

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：2019～2020

課題番号：19K15805

研究課題名(和文) ファイトプラズマのホストスイッチングを担う遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of gene expression involving host switching of phytoplasmas

研究代表者

二條 貴通(Nijo, Takamichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：80803139

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)：本研究では難培養性植物病原細菌ファイトプラズマの効率的な核酸配列解析系を構築した。先行研究において構築した、効率的かつ特異的なファイトプラズマRNA解析系を改良することで、より効率的にファイトプラズマの転写産物を解析することが可能になり、新規の転写産物を複数見出した。また、簡便かつ効率的なファイトプラズマゲノム解読系を構築し、本系を利用することで新規にファイトプラズマゲノムを決定した。さらに、媒介昆虫体内においてファイトプラズマを可視化する系を構築し、昆虫体内におけるファイトプラズマの増殖および動態を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、純粋培養系の確立していないファイトプラズマの効率的な転写産物解析系を構築したが、これはホストスイッチングに伴う遺伝子発現制御機構を解明する上で基盤的な役割を果たすツールである。また、構築した効率的なゲノム解読系を用いることで、遺伝情報が明らかになっていない各種ファイトプラズマのホストスイッチング機構解明に繋がることが期待される。さらに、媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの挙動が明らかになったことで、より詳細なホストスイッチング機構が明らかになることが見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we developed efficient methods for analyses of nucleic acids of phytoplasmas, obligate intracellular bacteria. An efficient and specific method for an analysis of phytoplasma RNA developed in previous study was modified in this project. As a result, we newly found several RNA transcripts of phytoplasma. We also developed an efficient method for enrichment of phytoplasma DNA, and newly determined a draft genome sequence of phytoplasma. Additionally, we developed an visualization method of phytoplasmas in insect vectors, and demonstrated spatiotemporal dynamics of phytoplasmas in insect vectors.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ 遺伝子発現制御 ホストスイッチング

## 1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマは1000種以上の多様な植物に感染する、篩部局在性の難培養性植物病原細菌である。ファイトプラズマ感染により、植物体の萎縮・黄化や枯死などが生じることから、ファイトプラズマ病は農業生産上大きな問題となっている。しかしながら、これまでにファイトプラズマに対して有効な防除法は確立されていない。

ファイトプラズマはヨコバイ等の篩部吸汁性昆虫により媒介され、昆虫体内でも増殖することが知られている(図1)。ファイトプラズマの植物-昆虫間ホストスイッチング機構を詳細に解明し、これをターゲットとすることにより、ファイトプラズマに対して有効な防除法を構築することが出来ると期待される。これまでに、ファイトプラズマは植物-昆虫間のホストスイッチングに伴い、全遺伝子の約1/3に相当する遺伝子の発現量を変動させることが、マイクロアレイ解析により明らかとなっている[PLoS One, 2011, 6:e23242]。したがって、ファイトプラズマはホストスイッチングに伴い遺伝子発現を劇的に変化させることで、植物と昆虫という全く異なる宿主環境に適応していると考えられる。

細菌の遺伝子発現制御に関与する因子の一つとして、シグマ因子が知られている。シグマ因子は転写因子の一種であり、RNAポリメラーゼ(RNA polymerase; RNAP) コア酵素と複合体を形成し、遺伝子上流に存在する特定のプロモーター配列を認識することにより、その下流の転写開始点から mRNA 合成を開始させる。一般に、細菌のゲノムには複数種のシグマ因子がコードされており、シグマ因子の種類ごとに認識するプロモーター配列が異なる。したがって、細菌はシグマ因子を使い分けることによって遺伝子発現を変動させ、周囲の環境変化に適応している[Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69:527-543]。ファイトプラズマでは、2種類のシグマ因子がゲノム上にコードされており、これら2種類のシグマ因子を使い分けることによって、ホストスイッチングに伴う環境変化に適応していると考えられる[Nat Genet, 2004, 36:27-39]。しかしながら、純粋培養系が確立していないファイトプラズマにおいては、その遺伝子発現制御機構の詳細は不明であった。申請者は近年、ファイトプラズマのシグマ因子の一つである RpoD が発現制御を担うターゲット遺伝子を複数特定し、RpoD が認識するプロモーター配列を特定した[Sci Rep, 2015, 5:11893]。また、ファイトプラズマの転写産物を宿主由来の転写産物を除外し効率的かつ網羅的に解析可能な実験系を構築することに成功[DNA Cell Biol, 2017, 36:1081-1092]し、ファイトプラズマの遺伝子発現制御機構解明に向けた端緒を開いたことで、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ本研究では、純粋培養系の確立していないファイトプラズマについて、効率的な核酸配列解析系を用いることで、ファイトプラズマの転写産物の網羅的に解析することにより、ホストスイッチングにおける遺伝子発現制御機構を解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) ファイトプラズマ RNA の網羅的解析

ファイトプラズマ感染植物由来の RNA より、ファイトプラズマ由来の RNA を特異的かつ網羅的に解析するため、原核生物 RNA の 5'末端特異的な増幅手法を用いて cDNA ライブラリを作製し、次世代シーケンス解析を行った。

### (2) ファイトプラズマゲノム DNA の効率的解析系構築

ファイトプラズマ感染植物由来の DNA より、ファイトプラズマゲノム DNA を特異的かつ効率的に解析するため、真核生物と原核生物のゲノム DNA における CpG メチル化の有無を利用した DNA 精製系を利用し、ファイトプラズマ DNA の濃縮を行ったのち、次世代シーケンス解析によりファイトプラズマゲノムの解読を行った。

### (3) 媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの動態解析

ファイトプラズマの膜タンパク質に対する抗体を利用した免疫染色系を構築し、媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの可視化を行い、経時的に観察した。併せて、昆虫の各器官におけるファイトプラズマ蓄積量をリアルタイム PCR により定量した。

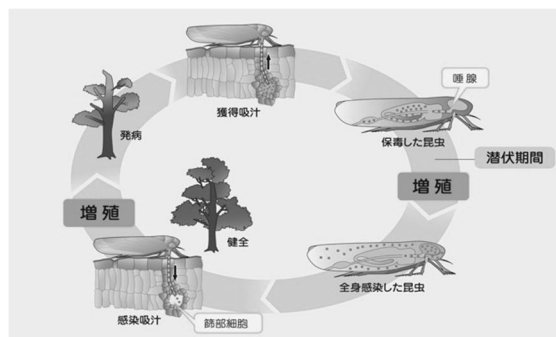


図1 ファイトプラズマのライフサイクル [PLoS One, 2011, 6:e23242, 一部改変]

#### 4. 研究成果

##### (1) ファイトプラズマ RNA の網羅的解析

‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ タマネギ萎黄病系統 (OY) 感染シュンギク由来の RNA を用いて、先行研究で構築した系によりファイトプラズマ RNA の網羅的解析を試みた。その結果、本系では rRNA や tRNA に由来する配列の割合が多いことが判明したため、使用する酵素を変更するなど系の改良を実施した。その結果、先に確立した系と比較して効率的にファイトプラズマの mRNA 由来の配列を解読可能なことが明らかとなった。また本研究により、新規の転写産物を複数見出すことに成功し、現在その詳細な解析を進めている。本系を利用することで、各種ファイトプラズマの転写産物を網羅的かつ効率的に解析することが可能になると考えられ、ファイトプラズマのホストスイッチングにおける遺伝子発現制御機構の解明に繋がることが期待される。また、本系を利用することで培養系の確立していない各種細菌についても、遺伝子発現制御機構の解明が期待される。

