

ファイトプラズマの膜表面タンパク質と宿主決定機構に関する研究

柿澤 茂行（産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門）

s.kakizawa@aist.go.jp

はじめに

ファイトプラズマ (phytoplasma) 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り媒介され動植物宿主間を水平伝搬し、穀類・野菜・果樹・観賞植物・樹木など、種々の有用植物の生育に深刻な影響を与える。感染した植物は、黄化・萎縮・叢生・花の葉化など特徴的な病徴を示すことから、その病原性発現メカニズムや昆虫媒介メカニズムに興味を持たれてきた。しかし、培養が困難なことから、その詳細な性状はこれまで明らかではなかった。本研究では、このユニークな病原体を研究対象に、その膜表面タンパク質およびタンパク質分泌機構について分子レベルで解析を行い、数多くの重要な知見を得た。

ファイトプラズマの膜表面タンパク質に関する研究

ファイトプラズマは細胞壁を持たず、宿主の細胞内に生息することから、その膜タンパク質は宿主-病原体の相互作用に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、ファイトプラズマが持つ膜表面タンパク質に着目して一連の研究を行った。

まず、タンパク質分泌装置である Sec system を構成する因子の遺伝子をファイトプラズマよりクローニングし、その発現を感染植物内において確認した (図 1)。また、Sec system はファイトプラズマの膜表面に存在し、機能していることを明らかにした^(1,2)。ファイトプラズマは培養できないためその遺伝子のクローニングは非常に困難であり、またゲノム解読も完了していない状況下であったため、本研究は機能の推定できる膜タンパク質のクローニングとしてファイトプラズマにおいて初めての研究となった。

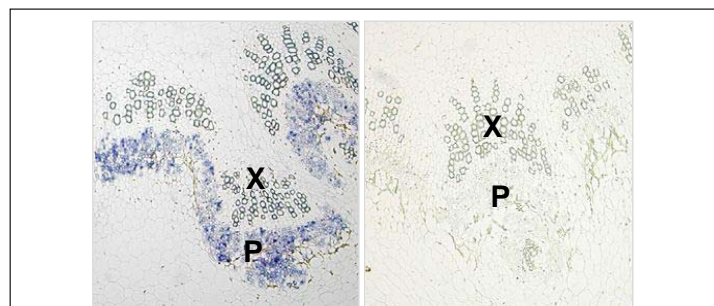


図1 . Sec systemの構成因子であるSecAに対する抗体を用いた免疫染色. 左が感染植物、右が健全植物. SecAの位置を示すシグナルは、ファイトプラズマの局在する篩部組織 (P) にのみ認められ、木部組織 (X) には認められない。

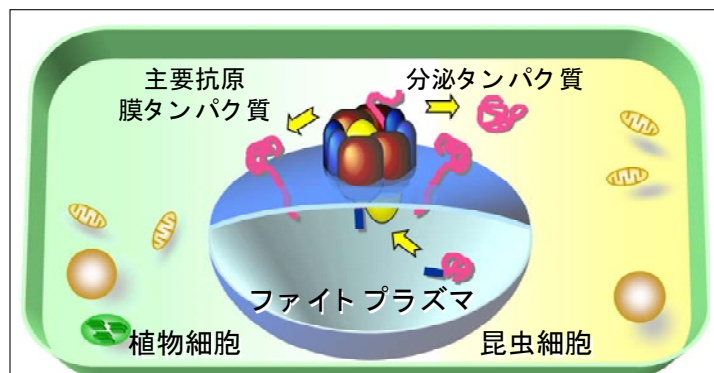


図2 . 宿主細胞内におけるファイトプラズマの分泌装置 Sec system の模式図. Sec systemを介して「主要抗原膜タンパク質」や種々の分泌タンパク質などが輸送される. 輸送される膜タンパク質や分泌タンパク質は、宿主の細胞質側へと露出するため、宿主-病原体の相互作用を解明する上で有力な候補である。

