

ファイトプラズマ研究の新展開

——第10回国際マイコプラズマ学会に出席して——

東京大学農学部附属農場 ^{なん}難 ^ば波 ^{しげ}成 ^{とう}任

はじめに

長い間ウイルス病であると思われてきた多数の黄化性植物病害が、透過型電子顕微鏡観察により、植物の篩部組織に局在する非常に小さな(0.2~1.0 μm)細胞壁を欠く原核微生物によるものと考えられるようになって以来、既に四半世紀がたつ。それらは、動物に見いだされた細胞壁を欠く原核微生物に似ていたため、当初 PPOs (pleuropneumonia-like organisms) と呼ばれ、のちに MLOs (mycoplasma-like organisms) と俗称 (trivial term) が定まることとなった。これまでに、300種類以上の病気が樹木・果樹・牧草・野菜・花卉など様々な植物で知られている。

しかし近年、分子生物学的な研究手法が普及するに伴って、MLOの分子系統学的な研究が飛躍的に発展し、ここ数年の間に従来の生物学的・分類学的な知見が改めて見直されるようになった。

本年7月18~26日にかけて、フランスのボルドーで第10回国際マイコプラズマ学会が開催されたが、MLO研究者にとっては、ここでその発見以来の画期的な変革を迎えることとなった。私は幸運にも文部省の国際研究会派遣研究員としてこの学会に参加することができた。今回は、参加国数39か国、参加者数527名余り、そのうち日本人は、荒井澄夫氏(久留米大医学部教授・日本マイコプラズマ学会会長)、北本治氏(東大医学部名誉教授・元日本マイコプラズマ学会会長)、原澤亮氏(東大医学部助教授)、福村隆氏(大阪市大理学部教授)、武藤昶氏(弘前大理学部教授)など学会会等である程度面識のある方々が多かったが、自分も含めわずか10人であったうえ、全体の中でも植物病理関係はわずか20~30人前後であり、あとはすべて医学部・理学部関係の研究者と、異分野の方々ばかりであったが、むしろ視野を広める良い機会となった。

学会長はフランスボルドー第II大学(INRA)分子細胞生物学研究室教授のJ. M. Bové(図-1)で、彼は植物病原の一つであるスピロプラズマの研究者としてよく知られており、その意味でも今回の学会がMLOの研究分

野にとって重要な局面となることは事前に予測されていたことではあった。

本稿では、誌面の都合で、速報的な意味を持った内容にさせていただくため、すべての範囲にわたってご紹介するのはまた別の機会にゆずることとして、今学会で特記すべきMLO関連の報告・決定事項について、その概略をご報告させていただくことでお許し戴きたい。

