

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14847

研究課題名（和文）細菌による花形態遠隔操作メカニズムの解明と汎用的な花形態制御技術開発への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the remote manipulation mechanism of flower morphology by bacteria and its application to the flower morphology control technology

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）・特任助教

研究者番号：50803160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では植物病原細菌由来のタンパク質ファイロジェンによる花形態制御機構の全貌解明に向けて、その機能を分子的に解析した。その結果、ファイロジェンがユビキチン非依存的プロテアソーム経路により標的を分解するユニークな機能を有することを解明するとともに、標的決定メカニズムを明らかとした。さらにアミノ酸変異導入実験とAIによる高精度なタンパク質構造予測プログラムを組み合わせ、ファイロジェンと標的宿主因子との結合モデルを構築した。またファイロジェン形質転換タバコ属植物の作出、およびタバコ属植物の異種接木試験に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花形態は花卉植物の価値を決定する最重要形質であり、より美しく珍奇な外観を作出することが常に求められる。本研究では植物の篩部に感染する植物病原細菌ファイトプラズマが分泌するタンパク質ファイロジェンが、篩部から花の形態を「遠隔制御」して葉化させることに着目し、ファイロジェン発現植物に様々な植物を接ぎ木することで、形質転換を行わずに様々な植物の花を葉化させることを目標として、形質転換植物の作出、遠隔制御機構の分子機構解明、標的認識部位の解析を行った。本研究により、形質転換を必要としない新規な花形態の制御技術の基盤が構築されたといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the function of phylogen, a protein from phytopathogenic bacteria, was investigated to elucidate the mechanism underlying manipulation of floral morphogenesis by phylogen. We found that phylogen has a unique function to degrade their targets by the proteasome-dependent but ubiquitin-independent pathway, and clarified the target-determining mechanism of phylogen. Furthermore, we constructed a binding model between phylogen and its target host factors by combining random mutagenesis experiments and a AI-based highly accurate protein structure prediction program. In addition, we have created phylogen-expressing tobacco plants (*Nicotiana* spp.) and conducted heterologous grafting technique using tobacco plants and other species.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイロジェン ファイトプラズマ

1. 研究開始当初の背景

花形態は花卉の価値を決定する最重要形質であり、より美しく珍奇な外観を作出することが常に求められる。花形態は時に外的要因によって大きく変化するが、代表的な例が篩部感染性病原細菌ファイトプラズマであり、花器官が葉へと変化する「葉化病」を様々な植物に引き起こす。葉化植物は病気と判明する以前は珍しい外見から人気を博し、例えば日本でも葉化アジサイが希少品種として高値で流通していた。このことは「花器官の葉化」が高い商品価値を持つことを示している。これまで、ファイトプラズマの分泌タンパク質「ファイロジェン」が幅広い植物に機能する葉化誘導因子として同定され(Maejima et al., 2014; Kitazawa et al., 2017)、園芸品種開発への応用の期待が高まっている。

ファイロジェンの応用的利用に向けては、その機能を理解する必要がある。ファイロジェンは、花器官形成に関わる4クラス(A、B、C、E)の「MADSドメイン転写因子(MTF)」のうちA、EクラスMTFに強く結合し、その分解を誘導する(Maejima et al., 2014; 図1)。しかし、花芽で機能するMTFの内、A、EクラスMTFを特異的に認識するメカニズムや分解誘導メカニズムの詳細にも不明な点が多い。加えて、ファイトプラズマが篩部にのみ感染し標的MTFが機能する花芽には侵入しないにも関わらず、ファイロジェンが如何に花形態を「遠隔制御」しているかは明らかでない。

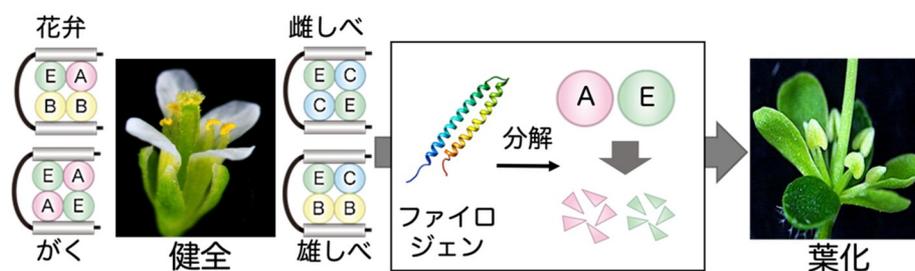


図1. ファイロジェンによる葉化メカニズム

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、植物病原細菌ファイトプラズマが篩部に分泌するタンパク質ファイロジェンが、花の形態を「遠隔制御」する機構を解析するとともに、ファイロジェンの標的認識部位を解明・改変し、花形態の自在な制御を可能とするための基盤を構築することである。以下に詳細を記す。

(1) ファイロジェンによる MTF 分解の分子機構の解明

ファイロジェンによる MTF 分解の際には、宿主植物が有するプロテアソームが関与する(Maejima et al., 2014)。プロテアソームによるタンパク質の分解は選択的であり、一般にユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれる経路に制御される。即ち、標的にユビキチンが結合(ユビキチン化)し、ユビキチン化したタンパク質がプロテアソームと直接結合、あるいはプロテアソームとユビキチン化タンパク質の両方を認識するシャトル分子によってプロテアソームへと運ばれ、分解される。ファイロジェンによる MTF の分解においてもユビキチンの関与が疑われていたが、一方でシャトル分子の一種 RAD23 がファイロジェンと結合することも知られ (MacLean et al., 2014)、ファイロジェンによる標的分解の分子メカニズムは不明であった。そこで、本研究では当該メカニズムの解明に向け、ファイロジェン、MTF、RAD23 の三者間相互作用を解析するとともに、MTF 分解におけるユビキチンの重要性を解析した。

(2) ファイロジェンによる標的認識機構の解明と人為的制御技術の開発

ファイロジェンは A、E クラス MTF に強い結合能を示すが、他の近縁な MTF に対しては相互作用活性を示さず(MacLean et al., 2014)、この結合性の違いが分解標的 MTF を決定していることを示唆している。ファイロジェンの標的結合性を人為的に改変できれば、MTF 分解を制御し葉化以外の様々な形質を植物に付加する技術の開発に繋がり、ファイロジェンの応用的価値向上につながるため、本研究ではファイロジェンの標的認識機構の解析を実施した。

(3) ファイロジェンによる花形態の遠隔制御機構の解明

ファイロジェンと標的 MTF は本来それぞれ篩部と花芽に存在し、空間的に隔離されている。ファイロジェンが篩部から花芽の MTF へと作用する機構は不明だが、ファイロジェンが非常に低分子量(約 10kDa)のタンパク質であることから、篩部から花芽へと移行して機能すると推察される。これを応用することで、ファイロジェン発現植物を様々な花卉に接木し、接いだ植物側の花器官を遠隔的に葉化できる可能性がある。本研究では、タバコ属植物が遠縁種を含む幅広い植物に接木可能なことを利用し、ファイロジェン発現タバコを作出し上記遠隔葉化システムの構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) ファイロジェンによる MTF 分解の分子機構の解明

ファイロジェン、MTF、RAD23 の植物細胞内での相互作用様式を解析するため、細胞内局在解析と共免疫沈降を行い、三者複合体の検出を試みた。当該複合体形成におけるユビキチンの重要性を解明するため、ユビキチン結合部位であるリジン残基をアルギニンに置換した MTF やファイロジェン変異体を作成し、MTF 分解誘導に与える影響を検証した。さらに同様の目的で、大腸菌を用いてファイロジェン、MTF、RAD23 を発現、精製したのち共免疫沈降に供し、ユビキチン非存在下での三者間相互作用を解析した。

(2) ファイロジェンによる標的認識機構の解明と人為的制御技術の開発

MTF におけるファイロジェンとの結合に重要な部位を決定するため、MTF の各ドメインとファイロジェンとの Yeast two hybrid 法を実施した。同様にファイロジェンにおける、MTF との結合に重要なアミノ酸を決定するため、ファイロジェンに無作為にアミノ酸変異を導入した変異体ライブラリーを作成し、標的 MTF、非標的 MTF との結合能が増強されるアミノ酸変異を選抜した。さらに AI を利用した高精度タンパク質構造予測モデルである ColabFold を利用し、ファイロジェンと MTF の結合モデル構築を試みた。

さらに葉化誘導活性が低下したファイロジェンホモログを見出し、その MTF や RAD23 との相互作用能を前項同様に検証することで、標的認識から分解誘導に至る条件を検討した。

(3) ファイロジェンによる花形態の遠隔制御機構の解明

遠縁種との接木が比較的寛容なタバコ属植物を材料とし、ファイロジェンを恒常的に発現する形質転換植物の作出を試みた。さらに、タバコと複数種の植物との異種接木を試みた。

4. 研究成果

(1) ファイロジェンによる MTF 分解の分子機構の解明

ファイロジェン、MTF、RAD23 の細胞内局在解析、および共免疫沈降の結果、MTF と RAD23 がファイロジェンを介して相互作用し、三者からなる複合体が形成されること、この複合体がプロテアソームとも相互作用していることが明らかとなった。加えて、ファイロジェンと RAD23 との相互作用の程度は MTF 非存在時には弱く、MTF 存在時には著しく増強された。即ち、ファイロジェンはまず標的である MTF と相互作用し、その後 RAD23 と相互作用することで、MTF をプロテアソームへと誘導すると考えられた (図 2)。また、この複合体に含まれるファイロジェンのユビキチン化が確認されたが、MTF のユビキチン化は確認されなかった。リジン残基を全てアルギニンに置換したファイロジェン変異体はユビキチン化されず、一方で

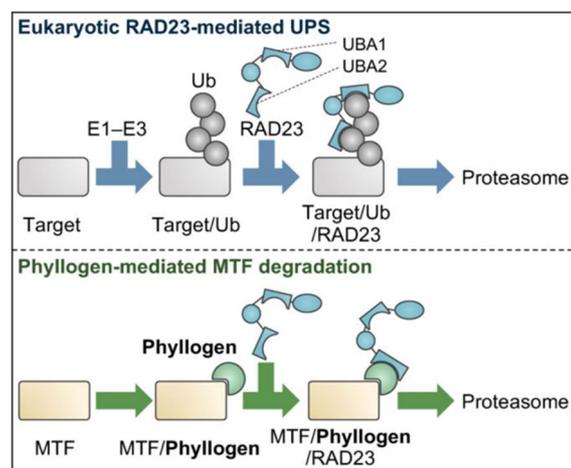


図2. ファイロジェンによる MTF 分解メカニズム

MTF 分解誘導能、および葉化誘導能を有していた。加えて、大腸菌で発現・精製したファイロジェン、MTF、RAD23 を用いて相互作用解析を行った場合にも、三者間相互作用が確認された。以上より、ファイロジェンはユビキチンの代わりに標的 MTF と RAD23 との相互作用を直接仲介することで、標的因子のユビキチン非依存的なプロテアソーム分解を誘導すると考えられた。これはファイトプラズマ以外の細菌が持つ病原因子には見られないユニークなメカニズムであると同時に、複数の酵素反応を伴うユビキチン化と異なり、ファイロジェン、MTF、RAD23 の相互作用のみで分解が誘導されると想定されるため、ファイロジェンの応用に向けて適したメカニズムであると考えられた。

(2) ファイロジェンによる標的認識機構の解明と人為的制御技術の開発

ファイロジェンによる標的認識機構を解明するため、まず MTF におけるファイロジェンに認識される部位を特定した。その結果、本来 MTF 同士の高量体化に寄与する領域にファイロジェンが結合することが判明し、MTF 同士の高量体化に重要なアミノ酸を変異させた場合にはファイロジェンとの結合能も喪失した。即ち、ファイロジェンは MTF 同士の相互作用に関わる領域を認識し、代わりに結合していると示唆された。

次に、ファイロジェンにおける、MTF との結合に重要なアミノ酸残基の網羅的探索を行なった。ファイロジェン変異体ライブラリの作出と選抜の結果、標的MTFとの結合が強まる変異を複数得ることに成功した。これらのアミノ酸は既知の結合関連残基と共に、ファイロジェンの立体構造上の特定の領域に集中して存在しており、当該領域がMTF との結合に働く領域と考えられた。また、同様の手法を用いて、本来標的ではないMTF に対しての結合を強めるアミノ酸変

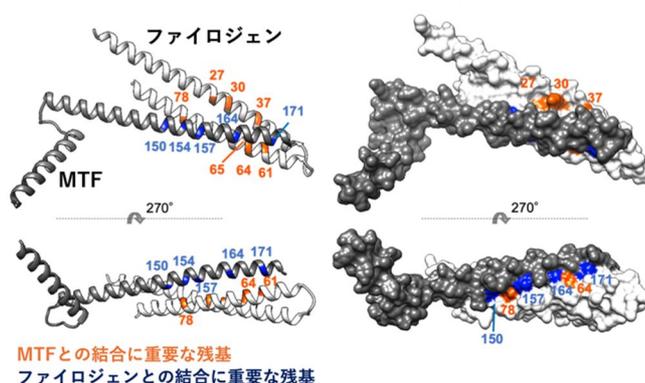


図3. ファイロジェンとMTFの相互作用様式

異も選抜することができた。更に ColabFold によるファイロジェンと MTF(ファイロジェンと結合する領域のみを使用)からなる複合体の構造予測を実施した結果、本実験で絞り込まれた領域が、上述した MTF 側でのファイロジェンとの結合に重要な領域と、相互作用面を形成することが予測された(図3)。以上より、ファイロジェンと MTF との結合に働く領域が特定され、ファイロジェンと MTF の結合モデルを構築できた。

更に、イネに感染するファイトプラズマ(rice yellow dwarf phytoplasma;RYD)由来のファイロジェン(PHYL_{RYD})の機能を解析した結果、PHYL_{RYD} は植物に軽微な形態異常しか誘導せず、その理由は標的 MTF の一部に対する分解誘導能が著しく低下しているためであった。興味深いことに PHYL_{RYD} は分解されない MTF との結合能は保持していた。その一方で、PHYL_{RYD} は分解可能な MTF と結合した際には RAD23 とも結合したのに対して、分解されない MTF と結合した際には RAD23 との結合は認められなかった。即ち、ファイロジェンの標的選択性は「ファイロジェンと MTF の結合性」に加えて、「両者が結合した後のシャトル因子との結合性」という 2 段階で制御されていることが示された。以上はファイロジェンの標的認識機構の理解、および制御に向けた重要な知見と考えられる。

(3) ファイロジェンによる花形態の遠隔制御機構の解明

ファイロジェン形質転換タバコ属植物の作出を行い、予定通り複数の形質転換植物を得ることに成功した。これらの植物でファイロジェンが発現することをウェスタンブロッティングにより確認するとともに、葉化が生じることを観察した。加えて、複数種の植物とタバコの接木実験を行い、接木可能な組み合わせを特定した。以上をふまえて、ファイロジェン形質転換タバコの接木実験により、ファイロジェンによる花形態の遠隔制御機構を解析するための基盤を構築した。

< 引用文献 >

Kitazawa Y, Iwabuchi N, Himeno M, Sasano M, Koinuma H, Nijo T, Tomomitsu T, Yoshida T, Okano Y, Yoshikawa N, Maejima K, Oshima K, Namba S. Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins. *J Exp Bot.* 2017 May 17;68(11):2799-2811.

MacLean AM, Orlovskis Z, Kowitzanich K, Zdziarska AM, Angenent GC, Immink RG, Hogenhout SA. Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* 2014 Apr 8;12(4):e1001835.

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. *Plant J.* 2014 May;78(4):541-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Masato, Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Matsuyama Juri, Matsumoto Oki, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Target degradation specificity of phytoplasma effector phyllogen is regulated by the recruitment of host proteasome shuttle protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13410	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 -
1. 著者名 Tokuda Ryosuke, Iwabuchi Nozomu, Kitazawa Yugo, Nijo Takamichi, Suzuki Masato, Maejima Kensaku, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Potential mobile units drive the horizontal transfer of phytoplasma effector phyllogen genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2023.1132432	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 -
1. 著者名 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Matsumoto Oki, Suzuki Masato, Matsuyama Juri, Koinuma Hiroaki, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Random mutagenesis-based screening of the interface of phyllogen, a bacterial phyllody-inducing effector, for interaction with plant MADS-box proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1058059	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 -
1. 著者名 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Sasano Momoka, Matsumoto Oki, Koinuma Hiroaki, Tokuda Ryosuke, Suzuki Masato, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 In press
2. 論文標題 A phytoplasma effector acts as a ubiquitin-like mediator between floral MADS-box proteins and proteasome shuttle proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac062	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵望・徳田遼佑・北沢優悟・鈴木拓海・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 ファイトブラズマのエフェクターの水平伝播はトランスポゾン様配列PMUにより引き起こされる
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 徳田遼佑・前島健作・岩淵望・北沢優悟・松本旺樹・鈴木誠人・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 PMUに座乗するファイロジェンの葉化誘導能の比較
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北沢優悟・鈴木誠人・岩淵望・前島健作・松山樹立・松本旺樹・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 イネ黄萎病ファイトブラズマのファイロジェンに見出された特異な分解標的スペクトラム
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木誠人・北沢優悟・岩淵望・前島健作・松山樹立・松本旺樹・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンの分解標的特異性はプロテアソーム関連因子との相互作用による制御を受ける
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松山樹立・北沢優悟・岩淵望・前島健作・松本旺樹・鈴木誠人・鯉沼宏章・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイトブラズマの葉化誘導因子ファイロジェンの標的認識に関わる新規アミノ酸残基の網羅的探索
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北沢優悟・松山樹立・岩淵望・前島健作・松本旺樹・鈴木誠人・鯉沼宏章・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンとMADSドメイン転写因子の結合に影響するアミノ酸残基はひとつの相互作用面を形成する
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本旺樹・北沢優悟・岩淵望・鯉沼宏章・鈴木誠人・徳田遼佑・前島健作・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイトブラズマの葉化誘導因子ファイロジェンと2種類の宿主因子による三者複合体の検出
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北沢優悟・岩淵望・松本旺樹・鈴木誠人・笹野百花・前島健作・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンは標的宿主因子のユビキチン非依存的なプロテアソーム分解により葉化を誘導する
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木誠人・北沢優悟・岩淵望・松本旺樹・山本桐也・前島健作・大島研郎・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 ファイロジェンは宿主因子の保存領域を相互作用の標的とする
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>病原性因子の標的選択性を決める新たな仕組みを発見 葉化病の治療薬開発に期待 https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20231218-1.html ファイトプラズマの病原性獲得の原動力を解明 病原性遺伝子はトランスポゾンによってシェアされる https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230511-1.html プロテインノックダウン技術の確立に一步近づく https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20230330-1.html タンパク質の新たな分解システム ファイロジェンによる葉化誘導メカニズム解明で発見! https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20220302-1.html</p>

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
---------	---------