加えて、ファイトプラズマの菌体表面の大半が「主要抗原膜タンパク質」により覆われていることを示し、その高レベルの発現を確認すると同時に、主要抗原膜タンパク質が Sec system により輸送され、ファイトプラズマの細胞膜上に局在していることを大腸菌の系で実験的に示した^(2, 8)。さらに、Sec system によって輸送されるタンパク質の N 末端には分泌シグナル配列が付加されているが、このコンセンサス配列は大腸菌等のものと類似していることを示し、ファイトプラズマの分泌タンパク質を容易にゲノム配列から推測できることを示した⁽⁹⁾。これら一連の研究により、ファイトプラズマは多数の分泌タンパク質を宿主細胞中へと分泌していることが明らかとなった。Sec system によって輸送される膜タンパク質や分泌タンパク質は、宿主の細胞質側へと露出するため、宿主-病原体の相互作用を解明する上で有力な候補と成ると予想された (図 2)。

昆虫宿主特異性の決定機構および膜タンパク質の多様性に関する研究

ファイトプラズマの植物への宿主特異性は一般に低く、1 種のファイトプラズマが非常に多数の植物種へと感染できる例も数多く知られている。一方、昆虫への宿主特異性は非常に高く、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厳密な宿主特異性を持つが、そのメカニズムはまったく不明であった。ファイトプラズマは植物における種子伝搬や昆虫における経卵伝搬はほとんど起こらないことが知られているため、媒介昆虫による伝搬が主な感染拡大経路であり、すなわち、昆虫宿主への感染の有無が自然界におけるファイトプラズマ病の拡散を決定する大きな要因となっていると考えられている。従って、ファイトプラズマの昆虫宿主特異性のメカニズムの解明は、病原体の拡散を阻止する防除法の確立につながり、その意義は大きい。

本研究では、ファイトプラズマの主要抗原膜タンパク質に焦点をあて、これと結合する宿主因子の同定を試みたところ、昆虫のアクチン・ミオシンと主要抗原膜タンパク質とが特異的に結合することを見いだした。また、この結合は媒介昆虫でのみ認められることから、主要抗原膜タンパク質とアクチン・ミオシンとの結合の可否によってファイトプラズマの昆虫宿主特異性が決定されることが明らかとなった^(6, 8)。

続いて、主要抗原膜タンパク質遺伝子を種々のファイトプラズマよりクローニングし、それらの配列を解析した。その結果、ファイトプラズマの系統によって主要抗原膜タンパク質遺伝子が異なり、大きく 3 種類に分類できることを明らかにした^(4, 8, 11, 12) (図 3)。加えて系統進化的解析により、主要抗原膜タンパク質が適応進化していることを発見した⁽⁵⁾。特に、その適応進化に伴って加わっている選択圧が極端に大きいことや、宿主細胞質に露出している領域により強い選択圧がかかっていることを明

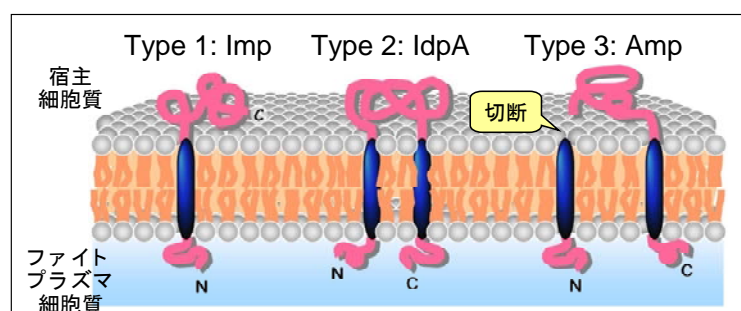


図3. ファイトプラズマの菌体表面を覆う主要抗原膜タンパク質の模式図。主要抗原膜タンパク質をコードする遺伝子はファイトプラズマの系統によって異なり、大きく 3 種類に分類できることが分かった。

またこれらの膜タンパク質の宿主細胞質に露出している領域は適応進化していることが分かり、これら膜タンパク質のスイッチングと適応進化により宿主特異性が変化することが示唆された。

