

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660032

研究課題名(和文)植物における免疫抑制療法の新規開発によるファイトプラズマ耐性植物の創出

研究課題名(英文)Development of phytoplasma tolerant plants by a novel immunosuppressive therapy

研究代表者

姫野 未紗子(Himeno, Misako)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特別研究員

研究者番号：10646970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトプラズマ感染が引き起こす篩部壊死を検出する実験系を検討し、トリパンブルー染色を用いた系を最適化した。また、LC-TOF-MSによる解析から、篩部壊死により転流阻害が起こり、その結果としてアントシアニンの生合成が誘導されることが示唆された。さらに、変異体を用いた接種試験により、アントシアニン類が細胞死を抑制することや植物免疫系が病徴へ関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Experimental methods to detect phloem cell death caused by phytoplasma infection were investigated, and the optimized method using trypan blue staining was developed. From the results obtained by LC-TOF-MS analysis, phloem cell death caused by phytoplasma infection was suggested to cause impaired phloem loading, resulting in activating anthocyanin biosynthesis pathway. Further, results of inoculation test using mutant plants suggested that anthocyanin accumulation is involved in the reduction of cell death and plant immune response pathway is associated with diseased symptoms. These results may contribute to development of phytoplasma tolerant plants.

研究分野：農学

キーワード：ファイトプラズマ 篩部壊死 病害防除

1. 研究開始当初の背景

植物病原体の感染による細胞死は過敏反応 (Hypersensitive Responses: 以下 HR) とよばれる一連の免疫応答によって引き起こされ、病原体を感染細胞に封じ込める役割を持つ (Greenberg, 1997)。一方で、近年、HR による細胞死は病原体を封じ込めるだけでなく、病徴の亢進といった負の影響を及ぼすことが明らかになりつつある。このように、抵抗性反応と壊死などの病徴発現には同様の経路が関わっており、その境界線は曖昧になりつつある。

一方で、ファイトプラズマ感染時に観察される特徴的な篩部壊死は、病原体の封じ込めとしては働かず、黄化や萎縮、および全身枯死といった致命的な病徴発現を引き起こすと考えられている (Lepka et al., 1999)。さらに、ファイトプラズマ感染植物では、HR の指標であるカロースの蓄積 (Oshima et al., 2001) 及び PR 遺伝子の転写誘導が認められること (Zhong and Shen, 2004) から、篩部壊死は HR 様の反応であると推測される。従って、篩部壊死の抑制によって、黄化、萎縮、花の形態異常といったファイトプラズマ病による大部分の病徴が抑えられると推測される。

ファイトプラズマ病による篩部壊死は、ファイトプラズマが病原体として発見された当初 (Doi et al., 1967) から知られていたものの、そのメカニズムに関する研究は進んでおらず、有効な防除手段は確立されていなかった。

2. 研究の目的

ファイトプラズマは世界各地で甚大な被害を引き起こす病原細菌であり、植物の篩部細胞内に寄生する。その防除法の確立が待たれるが、培養や性質転換が困難なことから、その分子生物学的研究は進んでおらず、抵抗性に関わる知見も乏しい。

一方、感染植物で見られる「篩部壊死」は、黄化や萎縮、花の形態異常、全身枯死などさまざまな全身症状の引き金になっている可能性が示唆されている。

本研究は、ファイトプラズマが引き起こす「篩部壊死」や全身壊死などの病徴には、植物免疫などの植物側の防御応答が関するとの推測のもと、まず篩部壊死に対する H 防御応答関連因子の関与を確認する。さらに、ファイトプラズマ感染時に防御応答カスケードを抑える技術を検討し、その手法を確立させる。それにより、ファイトプラズマに対する篩部壊死を特異的に抑制させ、無病徴化させることを目指す。そのメカニズムを詳細に解明し、得られた知見に基づきファイトプラズマ耐性植物の作出に向けた基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には、まず、ファイトプラズマが引き起こす篩部壊死のメカニズムを解明する目的で、実験系の確立および感染植物を用いた構造細胞学的な解析を行った。植物には、遺伝情報が最も豊富なシロイヌナズナを用い、接種には媒介昆虫であるヒメフタテンコバイを用いた。

次に、ファイトプラズマ感染時の植物側の免疫応答についてその全体像に迫ることを目的に、シロイヌナズナの変異体を用いた接種試験により、ファイトプラズマが引き起こす病徴に関与する植物側の宿主因子について解析を進めた。

4. 研究成果

ファイトプラズマの接種試験を行い、ファイトプラズマの感染によってシロイヌナズナに篩部壊死が起こることを、実験条件を最適化させたトリパンブルー染色によって明らかにした。感染による篩部壊死は、光合成産物の転流阻害を引き起こし、病徴発現に関与する可能性が示唆されている。そこで、ファイトプラズマ感染による転流阻害を検証する目的で、ファイトプラズマ感染葉における糖蓄積量を LC-TOF-MS により測定し、健全葉をコントロールとして比較解析した。その結果、ファイトプラズマ感染により測定したいずれの糖濃度も上昇し、特に Sucrose 濃度は健全の約 1000 倍と異常に蓄積することが判明した。

続いて、アントシアニン合成関連遺伝子を欠損させたシロイヌナズナでは、野生型と比較してファイトプラズマ感染による篩部壊死や葉の細胞死が激化することが明らかになった。同様の現象は、ナス科植物であるペチュニアにおいても観察された。一方、それら変異体ではファイトプラズマの蓄積量に影響は見られなかった。同様に、植物免疫応答経路を阻害するシロイヌナズナにおいても病徴の緩和が見られた。

従って、ファイトプラズマ感染植物におけるアントシアニンなど抗酸化作用物質の生合成誘導は、ファイトプラズマの生存や増殖に直接作用するような防御応答ではなく、感染に伴うストレスから植物自身を守り老化の促進を抑制する効果を持つ応答であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Maejima K., Kitazawa Y., Tomomitsu T., Yusa A., Neriya Y., Himeno M., Yamaji Y., Oshima K., Namba S. Degradation of class E MADS-domain transcription factors in Arabidopsis by a phytoplasmal effector, phyllogen. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10: e1042635. 査読有
DOI: 10.1080/15592324.2015.1042635
 2. Miura C., Komatsu K., Maejima K., Nijo T., Kitazawa Y., Tomomitsu T., Yusa A., Himeno M., Oshima K., Namba S. Functional characterization of the principal sigma factor RpoD of phytoplasmas via an in vitro transcription assay. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11893. 査読有
DOI: 10.1038/srep11893
 3. Minato N., Himeno M., Hoshi A., Maejima K., Komatsu K., Takebayashi Y., Kasahara H., Yusa A., Yamaji Y., Oshima K., Kamiya Y., Namba S. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7399. 査読有
DOI:10.1038/srep07399
 4. Himeno M., Kitazawa Y., Yoshida T., Yusa A., Miyazaki A., Neriya Y., Maejima K., Oshima K., Namba S. Study on the mechanism of purple top symptoms caused by phytoplasma infection. *Japanese Journal of Mycoplasmaology*, 2014, 41: pp2-3. 査読無
<http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I026307418-00>
 5. Neriya Y., Maejima K., Nijo T., Tomomitsu T., Yusa A., Himeno M., Netsu O., Hamamoto H., Oshima K., Namba S. Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 361: pp115-122. 査読有
DOI: 10.1111/1574-6968.12620
 6. Maejima K., Iwai R., Himeno M., Komatsu K., Kitazawa Y., Fujita N., Ishikawa K., Fukuoka M., Minato N., Yamaji Y., Oshima K., Namba S. Recognition of floral homeotic MADS-domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *The Plant Journal*, 2014, 78: pp541-554. 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12495
- 〔学会発表〕(計 6 件)
1. 岩淵望・鯉沼宏章・根津修・笹野百花・姫野未紗子・二條貴通・前島健作・難波成任
酵素標識抗体を用いた direct tissue stamp 法による感染植物組織内におけるファイトプラズマの所在解析技術の改良
平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21 日-23 日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）
 2. 鯉沼宏章・岩淵望・根津修・宮崎彰雄・二條貴通・姫野未紗子・前島健作・難波成任
FTA カードを用いたファイトプラズマ DNA の長期保存
平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21 日-23 日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）
 3. 姫野未紗子・遊佐礼・煉谷裕太郎・前島健作・山次康幸・大島研郎・難波成任
ファイトプラズマ感染植物におけるアントシアニン類の細胞死抑制への関与
日本マイコプラズマ学会第 42 回学術集会、2015 年 5 月 22 日-23 日、慶應義塾大学（東京都・港区）
 4. 姫野未紗子・友光達哉・遊佐礼・北沢優悟・煉谷裕太郎・前島健作・大島研郎・難波成任
パープルトップ症状はファイトプラズマ感染による細胞死の誘導を抑制する
平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 28 日-31 日、明治大学（東京都・千代田区）
 5. 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、2014 年 6 月 2 日-4 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
 6. 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、2014 年 5 月 22 日-23 日、東京大学
(東京都・文京区)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/feature-stories/elucidating-the-mystery-of-phytoplasmas-the-ultimate-idler-bacteria.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫野 未紗子 (Misako Himeno)

東京大学・農学生命科学研究科・特別研究員
研究者番号：10646970