

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏 名 西川 尚志
指導教官名 難波 成任

論文題目 ファイトプラズマの染色体外 DNA に関する研究

ファイトプラズマは植物の篩部細胞内に寄生する最小の細菌であり、数百種の植物に病気を引き起こす農業上重要な植物病原細菌である。主にヨコバイにより伝搬され、感染・発病した植物には萎縮・叢生・黄化・緑化・葉化などの症状を引き起こす。しかし人工培養が出来ないことから、検出・診断はもっぱら病徴観察や昆虫伝搬試験、電子顕微鏡観察などに頼っていた。しかし、近年ファイトプラズマ DNA の分離とその解析が可能となり、分子生物学的手法を用いた研究が急速に進み、系統解析によるファイトプラズマの分類体系の確立など、ファイトプラズマ研究はここ数年で著しい進展を見せている。

一般に、植物病原細菌には染色体外 DNA にその病原性に関与する遺伝子がコードされている例の多いことが知られている。本研究では、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (OY) の野生株である OY-W をモデル系統に用い、その継代過程で分離された病徴の極めて穏やかな変異株 (OY-M) より昆虫伝搬能喪失変異株 (OY-NIM) を作出した。そして、各分離株よりそれぞれ極めてユニークな染色体外 DNA を見出し、その構造および病原性や昆虫伝搬能との関係を解析した。

1. 昆虫伝搬能喪失変異株の作出および染色体外 DNA の抽出法の確立

昆虫による伝搬能を失った変異株を作出する目的で、OY-M の接木のみによる継代を繰り返し行った。継代のたびに、媒介昆虫であるヒメフタテンヨコバイ (*Macrosteles striifrons*) に吸汁させ、昆虫伝搬能を試験した。その結果、約 2 年にわたる継代ののち、昆虫伝搬能を喪失した変異株 (OY-NIM) を作出した。OY-NIM が昆虫伝搬能を喪失した要因を調べる目的で、OY-NIM 感染植物を吸汁した媒介昆虫より DNA を抽出し、ファイトプラズマに特異的な 16S rRNA 遺伝子を増幅する PCR によりファイトプラズマの存在を調べた。その結果、ファイトプラズマの存在は認められなかったことから、OY-NIM は昆虫体内に侵入できないか、あるいは昆虫体内で増殖できないものと考えられた。本研究により、人工培養できないファイトプラズマに対し、OY-NIM の作出により、昆虫伝搬のメカニズムに関する実験系を確立することが出来た。

そこで、これら野性株および変異株を用いて染色体外 DNA を大量かつ高度に抽出・精製する手法を確立した。すなわち、ファイトプラズマが植物の篩部細胞内に局在することを利用し、植物維管束組織を用いて酵素処理によりプロトプラスト化し、磨砕処理、分画遠心によりファイトプラズマの濃縮画分を得ることができた。この画分より DNA を抽出したところ、クローニングするのに十分な量の染色体外 DNA を得ることが出来た。電気泳動解析により、OY-W に 3 種類、OY-M に 2 種類、OY-NIM に 2 種類の環状と思われる染色体外 DNA の存在が示唆されたので、制限酵素処理によりクローニングを試みた。同時に、もとのファイトプラズマの濃縮画分の DNA 試料よりライブラリーを構築し、染色体外 DNA の全長の構造を解析した。

2. ウイルス型複製酵素を持った染色体外 DNA

OY-W から最大の染色体外 DNA (EcOYW1, 7005 bp) をクローニングし、その全長の塩基配列を決定した。EcOYW1 にコードされる複製酵素 (Rep) は植物と昆虫に感染する環状 1 本鎖 DNA ウイルスであるジェミニウイルスの Rep と相同性の高い、ユニークなウイルス型染色体外 DNA (EcOY-DNA) であった。

EcOYW1 には 7 つの open reading frames (ORF) が認められ、ORF1 には Rep が、また ORF5 には、*Clostridium perfringens* のプラスミド pIP404 等にコードされるコピー数制御タンパク質と相同性の高いタンパク質がコードされていた。EcOYW1 の複製・遺伝子発現を解析する目的で、Rep を大腸菌で大量発現ののち精製し、Rep 抗体を作製してウェスタンブロット解析を行ったところ、OY-W 感染植物特異的に予想される約 42 kDa のバンドが観察され、感染植物体内で Rep が発現していることが確認された。また、EcOYW1 の一

部をプローブとして用いてサザンブロットを行ったところ、OY-M 感染植物より抽出した DNA とは反応しなかったことから、EcOYW1 に相当する染色体外 DNA は OY-M およびこれに由来する OY-NIM には存在しないことが明らかとなった。このことから OY-M は OY-W を継代する過程で EcOYW1 を失ったと考えられ、この染色体外 DNA の有無と病原性との関係が示唆された。

