

植物マイコプラズマのゲノム構造・機能解析による 宿主の切替えと病原性の研究

●宮田 伸一

(独)農業・生物系特定産業技術研究機構・果樹研究所・生産環境部

＜研究の目的と進め方＞

植物マイコプラズマは国内外で農業上甚大な被害を与えている重要植物病原細菌である。植物の花組織や茎頂組織の形態形成に影響を及ぼす（葉化症状、叢生症状、つきぬけしょうじょうなど）(図1)ことや植物及び昆虫を宿主とする（植物節部局在性であり、節管液吸汁により半翅目昆虫に感染し媒介される）など、生物学上興味深い特徴も持っている(図2)。1968年に電子顕微鏡観察によってその病原微生物が細菌の一種であるマイコプラズマ様微生物である(MLO)ことが明らかにされたが、今日にいたるまで人工培養が成功しておらず、その生物学的性状ならびに病害発生機構の解明は非常に立ち遅れている。そこで本研究では、植物マイコプラズマのゲノム構造の全容を世界に先駆けて解明することで、その病理の分子機構に関する基盤的知見を得ることを目的としている。これは細胞内寄生性の植物病原細菌として初のゲノム解析であり、機能ネットワークを網羅的に解析することによって、これまで不明であった病原機能などを解明する端緒となることが期待される。

まず、植物マイコプラズマゲノムの全体像の把握を目指し、一次構造の解明に着手する。そのために我が国で発生している植物マイコプラズマの系統の中からモデル系統を選別する。また本病原細菌は植物節部組織に局在するため、節部組織の発達した代替宿主を用いて大量増殖系を確立する。これらの材料よりゲノムDNAを大量精製し、ファージライブラリーの構築に着手し、品質の検証を進め、改良を進める。また、一部クローンの解析によってゲノムの主要な構造と遺伝子の機能推定を進めるとともに、塩基配列情報の蓄積および解析によって、ゲノムの主要な構造と遺伝子の機能推定を進める。

＜研究開始時の研究計画＞

2000年度に本研究課題を開始した時には、すでに我が国において植物マイコプラズマ病の発生がよく知られており、代替宿主への接木接種ならびに虫媒接種による各系統の維持が行われ、16S rDNA塩基配列を指標とした系統解析が世界的に進められていた。

そこで本研究課題の遂行にあたり、まず16S rDNAによる系統解析や宿主範囲、媒介昆虫に関する情報を用いて、



図1. 植物マイコプラズマの感染により、花の葉化症状を呈するアジサイ

我が国で発生している植物マイコプラズマ病の系統からゲノム決定に適したモデル系統を選抜する。またそのうち、ニチニチソウやシュンギクなどの節部局在性細菌に適した代替宿主を用いた実験系を選抜し大量増殖系を確立する。

続いて、既報の節部局在性細菌の精製手法を参照し、上記代替宿主系を用いた効率的な細菌画分精製法を検討し、植物マイコプラズマのゲノムDNAの大量調製に取り組み。さらに精製ゲノムDNAを用いて、プラスミドおよびファージベクターによるゲノミックライブラリーの構築を行う。まずプラスミドクローンのランダムシーケンスによる陽性クローンの取得を行い、さらにそれらをプローブとしたファージライブラリーからのスクリーニングを行う。またショットガン法により、ゲノミックライブラリー中の一部のファージクローンDNAインサートの塩基配列を決定する。さらに周辺領域をスクリーニングやlong PCRなどによって取得し、全ゲノム構造の解明に取り組む。

以上の経過によって決定されたゲノム一次配列情報をもとに遺伝子領域の推定を行い、データベース照合によりアノテーションを試みる。アノテーション情報によって植物マイコプラズマゲノムの特徴を明らかにする。

＜研究期間の成果＞

まず、16S rDNA塩基配列による系統解析の結果、最大のグループであるAster yellowsグループ（グループI）に属し、我が国で発生していたタマネギ萎黄病の病原であるonion yellowsファイトプラズマ(OY)をゲノム決定のためのモデル系統の候補とした。さらに代替宿主であるニチニチソウおよびシュンギクを宿主とすることが確認でき、うちシュンギクでは半翅目のヒメフタテンヨコバイによって昆虫伝搬も可能であった。以上の結果をふまえ、OYを代替宿主・シュンギクを用いて虫媒継代によって増殖する実験系の構築を行った。