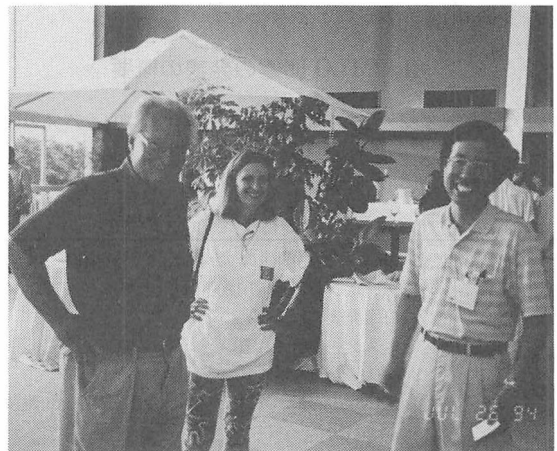


図-1 会長の J. M. Bové 夫婦

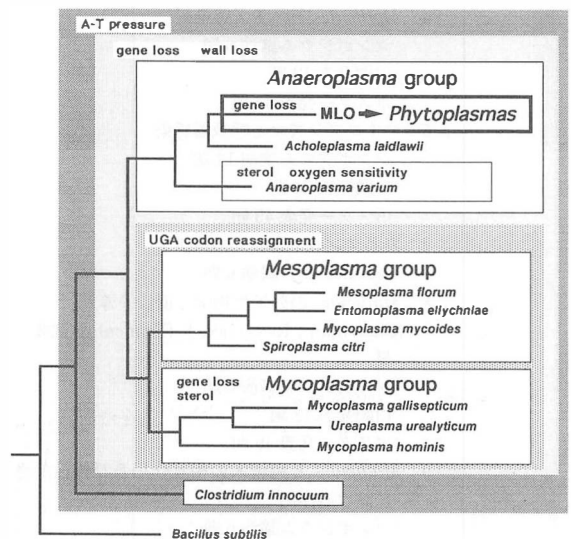


図-2 ファイトプラズマの分類学的位置

New Development in Research of Phytoplasmas. By Shigetou NAMBA

I MLO 研究の現状

従来 MLO の研究は主に病徴の記述や、電子顕微鏡観察、虫媒伝搬実験など手間と労力・時間のかかる手法により行われてきた。既に多数の植物種で病気が報告されているが、相互の比較が困難なため、それぞれ別の病名がつけられているのが現状である。昨年、我々は各種の MLO の 16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統学的解析を行い、その結果、MLO が動物マイコプラズマやスピロプラズマとは異なる微生物群であり、アコレプラズマに近縁で系統学的に大きな変異幅を有しながらも、一つの大きな微生物群であることを報告した (図-2) (NAMBA et al., 1993)。その後1年足らずの間にこの種の研究が世界各国で急速に進展し、今回の学会で、未発表のデータが多数報告されることとなった。

II MLO 関連の発表の概要

まずシンポジウムでは (表-1, 2), 最初にアメリカ

表-1 学会のプログラム構成及び演題数

セッション 1-2: ヒト・動物関係の <i>Mollicutes</i> の感染症 シンポジウム講演 12 題 口頭発表 23 題 ポスター発表 91 題
3: ファイトプラズマの系統学 (Chairman: KIRKPATRICK, B. (USA) & 難波成任)* シンポジウム講演 4 題 口頭発表 12 題 ポスター発表 40 題
4: <i>Mollicutes</i> とエイズ感染 シンポジウム講演 6 題 口頭発表 12 題 ポスター発表 44 題
5-6: マイコプラズマと呼吸器感染 シンポジウム講演 14 題 口頭発表 24 題 ポスター発表 45 題
7: 表面タンパク質とその遺伝子 シンポジウム講演 6 題
8: <i>Mollicutes</i> の分子生物学と遺伝子導入 (Chairman: RENAUDIN, J. (France) & 武藤 旻) シンポジウム講演 6 題 口頭発表 12 題 ポスター発表 40 題
9: <i>Mollicutes</i> と免疫系の相互作用及び慢性疾患における作用 シンポジウム講演 6 題

*日本人 Chairman のあるもののみ挙げた。

(ベルツピル) USDA の Dr. DAVIS らのグループが、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅による MLO の分類学的な再考察の提唱を行った。彼らはそれまで 16S rRNA 遺伝子の一部を PCR 増幅し、多数の制限酵素を用いて切断し、その泳動パターンを解析し分類を試みてきたが、診断には有効であっても、分類学的な解析には塩基配列を調べるのが最適であると述べ、その結果を報告した。その時点ではまだすべての解析を終えていないとのことであったが、途中経過として、MLO は約 11 のグループに分類されることを報告した。彼らは最後に、MLO が「目 (order)」レベルで *Acholeplasma* 目をはじめとする他の *Mollicutes* 綱の細菌とは独立させて分類すべきであると提唱して講演を終えた。続いて、ドイツ樹木保護研の Dr. SEEMÜLLER らのグループは全く同様に 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いて、MLO が五つのグループに分類されることを報告した。その中には我々の報告したアジアの MLO のデータも含まれていたが、我々の報告していた II 群を III 群に、III 群を IV 群としている点が異なっていた。しかし、この報告をめぐって、研究者ごとに分類の名称が異なることにより今後生ずるで

表-2 セッション3「ファイトプラズマの系統学」の構成

シンポジウム講演「ファイトプラズマの系統学」
1. GUNDERSEN, D. E., LEE, I-M., REHNER, S. A., DAVIS, R. E. and KINGBURY, D. T. Phylogeny of mycoplasma-like organisms: a basis for establishing their taxonomy.
2. SEEMÜLLER, E., SCHNEIDER, B., MÄURER, R., AHREUS, U., DAIRE, X., KISON, H., LORENZ, K-H., HOFFMAN, A., FIRAQ, G., AVINENT, L. and STACKEBRANDT, E. Phylogenetic classification of plant-pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA.
3. NAMBA, S., NAKASHIMA, K., KIM, Y-H., OKAMOTO, H., SATO, M. and IWANAMI, S. Phylogenetic diversity of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms (MLOs) in Asia using PCR amplification of 16S rRNA genes.
4. KIRKPATRICK, B., SMART, C., GAEDNER, S., GAO, J-L., AHREUS, U., MÄURER, R., SCHNEIDER, B., LORENZ, K-H., SEEMÜLLER, E., HARRISON, N., NAMBA, S. and DAIRE, X. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences.
口頭発表「ファイトプラズマ」
ポスター発表 (1)「ファイトプラズマ: 検出・分類・系統解析」 (2)「ファイトプラズマ: その他」

あろう不便さを問題とする発言が相次いだ。

次に我々のグループの報告が続いた。我々は、既に印刷になったデータ (NAMBA et al., 1993) のほかに、東南アジアの MLO、韓国と日本のナツメてんぐ巢病など異なる地域に発生する共通した病気の MLO の比較、それに最新のデータベース検索から得られたデータを併せて行った解析から、アジアの MLO は少なくとも四つの群に分類され、その他の地域の MLO と合わせると少なくとも 5 群に分けられること、またこれらの解析から、MLO はマイコプラズマとは系統分類上異なり、むしろファイトプラズマと呼称したほうがふさわしいことを提案した。

最後に、アメリカ (デービス) カリフォルニア大の Dr. KIRKPATRICK が、16/23S rRNA スペーサー領域の遺伝子を PCR 増幅し、塩基配列を決定したのち系統解析を行ったところ、16S rRNA 遺伝子による解析結果とほぼ同様な結果が得られたことを報告した。しかしその一部が 16S rRNA 遺伝子の結果と異なることや、用いる配列サイズの短さなどから、この手法は迅速な簡易分類に最適であるとした。また討論の中で、この方法が「種」以下の分類に相当であることが示唆された。

このほか、口頭発表及びポスター発表では、病気の発生の報告や、血清学的手法による検出等の内容をすべて含めて数えても、その半数を超える発表が 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅による検出・診断・分類に関するものであった。このほか、MLO の膜タンパク質遺伝子のクローニングや、MLO 感染組織からのキチナーゼの精製、IC-PCR による MLO の検出などの発表もあった。

III MLO 分類の新展開

これらの発表を受けて、翌日早朝から MLOs & Non-Spiroplasma Mollicutes in Plants & Insects Team のメンバー (表-3) が集まって、MLO に対する今後の分類学的な扱いをめぐる討議が行われた。このグループは、Dr. KIRKPATRICK を中心に、MLO の分子系統学的な研究を行っている世界中の研究者 19 人によって組織されている。

討議では活発な意見がかわされた。MLO はもはや現状にふさわしくない俗称であるとの認識が満場一致で了承され、ファイトプラズマ (phytoplasma, phyto: 植物, plasma: もの) が提案された (図-2, 3)。MLO が昆虫由来であるか植物由来であるかはいまだ議論のあるところであるが、それは今後の研究にゆだねることとし、以後「ファイトプラズマ」という俗称を採用することが承認された。16S rRNA 遺伝子の解析により、ファイトプラズマの中でも予想以上に系統学的に大きな変異のあ

ることが明らかになり、それぞれの clade ごとに、便宜上 I 群、II 群などの名称により分類・整理する試みが行われていたわけであるが (NAMBA et al., 1993)、今回の国際学会の発表で、これとはまた異なった番号が振られるものがいくつか現れ、紛らわしくなってきた。そこで、今後の研究上の混乱を避けるためにも、暫定的に学名 (Candidative genus name and species name) をつけることが提案され、属名を *Phytoplasma* とすることが承認された。その結果は、最終日に開催された Mollicute Taxonomy Subcommittee of the International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) において承認され、最終的に本委員会に図られ、proceedings に報告される予定となっている。

なおこのチームは、この時点をもって Phytoplasma Working Team と改称された。

表-3 ファイトプラズマワーキングチームのメンバー (アルファベット順)

Head: KIRKPATRICK, B. C. (USA)	
Members:	
BOUDON-PADIEU, E. (France)	GARNIER, M. (France)
CHEN, T. A. (USA)	HACKETT, K. (USA)
CHANG, C. -J. (USA)	HARRISON, N. (USA)
CLARK, M. F. (England)	HIRUKI, C. (Canada)
COUSIN, M. -T. (France)	LEE, I. -M. (USA)
DAVIS, R. E. (USA)	NAMBA, S. (Japan)
DA FALLA, G. A. (Sudan)	SEARS, B. (USA)
FIRRAO, G. (Italy)	SEEMÜLLER, E. (Germany)
FLETCHER, J. (USA)	SINHA, R. (Canada)

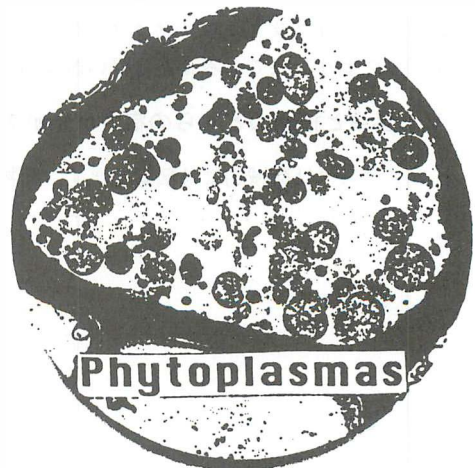


図-3 ファイトプラズマへの改称をアピールするために配られたバッジ。いかにもあちら風の発想である。

IV 今後の展望

Mollicutes の細菌は、地球上で最も小さなゲノムを持つ生命体であり、そのサイズは 600kbp 以下のものもある。これらの細菌は細胞壁を欠いている上に、DNA 修復やある種のアミノ酸・脂肪酸・リピッドの合成遺伝子を欠損しており、それは、*Mollicutes* の複雑な栄養要求性や病原菌及び腐生菌に特異的な生態学的住み分けを反映したものと考えられる。

ファイトプラズマはここ数年で急速に進展した遺伝子レベルの研究により新たな発展段階を迎えたといえる。その成果の一つが「ファイトプラズマ」への改称であり、この学会の主たる成果の一つであったといえる。ファイトプラズマは植物病原性スピロプラズマと生態学的に見て多くの類似点を有している一方で、系統学的には明らかに異なり、培養できていない点でもスピロプラズマとは異なる。

栄養要求性や形態学的な性状のみに頼って原核微生物を分類しようとするが見誤ることがある。例えば、数年前、細胞壁を欠く *Thermoplasma* 属 (*Thermoplasma acidophilum*) は、当初誤って *Mollicutes* に分類された。実際は細胞壁を欠く archaeobacterium であった。その後の生化学的及び分子生物学的研究により、*Thermoplasma* は *Mollicutes* よりも *Archaeobacteria* により似ていることがわかり、この属は再分類された。したがって文頭で述べたように、ファイトプラズマを用いた実験の困難さをかながみれば、分類学的な研究がこれまで進まなかったのもやむを得なかったといえよう。しかし今や、ファイトプラズマはその分子生物学的・生化学的知見から明らかに *Mollicutes* 綱のメンバーであり、なおかつマイコプラズマやスピロプラズマよりもアコレプラズマにより近縁であることは疑いがない。

V 昆虫と植物のどちらの宿主が先か?

ファイトプラズマは機械的には伝搬できず、植物や昆

虫における垂直伝搬もないので、自然界で生き残るためには宿主植物も媒介昆虫も必須である。ファイトプラズマの宿主植物はこれまで被子植物しか知られておらず、このことは、その起源が明らかに比較的最近であることを示している。したがって、ファイトプラズマは吸汁とともに、新規なしかし快適な環境である節部へと移行した昆虫の病原かあるいは共生生物から派生したものかもしれない。ファイトプラズマに最も近縁なアコレプラズマの多くが昆虫に寄生しており、植物表面に見いだされることから、植物と昆虫及び病原の間でより密接で特異的な関係を確立するチャンスは十分にあったはずである。ファイトプラズマの進化過程において生じた多様性は、その宿主である昆虫及び（または）植物の進化と共に並行したかあるいはむしろ急速に起こり、他の現存する宿主に適応するかたちで生まれたものかもしれない。しかしファイトプラズマのこのような高度な変異性があったからこそ、幸いにも遺伝子の欠失が起こり、栄養要求性が高まったため、生息場所が限定される結果となったのではないだろうか。

おわりに

ボルドーは歴史的な避暑地であり、会期中は数多くのツアーも用意されていたのであるが、滅多に触れることのない分野の興味深い発表が多く、特にシンポジウムの討論に時間が十分取ってあったために連日会場を回るのに奔走する有り様で、結局ツアーには一度しか参加できなかったのは残念であった。しかし研究者同士毎晩 12 時近くまで食事をしながらのディスカッションに花が咲き、有益な体験となった。また INRA (ボルドー) の共同研究者を訪ね、田舎ながら立派な施設を見学し、組織や運営システムについても情報を得ることができ、たまたま自分のところからモンペリエに留学してきていた助手がはるばる数百キロ車を駆って訪ねてきてくれるなど、短いながらも充実した旅であった。