

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681043

研究課題名(和文)ハイブリッドゲノムを用いた難培養細菌ファイトプラズマの培養系の確立

研究課題名(英文)Method for culturing of unculturable phytoplasma by a hybrid-genome strategy

研究代表者

柿澤 茂行(kakizawa, shigeyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10588669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円、(間接経費) 5,430,000円

研究成果の概要(和文)：すでに報告されている環状YAC(酵母人工染色体)ベクターを改良することで、高いクローニング効率を持つ全ゲノムクローニングのためのベクターを作成した。またファイトプラズマゲノムを感染植物から効率的に抽出する系を確立した。加えて、ゲノムのクローニングを確認するためのマルチプレックスPCRの系を確立した。確立したマルチプレックスPCRの手法を応用し、ファイトプラズマ感染植物中の系統判別が可能であることが判明したため、この戦略も確立した。

研究成果の概要(英文)：A vector system for the whole genome cloning was established. A previously reported circular YAC (yeast artificial chromosome) vector was modified and used for genome cloning. Using this new system, high efficiency of positive clones was observed. A method to extract phytoplasma genome from infected plant tissues was also established. In addition, a multiplex-PCR system was established to confirm cloning of large genomic fragment. Strain-identification of phytoplasmas in infected host was also performed using the multiplex-PCR system.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノム 細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム操作技術の進展

近年、合成ゲノム学の分野において、細菌のゲノムを大規模に再構成する手法が立て続けに開発されつつある。マイコプラズマという細菌を用いた例を挙げると、メガ bp 単位のゲノムを酵母の細胞内においてアッセンブルする手法 (PNAS 105: 20404-9, 2008)、溶液中で数百 kbp の DNA をアッセンブルする手法 (Nature Methods 6: 343-5, 2009)、細菌の環状ゲノムをまるごと細胞へと「ゲノム移植」する手法などが開発されている (Science 317: 632-8, 2007; Science 325: 1693-6, 2009)。これらの新手法は、メガベース単位のゲノムを操作・改変する上で非常に画期的かつ利用価値の高いものであり、細菌の研究を大きく進展させ、新たな知見を加速度的に生み出す手法として期待される。

これらの手法を開発する中で、「ゲノム移植によってドナー細菌の性質をレシピエント細菌へと完全に付与できる」という興味深い知見が得られている (図 1)。具体的には、ドナー細菌の増殖速度・コロニー形状・タンパク質の発現様式・膜タンパク質のレポーターなどのすべての性質がレシピエント細菌へと付与され、移植後の細菌はドナー細菌とまったく区別がつかなくなった (Science 317: 632-8)。この知見は、細菌が持つ多くの性質を、ゲノム移植によりすべて付与できるという好例である。

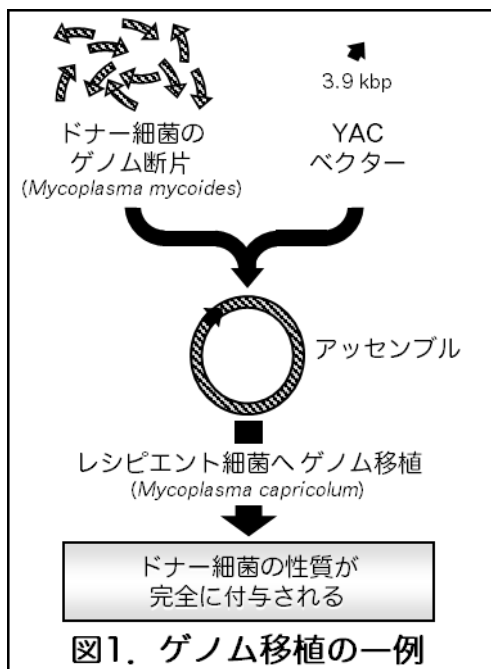


図1. ゲノム移植の一例

(2) 植物病原細菌ファイトプラズマ

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、ヨコバイなどの昆虫によって伝搬される。世界各国で多くの農作物に感染し、農業生産に甚大な被害を与えている一方で、植物に葉化 (花が葉に変

化する病徴) などのユニークな病徴を誘導する点は非常に興味深く (図 2)、加えて植物と昆虫という異なる生物界の宿主に感染できるホストスイッチング機構も興味深い。しかし培養ができないことから、その研究は非常に困難である。そのような状況の中、研究代表者らは世界に先駆けファイトプラズマのゲノム解読に成功した (Nature Genetics 36: 27-9, 2004)。ゲノム配列から、その病原性を司る遺伝子の候補は見いだせたものの、培養や遺伝子操作ができないことから詳細な解析ができないのが現状である。



2. 研究の目的

本研究は、近年開発されつつあるゲノム操作の技術を応用することで、植物病原細菌ファイトプラズマのゲノムを大規模に操作することで、ファイトプラズマの培養のための系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

近年開発された全ゲノムクローニングやゲノム移植などの手法に改良を加えた手法を用いた。クローニングの宿主としては出芽酵母を用い、環状の酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome: YAC) をベクターとして用いた。クローニング手法は、酵母の細胞内で相同組換えによるアッセンブルが自然に起こるという TAR (Transformation-Associated Recombination) cloning を応用した手法を用いた。また、マルチプレックス PCR には QIAGEN Multiplex PCR Kit を用い、各プライマーのアニール温度を 60 に設計した。

