

令和 4 年 5 月 30 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：20K22577

研究課題名（和文）遺伝子発現の時空間的変動に基づくファイトプラズマの昆虫適応機構の解明

研究課題名（英文）Gene expression analysis of phytoplasmas in insect tissues

研究代表者

鯉沼 宏章 (Koinuma, Hiroaki)

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：00884686

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、培養系が確立されていない植物病原細菌ファイトプラズマの昆虫組織における遺伝子発現変動解析を実施した。昆虫1個体から解剖した組織ごとの遺伝子発現解析系を構築し、本系を利用してファイトプラズマ遺伝子の経時的な発現解析を行うことで、昆虫体内で発現変動の特徴的なファイトプラズマ遺伝子を複数見出した。さらに、植物体内でファイトプラズマが分泌し、昆虫誘引に関わるエフェクターについて機能解析を行い、1アミノ酸の変異がエフェクターの機能を決定していること、およびユビキチンを介さずに標的タンパク質をプロテアソームへと輸送し分解していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトプラズマのライフサイクルにおいて、媒介昆虫を介した感染植物から他植物への伝搬は極めて重要である。本研究では昆虫組織ごとのファイトプラズマ遺伝子発現解析系を構築したが、これはファイトプラズマの昆虫媒介機構を解析する上で基盤的な役割を果たすツールである。また、本系を利用して発現変動の特徴的なファイトプラズマ遺伝子を複数特定したことから、昆虫組織における適応戦略の解明に繋がる。さらに昆虫誘引に関わるエフェクターの標的タンパク質分解メカニズムが明らかになったことで、植物と昆虫を行き来するファイトプラズマのライフサイクルの包括的な理解に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Phytoplasmas are transmitted by insect vectors in a persistent propagative manner. However, detailed mechanisms underlying insect transmission remain elusive. In this study, we constructed a system to analyze gene expression in each dissected tissue from a single insect. Using this system, we found several phytoplasma genes with different expression patterns in insect tissues. Furthermore, functional analysis of an effector involved in insect attraction revealed that a single amino acid mutation determines the function of its effector and that it transports target proteins to the proteasome for degradation without ubiquitin-mediated pathway.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ 昆虫媒介

1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマは、植物の篩部細胞内に寄生する植物病原細菌で、1000 種以上の植物に感染し、世界各地の農業生産に深刻な被害をもたらしている。ファイトプラズマは昆虫にも感染し媒介されるというユニークな特徴を持ち、植物と昆虫という異なる宿主を行き来する(図1)。ファイトプラズマのゲノムサイズは非常に小さいため、限られた遺伝子で宿主に適応し、感染を拡大していると想定される。実際、ファイトプラズマは植物宿主と昆虫宿主とを交代するたびに、全遺伝子の約 1/3 に相当する遺伝子の発現量を変化させていることがわかってきた。しかし、培養と形質転換の困難さから、宿主適応機構の全容は謎に包まれている。

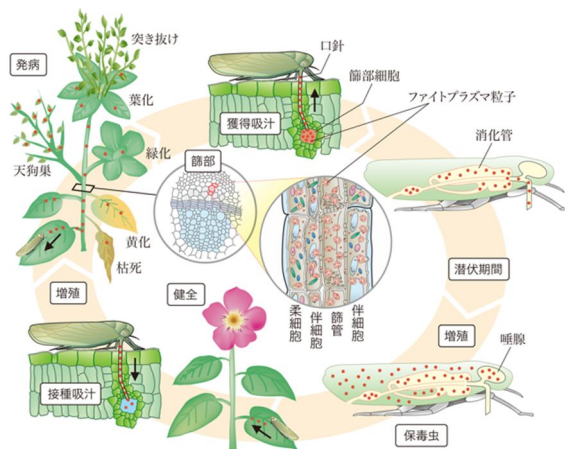


図1 ファイトプラズマの生活環

ファイトプラズマが昆虫に感染してライフ

サイクルを成立させる際には、ファイトプラズマが 感染植物から昆虫に獲得され、昆虫体内で増殖しながら複数の組織を通り抜けて全身へと移行(昆虫の体内環境に適応)し、新たな植物に伝搬される、というステップを踏む(図1)。申請者はファイトプラズマの昆虫体内における時空間的な動態を詳細に解析し、昆虫組織における局在や主要感染部位を特定した(Sci Rep, 2020, 10:4291)。一方で、昆虫媒介機構の詳細な分子メカニズムはわかっておらず、ファイトプラズマが昆虫に獲得され最終的に新たな植物へと伝搬される、一連のステップの理解は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、ファイトプラズマの媒介昆虫感染過程を包括的に理解し、昆虫宿主への適応機構を解明することを目指す。そのために、昆虫体内におけるファイトプラズマの遺伝子発現解析系の構築、およびそれを用いた遺伝子発現変動解析を行う。昆虫組織特異的な遺伝子発現変動を明らかにすることで、昆虫体内での感染ステージごとにファイトプラズマが使い分けている遺伝子の特定を試みる。昆虫感染の様々な段階で遺伝子をダイナミックに使い分けていることがわかれば、ファイトプラズマが複数の昆虫組織を通り抜けて全身を移行する分子メカニズム解明への端緒を開くことができる。

3. 研究の方法

(1) 昆虫体内におけるファイトプラズマ遺伝子発現解析系の構築と遺伝子発現変動解析

申請者が既に昆虫組織内の動態を解明し、各組織に侵入や蓄積する時期を特定している、タマネギ萎黄病ファイトプラズマとその媒介昆虫ヒメフタテンヨコバイを用いた。ファイトプラズマ感染植物を吸汁させた昆虫を回収し、1 個体から解剖した組織ごとに RNA を抽出してリアルタイム PCR に供試することでファイトプラズマの遺伝子発現を評価した。次に、ファイトプラズマ感染植物を吸汁させた昆虫を経時的に回収し、構築した系を利用してファイトプラズマの遺伝子発現変動解析を行った。

(2) 昆虫誘引に関わるエフェクターの機能解析

植物感染時にファイトプラズマが分泌するタンパク質(エフェクター)は植物宿主への適応や病原性の発現、形態変化に関わるだけでなく、その後の昆虫による獲得に影響を及ぼすものが存在する。そこで、植物の花を葉に変化させる「葉化」を誘導するとともに、昆虫誘引(昆虫を引きつけて、ファイトプラズマが感染植物から効率的に昆虫に獲得されるしくみ)にも関わるファイトプラズマのエフェクター「ファイロジェン」に着目した。

遺伝子内の保存性が高いプライマーを用いて、ファイロジェンが未知のファイトプラズマから PCR 法によりファイロジェンを網羅的に探索した。同定したファイロジェンをウイルスベクター/形質転換により植物に発現させ、葉化誘導能を検証した。さらに酵母ツーハイブリッド法を用いた花形成因子(MADS 転写因子)との結合性解析や変異ファイロジェンを用いた葉化誘導能の検証を行った。

(3) 昆虫誘引に関わるエフェクターの標的タンパク質分解機構の解析

ファイロジェンは標的タンパク質の MADS 転写因子をプロテアソームに輸送することで分解し、葉化を誘導する。そこで、ファイロジェン、MADS 転写因子、プロテアソーム輸送に関わる RAD23 の三者間相互作用を局在解析および共免疫沈降法により検証した。

4. 研究成果

(1) 昆虫体内におけるファイトプラズマ遺伝子発現解析系の構築と遺伝子発現変動解析

昆虫 1 個体から解剖した組織ごとにファイトプラズマの遺伝子発現を調べたところ、複数のファイトプラズマ遺伝子の発現を確認した。遺伝子発現解析系が確立できたため、構築した系を利用してファイトプラズマ遺伝子の経時的な発現解析を行った。その結果、特定の昆虫組織で発現変動が特徴的なファイトプラズマ遺伝子を複数見出した。現在、選抜したタンパク質について、昆虫組織内局在や組織ごとの相互作用能を解析している。

本研究で構築した昆虫組織ごとのファイトプラズマ遺伝子発現解析系は、ファイトプラズマの昆虫媒介機構を解析する上で基盤的な役割を果たすツールとなる。また、本系を利用して発現変動の特徴的なファイトプラズマ遺伝子を複数特定したことから、本成果は昆虫組織におけるファイトプラズマの適応戦略の解明に繋がる。

(2) 昆虫誘引に関わるエフェクターの機能解析

ファイロジェンの網羅的な探索により、多様なファイトプラズマ種・系統からファイロジェン特定した。特定したファイロジェンの葉化誘導能を評価したところ、葉化を引き起こさない「非葉化」型のファイロジェンが見いだされた。この非葉化型のファイロジェンは MADS 転写因子との結合性・分解性が低下しており、非葉化型に特徴的なアミノ酸残基を葉化型の残基に置換することで、MADS 転写因子との結合性・分解性が向上し、葉化を誘導した。

これらの成果は、ファイロジェンの機能が 1 アミノ酸の変異で決定されることを示すものであり、ファイロジェンの昆虫誘引メカニズムの解明に貢献すると考えられる。さらに、非葉化型ファイロジェンの存在は MADS 転写因子以外にもファイロジェンの相互作用因子が存在することを示唆しており、非葉化型ファイロジェンを用いることで昆虫誘引に関与する因子を効率的に探索できることが期待される。

(3) 昆虫誘引に関わるエフェクターの標的タンパク質分解機構の解析

ファイロジェン、MADS 転写因子、RAD23 の三者間相互作用を検証し、ファイロジェンを介して三者が複合体を形成することを示した(図 2)。また、この三者複合体はプロテアソームの構成因子とも相互作用していた。驚くべきことに、三者複合体に含まれるファイロジェンはユビキチン化されていたものの、ユビキチン化は MADS 転写因子の分解、および葉化誘導に必須ではなかった。

通常のプロテアソームによるタンパク質分解はユビキチンを介して行われるため、ユビキチンを介さずに標的タンパク質をプロテアソームへと輸送し分解することを明らかにした本成果は、極めてユニークであるとともに、タンパク質分解手法の幅を広げる応用上重要な意味を持つ。さらに、標的タンパク質分解メカニズムが明らかになったことで、ファイロジェンによる昆虫誘引の分子メカニズム解明にも繋がることを期待される。

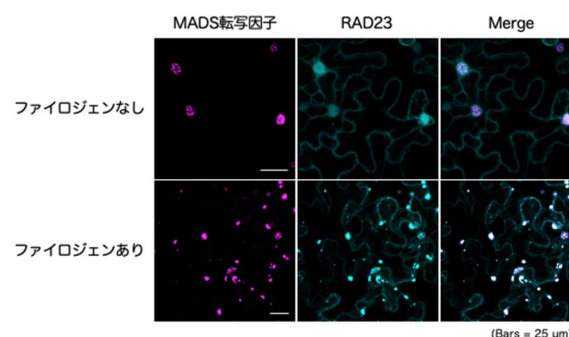


図 2 ファイロジェン、MADS 転写因子、RAD23 の相互作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Koinuma Hiroaki, Miyazaki Akio, Matsumoto Ouki, Suzuki Takumi, Niho 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 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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 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 徳田遼佑・渡邊聖斗・松本旺樹・鯉沼宏章・岡野夕香里・前島健作・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ガガイモに感染する新種のポレロウィルスの全ゲノム配列解析
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 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 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 ファイトプ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 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 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 ファイトプ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 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 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

〔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
---------	---------