らかにし、主要抗原膜タンパク質が宿主との相互作用に重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究により、主要抗原膜タンパク質に起こった適応進化と膜タンパク質遺伝子自体のスイッチングにより、巧妙かつダイナミックに宿主特異性が変化してきたであろう進化の道筋が明らかとなった^(8, 11, 12)。

これらの発見は、自然界においてファイトプラズマが昆虫宿主に適応して生存する戦略の一端を示唆するものである。この結合を阻害する非殺虫性の薬剤を開発すれば、安全な防除薬剤の開発に繋がると期待される。

おわりに

本研究では植物病原細菌であるファイトプラズマについて、その膜タンパク質および宿主との相互作用の観点から研究を行い、培養のできないファイトプラズマについて多くの知見を明らかにした。本研究においてファイトプラズマの分泌タンパク質や膜タンパク質の重要性を示すことができたが、この知見に立脚したファイトプラズマの分泌タンパク質の解析が世界中で精力的に進められ、病原性因子の特定や病徴誘導メカニズムの解明などの成果につながっており⁽¹⁰⁾、ファイトプラズマ研究は飛躍的に進展しつつある。一方で、ファイトプラズマは培養が困難なことからその研究は依然として困難であり、解明すべき未知な現象が数多く残っている。また、ファイトプラズマ病による農作物の被害も依然として著しく、特に発展途上国において顕著である。今後は、ファイトプラズマについてさらなる知見を明らかにし、植物病理学分野や農学分野の発展に寄与できるような研究を目指したい。

謝辞

本研究は、東京大学 大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室および、同大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 資源生物創成学研究室において実施したものです。本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科の難波成任教授には終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。同大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室および同大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 資源生物創成学研究室における様々な場面でご協力・ご助言を頂いた宇垣正志教授、宮田伸一先生、大島研郎先生、研究者諸氏、学生諸氏、また共同研究していただいた多くの方々に深く御礼申し上げます。最後に本賞にご推薦頂きました日本植物病理学会の関連の諸先生方に深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. (2001) Cloning and expression analysis of *Phytoplasma* protein translocation genes. ***Mol Plant-Microbe Interact*** 14: 1043-1050.
2. Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., and 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.
3. Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D.,

- Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genet* 36: 27-29.
4. Kakizawa, S., Oshima, K., and Namba, S. (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol* 14: 254-256.
 5. Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H.Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S., Ugaki, M., Kishino, H., and Namba, S. (2006) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J Bacteriol* 188: 3424-3428.
 6. Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., and Namba, S. (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4252-4257.
 7. Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S., and 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. Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., and Namba, S. (2008) Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9: 403-423.
 9. Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H.Y., Yamaji, Y., and Namba, S. (2009) Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett* 293: 92-101.
 10. Hoshi, A.*, Oshima, K.*, Kakizawa, S.*, Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2009) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6416-6421. (*: equally contributed to this study)
 11. Kakizawa, S., Oshima, K., and Namba, S. (2010) Functional genomics of phytoplasmas. In *Phytoplasmas: genome, plant hosts and vectors*. Weintraub, P.G. and Jones, P. (eds). Oxfordshire: CABI, pp. 37-50.
 12. Kakizawa, S., Hoshi, A., Ishii, Y., Kojima, N., Sugawara, K., Okano, Y., Maejima, K., Oshima, K., and Namba, S. (2011) Unique features of a phytoplasma genome and its membrane proteins involved in host specificity. In *Genome-enabled analysis of plant-pathogen interactions*. Wolpert, T., Shiraishi, T., Collmer, A., Akimitsu, K. and Glazebrook, J. (eds). Minnesota: APS press, pp. 103-110.
 13. Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y., and Namba, S. (2011) Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS One* 6: e23242.

Research on membrane proteins and host-specificity of phytoplasma

Shigeyuki Kakizawa

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Bioproduction Research Institut)

s.kakizawa@aist.go.jp