4. 研究成果

(1) クローニングベクターの作成

難培養細菌ファイトプラズマの全ゲノムをクローニングする系を確立するため、これに先立ち、クローニング用ベクターの調査および検討を行った。酵母において大きなゲノム断片をクローニングするための YAC(酵母人工染色体)ベクターはいくつか開発されているため (Science 317: 632-8, 2007)、これらを改変し、クローニング用ベクターとして検討した。ベクターは、酵母および大腸菌において複製するように設計されており、かつ、酵母においては環状のゲノムとして保持されるように設計されている。このベクターを用いたクローニングは、ベクター配列とターゲットとなるゲノム断片とが 60 bp ほど重複するような「のりしろ」配列を設計すると、酵母の細胞内で相同組換えによるアッセンブルが自然に起こるという TAR cloning を応用し (Science 317: 632-8, 2007)、の手法に倣ってストラテジーを確立した。「のりしろ」配列はプライマー合成によって作製した。このベクターを使うことでクローニング効率が大幅に改善されることを確認した。

(2) ゲノム抽出手法の改良

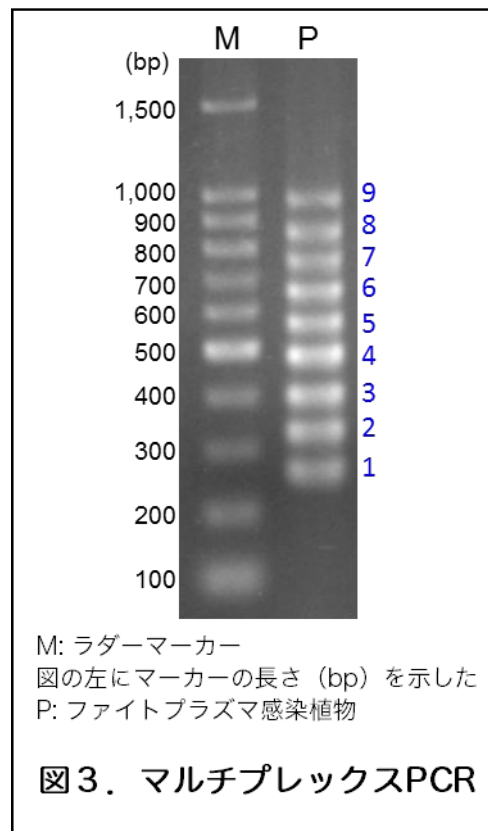
難培養細菌ファイトプラズマの全ゲノムを感染植物から抽出する系の確立を行った。感染植物におけるファイトプラズマ菌体の量は非常に少ないため、植物の核およびオルガネラゲノムの混入を防ぐ必要がある。遠心分離法およびパルスフィールドゲル電気泳動法を用いることで、純度の高いゲノムを抽出することに成功した。

(3) 規模ゲノムクローニングを確認する系の確立

大規模なゲノム断片のクローニングに成功したかどうかを確認する系としてはマルチプレックス PCR が最適であろうと考えられるため、この系の確立を試みた。ファイトプラズマゲノムの複数の領域に対してプライマーを設計し、これを混ぜ合わせ、1つの PCR 反応で 9断片 (9ゲノム領域) を増幅することができる系を確立した (図3)。プライマーは、全ゲノム内に1コピーのみ存在する遺伝子に対して設計する必要があり、プライマー同士のアニーリングおよびプライマー内のセルフアニーリングを防ぐ必要があるため、詳細な解析が必要であった。これにより、数百 kbp の断片のクローニングに成功したかどうかを1チューブ、1PCRリアクションで確認することができる。この系により、ゲノムクローニングの実験が速やかに進展するものと考えられる。

加えて、確立したマルチプレックス PCR の手法を応用することで、ファイトプラズマ感染植物中のファイトプラズマ系統の簡易判別を行うことができることが判明したため、このストラテジーの確立も行い諸学会および論文として発表した。この系は、培養のできないファイトプラズマについて、フィール

ドにおける感染調査などの疫学的な利用や、温室における保持ファイトプラズマ菌株の確認など、様々な場面への応用利用が期待される。



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 1 件)

1. Shigeyuki Kakizawa and Yoichi Kamagata. A Multiplex-PCR Method for Strain Identification and Detailed Phylogenetic Analysis of AY-Group Phytoplasmas, Plant Disease, 査読有り, Volume 98, Number 3, p299-305, 2014.
DOI: 10.1094/PDIS-03-13-0216-RE

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 柿澤茂行、鎌形洋一, 「マイコプラズマの全ゲノム操作技術を用いた難培養性細菌の研究」, 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 2014.3.8, 東京都世田谷区
2. 柿澤茂行、鎌形洋一, Recent progress on phytoplasma-host interactions and future of phytoplasma genomics, 10th International Congress of Plant Pathology, 2013.8, Beijing, China.

3. 柿澤茂行、鎌形洋一，「マイコプラズマの全ゲノム操作技術を用いた難培養性細菌の研究」，第 28 回日本微生物生態学会大会 (JSME 2012)，2012.9.20，愛知県豊橋市
4. 柿澤茂行、鎌形洋一，Multiplex-PCR for epidemiology of phytoplasma, 19th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), 2012.7, Toulouse, France.
5. 柿澤茂行、鎌形洋一，「マイコプラズマの全ゲノム操作技術を用いた難培養性細菌の研究」，第 39 回日本マイコプラズマ学会総会，2012.05.24，岩手県盛岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿澤 茂行 (KAKIZAWA SHIGEYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10588669

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし