

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14661

研究課題名(和文) 花の葉化因子「ファイロジェン」の作用機構解明による花器官形成制御技術開発

研究課題名(英文) Studies on regulation of floral organ formation based on the molecular mechanism of phyllogen, phyllody-inducing factor

研究代表者

難波 成任 (Namba, Shigetou)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：50189221

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)：ファイトプラズマは微小植物病原細菌であり、植物の花を葉に変化させる「葉化」などのユニークな症状を引き起こし、世界中の農業生産に甚大な被害をもたらしている。最近、申請者らは、ファイトプラズマのゲノム上にコードされる葉化実行因子「ファイロジェン」と、そのターゲット因子「MADSドメイン転写因子」を明らかにした。また、MADSドメイン転写因子の立体構造が解明された。本研究では、これら最新の知見をもとに、ファイロジェンの機能解析・構造解析を行い、ターゲットとの相互作用を分子レベルで解析した。

研究成果の概要(英文)：Phytoplasmas are plant pathogenic bacteria. They induce unique symptoms like phyllody, transformation of plant floral organs into leaf-like structures, and cause serious damages to crop production worldwide. We recently revealed the virulence factor of phyllody, phyllogen, and the target, MADS-domain transcription factors. Moreover, the tertiary structure of MADS-domain proteins were resolved. Taking advantage of these findings, we analyzed the function and structure of phyllogen and also analyzed the molecular interaction between phyllogen and the target.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ

1. 研究開始当初の背景

花器は種子・果実生産のほか観賞用として付加価値が高く、品種改良により多様な形質を持った花器が生み出されている。「ファイトプラズマ」は花器を葉化する植物病原微生物であり、葉化した花(ボタン・シャクヤク等)は1,000年以上前から付加価値が認められ、珍重されており、我が国でも病気と判明する以前は葉化病を発病した緑アジサイが緑花品種として高値で取引されていた。このように、葉化による園芸植物の付加価値は極めて高い一方で、葉化病は植物を衰弱させ枯死に至らしめる昆虫媒介性の重要病害であるため、農業生産における園芸植物としての利用は困難である。また、葉化病の発症機構は不明であった。

花はがく・花弁・雄しべ・雌しべの各花器官から構成されるが、これらの花器官は葉が変化したものである(Nature, 2001)。これは文豪ゲーテも示唆していた。植物細胞が葉から花器官に分化するメカニズムは植物に普遍的であり、MADSドメイン転写因子群がその主要実行因子である。従って、葉化病にこれら転写因子群が関わることは容易に想像されるが真偽は不明であった。

申請者らは葉化病誘導の分子機構を世界で初めて解明した(Plant Journal, 2011, 2014)。葉化病の原因遺伝子はファイトプラズマゲノムに共通して存在することから、「ファイロジェン(PHYLLOGEN)」と命名した。ファイロジェンは植物に導入すると、MADSドメイン転写因子群の一部に選択的に結合し、分解することにより花の葉化を引き起こすことを明らかにした。また最近、MADSドメイン転写因子の立体構造が解明され、ファイロジェンの機能を分子レベルで解明できる可能性が出てきた。

2. 研究の目的

ファイトプラズマは微小植物病原細菌であり、植物に黄化・萎縮・天狗葉・葉化などのユニークな症状を引き起こし、世界中の農業生産に甚大な被害をもたらしている。特に植物の花を葉に変化させる「葉化病」は、ときに植物の商品価値を高めることから、植物病防除の観点から大きな問題をはらんでいるが、その発症機構は不明である。最近、申請者らは、ファイトプラズマのゲノム上にコードされる葉化実行因子「ファイロジェン」と、そのターゲット因子「MADSドメイン転写因子」を明らかにした。また、MADSドメイン転写因子の立体構造が解明された。本研究では、これら最新の知見をもとに、ファイロジェンの構造解析を行い、ターゲットとの相互作用を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

葉化因子ファイロジェンの機能解析・構造解析を通じて、ファイロジェンと宿主因子の相互作用の構造的メカニズムを分子レベルで解明・利用し、葉化病の抑制因子を開発するとともに、花に新規形態を付与する技術の開発を目指す。研究手法の流れとしては、まずファイロジェンが標的とするMADSドメイン転写因子を特定し、その後ファイロジェンタンパク質の構造解析・構造予測を行う。それに基づき、MADSドメイン転写因子中におけるファイロジェンとの結合領域を特定する。すなわち、yeast two hybrid法によりファイロジェンと特異的に結合するMADSドメイン転写因子を明らかにする。ついで、MADSドメイン転写因子分解能をハイスループットに評価可能なYFPレポーター法を利用し、ファイロジェンと結合したMADSドメイン転写因子の分解活性を解析する。MADSドメイン転写因子は核局在性であるため、GFPと融合させて植物で一過的に発現させると、核にYFP蛍光が観察される。しかし、ファイロジェンを共発現させるとMADSドメイン転写因子の分解によりYFPも分解され、核の蛍光が消失する。そこで、新たにファイロジェンとの結合が確認されたMADSドメイン転写因子をファイロジェンと共に発現させることにより蛍光の消失が起こるかを観察する。

また、同じ実験系を用いて、MADSドメイン転写因子に部分的欠失変異を導入することにより、蛍光が消失しない変異領域をスクリーニングし、ファイロジェンにより認識される領域を特定する。これらのデータに基づいて、MADSドメイン転写因子とファイロジェンに点変異を導入し、それぞれにより葉化病抑制能および新たな葉化能を持つ機能性タンパク質の開発をおこなう。

