

# 論文内容の要旨

論文題目： ファイトプラズマのタンパク質膜輸送系および  
その基質に関する研究

氏名： 柿澤 茂行

## 序論

ファイトプラズマは 700 種以上の植物に病気を引き起こす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・発病した植物に萎縮・叢生・黄化・緑化・葉化などの特徴的な症状を引き起こす。しかし人工培養に成功していないことからその研究は困難であり、その検出・診断はもっぱら病徴観察・昆虫伝搬試験・電子顕微鏡観察などに頼っていた。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、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。

ファイトプラズマは細胞壁を持たず、また宿主の細胞内に寄生するため、菌体表面に存在すると予想される物質輸送系は、宿主である植物や昆虫との相互作用に極めて重要な役割を果たしていると予想される。しかし、これまでファイトプラズマにおける膜タンパク質の解析はほとんど行われていなかった。そこで本研究では *Candidatus Phytoplasma asteris*, OY strain を用い、そのタンパク質膜輸送系を構成する因子の解析と、その基質となるタンパク質についての解析を行った。

## 1. Sec system の構成タンパク質遺伝子のクローニングと発現解析

細菌におけるタンパク質膜輸送系については大腸菌や枯草菌などで複数の系が報告されているが、その中で Sec system のみが生存に必須である。そこで本研究ではこの Sec system に着目した。

大腸菌の Sec system は、SecA、SecY、SecE の 3 因子のみで機能する (図 1)。そこで OY より、それらの遺伝子のクローニングを試みた。OY より抽出したゲノム DNA よりゲノミックライブラリを作製し、すでに知られている遺伝子構成上の特徴を利用して目的のクローンを選抜し、それらをシーケンスすることにより、*secA* 遺伝子を含む 5506 bp の DNA 断片、*secY* 遺伝子を含む 2200 bp の DNA 断片、*secE* 遺伝子を含む 2374 bp の DNA 断片をそれぞれ得た。

その発現を調べるため、SecA タンパク質の一部を大腸菌で大量発現させ、精製タンパク質試料を用いて抗 SecA ポリクローナル抗体を作出した。その抗体を用いて、健全または OY 感染植物由来の抽出タンパク質に対してウェスタンブロット解析を行ったところ、感染植物に特異的に、SecA タンパク質の配列から予想される分子量と一致する 96 kDa のバンドが確認された。このことから、感染植物組織内で OY の SecA タンパク質が発現していると考えられた。以上の結果、ファイトプラズマに Sec system が存在することが強く示唆された (図 1)。

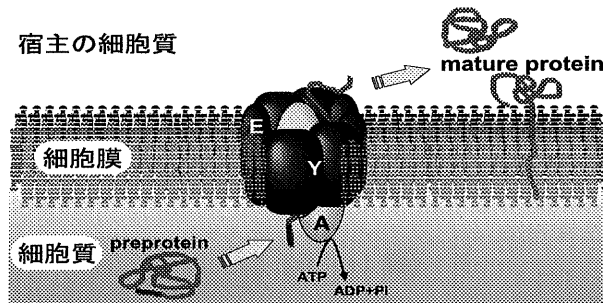


図 1. ファイトプラズマにおける Sec system の模式図。大腸菌等における研究より、この 3 因子のみが分泌系に必須な因子であることがわかっている。

## 2. Immunodominant membrane protein 遺伝子のクローニングと Sec system による輸送

次いで、Sec system によって輸送されるタンパク質の候補を調べた。既報のファイトプラズマのタンパク質から、他の細菌の Sec system に認識されるシグナル配列を持つものを検索したところ、aster yellows ファイトプラズマ (AY) の immunodominant membrane protein (IDP) の N 末端にそれと思われる配列を見出した。IDP はファイトプラズマに特有の機能未知の膜タンパク質であり、菌体表面に多量に存在することから重要な機能を持つと考えられ、ファイトプラズマ研究における焦点の 1 つとなっている。これまで数種のファイトプラズマより IDP 遺伝子がクローニングされているが、その詳細な解析は全く行われていなかった。そこで、IDP が Sec system を介して輸送されている可能性を考え、OY より IDP 遺伝子を含む 2364 bp の DNA 断片をクローニングした。OY の IDP は、その N 末端と C 末端に膜貫通領域を 1 つずつ持ち、膜タンパク質であると推定された。またその N 末端には、AY の IDP と同じく Sec system のシグナル配列と思われる配列が認められた (図 2)。

次に IDP を大腸菌で大量発現し、抗 IDP ポリクローナル抗体を作出した。IDP を発現させた大腸菌内で IDP が Sec system によって輸送されているならば、シグナル配列の切断された IDP が内膜と外膜の間であるペリプラズムに蓄積していると予想されるため、IDP 発現大腸菌を細胞質画分とペリプラズム画分とに分画し、抗 IDP 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、予想通りシグナル配列の切断された IDP がペリプラズム画分に局在していたことから、IDP は大腸菌の Sec system によって輸送され、輸送に伴いそのシグナル配列が切断されると考えられた (図 3)。

また作製した抗 IDP 抗体を用いて、健全または OY 感染植物由来の抽出タンパク質に対してウェスタンブロット解析を行ったところ、感染植物に特異的にバンドが確認された (図 4)。その分子量はシグナル配列の切断された IDP の推定分子量と一致したため、感染植物に存在する IDP、すなわちファイトプラズマが発現している IDP も、そのシグナル配列が切断されていると推定された。ファイトプラズマに Sec system が存在することと併せて考えると、IDP はファイトプラズマの Sec system によって細胞表面に輸送されている可能性が高い。以上の結果は、IDP のシグナル配列が大腸菌とファイトプラズマ双方の Sec system によって認識され得ること、さらには、両 Sec system によって認識されるシグナル配列に共通性があることを示唆する。

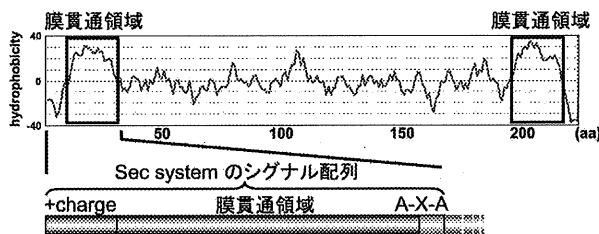


図 2. IDP の hydropathy profile と、膜貫通領域および Sec system のシグナル配列の推定。Sec system のシグナル配列は、+ charge、膜貫通領域、切断配列 Ala-X-Ala という 3 つのモチーフより成る。

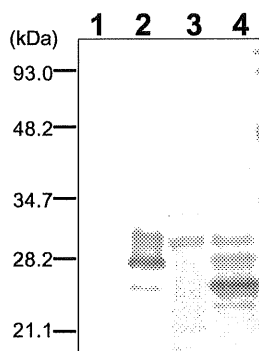


図 3 抗 IDP 抗体を用いたウェスタンブロットティング。1, 3: vector のみを導入した大腸菌、2, 4: IDP 発現大腸菌、1, 2: 細胞質画分、3, 4: ペリプラズム画分。シグナル配列を持つ、または持たない IDP の位置を黒と白の矢頭でそれぞれ示した。

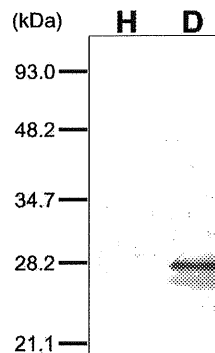


図 4. 抗 IDP 抗体を用いたウェスタンブロットティング。H: 健全植物、D: OY 感染植物由来タンパク質。黒および白の矢頭は、図 3. と同様。

### 3. Immunodominant membrane protein に認められた適応進化

OY と AY 由来の IDP 遺伝子の塩基配列を比較したところ、サイレントな変異頻度 (synonymous substitution rates:  $d_s$ ) よりもアミノ酸置換を伴う変異頻度 (nonsynonymous substitution rates:  $d_n$ ) がより高かった。一般に、アミノ酸置換変異はタンパク質の機能に影響を及ぼす可能性が高く、またサイレント変異は多くの場合中立であるため、通常の遺伝子ではサイレント変異頻度のほうが多い。ある遺伝子においてアミノ酸置換変異のほうが多いのは、そのアミノ酸置換によって適応度が上昇する場合、すなわち適応進化 (正の選択) が起こっている特殊な場合である。そこで、IDP に適応進化が起こっているかどうかを検証するため、互いに近縁な 6 種類のファイトプラズマ (OY、OY-M、OY-NIM、MD、PaWB、AYBG) より IDP 遺伝子および隣接する数遺伝子をクローニングし、既報の AY の遺伝子と共にそれらの  $d_s$  と  $d_n$  とを比較した。この手法は  $d_n / d_s < 1$

は負の淘汰、 $d_N/d_S=1$  は中立、 $d_N/d_S>1$  は適応進化をそれぞれ示すという理論に従っている。比較には、遺伝子全長の平均で  $d_N/d_S$  を計算する手法 (Nei-Gojobori method) と、コドン毎に  $d_N/d_S$  を計算する最尤法による手法を用い、それぞれ MEGA または PAML プログラムを使用した。その結果、どちらの手法によっても *IDP* 遺伝子のみ  $d_N/d_S$  が 1 を大きく超え、隣接する遺伝子の  $d_N/d_S$  は全て 1 未満になったことから、*IDP* 遺伝子に特異的に明確な適応進化が認められた (表 1)。また、最尤法による解析の結果、正の選択を受けていると推定されたアミノ酸サイトは *IDP* の中央領域、つまり宿主の細胞質側へと露出している領域に多く認められたことから、*IDP* 遺伝子にかかる正の選択圧は宿主との相互作用によって引き起こされている可能性が示唆された。さらに、ファイトプラズマの宿主範囲と生活環を考慮に入れると、*IDP* 遺伝子にかかる選択圧は植物宿主よりは昆虫宿主との相互作用による可能性が示唆された。以上の結果は、昆虫-ファイトプラズマ間における相互作用において、*IDP* が非常に重要な役割を担っている可能性を強く示唆する。

	OY-M	OY-NIM	AY	PaWB	MD	AYBG
OY	2.25	2.25	2.89	3.26	3.08	2.24
OY-M		-	-	6.20	3.66	-
OY-NIM			-	6.20	3.66	-
AY				6.52	3.58	-
PaWB					3.37	6.51
MD						3.87

表 1. *IDP* 遺伝子全長の平均で計算した  $d_N/d_S$ 。ハイフンは、 $d_S$  がゼロであったため計算できないことを示している。

## 結論

ファイトプラズマよりタンパク質膜輸送系である Sec system の構成因子の遺伝子をクローニングし、その発現を調べ、ファイトプラズマにおける Sec system の存在を示した。ファイトプラズマより機能の推定できる膜タンパク質の遺伝子が単離されたのは初めてである。また、その基質の候補として、ファイトプラズマ菌体表面に多量に存在する *IDP* 遺伝子を単離し、*IDP* が大腸菌およびファイトプラズマの Sec system により輸送されることを示唆した。これは、大腸菌とファイトプラズマの Sec system に認識されるシグナル配列に共通性があり、既存のシグナル配列推定プログラムを用いることによりファイトプラズマの分泌タンパク質の網羅的探索が可能であることを示唆する。ファイトプラズマに近縁な枯草菌においては、種々のタンパク質分解酵素、植物の細胞壁を消化する酵素などが Sec system を介して分泌されている。ファイトプラズマにおいてもこのようなタンパク質が輸送されているならば、その病原性に関与している可能性があり、さらなる解析が期待される。さらに、*IDP* に強い正の選択圧がかかっていることを見出し、その選択圧が昆虫宿主との相互作用によって引き起こされている可能性を提唱した。このことは、*IDP* がファイトプラズマにとって非常に重要な機能を担っている可能性を強く示唆しており、その解明が期待される。本研究により、これまで全く未知であったファイトプラズマの膜タンパク質における新知見を得ることができ、宿主-ファイトプラズマ間の相互作用やその病原性の解明への道を開く基礎的知見を得ることができた。