##### (2) ファイトプラズマゲノム DNA の効率的解析系構築

OY 感染シュンギク由来の DNA を用いて、真核生物と原核生物のゲノム DNA における CpG メチル化の有無を利用した DNA 精製系を利用してファイトプラズマゲノム DNA の簡便かつ効率的な濃縮系構築を試みた。本系により濃縮した DNA を次世代シーケンス解析に供試した結果、濃縮前の DNA と比較して OY 由来のシーケンスリードは 40 倍以上に向上し、効率的なゲノム解読が可能であることが示された (図 2)。また、本系を用いることで ‘*Ca. P. asteris*’ アジサイ葉化病系統 (HP) のドラフトゲノムを決定した (図 3)。純粋培養系の確立していないファイトプラズマでは、ゲノム解読が進んでいなかったが、本系により、ゲノム未解読のファイトプラズマ種についてもゲノム解読が容易になった。これにより各種ファイトプラズマにおけるホストスイッチング機構やこれに関わる遺伝子発現制御機構の解明に繋がることが期待される。

##### (3) 媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの動態解析

OY の膜タンパク質 Amp を標的とした免疫染色系を構築し、リアルタイム PCR による定量と併せることにより、媒介昆虫であるヒメフタテンヨコバイ体内における OY の挙動を明らかにした。OY は腸管からヒメフタテンヨコバイ体内に侵入し、増殖したのち血体腔を通じて全身に広がり、唾腺や脳に到達することが明らかになった。また、OY 感染昆虫の各器官における OY の遺伝子発現変動を明らかにするため、(1)において構築した RNA 解析系の適用について検討を進めている。本研究により、媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの詳細な動態や分布が明らかとなり、ホストスイッチングの詳細な機構解明に繋がることが期待される。

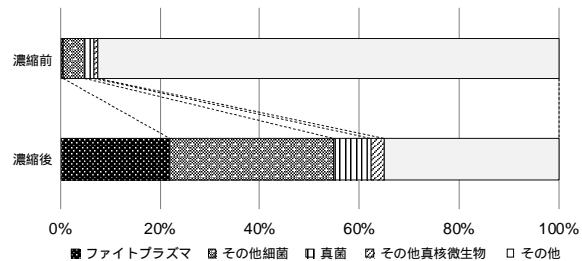


図 2 ファイトプラズマ DNA 濃縮系の利用有無によるシーケンスリード内訳の比較

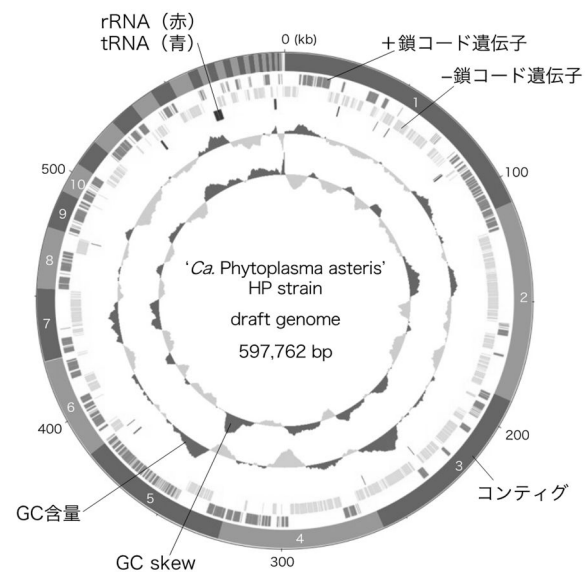


図 3 ‘*Ca. P. asteris*’ HP 系統のドラフトゲノム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tokuda Ryosuke, Nishikawa Masanobu, Hosoe Naoi, Nijo Takamichi, Iwabuchi Nozomu, Yoshida Tetsuya, Watanabe Kiyoto, Maejima Kensaku, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete genome sequence of a carrot torradovirus 1 isolate, obtained from Angelica keiskei in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00110-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00110-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa Masanobu, Tokuda Ryosuke, Yoshida Tetsuya, Nijo Takamichi, Maruyama Noriko, Katsu Kosuke, Maejima Kensaku, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete genome sequence of iris severe mosaic virus isolated in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00093-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00093-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Kitazawa Yugo, Miyatake Hideyuki, Nishikawa Masanobu, Tokuda Ryosuke, Koinuma Hiroaki, Miyazaki Akio, Nijo Takamichi, Oshima Kenro, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 513
2. 論文標題 Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 952-957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.060	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 -
1. 著者名 Koinuma Hiroaki, Maejima Kensaku, Tokuda Ryosuke, Kitazawa Yugo, Nijo Takamichi, Wei Wei, Kumita Kohei, Miyazaki Akio, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61042-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 柿澤茂行、二條貴通	4. 巻 3
2. 論文標題 ファイトプラズマの宿主特異性と遺伝子発現 (特集 ファイトプラズマとアグリバイオ)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1115-1120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Koinuma Hiroaki, Miyazaki Akio, Matsumoto Ouki, Suzuki Takumi, Nijo Takamichi, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Functional variation in phyllogen, a phylloidy inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1322-1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12981	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 -

