

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 13 年度博士課程入学
氏 名 魏 薇
指導教官名 日比 忠明

論文題目 ファイトプラズマの免疫組織化学的手法による動態解析

ファイトプラズマは、世界中で 700 種以上の植物に病害を引き起こす農業生産上重要な植物病原細菌の一群で、*Mollicutes* 綱に分類される。感染した植物は萎黄、叢生、萎縮、てんぐ巣、花の葉化・緑化などの特徴的な病徴を呈する。また、植物体内では篩部組織に局在し、篩管液を吸汁するヨコバイ等の害虫により伝搬される。ファイトプラズマは、植物と昆虫の細胞内という全く異なる環境下で生息することができるユニークな細菌であり、両宿主組織における局在・増殖・移行パターンなどその動態は非常に興味深い。しかし、人工培養が困難であることから、検出に適した特異抗体の作出、免疫組織学的手法の確立、定量法の確立など技術的な課題が多く、ファイトプラズマの宿主組織内における動態についてはほとんど知見がない。そこで本研究では、ファイトプラズマのタンパク質に対する特異抗体を作出し、それを用いて有効な検出法・免疫組織化学的解析法を確立し、nested-PCR による高感度な検出法とリアルタイム PCR による定量法を確立することを試みた。それをもとに、ファイトプラズマの植物・昆虫両宿主における感染・増殖・移行の過程を明らかにすることを目的として行った。

1. 抗ファイトプラズマタンパク質抗体の作出およびその比較解析

(1) 抗IDP抗体

ファイトプラズマは細胞壁を持たず細胞膜表面に膜タンパク質が露出していると考えられ、菌体を特異的かつ高感度に検出するためには、膜タンパク質に対する抗体を用いることが有効である。immunodominant membrane protein (IDP) はファイトプラズマの主要な膜タンパク質であり、タマネギ萎黄病 (OY) ファイトプラズマ強毒株 (OY-W) のゲノム DNA より単離した IDP 遺伝子をもとに抗 IDP 抗体が作出されている (Kakizawa *et al.*, in press)。そこで、数種ファイトプラズマに対する本抗体の有効性をウェスタンブロット解析により検討した。その結果、「AY 16S-group」に属する OY-W およびセリ萎黄病 (WDY)、レタス萎黄病 (LeY)、クワ萎縮病 (MD)、アジサイ葉化病 (JHP) の各ファイトプラズマに感染した植物より抽出した全タンパク試料のそれぞれより、OY ファイトプラズマ IDP の分子量に一致する健全植物からの試料には認められないバンドが検出された。しかし、「WX 16S-group」に属するアズキ萎黄病 (AdY)、リンドウてんぐ巣病 (GWB) の各ファイトプラズマに感染した植物からは検出されなかった。次いで、免疫組織化学的手法により感染植物の組織切片におけるファイトプラズマの組織内所在の観察を試みた。その結果、「AY 16S-group」ファイトプラズマの感染植物では篩部特異的に強いシグナルが認められたが、「WX 16S-group」ファイトプラズマの感染植物ではシグナルが認められなかった。以上より、抗 IDP 抗体は、「AY 16S-group」ファイトプラズマの検出に有効であることが明らかになった。またこれにより、ファイトプラズマの免疫組織化学的検出法が初めて確立された。

(2) 抗 SecA 抗体

Sec分泌系は真正細菌に普遍的に存在する膜輸送系であり、分泌タンパク質を菌体細胞質から細胞膜外へと輸送するシステムである。そこでOY-WのSec分泌系の構成因子 (SecA, Y, E) のひとつ、SecAタンパク質に対する抗体 (Kakizawa *et al.*, 2001) を用いて、AY, WX, EY, RYDの各16S-groupに属する8種のファイトプラズマの感染植物に対し、この抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、すべてのファイトプラズマ感染植物試料において、OY-WのSecAタンパク質の分子量に相当する95.7 kDa付近にバンドが観察された。また、感染植物の組織切片におけるファイトプラズマの組織内所在を観察した結果、すべてのファイトプラズマ感染植物篩部において特異的にシグナルが認められた。以上より、抗SecA抗体は異なる16S-groupのファイトプラズマに反応することが明らかになり、ファイトプラズマに共通した抗体である可能性が示唆された。

(3) 抗P17抗体

植物病原細菌のプラスミドには、病原性、抗生物質耐性、表現形質等に関与する重要な遺伝子をコードするものが多く知られている。OY-W、その弱毒株 (OY-M)、および昆虫伝搬能喪失株 (OY-NIM) のそれぞれに存在するプラスミドの遺伝子構造の比較解析により、OY-NIM のプラスミドには OY-W および OY-M のプラスミドにコードされる機能未知の膜タンパク質遺伝子 (*p17*) が欠失しており、このタンパク質の昆虫伝搬能との関連が示唆されているが (Nishigawa *et al.*, 2003)、その発現については調べられていない。そこで、この *p17* 遺伝子をクローニングし、コードされるタンパク質 (P17) を大腸菌で発現させたのち、P17 精製タンパク質を用いて抗 P17 抗体を作出した。この抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったが、OY-W、-M、-NIM 感染植物より特異的なタンパク質バンドは検出されなかった。そこで、同じ植物を材料に免疫組織化学的解析を行った結果、OY-W、-M 感染植物篩部で特異的シグナルが観察されたが、OY-NIM 感染シュンギクでは認められなかった。また、OY-W を保毒する媒介昆虫 (ヒメフタテンヨコバイ) について免疫組織化学的解析を行ったところ、抗 IDP 抗体および抗 SecA 抗体を用いた場合と異なり、植物と昆虫におけるシグナル強度が異なり、昆虫においてより強いシグナルを呈した。このことは、植物を用いたウェスタンブロット解析において P17 タンパク質が検出されなかったことと合わせ、P17 タンパク質が昆虫体内においてより発現量が高いことが示唆された。

2. 宿主植物における動態解析

宿主植物におけるファイトプラズマの動態はこれまで知られていない。そこで、高感度検出法である nested-PCR によりファイトプラズマの植物体内の移行を追跡し、リアルタイム PCR によりファイトプラズマの増殖速度を測定し、本研究で確立した免疫組織化学的手法により、各組織におけるファイトプラズマの分布を観察した。これらの結果をもとにファイトプラズマの植物における動態を解析した。すなわち、16S rRNA 遺伝子を増幅する nested-PCR により、接種 1 日後には接種葉に加えて茎頂と主茎全体に OY-W の移行が認められた。2 日後には根と最上位葉に検出された。1 週間後より順次新たな最上位葉が展開を始めたが、これらの葉では常に OY-W が検出された。そして 2 週間後以降上位葉から下位葉に向けて順に OY-W が移行し、3 週間後にはすべての葉より検出された。以上から、OY-W が植物体全体に展開するのは接種 3 週間後であることが明らかになった。また、翻訳伸長因子 EF-Tu をコードする *tuf* 遺伝子を増幅するリアルタイム PCR により、接種葉においても根においても、接種後 2~4 週間のあいだ、1 週間あたり約 6 倍ずつ OY-W は増殖することが明らかになった。さらに、感染植物の茎と根について切片を作製し、抗 IDP 抗体を用いてファイトプラズマの所在を観察した結果、接種 1 週間後までは検出されず、2 週間後に一部の篩部にシグナルが観察され、3 週間後以降には篩部全体に観察され

た。以上から、OY-W は接種後短時間のうちに接種葉から主茎まで移行し、接種 1 日後に茎頂を含む主茎全体に、2 日後には最上位葉および根に、その後は最上位葉から下位葉へと篩管を通じて移行することが明らかになった。リアルタイム PCR によるファイトプラズマの定量的解析はこれが初めてである。

3. 媒介昆虫における三次元動態解析

ヒメフタテンヨコバイにおける OY ファイトプラズマの経時的局在変化を、nested-PCR、リアルタイム PCR、免疫組織化学的手法により解析した。Nested-PCR により、OY-W、-M の獲得吸汁 1 日後では腹部、4~6 日後では胸部、10~14 日後では頭部でファイトプラズマが検出された。以上より、吸汁により虫体内に取り込まれたファイトプラズマは腹部、胸部、頭部という順番で移行・増殖することが明らかとなった。一方、OY-NIM は、獲得吸汁直後 nested-PCR を用いても検出されなかったことから、(1) 虫体内増殖量が検出限度以下であるか、(2) 植物篩管から口針を通じた取り込みが出来ないか、(3) 吸汁直後に口針あるいは消化器官内で速やかに分解されるか、のいずれかの可能性が考えられた。リアルタイム PCR により昆虫体内におけるファイトプラズマを定量した結果、1 週間あたり約 9~11 倍の割合で増殖することが明らかとなった。また、抗 IDP 抗体を用いた免疫組織化学的手法により得られた画像をもとに虫体の 3 次元立体構造を再構築し、虫体内におけるファイトプラズマの三次元動態を解析した。その結果、OY-W、-M は、獲得吸汁 14 日後には腸の一部、20 日後には腸の大部分、体腔と唾腺の一部、27 日後には唾腺の大部分、34 日後では唾腺全体、41 日後には脳の一部で検出された。媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの増殖速度の解明および動態の可視化はこれが初めてである。

結論

以上を要するに、抗 SecA 抗体は異なる 16S-group のファイトプラズマに対して広く反応し、全てのファイトプラズマの検出に有効である可能性が示唆された。OY-W 由来の抗 IDP 抗体は、AY 16S-group のファイトプラズマに特異的な抗体であることが明らかになった。また、OY-W および-M のプラスミドにコードされ、OY-NIM のプラスミドで欠失している *pI7* 遺伝子は、昆虫体内で特異的に発現量が増加することから、このタンパク質が昆虫伝搬能に関与している可能性が示唆された。また、nested-PCR、本研究で確立したリアルタイム PCR および免疫組織化学的手法により、ファイトプラズマの宿主における動態解析を行った結果、OY-W はシュンギクにおいては「接種葉⇨主茎⇨最上位葉・根⇨下位葉」、媒介昆虫においては「口針⇨腹部（腸管）⇨体腔⇨胸部（唾腺）⇨頭部（脳）」というパターンで移行・増殖することが明らかになった。