

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14465

研究課題名(和文) 難培養性植物細菌病の治療技術の開発および分子薬理機構の解明

研究課題名(英文) Chemotherapy techniques and molecular pharmacological mechanisms for diseases caused by unculturable plant-pathogenic bacteria

研究代表者

前島 健作 (Maejima, Kensaku)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：20726062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養系が確立されていない植物病原細菌ファイトプラズマを植物ごと培地上で培養する「試験管内培養系」を用いることで薬剤スクリーニングを実施した。様々な作用機序を有する薬剤から、ファイトプラズマの蓄積量を減少させる複数の薬剤を見出した。同じ系統の薬剤であっても誘導体ごとに効果が大きく異なることも明らかにした。また、薬剤を継続的に処理することにより、ファイトプラズマの完全な除去(ファイトプラズマフリー化)も可能であった。さらに、各種薬剤の標的となる遺伝子領域について配列情報から感受性/耐性のある程度推定可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、発見から50年を経ても理解が進んでいなかったファイトプラズマの薬剤感受性・耐性を包括的に解明した初めての成果である。未だ防除技術が確立されていないファイトプラズマ病研究及び対策を一変させる端緒となる可能性があり、新たな農薬が開発され、ファイトプラズマ病の防除のみならず治療への道を拓けると期待される。さらに、他にも存在する培養困難な植物病原細菌の防除・治療技術の開発にも本研究成果の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted drug screening by using an "in vitro culture system" in which the plant pathogenic bacteria phytoplasmas, whose in vitro culture system has not been established, were "cultured" within host plants on plant media. We found several drugs that significantly reduced the accumulation of phytoplasmas. We also found that the anti-phytoplasma activities significantly differed among derivatives of drugs. In addition, complete removal of phytoplasma (phytoplasma-free) was established by continuous treatment with the drug(s). In addition, we found that it is possible to estimate the susceptibility/resistance to various drugs from the sequence information of the drug target genes of phytoplasmas.

研究分野：植物保護科学

キーワード：ファイトプラズマ 試験管内培養 治療薬 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

植物の節部に寄生し代謝系を宿主に依存して増殖する細菌「ファイトプラズマ」はこれまでに 40 種以上が知られ、世界各地で 1000 種以上の植物に大きな被害を与えている。ファイトプラズマは 1967 年に我が国で世界に先駆けて発見されて以降、世界各国で精力的に研究がなされてきた。特に近年は分子生物学的展開によりファイトプラズマの性状は徐々に解明されつつある。しかしながら、発見から 50 年以上を経た現在も、未だ治療に結びつく十分な成果は得られていない。治療薬剤としては、1967 年にファイトプラズマの発見と同時に効果を確認された抗生物質「テトラサイクリン」(Ann Phytopath Soc Japan [1967] 33: 267-275) が唯一有効とされるものの、効果は一時的で、使用を中止すると再発病してしまうことが課題である(山本 [2010] 1511: 56-59)。

抗生物質は、ペニシリンの発見以来、医学・獣医学分野において極めて重要な地位を占めており、人畜の病原細菌病においても、その探索と作用機構の研究が精力的になされてきた(Nature Reviews Drug Discovery [2013] 12: 371-387)。中でも、大きな脅威である薬剤耐性菌出現の分子機構に関しては、ファイトプラズマに近縁な病原細菌マイコプラズマを含む様々な細菌において、塩基配列レベル(Microbiol Immunol [2001] 45: 617-620)さらには立体構造レベル(Mol Cell [2002] 10: 117-128; PNAS [2010] 107: 17158-17163)で耐性の有無を評価可能な薬理ゲノミクスが発達している。一方で、ファイトプラズマではテトラサイクリンも含めて抗生物質への感受性・耐性機構が解析された例は無く、耐性菌出現のリスクは全く検討されていない。

このように、ファイトプラズマに対抗するための「新たな防除・治療技術」および「耐性菌リスク評価技術」の開発が大きな課題であるが、ファイトプラズマは人工培養できないために、培地を用いた一般的な細菌に対する薬剤評価系を適用できず、ファイトプラズマの薬剤感受性・耐性に関する性状も理解が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで切望されつつも困難とされてきたファイトプラズマの防除・治療技術および耐性菌リスク評価技術を開発することである。それを可能にする独自の実験系として今回、ファイトプラズマの「試験管内培養系」を考案した。これは、培養系が確立されていないファイトプラズマを植物ごと培地上で培養することにより薬剤スクリーニングに供試するという逆転の発想により、培養困難性という障害を克服するとともに、植物への薬害の同時評価を可能とする方法である。また、耐性菌リスク評価のためには、薬剤の標的遺伝子情報が必須であるが、研究代表者の所属研究室では、世界に先駆けてファイトプラズマの全ゲノム解読に成功し(Nature Genetics [2004] 36: 27-29)、世界的研究拠点として国内外から収集したファイトプラズマコレクションを保有しているため、これらを利用した包括的な研究が可能である。

3. 研究の方法

(1) ファイトプラズマを植物ごと培地上で培養する「試験管内培養系」を用いて、抗細菌活性を有する 40 種類の抗生物質等の評価をおこなった。それぞれを 1~100 ppm の範囲で添加した培地上で、ファイトプラズマに感染したシュンギクの組織培養苗 3 個体を 4 週間維持した後、植物体の観察と全身における菌蓄積量の qPCR 評価をおこない、菌蓄積量が 1/10 に低下していた場合は、反復を増やして再度評価をおこなった。

(2) 有効性が確認された薬剤について、その誘導体を用いてファイトプラズマ蓄積量の低減効果を比較解析した。

(3) 本実験系を用いて有効な薬剤を含む培地上で感染苗を 4 ヶ月間継続的に処理した後、薬剤を含まない培地上でさらに 3 ヶ月維持し、ファイトプラズマ感染の有無を LAMP による高感度遺伝子検査法により経時的に評価した。

(4) ファイトプラズマにおける抗生物質への感受性や耐性のメカニズムを考察するため、他属細菌における薬剤感受性/耐性に関する遺伝情報との比較をおこなった。

4. 研究成果

(1) 40 種類の抗生物質等をスクリーニングした結果、最終的に 4 種類の抗生物質(ドキシサイクリン、クロラムフェニコール、チアンフェニコール、リファンピシン)を処理した場合にお

いて、植物の症状緩和と菌蓄積量の有意な減少が確認された。一方で、一般にマイコプラズマが感受性を示すマクロライド系やフルオロキノロン系の抗生物質では十分な有効性が確認されなかった。

(2) 有効性が確認された薬剤の誘導体について同様に評価したところ、同一系統の薬剤であっても誘導体ごとに効果が大きく異なっており、ファイトプラズマ蓄積量を大きく減少させる卓効を示す誘導体もあれば、全く効果のない誘導体もあることが明らかになった。

(3) 4ヶ月にわたる薬剤の継続的な施用により、ファイトプラズマ蓄積量が検出限界以下に低下することが確認された。さらに薬剤処理を停止した後、3ヶ月を経過しても検出限界以下の状態が継続したことから、薬剤処理により植物からファイトプラズマが完全に除去された(ファイトプラズマフリー化された)と考えられた。

(4) 各種薬剤とファイトプラズマにおける標的遺伝子の配列、および他の細菌における薬剤耐性変異の情報を比較した結果、テトラサイクリン系、フェニコール系、リファマイシン系およびマクロライド系の抗生物質について、それぞれ感受性および耐性の遺伝情報がファイトプラズマ属内で保存されていた。したがって、これらの抗生物質に対するファイトプラズマの感受性/耐性がファイトプラズマ属に共通する性質であると推察された。また、配列情報から感受性/耐性のある程度推定可能であることが示唆された。

本研究では、ファイトプラズマ感染植物を試験管内で薬剤処理する手法の有効性が示された。本手法は土壌を用いないことで薬剤の流亡や吸着・分解による影響を排除できるため、実験の再現性が高いとともに、肥培管理が不要で省スペース・ハイスループットであり、抗生物質の消費量も抑制され低コストとなるなど、多くの観点において合理的なスクリーニング系である。

本研究により、ファイトプラズマに対する効率的な薬剤スクリーニングが可能になり、有効あるいは無効な薬剤スペクトラムの全貌が初めて明らかになった。今後、ファイトプラズマへの対抗手段を構築するうえで極めて重要な基盤的知見として活用が期待される。

また、配列情報をもとに、ファイトプラズマの薬剤感受性/耐性のメカニズムについても推定できることが示され、今後蓄積が進むであろうファイトプラズマゲノム情報の利用価値を高める成果となった。

今後、本研究をもとにさらなる有効成分の探索が進むとともに、ファイトプラズマに対して選択的に効果を示す治療薬剤の開発が進むことを期待したい。また、ファイトプラズマ病のみならず、他の培養困難な植物病原細菌に対する防除・治療技術の開発にも本研究成果が応用されることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanno Kazuyuki, Maejima Kensaku, Miyazaki Akio, Koinuma Hiroaki, Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Nijo Takamichi, Hashimoto Masayoshi, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 164
2. 論文標題 Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma diseases using an in vitro plant-phytoplasma co-culture system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1048 ~ 1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.000681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎彰雄・前島健作・丹野和幸・北沢優悟・二條貴通・橋本将典・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイトプラズマ研究の温故知新：治療薬の試験管内評価法の開発
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前島健作・宮崎彰雄・丹野和幸・鈴木拓海・鯉沼宏章・岩淵望・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイトプラズマ研究の温故知新：治療薬の試験管内スクリーニング
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前島健作・難波成任
2. 発表標題 Keynote Lecture
3. 学会等名 The 4th meeting of the International Phytoplasma Working Group（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 前島健作・北沢優悟	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 7
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------