

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660034

研究課題名(和文) 昆虫永続伝搬性病原微生物のトランスジェネシス技術の開発

研究課題名(英文) Transgenesis of insect-transmissible plant-pathogenic microorganisms

## 研究代表者

難波 成任 (Namba, Shigetou)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50189221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトプラズマ等の昆虫媒介性細菌は多くが難培養性であり逆遺伝学的手法が利用できないため研究が困難である。本研究では、ファイトプラズマをモデルとして、昆虫永続伝搬性細菌の逆遺伝学的解析を可能にする新たな技術の構築を目的として研究を行った。まず、ファイトプラズマのプラスミドについてシャトルベクターに利用するため、複製に必要最小限な領域の絞り込みをおこなった。また、昆虫宿主、植物宿主の両宿主において安定的に発現すると考えられるファイトプラズマのプロモーター領域を特定した。さらに、シャトルベクターを構築するとともに、ファイトプラズマ細胞内にマーカー遺伝子を組み込むための遺伝子カセットを構築した。

研究成果の概要(英文)：Due to difficulties in culturing insect-transmissible plant-pathogenic bacteria (such as phytoplasmas) in vitro and in manipulating them genetically, these organisms are one of the most poorly characterized groups of plant pathogens. In this study, we investigated a “transgenesis method” that aims genetic manipulation without culturing using phytoplasmas as model organisms. We specified the minimum unit of a phytoplasmal plasmid for a development of shuttle vector. We also searched a phytoplasmal promoter that is active in both plant and insect hosts. Using these results, we constructed a shuttle vector and a gene expression cassette.

研究分野：農学

キーワード：プラスミド トランスジェネシス

## 1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマは700種以上の植物に感染する植物病原細菌であり、1967年に世界に先駆けて我が国で発見された。感染した植物は、萎縮・叢生・花の緑化・葉化などユニークな病徴を引き起こすことから、その昆虫媒介メカニズムや病原性発現のメカニズムには興味を持たれてきた。しかし、発見から40年が経つものの依然として人工培養が不可能であり、現在でもファイトプラズマは植物病原細菌のなかでも最も研究が難しいもののひとつといわれている。

1990年代になり、分子生物学的な手法による系統分類法が導入されたことにより(Namba et al., IJSB, 1993)、種レベルでの分類整理が急速に進んだ(Jung et al., IJSEM, 2002)。また、ファイトプラズマの分子遺伝学的研究の手がかりとして全ゲノム解読が期待され、世界各国でゲノムプロジェクトが開始されるなか、我が国において研究代表者らにより、世界で初めてファイトプラズマの全ゲノム解読に成功した(Oshima et al., Nature Genetics, 2004)。加えて、植物体内における動態解析(Wei et al., Phytopathology, 2004)、膜輸送系システムの機能解析(Kakizawa et al., MPMI, 2001)、染色体外DNAの機能解析(Oshima et al., Virology, 2001; Nishigawa et al., Microbiology, 2001)、宿主特異性の分子メカニズムの解析(Suzuki et al., PNAS, 2006)など、研究代表者の研究チームは内外を通じて最も研究が進んでいる。また、昆虫伝搬能喪失株の作出にも世界で初めて成功した(Oshima et al., Phytopathology, 2001)。

最近、研究代表者らの研究により、ファイトプラズマが保有するプラスミドの転写制御系が明らかとなった(Ishii et al., Microbiology, 2009; Gene, 2009)。また、ファイトプラズマの膜輸送系を阻害することにより、増殖を部分的に制御することにも成功している(PLoS One, 2011)。このように、我々は既にファイトプラズマの形質転換を可能にする材料や知見を獲得しており、これにより本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ファイトプラズマをモデルとして人工培養を経ない遺伝子導入技術(トランスジェネシス技術)の確立に挑戦し、昆虫永續伝搬性細菌の逆遺伝学的解析を可能にする新たな技術構築を目指す。

具体的には、研究代表者らによって見出されたファイトプラズマのプラスミドを利用した形質転換ベクターを開発する。まずプラ

ズミドにコードされる複製起点と複製酵素を含むプラスミドの複製に最小限必要な領域を用いてシャトルベクターの構築を行う。また、効率的にスクリーニングできる薬剤マーカーの検討、および遺伝子導入条件の検討を行い、これらの結果を融合させ、ファイトプラズマの形質転換系の確立と、相同組み換えを用いたロックアウト技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

ファイトプラズマは複数種類の染色体外DNAを有するため、これらが形質転換系のシャトルベクターに利用可能かどうかを検討した。研究代表者らの過去の研究により、OYファイトプラズマが有する全ての染色体外DNAがクローン化され、塩基配列が解読されている。OYファイトプラズマは、ウイルス型の複製酵素を持つ「染色体外DNA(EcDNA)」と、バクテリア型の複製酵素を持つ「プラスミド」の2種類に大きく分けられる。プラスミドのほうがサイズがコンパクトである点や、複製量が多いことを考慮し、本研究ではプラスミドをシャトルベクターに利用するため、複製に必要最小限な領域の絞り込みをおこなった。また、ファイトプラズマゲノム上にコードされる遺伝子のうち、発現量の多い遺伝子についてプロモーター解析をおこなった。シャトルベクターを構築するとともに、ファイトプラズマの細胞内にマーカー遺伝子を導入するための遺伝子カセットを構築した。

## 4. 研究成果

プラスミドの複製に必要最小限な領域の絞り込みをおこなった結果、複製酵素遺伝子を含むわずかな塩基配列のみからなる、従来の半分程度のサイズでも複製可能となる見込みが得られた。この成果により、プラスミド上に、複製に不要な領域の代わりに外来遺伝子を多数搭載するための目処が立った。昆虫宿主、植物宿主の両宿主において安定的に発現すると考えられるプロモーター領域を特定することができた。このプロモーター領域はシャトルベクター搭載した外来遺伝子を高発現させるために活用できると考えられた。マーカー遺伝子としては、蛍光タンパク質や抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子を用いることとし、いずれもファイトプラズマのゲノム情報にもとづいて使用コドンの最適化をおこない、ファイトプラズマ細胞内において高効率に翻訳され発現しうるようにした。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Minato N., Himeno M., Hoshi A., Maejima K., Komatsu K., Takebayashi Y., Kasahara H., Yusa A., Yamaji Y., Oshima K., Kamiya Y., Namba S.  
The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports* 4: 7399, 2014. 査読有  
doi: 10.1038/srep07399
2. Neriya Y., Maejima K., Nijo T., Tomomitsu T., Yusa A., Himeno M., Netsu O., Hamamoto H., Oshima K., Namba S.  
Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts. *FEMS Microbiology Letters* 361: 115-122, 2014. 査読有  
doi: 10.1111/1574-6968.12620
3. Himeno M., Kitazawa Y., Yoshida T., Maejima K., Yamaji Y., Oshima K., Namba S.  
Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports* 4: 4111, 2014. 査読有  
doi: 10.1038/srep04111
4. Maejima K., Oshima K., Namba S.  
Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* 80: 210-221, 2014. 査読有  
doi: 10.1007/s10327-014-0512-8
5. Oshima K., Maejima K., Namba S.  
Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. 査読有  
*Frontiers in Microbiology* 4:230, 2013.
6. Sugawara K., Honma Y., Komatsu K., Himeno M., Oshima K., Namba S.  
The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiology* 162: 2005-2014, 2013. 査読有  
doi: 10.1104/pp.113.218586
7. Takinami Y., Maejima K., Takahashi A., Keima T., Shiraiishi T., Okano Y., Komatsu K., Oshima K., Namba S.  
First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' infecting hydrangea showing

phyllody in Japan.

*Journal of General Plant Pathology* 79: 209-213, 2013. 査読有  
10.1007/s10327-013-0445-7

〔学会発表〕(計6件)

1. 原慎一郎・湊菜未・星朱香・前島健作・山次康幸・大島研郎・難波成任、ファイトプラズマの病原性因子 TENGU が誘導する不稔症状について、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 29～31 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)
2. 湊菜未、笠原博幸・竹林裕美子・前島健作・山次康幸・大島研郎・神谷勇治・難波成任、ファイトプラズマのエフェクター TENGU による植物の不稔症状誘導機構の解析、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 29～31 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)
3. 姫野未紗子・友光達哉・遊佐礼・北沢優悟・煉谷裕太郎・前島健作・大島研郎・難波成任、パープルトップ症状はファイトプラズマ感染による細胞死の誘導を抑制する、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 29～31 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)
4. 煉谷裕太郎・友光達哉・遊佐礼・二條貴通・鯉沼宏章・姫野未紗子・前島健作・大島研郎・難波成任、ファイトプラズマの膜タンパク質 P38 の MAM 領域は昆虫宿主への接着に重要である、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 29～31 日、明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)
5. 北沢優悟・吉田哲也・菅原杏子・姫野未紗子・前島健作・大島研郎・難波成任、ファイトプラズマの病原性因子 TENGU の機能領域と切断部位の特定、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2～4 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
6. 姫野未紗子・北沢優悟・吉田哲也・三浦千裕・前島健作・大島研郎・難波成任、ファイトプラズマ感染が引き起こすパープルトップ症状は宿主のアントシアニン合成経路に依存する、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2～4 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ae-b/planpath/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

難波 成任 (NAMBA SHIGETOU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：5 0 1 8 9 2 2 1

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：