植物マイコプラズマ画分を精製するため、OY感染シュンギクの茎組織を液体窒素中で1時間以上にわたり破碎

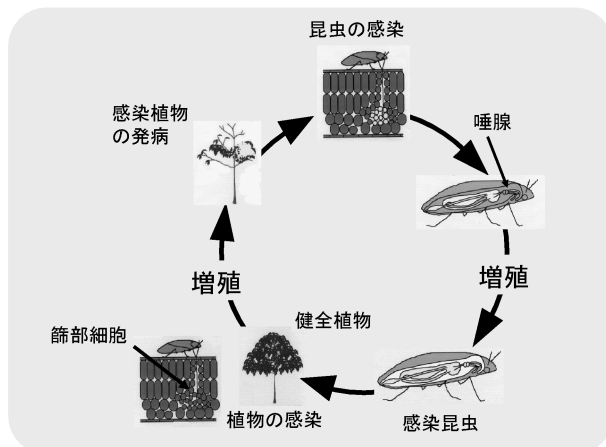


図2. 植物マイコプラズマのライフサイクル

し、分画遠心分離を繰り返した。得られた粗精製画分の全DNAを通常のアガロースゲル電気泳動に供試したところ、10 kbp以下の染色体外DNAの存在が明らかとなったため、それらをクローニングして同定するとともに、野生株OYWならびにその病原性変異株であるOYM、OYNIMにおける染色体外DNAとの構造比較を行った(0304301616, 0304301648, 0304301652)。またこれらにはウイルス型の複製酵素遺伝子とプラスミド型の複製酵素遺伝子を持つものが複数確認されたが、中には両者がキメラ構造をとっているものが確認された。このことから、ファージからプラスミドに進化する過程の名残を残している可能性が示唆された(0304301633)。またウイルス型の複製酵素遺伝子が宿主植物内で発現・翻訳されていることが免疫組織学的手法によって確認された(30304301636)。

さらに粗精製画分をパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)に供試し、約1 Mbpのゲノムを含むDNA画分を回収しSau3AI等の部分的制限酵素処理によってプラスミドライブラリーならびにファージライブラリーを作製した。プラスミドライブラリーからランダムに抽出したクローンの塩基配列を決定し、BLAST検索によるアノテーションを行い陽性クローンを選抜したのち、ファージライブラリーからスクリーニングを行った。得られたファージクローンの塩基配列を決定する中で、ゲノム構造についての多数の知見が得られた。strオペロンやS10-spcオペロンについて、枯草菌と同じモリキューテス綱に属する動物マイコプラズマらと比較したところ、植物マイコプラズマのゲノム構造はむしろ枯草菌に近いことが明らかとなった(0304301642, 0304301645)(図3)。また、2~3コピー存在することが知られていた16S rDNAの周辺配列を完全に同定した。さらにゲノム上に存在する遺伝子群などの構成を他の近縁細菌と比較したところ、必ずしもオペロン構造が保存されてはおらず、opp遺伝子群においてはモリキューテス綱において非常に多様な変異が蓄積されていることが明らかとなった(図4)

また機能遺伝子についての考察も進め、thymidilate kinase (tmk) 遺伝子が複数コードされているがおおよそ2種に分類でき、その一方のみで酵素活性が確認されたことから、植物マイコプラズマのゲノムには、遺伝子の複製による新機能獲得ならびに機能消失といった遺伝子進化の痕跡が見られることが示唆された(404091416)。さらに植物マイコプラズマの細胞内外の物質輸送にかかわるSecシステムの構成遺伝子を大腸菌によって発現させ、そのポリクローナル/モノクローナル抗体を用いてそれらが宿主植物内で発現されていることを確認し、また植物組織内における植物マイコプラズマの局在について調

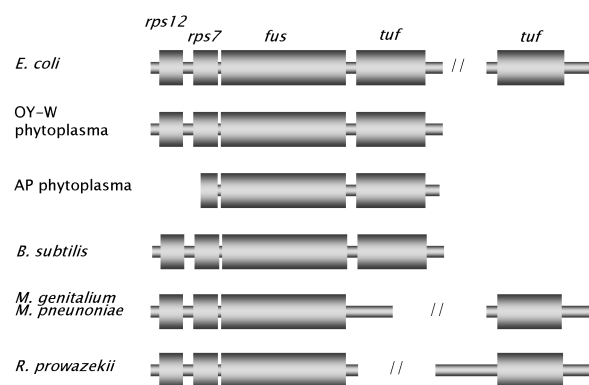


図3. 植物マイコプラズマのstrオペロンの遺伝子構成はマイコプラズマに似ていない

査することが可能となった(0304301640)。

ファージライブラリーからのスクリーニングではコンティグが全ゲノムを網羅できないため、ゲノミックウォーキングに取り組んだ。さらにゲノムのギャップ領域をLong PCRによって取得し、全ゲノム塩基配列の取得に取り組んだ。その結果、OYWゲノムを用いた際にはゲノムの7~8割をカバーするコンティグが作成でき、またOYMゲノムを用いると約860 kbpの全ゲノム構造を明らかにすることができた。これらの全塩基配列情報より遺伝子領域を推定した後、データベース照合による機能遺伝子の推定を行った(0304301655, 404091359)。

遺伝子構成について調べたところ、同じモリキューテス綱細菌であるマイコプラズマよりも少ない代謝系遺伝子しかコードされていないことが判明した。ペントースリン酸回路に関与する遺伝子や、予想外なことにATP合成酵素のサブユニットなど、これまで生命維持に必須と思われていた遺伝子が欠落していた。これは、ファイトプラズマが細胞内という栄養分の豊富な環境下に生息するうちに、退行的なゲノム進化を遂げた結果であると考えられ、生命が生きていくのに必要な「最少遺伝子」を議論する上で重要な知見となる(404091359)。

OYWおよびOYMゲノムの構造比較から、興味深い点がいくつか観察されている。両ゲノム上には解糖系に関わる遺伝子群がまとまってコードされた領域がともに存在するが、OYMゲノムには1コピーしか存在しないのに対し、OYWゲノム上には2コピー存在することが確認された。養分の豊富な篩部に局在する植物マイコプラズマは、代謝系の基質のほとんどを宿主から吸収していると推察されている。このことから、強病原系統のOYWでは解糖系遺伝子群が多く存在することでより基質を宿主植物より吸収することで病原性を発揮しているという可能性が示唆された。

注) 公募研究代表者は、2003年4月より現所属に異動したため、2003年度の本研究成果は前所属の東京大学・新領域創成科学研究科・資源生物創成学分野の難波教授、宇垣助教教授ならびに研究室スタッフの多大な貢献によってなされた。

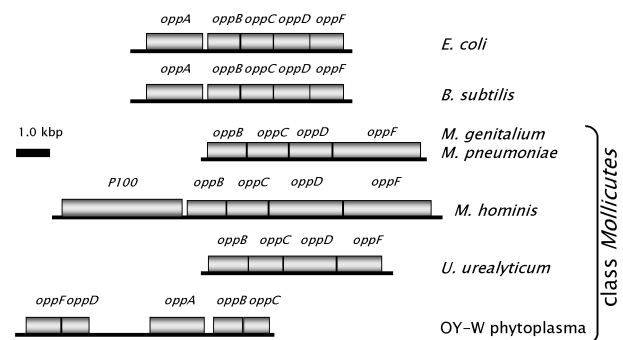


図4. Oligopeptide transport system 遺伝子群の構成は、モリキューテス綱では保存されていない

〈国内外での成果の位置づけ〉

植物マイコプラズマは難培養性であることから、世界的に研究が遅れていた。新病害の報告や16S rDNAを用いた系統解析が主たる研究成果として報告され、その生物学的性状の解明や病原性や宿主との相互作用にかかわる知見は皆無であり、そのためゲノム研究について関心が高まっていたが、まだほとんど着手されていなかった。そのため、染色体外DNAの網羅による病原性変異株官における比較や、生物進化上の新たな知見などは世界的に注目を集め、いくつかの国際雑誌において論文がトピッ

クスとして取り上げられるなど、国内外で大きな反響を得た。さらにゲノム構造の決定にともない、新規遺伝子探索や遺伝子構造の比較等の知見が得られると、それらの成果は非常に興味深く国際学術雑誌に受け入れられた。そして全ゲノム構造決定に関する取り組みはまさに世界初のものとなり、ゲノムの退行的進化に関する知見として世界的に注目され、国内でも新聞各社によって報道された。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

