

令和元年6月8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：2017～2018

課題番号：17H06618

研究課題名(和文) 感染に関わる宿主植物因子の網羅的特定を介したファイトプラズマ防除戦略の基盤構築

研究課題名(英文) Identification of host factors involved in infection of phytoplasma.

研究代表者

北沢 優悟 (Kitazawa, Yugo)

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：50803160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難培養性植物病原細菌ファイトプラズマの植物への高効率接種系を構築した。本接種系を用いて様々な遺伝的背景を持つシロイヌナズナ個体にファイトプラズマを接種し病徴の進展を観察した結果、ファイトプラズマ感染に起因する病徴の進展には植物ホルモン関連因子が寄与していることが示唆された。加えて、本接種系を活用したファイトプラズマに対する薬剤スクリーニング系を構築し、ファイトプラズマに対して有効な新規薬剤を複数特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ファイトプラズマの病徴の進展と植物ホルモンとの間の関連性が示唆されたが、これはファイトプラズマという特異な細菌がどのように宿主と関わり感染を成立させるかを明らかにする上で重要な知見である。加えて、本研究で確立した接種系により、これまで研究手法が限られていたファイトプラズマの研究が容易になることが見込まれる。したがって、本研究を基盤として、ファイトプラズマの感染機構や防除法に関する研究が一層進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we constructed a highly efficient inoculum system of phytoplasma, a non-cultivating phytopathogenic bacteria. Using this inoculation system, phytoplasma was inoculated into Arabidopsis plants with various genetic background. As a result, it was suggested that plant hormone contributes to the symptom development by phytoplasma. In addition, we constructed a drug screening system for phytoplasma, and identified several novel antimicrobials effective for phytoplasma.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ 感染機構 宿主因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマ(*Candidatus Phytoplasma* spp.)は、植物の師部細胞内に局在しヨコバイなどの昆虫に媒介される、絶対寄生性の植物病原細菌である。数百種の植物に感染し矮化、花器官の葉化・不稔などを引き起こすため、世界中の農業生産で問題となっている[Mol Plant Pathol, 2008, 9, 403-423]。退行的進化を遂げた細菌であるファイトプラズマは、限られた遺伝子しかゲノム上に持たないため、その生活環の多くを宿主植物に依存していると考えられている[Nat Genet, 2004, 36, 27-29]。ゆえに、ファイトプラズマと宿主因子の関係性を理解することは、ファイトプラズマが植物に病害を引き起こす分子メカニズムを解明する上で、重要である。それに加えて、感染に関わる宿主因子を特定することは、ファイトプラズマを防除する上でも重要である。ファイトプラズマと同じく絶対寄生性で、ゲノム中に限られた遺伝子しか持たない病原体である植物ウイルスは、ファイトプラズマ同様に感染を成立させるために様々な宿主因子を必要とする[Nat Rev Microbiol, 2011, 10, 137-149]が、このような感染に必須な宿主因子を欠損した植物は、ウイルスが感染できず抵抗性となる。このような抵抗性は病原体による打破が生じにくく持続性が高いと考えられており、近年のゲノム編集技術の発達も相まって、実際の作物に導入しやすい抵抗性として注目されつつある。以上のように、感染に関わる宿主因子を特定することは、学術的にも応用的にも極めて意義深い。

このようにファイトプラズマ感染に関わる宿主因子の解明は、非常に大きな重要性を有するにも関わらず、研究が進んでいるとは言いがたい。その理由として、ファイトプラズマの培養系が確立していない(難培養性)ために、研究を行う上での制限が多く存在していることが挙げられる。そのため、ファイトプラズマは形質転換などの遺伝子操作を行うことが不可能であり、分子生物学研究を行う上で大きな障壁となっている。培養系が確立していないことによるもう一つの障壁として、ファイトプラズマの安定的な接種が困難となることがある。ファイトプラズマは昆虫媒介性であり、培養できない以上、安定的な接種には媒介昆虫を介する必要がある。それにも関わらず、ファイトプラズマの維持には感染植物を挿木で継代し維持する手法が広く普及してきた。このような媒介昆虫を介さない維持によって、ファイトプラズマは昆虫媒介能を容易に喪失する[Phytopathol, 2001, 91, 1024-1029]ため、これらのファイトプラズマの昆虫を介した接種は不可能である。このような制約が、ファイトプラズマの性状や病原性機構に未知の点が多い要因となっている。

一方、申請者の所属研究室では、ファイトプラズマを昆虫と植物間で継代しながら維持してきた。したがって、当ファイトプラズマは昆虫を介して植物へと接種することが可能であり、実際に申請者は、モデル植物であるシロイヌナズナを含む様々な植物にファイトプラズマを接種し、ファイトプラズマの病原性機構を解析してきた[Plant J, 2014, 78, 541-554; Sci Rep-UK, 2014, 4, 4111]。そこで、本接種系を用いて、大規模なファイトプラズマ接種系を構築し、様々な遺伝的背景を有する植物に対するファイトプラズマ感受性スクリーニングを行うことで、ファイトプラズマ感染に関わる宿主植物因子を網羅的に特定し、ファイトプラズマの性状や病原性機構を解明することが可能であるという構想に至った。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナと媒介昆虫を用いたファイトプラズマ接種系により、多数のシロイヌナズナ個体に対し媒介昆虫を用いてファイトプラズマを安定的に接種することで、各個体のファイトプラズマ感受性を試験することを目的とする。感受性の変化した個体を選抜し原因遺伝子を特定することで、ファイトプラズマ感染に関わる宿主因子を網羅的に特定することを目指す。以上の実験により、ファイトプラズマの感染・病徴発現メカニズムを解明するとともに、防除法の構築に向けた基盤となる知見を収集することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず、ファイトプラズマの昆虫によるシロイヌナズナへの高効率接種系の確率を試みた。次いで、本接種系を用いて様々な遺伝的背景を持つシロイヌナズナに対してOYファイトプラズマを接種し病徴の進展を観察することで、異なる症状を示す個体の選抜を行い、ファイトプラズマの感染に関わる宿主因子の探索を行った。

## 4. 研究成果

'*Candidatus Phytoplasma asteris*' タマネギ萎黄病ファイトプラズマ(OYファイトプラズマ)がヒメフタテンヨコバイによって媒介されることを利用し、温室環境下で増殖させた当該昆虫を用いることで、多数のシロイヌナズナにOYファイトプラズマを同時接種する系の確立に成功した。本系によりOYファイトプラズマを接種したファイトプラズマ感受性シロイヌナズナ(Col-0)個体は、葉の矮化や紫色の着色(パープルトップ)といった症状が確認されたが、植物ホルモンに関わる遺伝子の変異体を用いた解析により、一部症状の発現が植物ホルモン経路と関連していることが示唆された。現在本知見に基づき、植物ホルモン関連経路がファイトプラズマの感染に与える影響を解析している。また、本接種系で培った技術を活用することで、ファイトプラズマ感染植物に薬剤を処理するスクリーニング系を確立し、ファイトプラズマに有効な抗生物質のスクリーニングを行った。その結果、複数の抗生物質がファイトプラズマに有

効であることを新たに見出した。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Iwabuchi N., Maejima K., Kitazawa Y., Miyatake H., Nishikawa M., Tokuda R., Koinuma H., Miyazaki A., Nijo T., Oshima K., Yamaji Y., Namba S.  
Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma.  
Biochemical and Biophysical Research Communications (in press), 2019. 査読有

(2) Tanno K., Maejima K., Miyazaki A., Koinuma H., Iwabuchi N., Kitazawa Y., Nijo T., Hashimoto M., Yamaji Y., Namba S.  
Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma diseases using an in vitro plant-phytoplasma co-culture system.  
Microbiology 164:1048-1058, 2018. 査読有

(3) Koinuma H., Miyazaki A., Wakaki R., Fujimoto Y., Iwabuchi N., Nijo T., Kitazawa Y., Shigaki T., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.  
First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’ infecting cassava in Japan.  
Journal of General Plant Pathology 84: 300-304, 2018. 査読有

(4) Yoshida T., Kitazawa Y., Neriya Y., Hosoe N., Fujimoto Y., Hagiwara-Komoda Y., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.  
Complete genome sequence of the first isolate of hibiscus latent Singapore virus detected in Japan.  
Genome Announcements 6:e00054-18, 2018. doi: 10.1128/genomeA.00054-18. 査読無

(5) Iwabuchi N., Endo A., Kameyama N., Satoh M., Miyazaki A., Koinuma H., Kitazawa Y., Maejima K., Yamaji Y., Oshima K., Namba S.  
First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma malaysianum’ associated with *Elaeocarpus* yellows of *Elaeocarpus zollingeri*.  
Journal of General Plant Pathology 84:160-164, 2018. 査読有

(6) Nijo T., Neriya Y., Koinuma H., Iwabuchi N., Kitazawa Y., Tanno K., Okano Y., Maejima K., Yamaji Y., Oshima K., Namba S.  
Genome-wide analysis of the transcription start sites and promoter motifs of phytoplasmas.  
DNA and Cell Biology 36:1081-1092, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 二條貴通・前島健作・鯉沼宏章・岩渕望・徳田遼佑・西川雅展・北沢優悟・山次康幸・難波成任  
感染植物由来 DNA からのファイトプラズマ DNA 濃縮系の検討  
平成 31 年度日本植物病理学会本大会、2019 年

(2) Iwabuchi N., Kitazawa Y., Fujimoto Y., Koinuma H., Nijo T., Yoshida T., Okano Y., Maejima K., Yamaji Y., Oshima K., Namba S.  
Phyllody induction in diverse plant species by the phytoplasma effector phyllogen through degradation of host floral MADS-domain transcription factors.  
22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 2018.

(3) Maejima K., Nijo T., Fujimoto Y., Hosoe N., Neriya Y., Koinuma H., Iwabuchi N., Kitazawa Y., Okano Y., Yamaji Y., Oshima K., Namba S..  
First characterization of transcription start sites of phytoplasma.  
Joint Congress of The 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology, The 45th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology, 2018.

(4) 鯉沼宏章・二條貴通・煉谷裕太郎・岩渕望・北沢優悟・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・大島研郎・難波成任  
ファイトプラズマの RNA 転写開始点の網羅的解析による非コード RNA の検出  
平成 31 年度日本植物病理学会本大会、2018 年

(5) 二條貴通・鯉沼宏章・煉谷裕太郎・岩渕望・北沢優悟・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・

大島研郎・難波成任  
ファイトプラズマの転写開始点上流に見いだされるプロモーター配列の解析  
平成 31 年度日本植物病理学会本大会、2018 年

〔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〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ae-b/planpath/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。