

令和 3 年 5 月 28 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：2019～2020

課題番号：19K23673

研究課題名（和文）ファイトプラズマの絶対寄生性のゲノム進化的解明

研究課題名（英文）Genome evolutionary insights into obligate parasitism of phytoplasmas

研究代表者

宮崎 彰雄（Miyazaki, Akio）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：70847748

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、ファイトプラズマ属細菌に特徴的かつ共通する“絶対寄生性”の分子機構にアプローチすることを目的とした。まず遺伝的背景解明の技術的障壁を克服するために、ファイトプラズマDNAの濃縮法を構築して、より効率的なゲノム解読を実現した。また、ファイトプラズマが植物体内で分泌するエフェクターであるファイロジェンについて、属内における共通性と多様性を解明した。さらに、昆虫体内における寄生実態を詳細に理解するため、感染部位が変遷する様子を詳細に観測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファイトプラズマ属細菌は、世界中で様々な農作物に壊滅的な被害をもたらしている植物病原体である。有効な農薬は開発できておらず、防除策の構築が喫緊の課題となっている。本研究では、その寄生システムの一端を、植物宿主と昆虫宿主の両面から明らかにした。ファイトプラズマは宿主細胞から独立しては生育できないため、寄生を成立させている分子メカニズムを標的にした新たな防除法が期待されており、本研究はその実現に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to approach the molecular mechanism underlying obligate parasitism, which is characteristic and common among phytoplasmas. In order to overcome the technical barriers to the elucidation of the genetic background, we developed a method for enrichment of phytoplasma DNA to achieve efficient genome sequencing. We also revealed the commonality and variation in phylogen, an effector family secreted in plants, among phytoplasma strains. In addition, to understand the parasitism in insects in detail, we observed the spatiotemporal dynamics of phytoplasmas.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ 絶対寄生性 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原体は、宿主生細胞から独立して腐生的に生育できない「絶対寄生性」と、宿主から離れても生育できる「条件的寄生性」に分けられる。前者は宿主に生育を依存しており、寄生に関わる生体システムを標的にすることで有効な防除法が確立できると期待される。しかし、その分子レベルのメカニズムは未解明なものが多い。絶対寄生性細菌の一群であるファイトプラズマ属('*Candidatus Phytoplasma* ')は、1000種以上の植物に感染し、黄化や叢生などの症状を引き起こして枯死させる。化学農薬など有効な防除法がなく、世界各地で深刻な問題となっている。ファイトプラズマはいずれも、宿主体液から脱することがなく昆虫と植物に交互に感染するのに対して、最も近縁なアコレプラズマ属は植物表面等で腐生的に生育する。そのため、ファイトプラズマ属の絶対寄生性は祖先が属分化に際して獲得した性質であると考えられたが、その全容は謎に包まれていた。

2. 研究の目的

ファイトプラズマ属細菌は、世界中で様々な農作物に壊滅的な被害をもたらしている植物病原体である。有効な農薬は開発できておらず、防除策の構築が喫緊の課題となっている。ファイトプラズマは宿主の生細胞から独立して生育できない絶対寄生性であるため、その寄生システムを標的にすることで有効な防除法を構築できる可能性が期待されている。そこで本研究では、ファイトプラズマがもつ絶対寄生性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ファイトプラズマ DNA 濃縮系の開発

ファイトプラズマは純粋培養できないため、本菌のみに由来する DNA 試料を用意できない点が、ゲノム解読の技術的障壁となっていた。そこでゲノム解読に先駆け、ファイトプラズマ DNA の濃縮系を構築した。原核生物であるファイトプラズマと異なり、宿主である植物や昆虫など真核生物の DNA は CpG のメチル化を受けるため、メチル化 CpG 結合タンパク質を利用することで、簡便かつ迅速にこれを除去した。以上で得られたファイトプラズマ濃縮 DNA 試料を、リアルタイム PCR に供して濃縮率を評価するとともに、以降のゲノム解読に供して有用性を確認した。

(2) ファイトプラズマのゲノム解読

保有する複数のファイトプラズマについて、(1)に従ってゲノム濃縮し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な塩基配列解読に供試した。このうち、群馬県で採集したアジサイ葉化病ファイトプラズマ (*hydrangea phyllody phytoplasma*; HP) について、同種のタマネギ萎黄病ファイトプラズマ (*onion yellows phytoplasma*; OY) との比較により詳細な解析を行った。

