

論文内容の要旨

論文題目

OY ファイトプラズマの主要抗原膜タンパク質と相互作用する 宿主昆虫タンパク質に関する研究

氏名 鈴木 志穂

序論

マラリアやスピロヘータ、リケッチア、それにファイトプラズマなど、昆虫により媒介され動植物に感染する病原微生物は、系統学的に離れた宿主に交互に感染し、それらの細胞内で増殖する。これらの病原微生物は、特定の昆虫により媒介されるという特異性を持っており、それが病気の伝搬力や被害の大きさを左右する。しかし、特異性を生み出す分子機構はその多くが不明である。この特異性のメカニズムを解明することは、病原体の拡散を阻止する防除法の確立につながり、その意義は大きい。

ファイトプラズマは、主にヨコバイにより伝搬され、700種以上の植物に感染して黄化・萎縮・叢生・枯死等の特徴的な症状を引き起こし、農業生産上甚大な被害を引き起こす植物病原細菌の一群である。ファイトプラズマは植物においては広い宿主範囲を有する一方で、その系統によりそれぞれ特異的な媒介昆虫を有する(Table.1.)。この昆虫宿主域を決定するメカニズムについて興味を持たれるものの、培養が困難なうえに、感染植物の篩部組織に局在することから、菌体蓄積量が少ないため分子生物学的な研究は遅れており、宿主との相互作用に関する知見はほとんど得られていない。本研究は、ファイトプラズマの昆虫宿主決定機構を明らかにすることを目的とした。

1. OY ファイトプラズマの主要抗原膜タンパク質(IDP)と相互作用する宿主因子の探索

動物病原細菌の多くでは、菌体表面の膜タンパク質が感染の過程で重要な機能を担っており、宿主細胞への侵入や細胞内移行に必要不可欠であることが知られている。一方、ファイトプラズマの菌体表面は、主要抗原膜タンパク質(immunodominant membrane protein: IDP)が大半を占めていると推定されている。IDP はファイトプラズマの菌体表面に露出している機能未知の膜タンパク質であり、幾つかのファイトプラズマで報告されているが、そのアミノ酸配列は系統間で多様性に富んでいる。

本研究では、*Candidatus Phytoplasma asteris*, OY strain (OY)のIDPを、大腸菌内で発現・

精製し、カラム樹脂に結合させて IDP アフィニティーカラムを作製した。IDP と相互作用する昆虫側・植物側の宿主因子を分離するために、ヒメフタテンヨコバイ(OY の代表的な媒介昆虫)・シュンギク・シロイヌナズナより分離した可溶性タンパク質画分を IDP アフィニティーカラムに通し、カラムに結合する宿主タンパク質を分離した。その結果、植物宿主から分離されたタンパク質は全て非特異的なカラム結合タンパク質であった一方、昆虫宿主からは、3 つのタンパク質 (P30, P42, P200) が IDP アフィニティーカラム特異的に検出され、IDP の昆虫特異的な相互作用が示された (Fig. 1.)。これら 3 つの昆虫宿主タンパク質は、MALDI-TOF MS を用いた peptide mass fingerprinting、ペプチドシーケンス、ウェスタンブロット解析により、それぞれ P30 は myosin light chain (MLC), P42 はアクチン, P200 は myosin heavy chain (MHC) と同定された。また、IDP を用いたファーウェスタンブロット解析を行ったところ、MLC 特異的バンドが観察されたことから、IDP は MLC に直接結合し、アクチン/MHC と複合体を形成していることが示唆された (Fig. 2.)。

そこで、ファイトプラズマ感染昆虫細胞内に存在する IDP-ミオシン-アクチン (IMA) 複合体を検出する目的で、OY 感染ヒメフタテンヨコバイより分離した可溶性全タンパク質画分を抗 IDP 抗体アフィニティーカラムに通し、カラムに結合したタンパク質を SDS-PAGE にて分離し、抗アクチン抗体を用いたウェスタンブロットングにより検出した。その結果、OY 感染昆虫サンプルに特異的に、非感染昆虫には認められないアクチンが検出されたことから (Fig. 3.)、昆虫細胞内において IMA 複合体形成が起こっていることが示唆された。