1. 著者名 Katsu Kosuke, Nijo Takamichi, Yoshida Tetsuya, Okano Yukari, Nishikawa Masanobu, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Complete genome sequence of pleioblastus mosaic virus, a distinct member of the genus Potyvirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 645-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04916-9	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 -

1. 著者名 Nijo Takamichi, Iwabuchi Nozomu, Tokuda Ryosuke, Suzuki Takumi, Matsumoto Oki, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 87
2. 論文標題 Enrichment of phytoplasma genome DNA through a methyl-CpG binding domain-mediated method for efficient genome sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 154-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-00993-z	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 -

1. 著者名 Kumita Kohei, Kitazawa Yugo, Tokuda Ryosuke, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 87
2. 論文標題 First report of anthracnose on tillandsia caused by Colletotrichum sp. in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-00995-x	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 勝 浩介、吉田哲也、丸山紀子、二條貴通、西川雅展、徳田遼佑、前島健作、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 東京都内のタケ亜科植物から検出されたポティウイルスの全ゲノム配列解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北沢優悟、岩瀨 望、宮武秀行、鯉沼宏章、宮崎彰雄、二條貴通、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 ファイトプラズマの葉化誘導エフェクター「ファイロジェン」の立体構造
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩瀨 望、北沢優悟、二條貴通、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 ファイトプラズマのエフェクター「ファイロジェン」の葉化誘導能に関わる ヘリックス構造の重要性
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鯉沼宏章、魏 薇、徳田遼佑、北沢優悟、二條貴通、汲田幸平、宮崎彰雄、前島健作、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 媒介昆虫個体内におけるファイトプラズマの経時的動態解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二條貴通、岩淵望、徳田遼佑、鈴木拓海、松本旺樹、宮崎彰雄、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 フィールドサンプルからの効率的なファイトプラズマゲノム解読系の構築
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯉沼宏章、徳田遼佑、松本旺樹、北沢優悟、二條貴通、宮崎彰雄、前島健作、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 媒介昆虫の主要感染器官におけるファイトプラズマの時空間動態
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩淵望、北沢優悟、松本旺樹、鈴木拓海、宮崎彰雄、二條貴通、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 ファイトプラズマの葉化誘導因子ファイロジェンの網羅的探索
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北沢優悟、岩淵望、松本旺樹、鈴木拓海、鯉沼宏章、二條貴通、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンの葉化誘導能は1アミノ酸の多形によって制御される
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二條貴通、鈴木拓海、岩淵望、徳田遼佑、松本旺樹、宮崎彰雄、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 効率的なゲノム解読に向けたファイトプラズマDNA濃縮系の構築
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 鈴木拓海、二條貴通、徳田遼佑、岩淵望、松本旺樹、宮崎彰雄、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 アジサイ葉化病ファイトプラズマHP系統のドラフトゲノム解析
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 徳田遼佑、鯉沼宏章、魏薇、北沢優悟、二條貴通、宮崎彰雄、前島健作、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 媒介昆虫体内におけるファイトプラズマの局在・量的変動解析
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 鯉沼宏章、徳田遼佑、松本旺樹、北沢優悟、二條貴通、宮崎彰雄、前島健作、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 媒介昆虫の主要感染器官におけるファイトプラズマの感染過程の可視化
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 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

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------