

ファイトプラズマのrecA遺伝子の偽遺伝子化に関する研究

HAGIWARA, Yuri / 萩原, 悠理

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022117>

ファイトプラズマの *recA* 遺伝子の偽遺伝子化に関する研究

STUDY ON THE GENERATION OF A PSEUDOGENE OF *recA* IN THE PHYTOPLASMA GENOME

萩原悠理

Yuri HAGIWARA

指導教員 大島研郎

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

Phytoplasma is a phytopathogenic bacterium that causes characteristic symptoms such as phyllody and proliferation in the infected plants. Phytoplasma loses many genes from the genome in the process of its evolution. As a result of sequencing full length *recA* genes from multiple phytoplasma lineage, I found that the processes of the generation of a pseudogene were different among phytoplasma strains. Although *recA* genes from several phytoplasma strains encoded a full length of the RecA protein, their gene products exhibited no recombinase activity in *E. coli*.

Key Words : phytoplasma, *recA*, pseudogene

1. 緒言

ファイトプラズマは植物に黄化や葉化、叢生などを引き起こす植物病原細菌である。ファイトプラズマは F₁F₀-ATP 合成酵素の遺伝子群を持たないなど顕著に退行的進化を遂げた生物であり(1), 遺伝子を喪失するプロセスに興味を持たれている。

Candidatus Phytoplasma asteris の 1 系統である OY-M では、DNA の修復や相同組み換えに関与する *recA* 遺伝子の内部に終止コドンになる変異が 2 ヶ所生じており、遺伝子として機能しない偽遺伝子になっている(2)。また、他の系統である AY-WB では *recA* がゲノムから喪失している。

このように *recA* は遺伝子喪失の途上にある遺伝子であり、退行的進化を探る上での標的として適していると考えられる。本研究では複数のファイトプラズマ系統の *recA* 全長配列を解読し、比較解析することで退行的進化の一端を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 配列の決定・アラインメント

OY-M および近縁種の *recA* 塩基配列を元に *recA* を増幅するためのプライマーを設計した。各ファイトプラズマ感染植物から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、*recA* を増幅した。増幅産物を DNA シーケンサーで解析することにより各ファイトプラズマの *recA* の塩基配列を決定した。MEGA ver.7 を用いてこれらの配列のアラインメントを行い、系統樹を作成した。相同性の計算には Genedoc を用いた。

(2) RecA の活性試験(*in vivo*)

Ca. P. asteris MD 系統および *Ca. P. aurantifolia* WBDL 系統の *recA* について *Escherichia coli* 用にコドンを変更した人工合成遺伝子を作製し、pGEM-T Easy Vector Systems(プロメガ製)を用いて発現用プラスミドを作製した。これを *E. coli* の JM109株(*recA*-)および JM101株(*recA*+)に導入し、IPTG を添加した培地で発現誘導を行った。*recA* が働くとプラスミドが組換えを起こして多量体を形成するためラダー状のバンドが観察される。それぞれの株からプラスミドを抽出して電気泳動し、バンドパターンを観察することによって RecA 活性を評価した。また、*E. coli* と WBDL の RecA を融合させたキメラタンパク質を作製して、同様の実験を行った(図 1)。

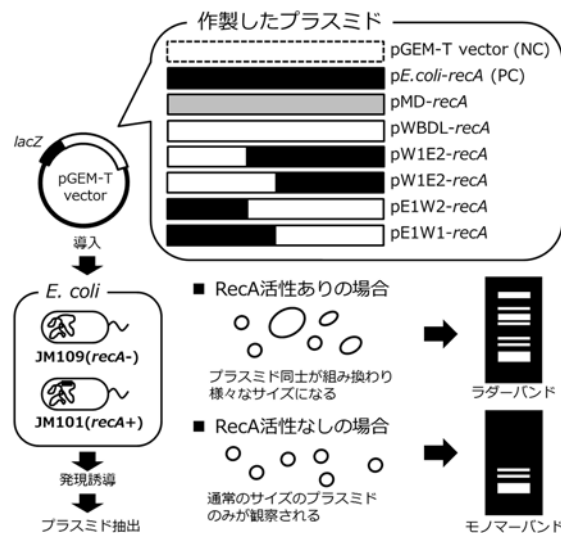


図 1. RecA 活性試験の概要図。

(3) RecA の活性試験(in vitro)