(3) 昆虫体内における動態解析

ファイトプラズマの寄生環境を解明するため、昆虫宿主体内における分布と挙動を高精細なバイオイメージングによって解析した。すなわち、OY を獲得したヒメフタテンヨコバイについて、ファイトプラズマ表面の Amp タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。この際、ファイトプラズマ獲得後の日数が異なるヨコバイを比較することで、時系列的な分布変化にアプローチした。

(4) 病原性遺伝子ファイロジェンの保存性解析

寄生に伴う花の葉化誘導メカニズムについて、ファイトプラズマ種間における保存性の解明を試みた。すなわち、葉化誘導因子ファイロジェンのヘリックス上に存在する保存領域に対してプライマーを設計し、PCR 法により様々なファイトプラズマ種からファイロジェン遺伝子を探索した。ファイロジェン部分領域が増幅されたうちいくつかについては、さらに genome walking により遺伝子全長を解読した。これらを配列比較および分子系統解析することで、多様性あるいは保存性にアプローチした。

4. 研究成果

(1) ファイトプラズマ DNA 濃縮系の開発

OY 感染シュンギク的全 DNA から CpG メチル化 DNA を除去したところ、ファイトプラズマ DNA の割合が 10 倍以上に向上した。また、次世代シーケンサー Illumina MiSeq によるファイトプラズマ由来リードの割合を調べたところ、わずか 0.64% から 27.91% に増加し、約 44 倍の向上が見られた。濃縮 DNA から得られたリードのうち 100 万を抽出し、既報 OY ゲノムへのマッピングおよび de novo アセンブリしたところ、OY ゲノムの約 90% を解読できたことが示された。このことから、本濃縮法はゲノム解読の効率を向上するために有用であると考えられた。

(2) ファイトプラズマのゲノム解読

HP の次世代シーケンスの結果、2,371,415 リードが解読された。これらを de novo アセンブリしたのち BLAST 検索すると、36 コンティグがファイトプラズマ由来であると推定され、その総塩基長は 597,762 bp であった。同種である OY のゲノムとの比較により、重複遺伝子領域を除く HP ゲノムの大部分を解読できたと考えられた。以上で得られた HP ドラフトゲノムには 521 遺伝子が見出され、そのうち 13 遺伝子がファイロジェンを含む分泌タンパク質遺伝子と推測され、病原性因子の候補と考えられた。

(3) 昆虫体内における動態解析

ヒメフタテンヨコバイにおいて、獲得後 14 日の時点では OY は消化管に局在したが、20 日で血体腔と唾腺の一部、41 日で脳にも認められた。消化管では、7 日で中腸前部の上皮細胞内、14 日以降は内臓筋に観察された。内臓筋上では、14 日で環状筋のみに観察されたが、21 日で縦走筋にも見出され、その後これらの筋繊維に沿って分布が広がった。唾腺では、タイプ III 細胞に最も高頻度に観察され、獲得後 14~21 日でタイプ III 細胞の表面、28 日で細胞内部にも見出された。

(4) 病原性遺伝子ファイロジェンの保存性解析

PCR 法による網羅的探索の結果、これまでに発見されていない 4 種を含め、9 種 25 系統のファイトプラズマからファイロジェン遺伝子の部分配列が検出された。既報の知見と合わせると、少なくとも 11 種 59 系統の様々なファイトプラズマが、共通してファイロジェン遺伝子をもつことが明らかとなった。さらに配列同一性を算出したところ、塩基で 66.7%以上、アミノ酸で 44.1%以上と多様性に富んでいた。系統解析の結果 4 グループに分かれたため、これらを phyl-A, -B, -C, -D とした。いずれのグループにおいても、2つのヘリックスからなるコイルドコイル構造が予測されたことから、共通の機能メカニズムが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koinuma Hiroaki, Maejima Kensaku, Tokuda Ryosuke, Kitazawa Yugo, Nijo Takamichi, Wei Wei, Kumita Kohei, Miyazaki Akio, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61042-x	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 該当する

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 Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Maejima Kensaku, Koinuma Hiroaki, Miyazaki Akio, Matsumoto Ouki, Suzuki Takumi, Nijo 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 -

〔学会発表〕 計4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・魏薇・徳田遼佑・北沢優悟・二條貴通・汲田幸平・宮崎彰雄・前島健作・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 媒介昆虫個体内におけるファイトプラズマの経時的動態解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020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 フィールドサンプルからの効率的なファイトプラズマゲノム解読系の構築
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 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 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

〔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
---------	---------