4. 研究成果

植物の花器官分化では、A、B、C、Eの4クラスに分類されるMADSドメイン転写因子が器官特異的な組み合わせで機能する(ABCEモデル)。A、EクラスのMADSドメイン転写因子が欠失したシロイヌナズナでは、ファイロジェン形質転換シロイヌナズナと同様の花器官の変異が観察されるため、ファイロジェンがこれらの機能を阻害している可能性が考えられた。そこでファイロジェンと、シロイヌナズナのMADSドメイン転写因子であるAPELATA1(AP1; クラスA)、SEPALLATA3(SEP3; クラスE)の相互作用を解析した。Yeast two hybrid法により、ファイロジェンは両MADSドメイン転写因子と結合することが示された。さらに、これらのMADSドメイン転写因子から成る多量体の形成がファイロジェンによって阻害されることが、

in planta で示された。また、ファイロジェンを形質転換したシロイヌナズナにおいては、AP1 や SEP3 による遺伝子の発現制御が阻害されていた。以上のことから、ファイロジェンは A クラス、E クラスの MADS ドメイン転写因子の機能を阻害し、シロイヌナズナに花器官の形態を誘導すると考えられた。

ファイロジェンによる標的 MADS ドメイン転写因子の機能阻害機構を更に解析するため、YFP を付加した標的 MADS ドメイン転写因子を *Nicotiana benthamiana* 葉においてファイロジェンと共に一過的に発現させ、YFP 蛍光を観察した。その結果、YFP 融合 MTF の蛍光はファイロジェン存在時には著しく減衰していた。このことからファイロジェンによって MADS ドメイン転写因子の蓄積量が低下したと考えられた。従って、ファイロジェン存在下でこれらの MADS ドメイン転写因子は分解へと誘導されるものと考えられ、分解誘導経路のさらなる解析を行った。その結果、植物細胞内の主要なタンパク質分解経路であるプロテアソームを阻害した場合に、ファイロジェンによる YFP-SEP3 の分解誘導が抑制された。以上より、ファイロジェンは標的 MADS ドメイン転写因子のプロテアソームを介した分解を誘導し、花器官の形態異常を引き起こすと考えられた。

ファイロジェンはわずか 91 アミノ酸の小型タンパク質であり、類似のタンパク質はこれまで報告されていない。ファイロジェンタンパク質の大量発現・精製により構造解析を行った。また、核局在性の MADS ドメイン転写因子を利用した YFP レポーターアッセイ系を利用し、MADS ドメイン転写因子の部分変異体をファイロジェンとともに発現させて核の蛍光の有無を観察し、MADS ドメイン転写因子中のファイロジェン結合領域を特定した。これらの情報をもとに、ファイロジェンと MADS 転写因子の結合特異性に関わるアミノ酸残基を詳細に探索した結果、相互作用に重要な部位を見出した。

本研究により、葉化病の抑制因子や花器官の形態制御技術を開発するうえで基礎となる重要な知見が得られた。ファイロジェンの機能改変と植物への導入は、花の新たな育種技術として期待される。MADS ドメイン転写因子群は植物に普遍的に存在するため、本研究の成果は広く植物に応用可能である。既に花卉では青いカーネーションやバラなどの形質転換体が品種として市場化されており、将来的にはファイロジェンを用いた様々な葉化品種による花卉市場における新たな分野開拓が期待される。

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3件)

(1) Kitazawa Y., Iwabuchi N., Himeno M., Sasano M., Koinuma H., Nijo T., Tomomitsu T., Yoshida T., Okano Y., Yoshikawa M., Maejima K., Oshima K., Namba S.

Phytoplasma-conserved phylogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erx158, 2017.

(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 5: 11893, 2015.

(3) 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, phylogen.

Plant Signaling & Behavior 10: e1042635, 2015.

(学会発表)(計10件)

(1) 前島健作・三浦千裕・岩渕望・鯉沼宏章・二條貴通・北沢優悟・煉谷裕太郎・姫野未紗子・大島研郎・難波成任
ファイトプラズマの遺伝子発現制御のしくみをさぐる

第43回日本マイコプラズマ学会、2016年6月、長崎市

(2) 二條貴通・三浦千裕・岩渕望・鯉沼宏章・北沢優悟・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 は多様な遺伝子の転写制御に關与する

平成28年度日本植物病理学会大会、2016年3月、岡山県

(3) 鯉沼宏章・岩渕望・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、岡山県

(4) 笹野百花・前島健作・西田萩子・遊佐礼・北沢優悟・煉谷裕太郎・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、2016年3月、岡山県

(5) 岩渕望・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、岡山県

(6) 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、2016 年 3 月、岡山県

(7) 煉谷裕太郎・遊佐礼・二條貴通・鯉沼宏章・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接着因子 P38 の同定および接着能解析

第 42 回日本マイコプラズマ学会、2015 年 5 月、東京都

(8) 北沢優悟・遊佐礼・煉谷裕太郎・姫野未紗子・前島健作・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマは共通の葉化誘導因子ファイロジェンを有する

第 42 回日本マイコプラズマ学会、2015 年 5 月、東京都

(9) 前島健作・姫野未紗子・北沢優悟・福岡 美里・石川一也・煉谷裕太郎・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマの病原性因子 PHY11 による葉化誘導機構

第 42 回日本マイコプラズマ学会、2015 年 5 月、東京都

(10) 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

第 42 回日本マイコプラズマ学会、2015 年 5 月、東京都

〔図書〕(計 2 件)

(1) 前島健作・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマの分類, 性状

最新マイコプラズマ学: 61-65

近代出版, 2016.

(2) 大島研郎・前島健作・難波成任

ファイトプラズマの植物病理

最新マイコプラズマ学: 66-71

近代出版, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波成任 (NAMBA SHIGETOU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 50189221

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし