

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14853

研究課題名(和文)ファイトプラズマによる葉化病の分子構造基盤解明と新規防除法開発

研究課題名(英文)Elucidating the structural molecular mechanism responsible for phytoplasma-induced phyllody to facilitate the development of innovative strategies for disease management.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原細菌ファイトプラズマのもつ病原性因子ファイロジェンは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。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)、およびユビキチンに結合してポリユビキチン化タンパク質をプロテアソームへと運びシャトルタンパク質であるRAD23に結合し、プロテアソームを介したMTFの分解を誘導する。本研究では、ファイロジェン/MTF/RAD23の三者を主軸とした複合体形成機構の統合的な理解のため、三者が相互作用する際に必要な分子構造や結合様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ファイロジェン/MTF/RAD23が三者間で相互作用する際に必要な分子構造や結合様式を明らかにした。その結果、ファイロジェンはユビキチンの代わりに標的MTFとRAD23の保存領域に結合し、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ことが示唆された。今後は、本研究で明らかになった結合領域を標的にした化合物を探索することで、ファイロジェンの機能を阻害する新規防除法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Phyllogen is a conserved virulence effector of phytoplasma known for its phyllody inducing ability. Previous research has demonstrated that phyllogen binds to two key proteins: MADS-box transcription factors (MTFs) and RAD23, a shuttle protein involved in the transportation of polyubiquitinated proteins to the proteasome. This interaction triggers the proteasome-mediated degradation of MTFs. In this study, we investigated the molecular structures responsible for the interaction between these three components, providing a comprehensive understanding of the molecular mechanism underlying the formation of the phyllogen/MTF/RAD23 ternary complex.

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 MADS-box転写因子 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

抗生物質や抵抗性品種は病害防除において必要不可欠であるが、薬剤耐性菌/抵抗性打破株の出現、および宿主に共生する微生物叢や抵抗性誘導を介した植物の生育への二次的な影響を避けるため、病原体のもつ様々な細胞機能を標的にした新規防除法の研究開発が必要である。エフェクターは種々の病原体が独自に獲得した分泌タンパク質の総称であり、病原体の感染に有利になるように宿主の様々な細胞機能を改変する [Trends Microbiol (2020) 28:523-535]。そのため、エフェクターの立体構造や標的宿主因子に対する認識機構の解明は病原体の感染戦略を理解するだけでなく、それらを応用して各病原体に対する特異的な防除戦略を効率的に設計するための基盤情報を得るうえで重要となる。

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。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し、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]。同時に、ファイロジェンはポリユビキチン化タンパク質に結合してプロテアソームへと運ぶシャトルタンパク質である RAD23 と結合するため、ファイロジェンによる MTF 分解においてファイロジェン/MTF/RAD23 の三者を主軸とした複合体形成が仮定されているが [PLoS Biol. (2014) 12, e1001835]、その実体は明らかになっていない。すなわち、これまでにファイロジェンについて機能の基盤となる立体構造 [Biochem. Biophys. Res. Commun. (2019) 513, 952-957.] や MTF との結合に重要な表面残基 [Mol. Plant Pathol. (2020) 21, 1322-1336.] が明らかになっているが、MTF および RAD23 については不明だった。以上より、ファイトプラズマの病原性に関する分子構造基盤の解明のため、ファイロジェン/MTF/RAD23 が相互作用する際に必要な分子構造や結合様式に基づく複合体形成機構の統合的な理解が必要と考えられる。同時に、ファイロジェンを含めファイトプラズマのエフェクターは病原性および伝染性を高めると考えられているため [Proc. Jpn. Acad., Ser. B. 2019 95:401-418]、ファイトプラズマに対する新規防除法の開発に向けた分子基盤を得る上でも極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ファイロジェン/MTF/RAD23 間の結合様式に基づく複合体の形成機構の解明と、ファイロジェンを標的にした新規防除法の開発である。申請者はこれまでにファイロジェンに着目することで、ファイトプラズマのエフェクターの機能に重要な分子構造を独自に明らかにしてきた。第1に、ファイトプラズマのエフェクターとして初めてファイロジェンの立体構造を解明し、ファイロジェンが MTF どうしの多量体化を担う K ドメインと類似した ヘリックス構造を形成することで MTF および RAD23 との結合能を獲得したこと

を明らかにした[Biochem. Biophys. Res. Commun. (2019) 513,952-957.]. 第2に、ファイロジェンファミリーの統合的解析により、MTF との結合にはタンパク質表面に露出した親水性アミノ酸が関与することを見出した[Mol. Plant Pathol. (2020) 21,1322-1336.]. 一方で、MTF および RAD23 については未解明であるものの、ファイロジェンは本来花をつけない裸子植物やシダ植物を含む広範な植物の MTF を分解するため、それぞれの標的因子には複合体形成に関わる植物共通の新規な構造学的特徴が存在すると想定される。本研究では、申請者が明らかにした独自の知見と網羅的な結合解析に基づいてファイロジェンと結合するために必要なアミノ酸残基とその結合様式を特定する。これにより、ファイトプラズマによる葉化病の発病に重要なこれまでにない創造的な分子構造基盤を明らかにし、新規防除法の開発に応用する。

3. 研究の方法

- (1) ファイロジェンはシロイヌナズナの持つ様々な MTF および RAD23 に結合することが明らかになっているが、ファイロジェンとの結合に必要な最小単位は不明である。そこで、シロイヌナズナの持つ MTF および RAD23 について、様々な長さの欠損変異体を作成し、yeast two hybrid 法および共免疫沈降法を用いてファイロジェンとの結合性を検証する。ファイロジェンには立体構造および機能が既に明らかになっている onion yellows ファイトプラズマのファイロジェン (PHYLO_Y) を用いる。続けて、ファイロジェンとの結合に重要なアミノ酸残基を特定するため、最小結合領域に保存されたアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成する。作成した各変異体について、PHYLO_Y との結合性を評価することで、PHYLO_Y による認識に重要なアミノ酸を網羅的に特定する。次いで、特定したアミノ酸が他のファイロジェンとの結合に重要かどうかを検証するため、PHYLO_Y と同一性の低いファイロジェンについても結合性を評価し、ファイロジェンファミリー全体に対して重要なアミノ酸を絞り込む。
- (2) ファイロジェンファミリーに保存される ヘリックス上の複数のアミノ酸が MTF との結合に重要であることが報告されているものの、それ以外のアミノ酸の影響および RAD23 との結合に重要なアミノ酸は不明である。そこで、ファイロジェンにランダムにアミノ酸変異を導入し、yeast two hybrid 法により MTF との結合に関与するアミノ酸について網羅的なスクリーニングを試みる。また、ファイロジェンホモログ間の葉化誘導活性の比較解析から機能に重要なアミノ酸を絞り込む。
- (3) 得られた結果と立体構造情報、および植物細胞内でのファイロジェン/MTF/RAD23 の三者間相互作用解析を元に、三者間の結合様式を決定し、ファイロジェン/MTF/RAD23 複合体モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) MTF においては、ファイロジェンは MTF どちらの四量体化を担う領域に対して、四量体化関連残基を介して相互作用することが示唆された。RAD23 においては、ファイロジェンはユビキチン結合ドメインである UBA2 ドメインと結合することが確認された。いずれの領域も本来は宿主因子間の相互作用を担う領域で、植物間で高度に保存されるため、ファイロジェンが広範な植物に葉化を誘導することを裏付ける知見と考えられた。MTF の四量体化領域および UBA2 ドメインは、PHYLO_Y と配列同一性の低いファイロジェン (PHYLO_{PnWB}) とともに結合することが確認されたため、ファイロジェンファミリー全体に対して重要なアミノ酸であることが示唆された。

(2) ファイロジェンのランダム変異ライブラリーの中から、MTF との結合に關与する複数のアミノ酸を特定した。また、ファイロジェンホモログ間の葉化誘導活性の比較解析から、機能に重要なアミノ酸を特定した。これらのアミノ酸は、結合に關連する既知のアミノ酸とともに、立体構造上で特定の領域に集中していたため、当該領域が MTF との結合に働くと考えられた。

(3) 各タンパク質の立体構造情報をもとに、AI による高精度なタンパク質複合体予測プログラムである ColabFold を用いて、ファイロジェン/MTF 複合体の構造を予測した。その結果、(1)で明らかにした MTF におけるファイロジェンとの結合に重要な領域と、(2)で明らかにしたファイロジェンにおける MTF との結合に重要な領域とが相互作用面を形成することが予測され、ファイロジェンと MTF の複合体の結合モデルを構築できた。さらに、植物細胞でファイロジェン/MTF/RAD23 を共発現させ、共免疫沈降解析によりファイロジェン/MTF/RAD23 のタンパク質間相互作用を解析した結果、MTF と RAD23 はファイロジェンを介して相互作用し、三者からなる複合体が形成されることを明らかにした。興味深いことに、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複合体形成および 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 の保存領域に結合し、両タンパク質の相互作用を直接仲介することで、標的因子をプロテアソームへと運搬し、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。今後は、本研究で明らかになった結合領域を標的にした化合物を探索することで、ファイロジェンの機能を阻害する新規防除法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 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 - |
| 1. 著者名 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Matsumoto Oki, Suzuki Masato, Matsuyama Juri, Koinuma Hiroaki, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Random mutagenesis-based screening of the interface of phyllogen, a bacterial phyllody-inducing effector, for interaction with plant MADS-box proteins | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 1058059 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1058059 | 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 Tokuda Ryosuke, Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Nijo Takamichi, Suzuki Masato, Maejima Kensaku, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Potential mobile units drive the horizontal transfer of phytoplasma effector phyllogen genes | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Genetics | 6. 最初と最後の頁 1132432 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2023.1132432 | 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 Masato, Iwabuchi Nozomu, Fujimoto Yuji, Suzuki Takumi, Matsumoto Oki, Motohashi Tomohiro, Neil, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Clover Yellow Mosaic Virus Isolated from White Clover in Japan | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e00324-22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00324-22 | 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 Maruyama Noriko, Iwabuchi Nozomu, Nishikawa Masanobu, Nijo Takamichi, Yoshida Tetsuya, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Tea Plant Necrotic Ring Blotch Virus</i> Detected from a Tea Plant in Japan | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e00323-22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00323-22 | 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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 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 ファイロジェンは標的宿主因子のユビ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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 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 |
| 2. 発表標題 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 |
| 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 徳田遼佑・岩淵望・二條貴通・北沢優悟・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 全ゲノム情報の比較に基づくファイトプラズマの種内近縁性の評価 |
| 3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023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に結合する |
| 3. 学会等名 第49回 日本マイコプラズマ学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 ファイロジェンはユビキチン非依存的にプロテアソーム分解により標的を分解するユニークな病原性因子である |
| 3. 学会等名 第49回 日本マイコプラズマ学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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は2種類の宿主因子の相互作用を仲介する |
| 3. 学会等名 第49回 日本マイコプラズマ学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松山樹立・北沢優悟・岩淵望・前島健作・松本旺樹・鈴木誠人・鯉沼宏章・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葉化誘導因子ファイロジェンの標的認識に関わる新規アミノ酸残基の網羅的探索 |
| 3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 北沢優悟・松山樹立・岩淵望・前島健作・松本旺樹・鈴木誠人・鯉沼宏章・大島研郎・難波成任・山次康幸 |
| 2. 発表標題 ファイロジェンとMADSドメイン転写因子の結合に影響するアミノ酸残基はひとつの相互作用面を形成する |
| 3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <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! https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20220302-1.html プロテインノックダウン技術の確立に一步近づく https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230330-1.html ファイトブラズマの病原性獲得の原動力を明らかに https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230511-1.html</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 |
|---------|---------|
|---------|---------|