

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640111

研究課題名(和文)細胞内寄生細菌のゲノムにコードされる免疫抑制因子の探索

研究課題名(英文) Survey for immunologic suppressor factors encoded in the intracellular parasitic bacterial genome

研究代表者

大島 研郎 (OSHIMA, Kenro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：00401183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトプラズマ(Candidatus Phytoplasma属細菌)は、植物の細胞内に寄生し、700種以上の植物に病気を引き起こす絶対寄生性細菌である。本研究は、ファイトプラズマのゲノムにコードされる遺伝子の中から、宿主をコントロールする因子を同定し、その作用機作を明らかにすることを目的とした。ゲノムにコードされる分泌タンパク質に焦点を当てスクリーニングを行った結果、花器官の異常を誘導する因子Phyl1を同定した。機能解析の結果、Phyl1は宿主のコピキチンプロテアソーム系を介してMADS-box転写因子群の分解を誘導することが示された。

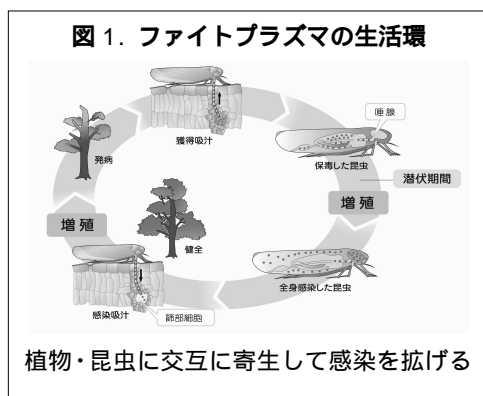
研究成果の概要(英文)：Phytoplasmas are intracellular bacterial pathogens of plants and insects and cause devastating yield losses in diverse low- and high-value crops worldwide. To investigate the molecular mechanisms of the regulation of the host cells, we focused on phytoplasma-secreted proteins. As a result of screening, we found a phytoplasma-secreted protein, PHYL1, which induces morphological changes in flowers that are similar to those seen in phytoplasma-infected plants. By yeast two-hybrid and in planta transient coexpression assays, we found that PHYL1 interacts with and degrades floral homeotic MADS-domain proteins.

研究分野：植物病理学

キーワード：ゲノム 寄生 ファイトプラズマ

### 1. 研究開始当初の背景

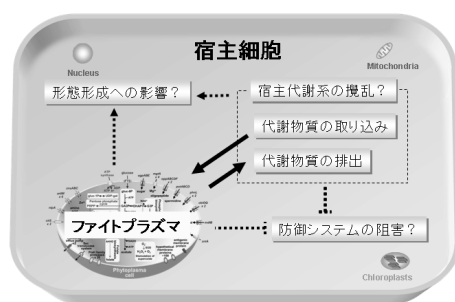
ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma* 属細菌) は、植物の細胞内に寄生し、700 種以上の植物に病気を引き起こす絶対寄生性細菌である。イタリアやドイツで年間 1 億ユーロの損害が生じるなど、世界中の農作物生産に大きな被害を与えている。ファイトプラズマ病の予防・治療法の確立が切望されているものの、人工培養が不可能な微生物であるため、現在でも最も研究が難しい病原体の一つといわれている。ファイトプラズマは昆虫及び植物に寄生することができ、昆虫を介して植物から植物へと伝搬される(図 1)。ファイトプラズマはこれらの宿主をコントロールすることで感染を成立させていると考えられるが、その全容は未だ謎に包まれている。



### 2. 研究の目的

本研究は、ファイトプラズマのゲノムデータを活用することで、ゲノムにコードされる遺伝子の中から、宿主をコントロールする因子を同定し、その作用機作を明らかにすることを目的としている。

図 2. 分泌タンパク質が宿主に及ぼす影響



ファイトプラズマは細胞内寄生するため、分泌タンパク質は宿主細胞内で機能し、様々な影響を与える

### 3. 研究の方法

ファイトプラズマは細胞内に寄生し、ペプチドグリカン等の細胞壁を持たないため、分泌されたタンパク質は宿主細胞質で直接的に機能する(図 2)。そこで、宿主を制御する因子の候補として、分泌シグナルを持つタンパク質に注目した。ファイトプラズマは植

物や昆虫に感染する際に、それぞれの宿主に合わせて自身の遺伝子発現を変化させることが示唆されている。昆虫内で働く因子は昆虫感染時に、植物内で働く因子は植物感染時に特異的に発現する可能性が考えられるため、この網羅的な遺伝子発現データも参考にして候補遺伝子を選抜した。

### 4. 研究成果

(1) タマネギ萎黄病ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma asteris*) のゲノムにコードされる分泌タンパク質を恒常的に発現するシロイヌナズナ形質転換体を網羅的に作出した結果、花器官の異常を誘導する因子 *Phyl1* を同定した。植物の花器官分化は ABCE クラスの MADS-box 転写因子群 (MTFs) の発現パターンにより決定される。酵母ツーハイブリッド法により解析したところ、*PHYL1* とクラス A および E の MTFs (*AP1*, *SEP3*) との相互作用が観察された。また *AP1* や *SEP3* により正に制御されるクラス B の MTFs の発現量も *PHYL1* 発現時には減少していた。以上より、*PHYL1* はクラス A および E の MTFs を標的に結合・機能阻害することにより花器官の葉化を誘導すると考えられた。

(2) *Phyl1* による MTFs の機能阻害機構の詳細を調べるため、YFP 融合 MTFs (*AP1*, *SEP3*) を作出し、*Nicotiana benthamiana* 葉に *Phyl1* と共発現させ、MTFs の細胞内所在や蓄積の様子を解析した。その結果、両 MTF ともに YFP 蛍光が消失し蓄積量が低下したため、*Phyl1* 存在下で MTFs は分解されると考えられた。次いで、MTF の分解機構を調べるため、植物が有するタンパク質分解機構との関連を調べたところ、ユビキチンプロテアソーム系阻害剤処理下で *SEP3* の分解が抑制された。さらに免疫沈降法を用いて YFP-*SEP3* を回収し抗ユビキチン抗体で検出した結果、*Phyl1* 共発現時により強いシグナルが検出され、YFP-*SEP3* のユビキチン化が促進されていることが示唆された。以上より、*Phyl1* は宿主のユビキチンプロテアソーム系を介して MTFs 分解を誘導することが示された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Maejima, K., Kitazawa, Y., Tomomitsu, T., Yusa, A., Neriya, Y., Himeno, M., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2015). Degradation of class E MADS-domain transcription factors in Arabidopsis by a phytoplasmal effector, *phyllogen*. *Plant Signal Behav.* 査読有, 10, e1042635.  
DOI: 10.1080/15592324.2015.1042635  
Miura, C., Komatsu, K., Maejima, K., Nijo, T., Kitazawa, Y., Tomomitsu, T., Yusa, A., Himeno, M., Oshima, K. &

Namba, S. (2015). Functional characterization of the principal sigma factor RpoD of phytoplasmas via an in vitro transcription assay. *Scientific Rep.*, 査読有, 5, Article 11893. DOI: 10.1038/srep11893

Fukuda, K., Hamamoto, H., Hashimoto, M., Nakayama, M., Netsu, O., Kagiwada, S., Oshima, K. & Namba, S. (2015). A survey on the current status of plant disease control by agricultural firms and farmers in Japan. *Jpn. J. of Phytopathol.*, 査読有, 81, 127-135. DOI: 10.3186/jjphytopath.81.127

Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, K., Kamiya, Y. & Namba, S. (2014). The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Rep.*, 査読有, 4, Article 7399. DOI: 10.1038/srep07399

Neriya, Y., Maejima, K., Nijo, T., Tomomitsu, T., Yusa, A., Himeno, M., Netsu, O., Hamamoto, H., Oshima, K. & Namba, S. (2014). Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有, 361, 115-122. DOI: 10.1111/1574-6968.12620

Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, K., Oshima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y. & Namba, S. (2014). In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell*, 査読有, 26, 2168-2183. DOI: 10.1105/tpc.113.120535

Maejima, K., Oshima, K. & Namba, S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J. Gen. Plant Pathol.*, 査読有, 80, 210-221. DOI: 10.1007/s10327-014-0512-8

Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., Ishikawa, K., Fukuoka, M., Minato, N., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2014). Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phylogen, induces phyllody. *Plant J.*, 査読有, 78, 541-554. DOI: 10.1111/tpj.12495

Himeno, M., Kitazawa, Y., Yoshida, T.,

Maejima, K., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2014). Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Rep.*, 査読有, 4, Article 4111. DOI: 10.1038/srep04111

〔学会発表〕(計10件)

笹野百花, 前島健作, 西田萩子, 遊佐礼, 北沢優悟, 煉谷裕太朗, 大島研郎, 難波成任: ファイロジェンとシロイヌナズナのクラス E MADS-box 転写因子群の相互作用 (平成 28 年度日本植物病理学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2016 年 3 月 21-23 日)

三浦千裕, 二條貴通, 鯉沼宏章, 岩淵望, 姫野未紗子, 前島健作, 小松健, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマのシグマ因子 RpoD を用いた in vitro 転写系の確立 (平成 28 年度日本植物病理学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2016 年 3 月 21-23 日)

若木連也, 遠藤 藍, 濱本 宏, 前島健作, 難波成任, 大島研郎: ハウスキーピング遺伝子 rpoB, rpoC, fusA に基づくファイトプラズマの系統解析 (平成 28 年度日本植物病理学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2016 年 3 月 21-23 日)

前島健作, 姫野未紗子, 北沢優悟, 福岡美里, 石川一也, 煉谷裕太朗, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマの病原性因子 PHYL1 による葉化誘導機構 (日本マイコプラズマ学会第 42 回学術集会, 慶應義塾大学 芝共立キャンパス マルチメディア講堂, 東京都港区, 2015 年 5 月 22-23 日)

北沢優悟, 遊佐礼, 煉谷裕太朗, 姫野未紗子, 前島健作, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマは共通の葉化誘導因子ファイロジェンを有する (日本マイコプラズマ学会第 42 回学術集会, 慶應義塾大学 芝共立キャンパス マルチメディア講堂, 東京都港区, 2015 年 5 月 22-23 日)

大島研郎, 前島健作, 難波成任: ファイトプラズマ病の診断・治療・予防技術の現状と展望 (日本マイコプラズマ学会第 42 回学術集会, 慶應義塾大学 芝共立キャンパス マルチメディア講堂, 東京都港区, 2015 年 5 月 22-23 日)

北沢優悟, 吉田哲也, 菅原杏子, 姫野未紗子, 前島健作, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマの病原性因子 TENGU の機能領域と切断部位の特定 (平成 26 年度日本植物病理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌

市, 2014年6月2-4日)  
姫野未紗子, 北沢優悟, 吉田哲也, 三浦千裕, 前島健作, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマ感染が引き起こすパープルトップ症状は宿主のアントシアニン生合成経路に依存する(平成26年度日本植物病理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市, 2014年6月2-4日)

北沢優悟, 吉田哲也, 菅原杏子, 友光達哉, 原慎一郎, 煉谷裕太郎, 姫野未紗子, 前島健作, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマのてんぐ巣症状誘導因子の植物内プロセッシング(日本マイコプラズマ学会第41回学術集会, 東京大学伊藤謝恩ホール, 東京都文京区, 2014年5月22-23日)

姫野未紗子, 北沢優悟, 吉田哲也, 遊佐礼, 宮崎彰雄, 煉谷裕太郎, 前島健作, 大島研郎, 難波成任: ファイトプラズマ感染によるパープルトップ症状誘導メカニズムに関する解析(日本マイコプラズマ学会第41回学術集会, 東京大学伊藤謝恩ホール, 東京都文京区, 2014年5月22-23日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 研郎 (OSHIMA, Kenro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号: 00401183

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: