mycoplasma-like organism in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **48**, 551-554 (1982).

- Murray, R. G. E., & Schleifer, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 174-176 (1994).
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R. & Reed, J. W. Auxin Response Factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107-4118 (2005).
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S. & Tsuchizaki, T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 461-467 (1993).
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. & Jones, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436-439 (2006).
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y. & Voinnet, O. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* **321**, 964-967 (2008).
- Nicolaisen, M., & Horvath, D. P. A Branch-inducing phytoplasma in *Euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *J. Phytopathol.* **156**, 403-407 (2008).
- Nipah, J. O., Jones, P. & Dickinson, M. J. Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. *Plant Pathol.* **56**, 777-784 (2007).
- Oerke, E. C. & Dehne, H. W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* **23**, 275-285 (2004).
- Oerke, E. C. Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.* **144**, 31-43 (2006).

Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, K., Oshima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y. & Namba, S. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a Potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* **26**, 2168-2183 (2014).

Oshima, K., Miyata, S. I., Sawayanagi, T., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Furuki, K. I., Yanazaki, M., Suzuki, S., Wei, W., Kuboyama, T., Ugaki, M. & Namba, S. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma. *J. Gen. Plant Pathol.* **68**, 225-236 (2002).

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S. I., Ugaki, M. & Namba, S. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* **36**, 27-29 (2004).

Pitaksaringkarn W., Ishiguro S., Asahina M. & Satoh S. *ARF6* and *ARF8* contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Biotech.* **31**, 1-5 (2014).

Plenck J. J. *Physiologia et pathologia plantarum* (In Latin) [123-125] (Apud A. Blumauer, Vienna, Austria, 1794)

Pracros P., Renaudin J., Eveillard S., Mouras A. & Hernould M. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 62-68 (2006).

Razin, S. [The genus *Mycoplasma* and related genera (class *Mollicutes*).] *The Prokaryotes Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria* [Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (ed.)] [836-904] (Springer, New York, NY, USA, 2006)

Reeves, P. H., Ellis, C. M., Ploense, S. E., Wu, M. F., Yadav, V., Tholl, D., Chetelat, A., Haupt, I., Kennerley, B. J., Hodgens, C., Farmer, E. E., Nagpal, P. & Reed, J. W. A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLoS Genet.* **8**, e1002506 (2012).

Rubio-Somoza, I. & Weigel, D. Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three microRNAs. *PLoS Genet.* **9**, e1003374 (2013).

Salehi M., Izadpanah K., Nejat N. & Siampour M. Partial characterization of phytoplasmas associated with lettuce and wild lettuce phyllodies in Iran. *Plant Pathol.* **56**, 669-676 (2007).

Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J. & Xie, D. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1000-1013 (2011).

Spena, A., Estruch, J. J., Prinsen, E., Nacken, W., Van Onckelen, H. & Sommer, H. Anther-specific expression of the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases IAA content in anthers and alters anther development and whole flower growth. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 520-527 (1992).

Sugawara, K., Honma, Y., Komatsu, K., Himeno, M., Oshima, K. & Namba, S. The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiol.* **162**, 2005-2014 (2013).

Sugio A., Kingdom H. N., MacLean A. M., Grieve V. M. & Hogenhout S. A. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1254-1263 (2011a).

Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R. & Hogenhout, S. A. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**, 175-195 (2011b).

Sugio, A., MacLean, A. M. & Hogenhout, S. A. The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP binding and destabilization. *New Phytol.* **202**, 838-848 (2014).

Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C. E., Ueno, Y., Yamamoto, K. T., Machida, Y., Nakamura, K. & Ishiguro, S. Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant Cell Physiol.* **51**, 164-175 (2010).

Tessema, T., Obermeier, C., Einhorn, G., Seemüller, E. & Büttner, C. Phyllody disease of parthenium weed in Ethiopia. *Pest Mgt. J. Eth.* **8**, 39-50 (2004).

Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., & Gibb, K. S. Comparative genome analysis of “*Candidatus* Phytoplasma australiense”(subgroup *tuf*Australia I; *rp*-A) and “*Ca.* Phytoplasma asteris” strains OY-M and AY-WB. *J. Bacteriol.* **190**, 3979-3991 (2008).

The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group. ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1243-1255 (2004).

Urbanaviciene D., Jomatiene R., Valiunas D. & Davis R. E. Molecular detection of phytoplasmas in oats, barley, and *Triticosecale* and their classification based on 16S rRNA gene polymorphisms. *Zemes Ukio Mokslai* **3**, 15-19 (2004).

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034 (2002).

Vivian-Smith A., Luo M., Chaudhury A. & Koltunow A. Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 2321-2331 (2001).

Wei, W., Davis, R. E., Nuss, D. L. & Zhao, Y. Phytoplasmal infection derails genetically preprogrammed meristem fate and alters plant architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 19149-19154 (2013).

Weintraub, P. G. & Beanland, L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* **51**, 91-111 (2006).

Wu M. F., Tian Q. T. & Reed J. W. Arabidopsis *microRNA167* controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **133**, 4211-4218 (2006).

Xiang, Y., Song, M., Wei, Z., Tong, J., Zhang, L., Xiao, L., Ma, Z. & Wang, Y. A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defence system. *J. Exp. Bot.* **62**, 5471-5483 (2011).

Yahara, T. & Oyama, K. Effects of virus infection on demographic traits of an agamosperous population of *Eupatorium chinense* (Asteraceae). *Oecologia* **96**, 310-315 (1993).

Yang, J. Y., Iwasaki, M., Machida, C., Machida, Y., Zhou, X. & Chua, N. H. BC1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes Dev.* **22**, 2564-2577 (2008).

Zhang, J., Hogenhout, S. A., Nault, L. R., Hoy, C. W. & Miller, S. A. Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology* **94**, 842-849 (2004).

Zhang X. S. & O'Neill S. D. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* **5**, 403-418 (1993).

伊藤寿朗. [5. 花の器官形成-ABC モデルとその関連遺伝子-] 植物ゲノム機能のダイナミズム -転写因子による発現制御- [岩渕雅樹・篠崎一雄編] [64-72] (シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, 日本, 2001)

大場秀章. 植物分類表 [大場秀章・森弦一編] (アボック社, 鎌倉, 神奈川県, 2011)

奥田誠一. わが国に発生するマイコプラズマ病. *植物防疫* **26**, 180-183 (1972).

河村好章. 医学細菌の分類・命名の情報: 15. *Candidatus*-培養に成功していない原核生物の暫定的地位. *感染症学雑誌* **76**, 985-987 (2002).

小柴共一, 澤進一郎, 太田啓之, 関本(佐々木)結子. [第2章 オーキシン, 第8章 ジャスモン酸] 新しい植物ホルモンの科学 第2版 [小柴共一・神谷勇治編] (講談社, 東京, 日本, 2010)

塩見敏樹, 田中穰. 継代保存中に発生したタマネギ萎黄病 *Phytoplasma* の病徴変異株 (関東部会). *日本植物病理學會報* **62**, 614 (1996).

四方英四郎. 海外に発生するマイコプラズマ様微生物による植物の病害. *植物防疫* **26**, 184-189 (1972).

志佐誠. 植物の不稔性 (養賢堂, 東京, 日本, 1937)

志佐誠. [I 採種の基礎知識, 2 花から種子へ] 蔬菜花卉 採種園芸 [志佐誠編] [9-32] (朝倉書店, 東京, 日本, 1959)

千秋博子. 「Flexivirus 科ウイルスの RNA サイレンシングサブプレッサーの生物学的研究」博士論文. 東京大学. (2012)

高橋英樹. [第7章 植物の抵抗性発現機構, 3. 抵抗性発現に関わる遺伝子制御] 植物病理学 [眞山滋志・難波成任編] [224-227] (文永堂出版, 東京, 日本, 2010)

難波成任. MLO からファイトプラズマへ-ファイトプラズマの分類. *植物防疫* **50**, 152-156 (1996).

日向康吉. 花-性と生殖の分子生物学 [日向康吉・磯貝彰・米田好文・鳥山欽哉・鎌田博・長戸康郎編] (学会出版センター, 東京, 日本, 2001)

安田貞雄. [第4章 受精の生理] 高等植物生殖生理學 (開花及び結実の理論と実験)
[130-291] (養賢堂, 東京, 日本, 1951)

略語一覽

ARF	auxin response factor
AY-WB	aster yellows strain witches' broom
<i>Ca.</i>	<i>Candidatus</i>
IAA	indole-3-acetic acid
JA	jasmonic acid
LOX2	lipoxygenase 2
miR	microRNA
MLO	mycoplasma-like organism
OY	onion yellows
SAP	secreted AY-WB protein
TCP	TEOSINTEBRANCHED, CYCLOIDEA, PROLIFERATION FACTOR 1 AND 2
TENGU	phytoplasma tengu-su inducer
TYLCCNV	tomato yellow leaf curl China virus