WBDL の人工合成 *recA* 遺伝子を pGEX-4T-1 ベクターに挿入し、Glutathione S-transferase(GST)との融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。 *E. coli* BL21(DE3)株にこのプラスミドを導入し、融合タンパク質を発現誘導した。ソニケーションにより菌体を磨砕し、アフィニティーカラムを用いて融合タンパク質のみを精製した。これについて ATPase 活性試験を行い、RecA の ATPase 活性を測定した。

3. 結果および考察

(1) 各ファイトプラズマの *recA* 配列決定および比較

調査した各ファイトプラズマの *recA* 配列を基に系統樹を作成した結果、16S rRNA に基づいた系統樹とほぼ同型になったが、互いの相同性が 16S rRNA では 87~99%であるのに対し *recA* では 64~98%とやや低い値を示し、*recA* 遺伝子には変異が蓄積しやすい傾向が認められた。

これらの *recA* 配列を解析したところ、 *Ca. P. asteris* OY-M・PaWB・MBS・OY-W・AY-WB 系統・ *Ca. P. australiense* CPA 系統、 *Ca. P. pruni* PoiBI 系統では *recA* が偽遺伝子化していた(図 2)。

PaWB は 419 番目周辺に 1 塩基の T の挿入があり、このフレームシフトにより 430~432 番目の塩基が終止コドン(TGA)化していた。さらに、971 番目付近に 1 塩基の A の挿入があった。MBS は 31 番目の塩基置換(G→T)による終止コドン(TAA)があった。OY-W は 82 番目の塩基の塩基置換(C→T)による終止コドン(TAA)に加え、533~551 番目の計 19 塩基の欠失とそのフレームシフトによる 604~606 番目の塩基の終止コドン(TAA)化があった。AY-WB は両端の約 100 bp のみ *recA* と高い相同性を示す領域が存在し、その中で 31 番目の塩基置換(G→T)による終止コドン(TAA)、53 番目付近に 1 塩基の A の欠失、535 番目付近に 1 塩基の A の挿入とフレームシフトによる 594~596 番目の終止コドン(TAA)化があった。中間の配列のみで相同性検索を行ったところ、トランスポゼースの一部と 84%の相同性を示した。CPA は開始コドンが変異していたほか 5ヶ所の塩基挿入または欠失があり、置換およびフレームシフトにより 76~78 番目、333~335 番目、625~627 番目の塩基が終止コドン(TAA)化していた。PoiBI は 1002 番目に 1 塩基の T の挿入があり、フレームシフトにより 1030~1032 番目の塩基が終止コドン(TAA)化していた。

MD, WBDL, *Ca. P. japonicum* JHP 系統については *E. coli* の *recA* とほぼ同じ塩基長の遺伝子がコードされており、偽遺伝子化していない可能性が考えられた。

本研究により、同じ *Ca. P. asteris* 種であっても、*recA* 全長がコードされている系統や、*recA* が偽遺伝子化した系統が存在することが示唆された。また、偽遺伝子化に関わる変異に共通性は少なく、系統ごとに多様であった。これらの結果から、*recA* はファイトプラズマの共通祖先の段階で偽遺伝子化したのではなく、現在のように系統が細分化した後それぞれに変異が生じたかと推測された(図 3)。

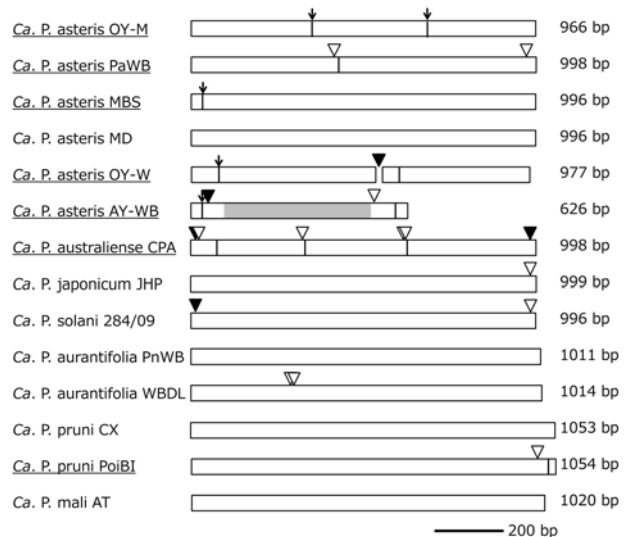


図 2. 各ファイトプラズマの *recA* における変異箇所. 下線は *recA* が偽遺伝子化している系統. | : 終止コドン(↓ : 塩基置換, 無印 : フレームシフト), ▽ : 塩基挿入, ▼ : 塩基欠失をそれぞれ示している. 灰色はトランスポゼースの一部をコードする領域.

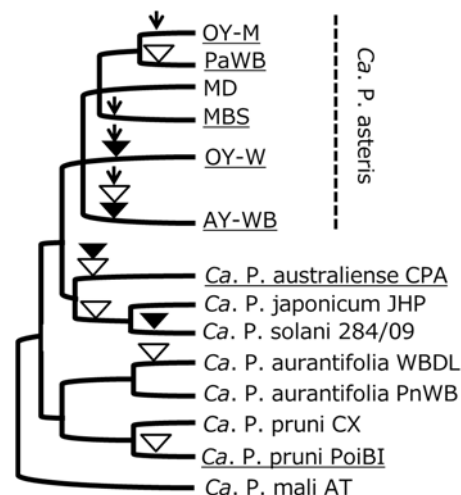


図 3. 調査したファイトプラズマの系統樹に基づいた *recA* の変異概要. 下線は *recA* が偽遺伝子化している系統. ↓ : 塩基置換による終止コドン, ▽ : 塩基挿入, ▼ : 塩基欠失をそれぞれ示している.

(2) RecA の活性試験

pE. coli-recA を持つ大腸菌からプラスミドを抽出し、電気泳動を行った結果、組換えによって生じたラダー状のバンドが観察された。一方、*pMD-recA* や *pWBDL-recA* ではどちらの場合にもラダー状のバンドは見られなかった。また、*E. coli* と WBDL のキメラタンパク質を発現するプラスミドを用いた場合も同様の結果であった(図 4)。

RecA 活性試験では、MD および WBDL のいずれのファイトプラズマにおいても RecA 活性は認められなかった。このことから、MD および WBDL の *recA* は、見かけ上は完全長のタンパク質をコードしているものの、*recA* としての機能は失われている可能性が示唆された。

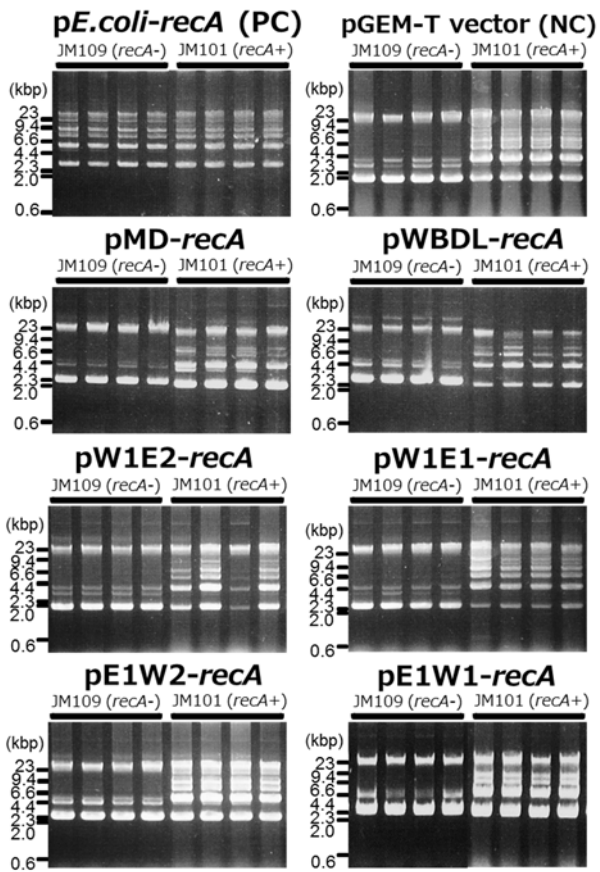


図 4. 各 *recA* 遺伝子が挿入された pGEM-T ベクターを持つ大腸菌から抽出したプラスミドの電気泳動像.

4. 謝辞および成果の公表

本研究を行うにあたり、ご指導・ご援助いただいた東京大学 難波成任先生、前島健作先生、並びに法政大学 植物医学専修の皆様にご心より御礼申し上げます。なお、本研究における主要成果は日本植物病理学会大会(平成 29 年度)において報告しました。

参考文献

- 1) Oshima et al. (2013). *Front Microbiol.* 4: 230.
- 2) Oshima et al. (2004). *Nat Genet*, 36, 27-29.