全ゲノム塩基配列の決定により全ORFのアノテーションも行われたが、これまで全ゲノムが解明されている植物病原細菌などで知られている既知の病原遺伝子に相当するものが見あたらなかった。そのため、アノテーション情報に基づき推定される代謝系等から植物マイコプラズマの病原性に関与する因子を特定することは不可能であると考えられた。全ゲノムのクローニングに成功したのは病原性の低下したOYM系統である。強病原性系統のOYWとゲノム構造や遺伝子構成を比較することによって、上記の病原性因子の特定のために非常に興味深い考察が可能であると思われた。しかしOYWゲノムクローンのコンティグを完全につなげることができなかった。その理由として、OYMならびにOYWはじめ、植物マイコプラズマゲノムには非常に多数の反復配列が存在していることが判明し、特にOYWのゲノムサイズはOYMよりも170kbpほど大きいために、ゲノミックウォーキングやスクリーニングによる欠落部位の補充が非常に困難だったのではないかと推察される。

また各遺伝子の機能解析についてはtmk遺伝子やsecA、染色体外DNAのrep遺伝子等が大腸菌によるタンパク質発現系を用いて、活性測定やモノクローナル交代作出に供試された。しかし、転写レベルでの網羅的な発現解析などはサンプル調整の困難さから実験系を開発することはできなかった。

今後の課題

これまで前所属の東京大学・新領域創成科学研究科・資源生物創成学分野では、虫媒継代によって虫媒伝搬能を維持した系統(OYW, OYM)のみならず、罹病植物の接木接種によって継代することにより虫媒伝搬能を失った非虫媒伝搬株(OYNIM)の作出に成功している。植物マイコプラズマの生物学的性状として、昆虫細胞内と植物細胞内の2種類の大きく異なる環境においていずれも生存・増殖することができる。そこでOYNIM系統のゲノム構造の決定の取り組みることにより、OYMならびにOYWのそれと比較することで虫媒伝搬関連遺伝子(群)の特定に大いに貢献できる可能性がある。植物マイコプラズマを含む多くの節部局在性細菌は一度感染すると有効な治療法がないため、農業の現場では罹病植物を完全伐採するしかない。従って媒介昆虫の駆除による予防手段がもっとも効果的となる。虫媒伝搬関連因子の特定により、新たな有効防除法の開発に取り組むことも必要だと考えられる。

研究期間の全成果公表リスト

1 0304301616
Oshima, K., Shiomi, T., Kuboyama, T., Sawayanagi, T., Nishigawa, H., Kakizawa, S., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. *Phytopathology*, 91,

- 1024-1029 (2001)
- 2 0304301633
Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like domains: clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination? *Virology*, 285, 270-277 (2001)
- 3 0304301636
Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T. and Namba, S. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*, 147, 507-513 (2000)
- 4 0304301640
Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *MPMI*, 14, 1043-1050 (2001)
- 5 0304301642
Miyata, S., Furuki, K., Sawayanagi, T., Oshima, K., Kuboyama, T., Tsuchizaki, T., Ugaki, M. and Namba, S. The gene arrangement and sequence of str operon of phytoplasma resemble those of *Bacillus* more than those of *Mycoplasma*. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 62-67 (2002).
- 6 0304301645
Miyata, S., Furuki, K., Oshima, K., Sawayanagi, T., Nishigawa, H., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Ugaki, M. and Namba, S. Complete nucleotide sequence of the S10-spc operon of phytoplasma: gene organization and genetic code resemble those of *Bacillus subtilis*. *DNA and Cell Biol.*, 21, 527-534 (2002)
- 7 0304301648
Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298, 195-201 (2002)
- 8 0304301652
Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148, 1389-1396 (2002)
- 9 0304301655
Oshima, K., Miyata, S., Sawayanagi, T., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Furuki, K., Yanazaki, M., Suzuki, S., Wei, W., Kuboyama, T., Ugaki, M. and Namba, S. (the 1st and 2nd authors contributed equally) Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 225-236 (2002)
- 10 404091359
Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S., Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-

pathogenic phytoplasma., *Nature Genetics*, 36, 27-29 (2004).

11 404091416

Miyata, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Kuboyama, T., Ugaki, M. and Namba, S., Two different thymidylate kinase gene homologues, including one that has catalytic activity, are encoded in the onion yellows phytoplasma genome., *Microbiology*, 149, 2243-2250 (2003)