

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 20 年度博士課程 進学

氏 名 石井 佳子

指導教員 東京大学大学院教授 難波 成任

論文題目 ファイトプラズマプラスミドのプロモーターに関する分子生物学的研究

プラスミドは、細菌の細胞内で染色体とは独立に複製する因子である。一般にプラスミドは、病原性因子や抗生物質耐性遺伝子など、細菌の生存上重要な遺伝子をコードする 경우가多く知られている。また、染色体と比べ変異が入りやすいことから、多くの細菌はプラスミド上の遺伝子の再編成により、環境の変化に適応していると考えられている。

ファイトプラズマは多様な植物種に病気を引き起こす、農業生産上重要な植物病原細菌である。ファイトプラズマは植物体内では篩部組織に局在し、ヨコバイなどの吸汁性昆虫によって、植物から植物へと伝搬される。一般に昆虫媒介性細菌では、そのプラスミド上に昆虫伝搬能関連遺伝子をコードする例が多く知られている。ファイトプラズマにおいても、**clover phyllody** ファイトプラズマの昆虫伝搬能喪失株が持つプラスミドにおいて、極度の配列再編成が起こっていることから、プラスミドにコードされる遺伝子と昆虫伝搬能との関連性が指摘されている。

当研究室では、タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma asteris*, OY strain) の弱毒株 (OY-M) および、OY-M 感染植物を組織培養することによって単離された昆虫伝搬能喪失株 (OY-NIM) を維持している。OY ファイトプラズマは 2 種類のプラスミドを保持しており、1 つはウイルスの複製酵素と相同な複製酵

素 (RepEC) をコードするプラスミド EcOY-DNA であり、もう一つは細菌のプラスミドの複製酵素と相同な複製酵素 (RepBP) を持つプラスミド pOY-plasmid である。OY-M および OY-NIM は共に、EcOY-DNA (EcOYM、EcOYNIM) と pOY-plasmid (pOYM、pOYNIM) をそれぞれ 1 種類ずつ保持している。OY-NIM が持つプラスミドである pOYNIM は、pOYM にコードされる機能未知の膜タンパク質 ORF3 を欠失している。従って ORF3 は、昆虫伝搬能に関与する可能性が推測されていた。しかしその後 EcOYNIM の配列が決定され、*orf3* 遺伝子が EcOYNIM にコードされていることが明らかとなったため、ORF3 の昆虫伝搬能への関与は疑わしいものとなっていた。

本研究では、ORF3 の昆虫伝搬能への関与を解析するために、植物および昆虫内における ORF3 タンパク質の発現解析、*orf3* 遺伝子の転写開始点の特定および OY-M や OY-NIM の EcOY-DNA におけるプロモーター領域の比較解析を行った。また、OY ファイトプラズマのプラスミドに宿主環境の変化が与える影響について解析するため、約 10 年間に渡って維持した OY-NIM のプラスミド配列を OY-M のプラスミドと比較解析した。

1. 植物および昆虫宿主内における ORF3 のタンパク質の発現解析

植物宿主内における ORF3 のタンパク質の発現を確認するため、ORF3 タンパク質を大腸菌において大量発現させ、抗 ORF3 抗体を作出した。この抗体を用いて OY-M および OY-NIM 感染植物の免疫組織化学的染色を行った。その結果、OY-M 感染植物ではファイトプラズマが局在する篩部組織特異的にシグナルが観察されたが、OY-NIM 感染植物では全くシグナルが観察されなかった。従って OY-NIM は、そのプラスミドである EcOYNIM に *orf3* をコードしているにも関わらず、植物宿主内で ORF3 タンパク質を発現していないことが示唆された。

また、植物および昆虫宿主内における ORF3 のタンパク質の発現を比較するため、抗 ORF3 抗体を用いて OY-M 感染植物および感染昆虫の免疫組織化学的染色を行った。その結果、昆虫宿主においては 1 $\mu\text{g/ml}$ の ORF3 抗体を反応させた場合でも強いシグナルが認められたが、植物宿主においては 100 $\mu\text{g/ml}$ の ORF3 抗体を反応させないとシグナルは確認できなかった。この結果は、昆虫宿主内では ORF3 タンパク質の発現量が増加している可能性を示唆しており、ORF3 は昆虫宿主内で重要な役割を担っていると考えられた。

2. *orf3* 遺伝子の転写開始点の特定

OY-NIM は植物宿主内において ORF3 タンパク質を発現していないことから、*orf3* は転写発現していない可能性が考えられた。そこで *orf3* 遺伝子の転写開始点を決定し、その上流を OY-M と OY-NIM で比較した。*orf3* 遺伝子の転写開始点を特定するため、OY-M 感染昆虫から抽出した RNA を用いて 5'-RACE を行った。5'-RACE では、逆転写した反応産物の 5'末端にアダプター配列を付加させ、アダプターのプライマーと遺伝子特異的プライマーを用いて initial PCR および nested PCR を行った。得られた増幅産物は、TA クローニングとシーケンスを行い配列の決定を試みた。

orf3 は、*orf1-orf2* の下流にコードされている。5'-RACE の結果、*orf1* の内部から始まる増幅産物に加え、*orf1* と *orf2* の遺伝子間領域から始まる増幅産物が得られた。この結果は OY-M では *orf3* 遺伝子の転写が、*orf1* の内部および *orf1* と *orf2* の遺伝子間領域の 2 ヶ所から開始していることを示唆している。

3. *orf3* 遺伝子のプロモーターの推定と比較解析

EcOYM における *orf3* 遺伝子の転写開始点上流のプロモーター配列を、プロモーター予測ソフトウェアによって探索したところ、それぞれプロモーター配列が予測された。これら 2 つのプロモーターを、それぞれ ORF3-pro1 および ORF3-pro2 と命名した。EcOYM の ORF3-pro1 と ORF3-pro2 に該当する EcOYNIM 上の配列を調べたところ、ORF3-pro1 では配列が 2 塩基変異しており、ORF3-pro2 においてはプロモーター領域全長を含む 157 bp の領域が欠落していた。これらの結果から、OY-NIM では *orf3* のプロモーターが変異および欠落し、そのために OY-NIM は *orf3* を発現できなくなった可能性が考えられた。

4. 1998-2006 年における OY-M と OY-NIM プラスミドの比較解析

OY-M は植物と昆虫を用いて維持している一方で、OY-NIM は植物内でのみ維持しているため、両者は宿主環境が大きく異なる。加えて、OY-NIM は短期間で OY-M から単離されたことから、OY-NIM のプラスミド配列は単離後から現在までの間に、更に配列が変化していると推測された。そこで、約 10 年間に渡る OY-M および OY-NIM プラスミドの比較解析を行い、ファイトプラズマが一定の環境に生息・適応することによるプラスミドへの影響を解析した。まず、2006 年の OY-M 感染植物および 1998-2000、2002-2006 年までの OY-NIM 感染植物から DNA を抽出し、その DNA を用いて *orf3* の PCR 解析を行った。その結果、OY-M 感染植物と 1998-2000 年の OY-NIM 感染植物では *orf3* のバンドが検出されたが、2002-2006

年の OY-NIM 感染植物では検出されなかった。従って、*orf3* プロモーターが変異および欠落した EcOYNIM は、2000 年以降 *orf3* 遺伝子も欠失したことが明らかとなった。同様に、各 DNA を用いてプラスミドの複製酵素 *repEC* の PCR および Southern blotting 解析を行ったところ、OY-M 感染植物と 1998-2005 年の OY-NIM 感染植物ではバンドが検出されたが、2006 年の OY-NIM 感染植物では検出されなかった。プラスミドは染色体とは独立して複製するため、複製酵素の存在は必須であると考えられる。また、現在までに報告されているファイトプラズマのプラスミドには、複製に関与する遺伝子が必ずコードされている。2006 年の OY-NIM 感染植物では *repEC* が検出されないことから、EcOYNIM は 2005 年から 2006 年の間に OY-NIM から消失したと考えられた。以上の結果より、EcOYNIM は植物による継代・維持で配列が段階的に失われ、遂にはプラスミド自体が OY-NIM から消失したことが明らかとなった。一方で、もう一つのプラスミド pOYNIM にコードされる複製酵素 *repBP* の PCR および Southern blotting 解析では、全ての感染植物でバンドが検出されたことから、pOYNIM は OY-NIM で保持され続けていることが明らかとなった。

本研究の結果、OY-NIM のプラスミドは植物内という一定の宿主環境における維持により、段階的に配列が欠失していることが明らかとなった、この結果は、*orf3* を含め OY プラスミドにコードされる遺伝子が、植物内での生存に必須ではないことを示しており、OY プラスミドと昆虫伝搬能との関連性が強く示唆された。また、OY プラスミドの可塑性が強く示唆され、ファイトプラズマの多様性を理解するために、近縁な系統間におけるプラスミドの比較が重要であることを示唆した。今後、プラスミドにコードされる遺伝子とファイトプラズマの昆虫伝搬メカニズムとの関連性について、更に解析が進むことが期待される。