

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2004-2008 年度

課題番号：16108001

研究課題名（和文） 細胞内寄生植物病原細菌のポストゲノミクス

研究課題名（英文） Postgenomics of plant pathogenic microorganisms
that live intracellularly

研究代表者

氏名（アルファベット）難波 成任（NAMBA, SHIGETOU）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号 50189220

研究成果の概要：

細胞内寄生性植物病原細菌の一種であるファイトプラズマをターゲットとし、そのゲノム配列にもとづいたポストゲノミクス解析を多方面から行った。その結果、ファイトプラズマの宿主特異性を決定している分子メカニズムの解明に成功し、またファイトプラズマが持つ新規な病原性因子の単離にも成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	30,100,000	9,030,000	39,130,000
平成 17 年度	19,700,000	5,910,000	25,610,000
平成 18 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
平成 19 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
平成 20 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	81,800,000	24,540,000	106,340,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：細胞内寄生，ポストゲノム，宿主特異性，病原性

1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生性の植物病原細菌は、農業生産上甚大な被害を引き起こす昆虫媒介性の細菌の一群であり、この一種であるファイトプラズマは、国内外を問わず農業上甚大な被害を与えているが、培養不可能であることからその病理の分子レベルでの解明は遅れていた。近年、この微生物が持つマルチホスト型の生活環において新たな知見が得られ、また、その全ゲノム塩基配列が解読されつつあり、これによりこれまで不可能であった多くの実験が可能となった。

2. 研究の目的

本研究はファイトプラズマのゲノムデータに基づき、そのポストゲノムを通じて、異なる防御機構を回避し、両宿主に侵入する能力を獲得した特異な微生物の病原性ならびに宿主決定の分子機構を解明するとともに、特殊環境に生きる細菌の巧みなライフスタイルの謎に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

ファイトプラズマのゲノム塩基配列の詳細な解読と、近縁系統との比較ゲノム解析などの手法および、タンパク質カラムや抗体カラムによる宿主因子の単離、二次元電気泳動や質量分析による宿主因子の同定などの一

連の分子生物学的手法を用いた。

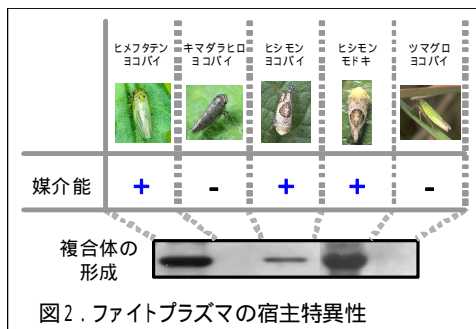
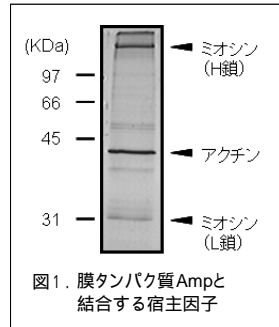
4. 研究成果

(1) 宿主特異性の分子メカニズムの解明
 ファイトプラズマは、特定のヨコバイによって媒介され、他のヨコバイによって媒介されないという宿主特異性を持つが、その特異性を決めているメカニズムはこれまで不明であった。

この特異性の分子メカニズムを解明する目的で、ファイトプラズマの主要抗原膜タンパク質 (Amp) と結合する昆虫宿主因子を単離・同定したところ、Amp は、細胞骨格であるマイクロフィラメントを構成するアクチンやミオシンと複合体を形成することが明らかとなった (図1)。さらに、ファイトプラズマ媒介能のある昆虫ではこの Amp-マイクロフィラメント複合体の形成が観察されたが、ファイトプラズマを媒介しない昆虫では複合体の形成が認められなかった (図2)。これらの結果は、Amp-マイクロフィラメント複合体の形成は、ファイトプラズマの媒介昆虫決定に大きく関与することを示している。植物病原細菌のみならず、ヒトや動物へ感染する病原細菌も含め、昆虫宿主の決定因子が単離されたのはこれが初めてであり、学術的な意義も大きく、農学・医学・疫学などの領域に広く貢献することが期待される。

(2) 病原性因子の同定

植物病原体は植物に感染して病徴を引き起こし、農作物の収量や品質に大きな影響を及ぼすことから、その病徴発現メカニズムの解明は農学における最重要テーマの一つである。しかし、ファイトプラズマなどが引き起こす萎縮・叢生・黄化などの病徴に関しては、その病原性因子や病徴発現メカニズムも



不明であった。

今回、ファイトプラズマが持つ分泌タンパク質に注目し、植物体において発現を行った

ところ、ファイトプラズマに特徴的な病徴を引き起こす全く新規の誘導因子を見出した。また、ファイトプラズマ感染植物組織における病原性因子の動態を調べたところ、植物の茎頂分裂組織 (成長点) や側芽の分枝領域の細胞にまで移行していることが分かった。ファイトプラズマは篩部局在性であることから、この病原性因子はファイトプラズマから分泌された後、篩管細胞より隣接細胞を経て、多くの植物組織へ輸送されていることが示唆された。

次にこの遺伝子を形質転換したシロイヌナズナを作成したところ、ファイトプラズマの感染により現れる病徴が確認された。この病原性因子は、植物に形態変化を誘導する植物病原細菌由来の因子としては、まったく新規なものであり、この発見は非常に大きな意義を持つ。病原性細菌由来の同様の因子はこれまで例がないため、学術的にも非常に興味深く、応用面への実用化も期待される。

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 26 件)

- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y. & Namba, S. (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 6416-6421. (査読有り)
- Ishii, Y., Kakizawa, S., Hoshi, A., Maejima, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2009) In the non-insect-transmissible line of Onion Yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology-(UK)* in press. (査読有り)
- Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H. Y., Yamaji, Y. & Namba, S. (2009) Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 92-101. (査読有り)
- Arashida, R., Kakizawa, S., Hoshi, A., Ishii, Y., Jung, H. Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2008) Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA Cell Biol.* **27**, 209-217. (査読有り)
- Arashida, R., Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H. Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima,

- K. & Namba, S. (2008) Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (Amp) gene and *in situ* detection of Amp from malformed flowers infected with Japanese hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology* **98**, 769-775.
6. Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N. & Namba, S. (2008) Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 403-423.
 7. Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S. & Namba, S. (2007) Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus* Phytoplasma asteris. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 481-489.
 8. Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H. Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S., Ugaki, M., Kishino, H. & Namba, S. (2006) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J. Bacteriol.* **188**, 3424-3428.
 9. Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M. & Namba, S. (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4252-4257.
 10. Kakizawa, S., Oshima, K. & Namba, S. (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol.* **14**, 254-256.
 11. Jung, H. Y., Chang, M. U., Lee, J. T. & Namba, S. (2006) Detection of "*Candidatus* Phytoplasma asteris" associated with henon bamboo witches' broom in Korea. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**, 261-263.
 12. Kayukawa, T. & Ishikawa, Y. (2005) Detection of chill injuries in the pupae of the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Appl. Entomol. Zool.* **40**, 193-198.
 13. Chen, B., Kayukawa, T., Jiang, H., Monteiro, A., Hoshizaki, S. & Ishikawa, Y. (2005) DaTrypsin, a novel clip-domain serine proteinase gene up-regulated during winter and summer diapauses of the onion maggot, *Delia antiqua*. *Gene* **347**, 115-123.
 14. Tabata, J. & Ishikawa, Y. (2005) Genetic basis to divergence of sex pheromones in two closely related moths, *Ostrinia scapulalis* and *O. zealis*. *J. Chem. Ecol.* **31**, 1111-1124.
 15. Li, G. & Ishikawa, Y. (2005) Oviposition deterrents from the egg masses of adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* and Asian corn borer, *O. furnacalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **115**, 401-407. (査読有り)
 16. Fu, X., Fukuzawa, M., Tabata, J., Tatsuki, S. & Ishikawa, Y. (2005) Sex pheromone biosynthesis in *Ostrinia zaguliaevi*, a congener of the European corn borer moth *O. nubilalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 621-626. (査読有り)
 17. Sakamoto, H., Ishikawa, Y., Sasaki, T., Kikuyama, S., Tatsuki, S. & Hoshizaki, S. (2005) Transinfection reveals the crucial importance of *Wolbachia* genotypes in determining the type of reproductive alteration in the host. *Genet. Res.* **85**, 205-210. (査読有り)
 18. Kayukawa, T., Chen, B., Miyazaki, S., Itoyama, K., Shinoda, T. & Ishikawa, Y. (2005) Expression of mRNA for the t-complex polypeptide-1, a subunit of chaperonin CCT, is upregulated in association with increased cold hardiness in *Delia antiqua*. *Cell Stress Chaperones* **10**, 204-210. (査読有り)
 19. Munyiri, F.N. & Ishikawa, Y. (2005) Feeding glucose or sucrose, but not trehalose, suppresses the starvation-induced premature pupation in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris*. *J. Insect Physiol.* **51**, 1005-1012. (査読有り)
 20. Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A. & Ishikawa, Y. (2005) The expression of HSP90 gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Mol. Biol.* **14**, 697-702. (査読有り)
 21. Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2004) Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**, 135-142. (査読有り)
 22. Wei, W., Kakizawa, S., Jung, H.Y., Suzuki, S., Tanaka, M., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T. & Namba, S. (2004) An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology* **94**, 683-686. (査読有り)
 23. Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H. Y., Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T. & Namba, S. (2004) *In planta* dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by

- insect transmission. *Phytopathology* **94**, 244-250. (査読有り)
24. Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genet.* **36**, 27-29. (査読有り)
 25. Kageyama, D., Nishimura, G., Ohno, S., Takanashi, T., Hoshizaki, S. & Ishikawa, Y. (2004) *Wolbachia* infection and all-female trait in *Ostrinia orientalis* and *O. zaguliaevi* (Lepidoptera: Crambidae). *Entomol. Exp. Appl.* **111**, 79-83. (査読有り)
 26. Munyiri, F.N., Shintani, Y. & Ishikawa, Y. (2004) Evidence for the presence of a threshold weight for entering diapause in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *J. Insect Physiol.* **50**, 295-301. (査読有り)

〔学会発表〕(計 76 件)

1. Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H. Y., Oshima, K., Namba, S.: Sequence diversity and positive selection of a surface membrane protein of phytoplasma. (17th International Congress of the International Organization for Mycoplasma, 天津医科大学, 2008 年 7 月 6-11 日)
2. Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H. Y., Oshima, K., Namba, S.: Positive selection on a surface membrane protein and insect vector specificity of phytoplasma. (International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Istanbul, 2008 年 8 月 5-9 日)
3. 星 朱香, 石井 佳子, 川西 剛史, 柿澤 茂行, 大島 研郎, 難波 成任: 葉化組織におけるファイトプラズマの局在解析(日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会, 東京大学, 2008 年 5 月 30-31 日)
4. 石井 佳子, 星 朱香, 川西 剛史, 柿澤 茂行, 大島 研郎, 難波 成任: ファイトプラズマのプラスミド上の膜タンパク質遺伝子 ORF3 のプロモーター解析(日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会, 東京大学, 2008 年 5 月 30-31 日)
5. 柿澤 茂行, 星 朱香, 石井 佳子, 川西 剛史, 大島 研郎, 難波 成任: ファイトプラズマの検出・診断の歴史と現状(日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会, 東京大学, 2008 年 5 月 30-31 日)
6. 大島 研郎, 石井 佳子, 星 朱香, 川西 剛史, 柿澤 茂行, 難波 成任: マイコプラズマ様微生物の世界 - ファイトプラズマ発見の歴史と新展開 - (日本マイコプラズマ学会第 35 回学術集会, 東京大学, 2008

年 5 月 30-31 日)

7. 大島 研郎, 星 朱香, 石井 佳子, 柿澤 茂行, 難波 成任: ファイトプラズマゲノムにおけるスクロースホスホリラーゼ遺伝子の機能欠損(平成 20 年度日本植物病理学会大会, くにびきメッセ, 2008 年 4 月 26-28 日)
8. 星 朱香, 石井佳子, 柿澤 茂行, 大島 研郎, 難波 成任: ファイトプラズマのプラスミド上にコードされる膜タンパク質 ORF3 の免疫組織化学的解析(平成 20 年度日本植物病理学会大会, くにびきメッセ, 2008 年 4 月 26-28 日)
9. 石井佳子, 星 朱香, 柿澤 茂行, 大島 研郎, 難波 成任: ファイトプラズマの昆虫伝搬能喪失株におけるプラスミド上のプロモーター配列欠失について(平成 20 年度日本植物病理学会大会, くにびきメッセ, 2008 年 4 月 26-28 日)
10. 大島 研郎, 柿澤 茂行, 難波 成任: 植物病原細菌ファイトプラズマの膜タンパク質 Amp の昆虫感染への関連性(平成 20 年度日本農芸化学学会大会, 名城大学, 2008 年 3 月 27-29 日)

他、国際学会発表 11 件、国内学会発表 55 件

〔図書〕(計 7 件)

1. 柿澤茂行, 大島研郎, 難波成任. (2009). 植物病原菌ファイトプラズマの全ゲノム解読とベクターの特異性の分子機構. 感染・炎症・炎症 39, 48-51.
2. 難波成任. (2008)ファイトプラズマによる植物の病害. 微生物の事典. 朝倉書店.
3. Oshima, K. and Namba, S. (2005) Metabolic pathways encoded in the small genomes of bacterial parasites. In Recent Research Developments in Bioenergetics, vol. 3, Transworld Research Network: 45-61.
4. 柿澤茂行, 難波成任. (2005) 怠け者の小さな植物病原微生物: ファイトプラズマ - 初めて入れられた分子生物学的メス. BRAIN テクニクス. 109(15).
5. Namba, S., Oshima, K. & Gibb, K. (2005). Phytoplasma Genomics. in Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity and Strategies for Control (ed. Alain Blanchard and Glenn Browning, Horizon Bioscience), 1-20.
6. 大島研郎, 難波成任. (2004). 植物病原細菌ファイトプラズマの全ゲノム解読の意義 - 退行的進化を遂げた微生物の生存戦略 蛋白質・核酸・酵素 49, 649-653.
7. 大島研郎, 難波成任. (2004). 怠け者の小さな植物病原微生物 - 生物はどこまで遺伝情報を減らすことができるのか? 化学と生物 42, 154-160.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 成任

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50189220

(2) 研究分担者

石川 幸男

（平成 16 年度から 18 年度までの期間、研究組織に参加）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

授

研究者番号：60125987

(3) 連携研究者