

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22562

研究課題名（和文）花の葉化誘導ペプチド「ファイロジェン」の非葉化型バリエーションを用いた新規機能の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of phyllogen, a phyllody-inducing peptide, using non-phyllody-inducing variants

研究代表者

岩淵 望（Iwabuchi, Nozomu）

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：00888753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ファイトプラズマのもつ花の葉化誘導ペプチド「ファイロジェン」の新規機能の解明を目的とした。まず葉化以外の植物体への影響を解析するため、「非葉化型」および「葉化型」ファイロジェンの形質転換体を作成するとともに、ウイルスベクターによる簡便かつ効率的なタンパク質発現系を構築した。また、ファイロジェン遺伝子の多様性を明らかにするため、ファイトプラズマの効率的なゲノム解析法を構築した。さらに、ファイロジェンの新たな分子機能を解明するため、「非葉化型」ファイロジェンと相互作用する新規宿主因子を同定し、ファイロジェンによる宿主因子の分解機構を詳細に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作出したファイロジェン遺伝子の形質転換体およびウイルスベクターを用いた植物体への簡便かつ迅速なタンパク質発現系を目的に応じて使い分けていくことで、ファイロジェンによる植物体への様々な影響を詳細に解析可能であることが期待される。また、構築したファイトプラズマゲノムの効率的な解読法を用いることで、ファイロジェン遺伝子の多様性および機能分化への理解が進むことが期待される。さらに、ファイロジェンと相互作用する新規宿主因子や既存の宿主因子の分解機構を詳細に解明したことから、本研究はファイロジェンの新規機能の解明に向けた基盤的知見となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to elucidate the novel function of phyllogen, a phyllody-inducing peptide in phytoplasmas. To elucidate novel effects on plants, we constructed transgenic plants of phyllogen genes and a simple and efficient protein expression system using viral vectors. In addition, we developed an efficient genome sequencing method to reveal the diversity of phyllogen genes. To elucidate the novel molecular function of phyllogen, we identified novel host factors that interact with a non-phyllody inducing phyllogen and analyzed the degradation mechanism of host factors by phyllogen in detail.

研究分野：植物保護科学

キーワード：ファイトプラズマ 葉化 ファイロジェン エフェクター

## 1. 研究開始当初の背景

病原体から分泌される多種多様なタンパク質(エフェクター)は宿主の様々な細胞機能を改変し、感染に有利な環境を作り出すため、エフェクターの機能分化や多様化は病原体の進化を理解する上で重要である[Trends Microbiol (2020) 28:523-535]。しかし、これまでにひとつのエフェクターファミリーに関して機能を統合的に解析し、ファミリー内部での多様化、機能分化の道筋について理解を試みている事例は少ない。ファイトプラズマは昆虫によって媒介され、世界中の作物生産に甚大な被害を及ぼす植物病原菌である。そのエフェクターの1つであるファイロジェンは植物の花形成に関わる MADS-box 転写因子(MTF)に結合しプロテアソームを介した分解を誘導することで、ファイトプラズマに共通の症状の1つ、花の「葉化」を引き起こす[The Plant Journal (2014) 78, 541-554]。ファイトプラズマは退行的進化を遂げた細菌であり、生存に必須な限られた遺伝子しか持っていない。そのため、ファイトプラズマ間で高度に保存されるファイロジェンは病原体進化において重要な役割を担うと考えられる。

これまでに、ファイロジェンは花形成以外を制御する MTF と結合することが報告されているため[PLoS Biol (2014) 12, e1001835]、実際は植物のあらゆる生育過程で影響を及ぼしており、葉化はその一端に過ぎない可能性が高い。また、ファイトプラズマを媒介する昆虫の誘引など葉化に非依存的な機能も報告されている[Front. Plant Sci (2016) 7:885]。以上のことから、ファイロジェンは様々な機能を獲得・喪失したことでファイトプラズマの宿主適応に貢献した可能性が高いが、これまでの研究は「葉化」のみに注目されてきたため、機能分化の詳細な分子機構は未解明のままである。申請者は網羅的なファイロジェン遺伝子の機能解析により、わずか1アミノ酸の多型により葉化誘導能を失った「非葉化型」ファイロジェンが複数のファイトプラズマに保存されることを見出した[Mol Plant Pathol (2020) 21:1322-1336]。「非葉化型」ファイロジェンは基本的な立体構造や宿主因子との結合活性を保持しつつも標的 MTF との特異性が変化していたことから、葉化誘導とは独立の新しい標的と機能をもつことが想定され、エフェクターを用いた病原体進化の観点から極めて興味深い。

## 2. 研究の目的

本研究では、「非葉化型」ファイロジェンに着目し、葉化とは独立したファイロジェンの新規機能とその分子機構の解明を目指す。これまでにファイロジェンは葉化誘導だけでなく媒介昆虫の誘引に関わるなど、その多機能性が示唆されているが、葉化誘導と完全に切り分けて解析することは困難であった。本研究では、申請者が独自に発見した「非葉化型」ファイロジェンを用いることで、この問題の解決が可能である。

## 3. 研究の方法

(1) 「葉化型」および「非葉化型」ファイロジェンによる植物体への様々な影響を比較検証するため、野生型シロイヌナズナにそれぞれのファイロジェン遺伝子を形質転換し、継代していくことでホモ系統の作製を行う。植物体への形質転換には時間と労力がかかるため、それと並行してウイルスベクターとして様々な植物で利用されるタバコ茎えそウイルスベクターを用いたタンパク質の効率的発現系の構築を行う。

(2) 様々なファイトプラズマのゲノム情報からファイロジェンの機能分化や多様化を網羅的に解析するため、感染植物 DNA からファイトプラズマゲノム濃縮系を構築し、フィールドサンプル由来のファイトプラズマゲノムの解読を行う。

(3) ファイロジェンの新たな分子機能を解明するため、yeast two hybrid 法を用いて、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーから「非葉化型」ファイロジェンと結合する宿主因子を網羅的に探索するとともに、宿主因子の分解機構を詳細に解析する。

## 4. 研究成果

(1) 野生型シロイヌナズナに「非葉化型」に加えて、「葉化型」ファイロジェン遺伝子の形質転換を行い、継代していくことでホモ系統を得ることができたため、「葉化型」および「非葉化型」ファイロジェンによる植物体への様々な影響を比較検証することが可能となった。また、口蹄疫ウイルスの 2A ペプチド遺伝子を用いてタバコ茎えそウイルスベクターを用いたタンパク質発現系を改変し、植物体への簡便かつ迅速なエフェクター発現系を構築した。いずれもファイロジェンの機能を比較するための実験系として有用であり、目的に応じて使い分けていくことでファイロジェンによる植物体への影響を詳細に解析可能であることが期待される。

(2) ファイトプラズマ感染植物由来の全 DNA から真核生物に特有の CpG メチル化 DNA を除去することで、原核生物であるファイトプラズマの DNA を濃縮することに成功した。濃縮したファイトプラズマゲノムを用いて希少なフィールドサンプル由来のアジサイ葉化病ファイトプラズマのドラフトゲノムを効率的に決定し、ファイロジェンを含む 13 遺伝子のエフェクターを同定した。今後、本手法により様々なファイトプラズマゲノムを解読することで、ファイロジェンを含むエフェクターの多様性および機能分化への理解が進むことが期待される。

(3) 「非葉化型」ファイロジェンと相互作用する宿主因子の探索の結果、ファイロジェンは MTF に加えて、多様な宿主因子と結合することが明らかになった。そこで、特定した因子との結合がファイロジェンに共通の機能かどうか検証するため、「葉化型」ファイロジェンとの相互作用を解析したところ、当該因子の中には「葉化型」ファイロジェンとも相互作用とする因子と「非葉化型」のみが相互作用する因子が含まれることが明らかになった。続けて、植物細胞内で特定した因子を「非葉化型」ファイロジェンと同時に発現させ、分解誘導されるかどうか検証したところ、一部の因子は「非葉化型」ファイロジェンにより分解されることが明らかになった。以上より、「非葉化型」ファイロジェンは MTF とは異なる新しい標的をもつことが明らかになり、葉化誘導とは独立したファイロジェンの新たな機能の解明に向けた基盤的知見を得ることができた。

加えて、ファイロジェンが多様な宿主因子を同一の機構で分解を誘導するかどうか検証するため、「葉化型」ファイロジェンが MTF を分解するメカニズムについてより詳細に解析した。その結果、MTF はファイロジェンを介してプロテアソームとユビキチン化タンパク質の両方を認識するシャトル分子の一種である RAD23 と相互作用し、複合体を形成した。さらに、この複合体に含まれるファイロジェンはユビキチン化される一方で、このユビキチン化は MTF の分解に必須でないことが明らかになった。以上より、ファイロジェンはユビキチンの代わりに標的 MTF と RAD23 に結合し、両タンパク質の相互作用を直接仲介することで、標的因子のユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を誘導すると考えられた。「非葉化型」ファイロジェンでは MTF との結合特異性が変化しているものの、MTF との結合に重要な立体構造と RAD23 との結合性は維持されている。そのため、今後新しく同定した宿主因子がファイロジェンによってユビキチン非依存的に分解されるかどうかを検証していくことでファイロジェンの新規機能をより詳細に解析できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 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 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Sasano Momoka, Matsumoto Oki, Koinuma Hiroaki, Tokuda Ryosuke, Suzuki Masato, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 A phytoplasma effector acts as a ubiquitin-like mediator between floral MADS-box proteins and proteasome shuttle proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1709-1723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac062	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 Suzuki Takumi, Iwabuchi Nozomu, Tokuda Ryosuke, Matsumoto Oki, Yoshida Tetsuya, Nishikawa Masanobu, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Mirabilis Crinkle Mosaic Virus Isolated from Pokeweed in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0028321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00283-21	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北沢優悟, 松本旺樹, 岩淵望, 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 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 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 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 アジサイ葉化病ファイトプラズマ 'Candidatus Phytoplasma asteris' HP系統のドラフトゲノム解析
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, 前島健作, 大島研郎, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 タバコ茎えそウイルスベクターを用いたシロイヌナズナにおけるファイトプラズマエフェクター効率的発現系の構築
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会 関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本旺樹, 北沢優悟, 岩淵望, 鯉沼宏章, 鈴木誠人, 徳田遼佑, 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と2種類の宿主因子による三者複合体の検出
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北沢優悟, 岩淵望, 松本旺樹, 鈴木誠人, 笹野百花, 前島健作, 大島研郎, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンは標的宿主因子のユピキチン非依存的なプロテアソーム分解により葉化を誘導する
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木誠人, 北沢優悟, 岩淵望, 松本旺樹, 山本桐也, 前島健作, 大島研郎, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンは宿主因子の保存領域を相互作用の標的とする
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木拓海, 岩淵望, 徳田遼佑, 松本旺樹, 吉田哲也, 西川雅展, 前島健作, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 mirabilis crinkle mosaic virus によるヨウシュヤマゴボウ縮葉モザイク病 (新称)
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前島健作, 宮崎彰雄, 丹野和幸, 鈴木拓海, 鯉沼宏章, 岩淵望, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 ファイトブラズマ研究の温故知新: 治療薬の試験管内スクリーニング
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北沢優悟, 岩淵望, 宮武秀行, 徳田遼佑, 鯉沼宏章, 前島健作, 大島研郎, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 ファイトブラズマの花器官葉化誘導因子ファイロジェンの立体構造解析
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
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, 鈴木寛人, 前島健作, 大島研郎, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 網羅的探索法による多様なファイロジェン遺伝子の同定
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
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, 鈴木誠人, 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と葉化誘導能を制御する1アミノ酸多型の特定
3. 学会等名 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
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 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
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 第48回日本マイコプラズマ学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>葉化病の病原タンパク質「ファイロジェン」の機能は1アミノ酸の変異で制御される  <a href="https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20200819-2.html">https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20200819-2.html</a></p> <p>タンパク質の新たな分解システム ファイロジェンによる葉化誘導メカニズム解明で発見!  <a href="https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20220302-1.html">https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20220302-1.html</a></p>
--

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
---------	---------