3. ユニークな複製酵素を持つプラスミド DNA

OY-W、OY-M、OY-NIM にはそれぞれ約 3~4 kbp の環状染色体外 DNA、pOYW (3933 bp, 5 ORFs)、pOYM (3932 bp, 5 ORFs)、pOYNIM (3062 bp, 3 ORFs) が認められた。これらの DNA は pLS1 family プラスミドの Rep に似た複製酵素 (Rep) をもったプラスミド DNA (pOY プラスミド) であった。しかし、pOY プラスミドの Rep は pLS1 family の Rep に比べ C 末端側が約 120 アミノ酸長く、この領域には哺乳動物のサーコウイルスなどの 1 本鎖 DNA ウイルスの Rep のヘリカーゼドメインと高い相同性が認められた。プラスミドがこのような構造の Rep を持つ例はこれまで知られておらず、(1) pOY プラスミドの祖先がウイルスのヘリカーゼドメインを組換えにより獲得した可能性や、(2) 真核生物の 1 本鎖 DNA ウイルスは原核生物のプラスミドから進化したと考えられているが、pOY プラスミドがその進化の中間体を起源としている可能性が示唆された。

pOYW と pOYM には 1 本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) 遺伝子と相同性の高い遺伝子をコードする ORF が認められたが、その他の ORF には Rep 以外には既知の遺伝子との相同性は認められなかった。また、pOYNIM は約 900 bp 短く、ORF4(SSB)と ORF3 が欠失していた。ORF3 は、膜貫通領域を 2 つ持つ膜タンパク質をコードしていると推定された。

同じ *Mollicutes* 綱の植物病原細菌であるスピロプラズマでも、接木により継代を繰り返すことで昆虫伝搬能喪失変異株が作出されているが、その欠失している遺伝子に関しては詳細には明らかにされていない。また、動物マイコプラズマで知られている感染に必要な接着性の膜タンパク質と相同性の高いタンパク質がスピロプラズマにおいても見出され、昆虫伝搬能との関連が示唆されている。ファイトプラズマは細胞壁を持たないために、膜タンパク質が直接宿主と相互作用するはずで、昆虫伝搬においても何らかの機能に関与している可能性がある。

4. 染色体外 DNA のダイナミックな組換え

OY-W、OY-M、OY-NIM にはそれぞれ約 5 kbp の環状染色体外 DNA、EcOYW2 (5560 bp, 7 ORFs)、EcOYM (5025 bp, 6 ORFs)、EcOYNIM (5045 bp, 6 ORFs) が認められた。Rep の特徴からこれらは EcOY-DNA であり、ORF4 および ORF5

に SSB と Rep がそれぞれコードされていたが、その他の ORF には既知の遺伝子との相同性は認められなかった。これらの染色体外 DNA の遺伝子構造を EcOYW1 や pOYW と比較した結果、EcOYW2 は EcOYW1 の Rep 遺伝子周辺の約 2 kbp、および pOYW の ORF1~4 を含む約 2 kbp と相同な領域を有していること、また、EcOYM と EcOYNIM には EcOYW1 の ORF7 を含む領域を有していることが分かった。このことから、EcOYW2 は EcOYW1 と pOYW のダイナミックな組換えによって出現し、EcOYM は OY-M が OY-W から分離される過程でさらに一部 EcOYW1 との間に組換えを起こして生じたと考えられた。このように、細菌の変異の過程で染色体外 DNA 同士がダイナミックな組換えを起こした興味深い痕跡が見いだされた。

5. PCR によるファイトプラズマの検出と識別

EcOYW2、EcOYM、EcOYNIM に共通する塩基配列を用いて、それぞれ異なるサイズが増幅されるような PCR プライマーセット (EC-d1/EC-d2) を設計した。各ファイトプラズマ感染植物から抽出した total DNA を用いて PCR を行った結果、それぞれから予想されたサイズの DNA 断片が増幅された。染色体外 DNA はゲノム DNA よりコピー数が多く、ribosomal RNA 遺伝子より同一種内での変異が大きいこと、また、PCR による検出はハイブリダイゼーションよりも約 500 倍感度が高いという報告があることから、EC-d1/EC-d2 を用いた PCR はファイトプラズマの高感度な検出と識別には有効である。また、各分離株を区別できることを利用して、混合感染した植物における干渉現象の解析などにも応用できることが期待される。

以上を要するに、本研究により、タマネギ萎黄病ファイトプラズマの野性株および作出した変異株よりユニークな染色体外 DNA の全セットを構造的かつシステムティックに初めて解析し、EcOY-DNA については病原性と、プラスミドについては昆虫伝搬性との関連性を示唆した。pOY プラスミドの構造的な特徴から、その複製酵素の祖先が、環状 1 本鎖 DNA ウイルスの複製酵素の祖先へと進化した可能性を示唆した。

また、約 5 kbp の EcOY-DNA は、EcOY-DNA および pOY プラスミドとの間のダイナミックな組換えによって生じたことを示唆した。細菌において染色体外 DNA 間の組換えは進化的に重要な役割を果たしており、新たな環境への急速な適応を可能としていることから、このような組換えが、ファイトプラズマの広い宿主と多様な病原性との関連性を示唆した。本研究成果により、ファイトプラズマのリバーシブルな遺伝子工学による病原性や昆虫伝搬能の解明への道を開く基礎的知見を得ることができた。