

令和 3 年 5 月 6 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：19K15840

研究課題名(和文) 病原性因子ファイロジェンが有する多機能性の基盤となる分子機構の研究

研究課題名(英文) Research on the molecular mechanism of phyllogen, a multi-functional bacterial effector

研究代表者

北沢 優悟 (Kitazawa, Yugo)

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：50803160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物病原細菌ファイトプラスズマが分泌する花器官葉化誘導因子ファイロジェンが、葉化以外に昆虫誘因能などを示すことに着目し、この多機能性の根底にある分子的機能の解明を目指した。ファイロジェンが標的とする宿主因子のスクリーニングを行い、既知の花器官形成関連因子に加え、昆虫応答関連因子を含む様々な宿主因子にファイロジェンが結合し、その分解を誘導することが判明した。さらに、多種のファイトプラスズマからファイロジェンを同定し機能を比較したところ、その機能には差異が見受けられ、ファイトプラスズマごとにファイロジェンの機能が多様化していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトプラスズマにとって、媒介昆虫を介した感染植物から他植物への伝搬は生存のための最重要課題である。本研究では花器官葉化因子であり昆虫誘因因子としても知られるファイロジェンの機能解析の結果、当該多機能性を支配する分子機構の解明につながる新規標的因子を同定したものであり、植物-昆虫間を交互に感染するファイトプラスズマの感染戦略の解明につながる。さらに本研究ではファイトプラスズマ間でファイロジェンの機能が多様化していることを示しており、本成果はファイトプラスズマが世界中で様々な植物に感染する上で環境適応を如何に成し遂げたかを解明する端緒となりうる。

研究成果の概要(英文)：Phyllogen, which is secreted by phytoplasmas, not only induces phyllody of flowers but enhances insect colonization on plants. However, mechanisms underlying the multifunctionality of the protein remain unelucidated. In this study, we screened host factors targeted by phyllogens. The results showed that phyllogens bind to and induce degradation of various host factors including those related to insect resistance in addition to those related to flower development. Furthermore, we identified phyllogens from various phytoplasmas and compared their functions. The results showed functional differences among the phyllogens, suggesting that the functions of phyllogens may be diversified among phytoplasmas and contribute to environmental adaptation.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラスズマ ファイロジェン

1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマは、ヨコバイなどの吸汁性昆虫に媒介され植物の篩部細胞に寄生する病原細菌である。世界中で 1000 種を超える植物に感染し大きな経済被害を与えているため、その防除が喫緊の課題である。その一方で、ファイトプラズマは退行的進化を遂げ、限られた遺伝子しか持っていない。したがって数少ない遺伝子で宿主適応・感染拡大を果たしていると想定され、そのメカニズムの解明が待たれている。

植物の花が葉のように変化する「葉化」は、ファイトプラズマ特有の症状である。葉化誘導因子としてファイトプラズマが分泌するタンパク質「ファイロジェン」が同定されており、ファイロジェンは植物の花器官形成に関わる「MADS-box 転写因子 (MTF)」のプロテアソームを介した分解を誘導することで花器官形成プロセスを阻害する。興味深いことに、ファイロジェンの機能は葉化誘導のみに留まらず、例えば発現植物に媒介昆虫を誘引する作用があることが知られている。この昆虫誘引は葉化とは独立した現象と考えられており、ファイロジェンは花器官形成因子を標的とする葉化誘導因子であると同時に、異なる機構で「昆虫誘引因子」としても機能する特異なタンパク質であると言える。ファイトプラズマが昆虫媒介性であることから、昆虫誘引因子としてのファイロジェンもまた極めて重要な生物学的意義を果たしているはずだが、ファイロジェンの多機能性の根底にある分子的機能は全く明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、多機能性因子であるファイロジェンの機能を解明・再解釈し、本因子がファイトプラズマの感染環において果たす役割を包括的に理解することを目的とする。特に昆虫誘引因子としての機能に着目してファイロジェンの機能解析を行うことを企図する。上述したように、これまでファイロジェンは MTF の分解誘導活性を持つことが示されてきたが、MTF と植物の昆虫誘引性を結びつける知見は皆無であり、既存の知見をもとにファイロジェンの昆虫誘引機構を推察することは出来ない。申請者は、ファイロジェンが MTF 中の特定の領域 (K ドメイン; 2つのヘリックスがループで繋がれた構造) と結合、分解を誘導することに着目し、類似したヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有する広範な宿主因子をファイロジェンが標的とすることで多機能性を獲得したという仮説を立てた。とりわけそのようなタンパク質の中には、昆虫への防御応答に関連する因子が報告されていることから、ファイロジェンが MTF に加え当該宿主因子を標的としている可能性を考え、これを検証することを本研究の主眼とした。加えて様々なファイトプラズマからファイロジェンを探索、機能を比較することで、ファイロジェンが有する機能の普遍性や機能分化の有無の検証を行った。

3. 研究の方法

ヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有する様々なシロイヌナズナ因子をクローニングし、ファイロジェンの標的となるかを検証した。検証には YFP を用いた生細胞内イメージングをウェスタンブロットティングによるタンパク質の定量実験と併用し、植物細胞内で宿主因子をファイロジェンと共発現させて分解誘導が生じるかを検証した。また Yeast two hybrid (Y2H) によるファイロジェンと相互作用する宿主因子の網羅的探索も行った。ファイロジェンによる分解誘導が確認された因子について、その標的領域の絞り込みを行い、網羅的発現抑制系を構築することを試みた。

また、ファイロジェンの機能に重要な保存領域にプライマーを設計し、様々なファイトプラズマから効率的にファイロジェンを探索した。同定したファイロジェンをウイルスベクターを用いて植物に発現させ、その影響を解析した。

4. 研究成果

ファイロジェンの標的となるシロイヌナズナ因子の網羅的な探索により、既知の標的宿主因子である花形成関連 MTF に加え、類似構造を有する様々な新規因子がファイロジェンの標的となり植物細胞内で分解を誘導されることが明らかとなった。また Y2H によるスクリーニングにおいても多様な宿主因子がファイロジェンと相互作用することが確認され、ファイロジェンが多岐にわたる宿主因子を MTF 同様に分解誘導している可能性が示唆された。新たに標的として同定したのものには、イネにおいて JA 応答や害虫の食害への応答に関わる basic helix-loop-helix 転写因子のホモログが含まれており、当該因子がファイロジェンによって分解誘導されることも確認された。以上より当初の想定通り、ファイロジェンがヘリックス-ループ-ヘリックス構造を有する様々な宿主因子の分解誘導を介して、植物の昆虫誘引性を制御している可能性が強く示唆された。

以上の結果を踏まえ標的宿主因子群の分解誘導による影響を検証するため、当該因子群におけるファイロジェンが共通して結合する領域を絞り込み、植物における網羅的発現抑制系を構築することを試みた。しかしながら、標的因子が当初の想定より多岐にわたり、構造上の類似性は認められるものの共通の結合モチーフの特定には至らず、網羅的発現抑制系の構築は困難で

あった。そこで、異なるアプローチからファイロジェンの分子的機能の解明を進めるため、様々な地域、植物を由来とするファイトプラズマからファイロジェンを探索し、その機能の保存性を解析した。ファイロジェンの機能に重要な保存領域を標的とした遺伝子増幅法に基づく効率的な探索系により、これまでファイロジェンが発見されていなかった種を含む9種25系統のファイトプラズマから新たにファイロジェンホモログを同定し、既知のファイロジェンを含めた比較解析を行った。その結果、ファイロジェンの機能についてホモログ間で差異が見られ、最も顕著な事例としては葉化誘導能を喪失したファイロジェンホモログが複数見出された。これらのファイロジェンは1アミノ酸の多型によって、花形成関連 MTF との相互作用能を失っており、本アミノ酸が標的因子との相互作用に重要であることが明らかとなった。一方でこのような機能的な差異とは相反して、ホモログ間での基本的なタンパク質構造やプロテアソーム関連因子である RAD23 との結合能は保持されていた。このことから、いずれのホモログも基本的な機能は維持しており、相互作用する宿主因子を変化させることで機能を分化させている可能性が示唆された。本知見はファイロジェンを用いた環境適応戦略を理解する上で非常に重要と考えられる。

以上より、本研究ではファイロジェンが花形成関連 MTF だけでなく、昆虫応答関連因子を含む構造的に類似した幅広い因子を標的としていること、ファイロジェンホモログ間で機能分化が生じていることを明らかとした。今後は、ファイロジェンホモログ間の標的宿主因子、植物に与える影響をさらに比較解析することで、ファイロジェンに共通の根幹をなす機能の有無や、機能分化を及ぼす原因となった分子メカニズムの解明が進展すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

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 phyllody 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 前島健作、北沢優悟	4. 巻 3
2. 論文標題 ファイトプラズマの病原性と治療技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1108-1114
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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 松本旺樹・岩淵望・北沢優悟・鈴木拓海・鯉沼宏章・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 葉化誘導能をもたないファイロジェングループの特定
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アミノ酸の多型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 北沢優悟・岩淵望・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 岩淵望・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 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Miyatake Hideyuki, Nishikawa Masanobu, Tokuda Ryosuke, Oshima Kenro, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou
2. 発表標題 Structural analysis of phyllogen, a phyllody-inducing effector, revealed the importance of two conserved-helices.
3. 学会等名 4th Meeting of the International Phytoplasmologist Working Group (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------