以上の結果より、ファイトプラズマ菌体表面を覆う IDP は宿主昆虫のミオシンと結合することが明らかになった。ミオシンは、真核細胞内のオルガネラや分泌小胞等に結合し、アクチンフィラメント上を滑り運動してこれらを輸送するモータータンパク質であることが知られている。これまでクラミジア、赤痢菌等の病原細菌がヒト細胞に感染後、微小管やアクチンフィラメントに沿って移動することが知られており、これらの細菌の細胞内移行にモータータンパク質の関与が示唆されている。同様にファイトプラズマが昆虫宿主細胞内を移行するために、ミオシンモータータンパク質を利用している可能性が予想され、宿主のオルガネラ輸送システムをファイトプラズマが巧妙に利用している可能性が考察された。

2. IMA 複合体形成能とファイトプラズマ昆虫宿主特異性

今まで幾つかのファイトプラズマからそれぞれ IDP 遺伝子がクローニングされているが、IDP のアミノ酸配列は周辺領域にコードされる遺伝子と比較して、ファイトプラズマ系統間での配列多様性が認められる。従って、ファイトプラズマの系統ごとに異なる昆虫宿主範囲に、IDP が関与している可能性が推測された。ここでは、IMA 複合体とファイトプラズマの昆虫宿主特異性との関連性に焦点をあて、各系統のファイトプラズマの媒介昆虫を材料に、IDP の IMA 複合体形成能について調べた。

OY 媒介ヨコバイ 3 種、非媒介ヨコバイ 2 種のそれぞれより抽出した可溶性タンパク質を、IDP アフィニティーカラムに通し、カラムに結合したタンパク質画分に対し抗アクチン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、OY 媒介ヨコバイからはアクチン特異的バンドが検出され、IMA 複合体が形成されることが強く示唆された。一方、OY 非媒介性ヨコバイにおいては、同様なバンドは全く検出されず、IMA 複合体の形成は認められなかった (Fig. 4.)。以上の結果、IDP は媒介昆虫のミオシンモータータンパク質と特異的に結合するものと判断され、これがファイトプラズマの昆虫宿主特異性に関与しているものと考えられた。

3. IDP と宿主ミオシンモータータンパク質の結合に関与する要因の解析

IDP と昆虫宿主のミオシンモータータンパク質の間の結合が、OY 媒介昆虫特異的に認められたことから、ファイトプラズマの昆虫媒介能の決定に関与していることが示唆された。そこで、

ヨコバイのミオシンモータータンパク質と IDP の結合の可否を決定する要因を調べた。一般にタンパク質間の結合能に影響する要因には、タンパク質の立体構造や結合部位のアミノ酸の親和性のほか、タンパク質の翻訳後修飾(糖鎖、脂質等)による親和性などがある。病原と宿主受容体との相互作用が最も詳細に分かっている動物ウイルスでは、多くの場合、宿主受容体は糖鎖であり、インフルエンザウイルスでは宿主タンパク質表面上の糖鎖修飾の違いにより宿主特異性が決定されている。

まず MLC の立体構造や結合部位のアミノ酸による親和性が結合の決定要因となっている可能性を検証するために、ヒメフタテンヨコバイからクローニングした全長 MLC を大腸菌内にて発現・精製し、MLC と IDP の *in vitro* における結合能を、カラムアフィニティークロマトグラフィーにより調べた。その結果、MLC は IDP に対する結合能を示さなかったことから、MLC と IDP の結合にはタンパク質修飾を必要とする可能性が示唆された。そこで次に糖鎖修飾の関与を検証するために、ヨコバイより可溶性タンパク質を抽出したのち、タンパク質には影響を与えずに糖鎖を特異的に酸化変性する目的で、これに過ヨウ素酸化処理を行ない、IDP-昆虫宿主ミオシンモーター間の相互作用を検証した。処理したタンパク質溶液を IDP アフィニティークラムに通し、カラム結合タンパク質を SDS-PAGE、銀染色により検出した。その結果、昆虫宿主 MLC の IDP に対する結合能は、対照の無処理サンプルとは異なり、過ヨウ素酸化処理により失われた。また、結合能は、加えた過ヨウ素酸ナトリウムの濃度依存的に弱くなった。この結果は、IDP-MLC 間相互作用に糖鎖が関与している可能性を示唆するものである。

結論

ファイトプラズマは炭素源の豊富な植物篩部の細胞内という特殊環境に寄生することにより、通常の細胞が生きていくために保持している生合成能の殆どを退行的進化により捨て去った生物であると考えられる。ファイトプラズマは代謝系関連遺伝子のみならず、他の細菌がもつ鞭毛や線毛等の構造を欠き、菌体移行や宿主への接着に関与する因子が見出されていないことから、今まで宿主特異性のメカニズムは不明であった。本研究では、ファイトプラズマの菌体表面を覆う IDP が媒介性の昆虫宿主のミオシンモータータンパク質に特異的に結合することを明らかにし、ファイトプラズマが昆虫宿主細胞内で IMA 複合体を構成してアクチンフィラメント上を輸送される可能性を推定した。このことは、感染細胞内における移行能の有無が昆虫宿主特異性の決定に深く関わっていることを示唆するものである。本研究により、ファイトプラズマの昆虫宿主特異性の決定に関する基盤的な知見を得ることが出来たものと考えられる。

	ヒメフタテンヨコバイ <i>Macrosteles strifrons</i>	キマダラヒロヨコバイ <i>Ophiola flavopicta</i>	ヒシモンヨコバイ <i>Hishimonus sellatus</i>	ヒシモンモドキ <i>Hishimonoides sellatiformis</i>	ツマグロヨコバイ <i>Nephotettix cincticeps</i>
タマネギ萎黄病 ファイトプラズマ (OY)	+	-	+	+	-
クワ萎縮病 ファイトプラズマ	-	-	+	+	-
リンドウてんぐ巢病 ファイトプラズマ	-	+	nt	nt	-
イネ黄萎病 ファイトプラズマ	-	-	-	-	+

+: 媒介能あり。 -: 媒介能なし。 nt: 不明

Table1. 各系統ファイトプラズマの昆虫宿主範囲

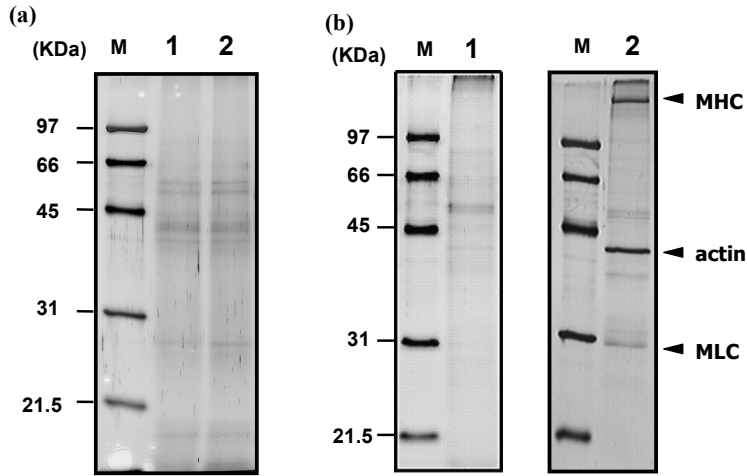


Fig.1. SDS-PAGEの泳動像。
 (a)植物宿主(シロイヌナズナ)から分離したIDP結合タンパク質。
 レーン1:BSAカラム結合タンパク質(コントロール)
 レーン2:IDPカラム結合タンパク質
 (b). 昆虫宿主(ヒメフタテンヨコバイ)から分離したIDP結合タンパク質。
 レーン1:BSAカラム結合タンパク質(コントロール)
 レーン2:IDPカラム結合タンパク質
 M: molecular marker、MHC:myosin heavy chain、
 MLC:myosin light chain

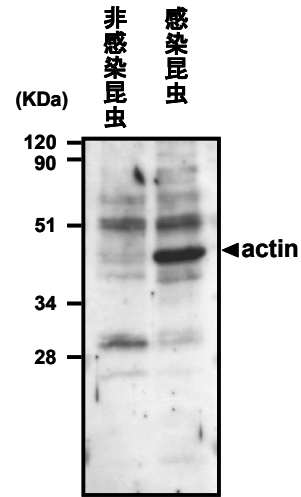


Fig. 3. OY感染・非感染ヒメフタテンヨコバイの粗抽出タンパク質溶液を抗IDP抗体カラムに通し、IDP-ミオシン-アクチン複合体を分離した。分離後の複合体を抗アクチンポリクローナル抗体を用いて検出した。

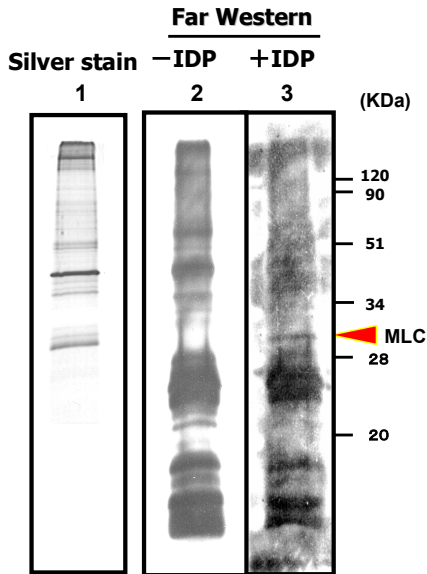


Fig. 2. ファーウエスタンブロット解析により、IDPと直接結合する昆虫宿主タンパク質を特定した。IDPはMLCと特異的に結合している。
 レーン1:ヒメフタテンヨコバイから抽出したIDPアフィニティーカラム結合タンパク質。SDS-PAGE後、銀染色したもの。
 レーン2:ファーウエステンの非特異的シグナルを検出するために、IDPアフィニティーカラム結合タンパク質を転写したPVDFメンブレンを、精製IDPと反応させずに、IDP検出の操作を行った。
 レーン3:IDPアフィニティーカラム結合タンパク質を転写したPVDFメンブレンを精製IDPと反応させた後、IDPを検出した。

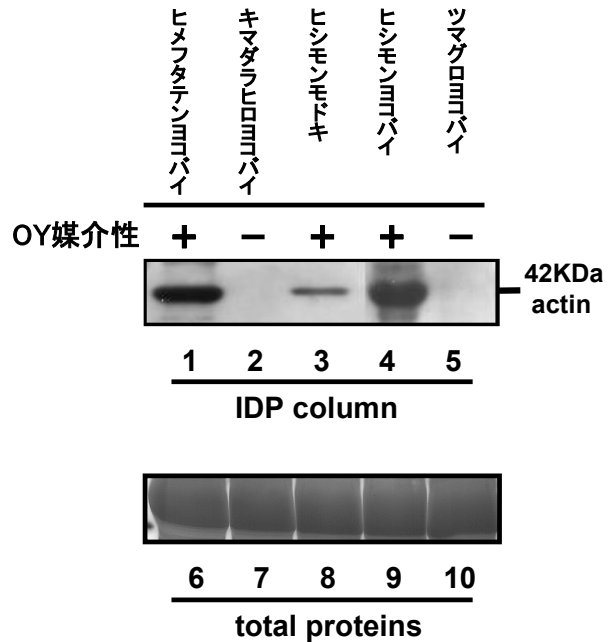


Fig.4. IDPはOY媒介性ヨコバイのミオシンモーターのみと特異的に相互作用する。
 ヒメフタテンヨコバイ(レーン1,6),ヒシモンモドキ(レーン3,8),ヒシモンヨコバイ(レーン4,9)がOY媒介性ヨコバイであり、キマダヒロヨコバイ(lane2,7), ツマグロヨコバイ(lane5,10)がOY非媒介性ヨコバイである。lane6-10がIDPアフィニティーカラムに通す前の各種ヨコバイの可溶性タンパク質画分であり、カラムに通すタンパク質量はほぼ同じであることを示している。lane1-5は各種ヨコバイのタンパク質をIDPアフィニティーカラムに通し、カラム結合タンパク質をアクチン抗体を用いたウエスタンブロット解析により検出したものである。3種のOY媒介性ヨコバイではアクチンが検出される一方、2種のOY非媒介性ヨコバイでは検出されなかった。