

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19239

研究課題名（和文）昆虫の寿命を延ばす細菌が分泌するアンチエイジング因子の探索

研究課題名（英文）Exploring anti-aging factors secreted by bacteria that extend the lifespan of insects

研究代表者

大島 研郎（Oshima, Kenro）

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：00401183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ファイトプラズマは植物の細胞内に寄生して病気を引き起こす病原細菌である。ファイトプラズマは植物以外に昆虫にも細胞内寄生し、昆虫を介して植物から植物へと伝搬される。ファイトプラズマが感染した媒介昆虫は寿命が伸びたり、高齢になっても産卵数が維持される。ファイトプラズマのアンチエイジング効果に関わるメカニズムには興味を持たれているが、その全容は謎に包まれていた。本研究は、この現象に関わる宿主操作のメカニズムを解明することを目的とし、ファイトプラズマの分泌タンパク質を新たに計7個クローニングするとともに、分泌タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に細胞の老化には酸化や糖化に関わることが知られているが、ファイトプラズマの分泌タンパク質にはこのような酵素活性に関わるモチーフやドメインが存在しない。そのため、これまでの知見とは全く異なるメカニズムで老化を抑えている可能性を秘めており、新たな視点からアンチエイジングの研究分野に切り込むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Phytoplasma is a pathogenic bacterium that parasitizes within plant cells. Phytoplasmas intracellularly parasitize not only plants but also insects, and are transmitted from plant to plant via insect vectors. Insect vectors infected with phytoplasma have a longer lifespan and maintain the number of eggs laid even in old age. Although the mechanism involved in the anti-aging effect of phytoplasma has been of interest, the whole picture has been unclear. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of host manipulation involved in this phenomenon, and cloned a total of 7 new phytoplasma secreting proteins and identified host proteins that interact with the secretory proteins.

研究分野：植物病理学

キーワード：ファイトプラズマ 老化 分泌タンパク質

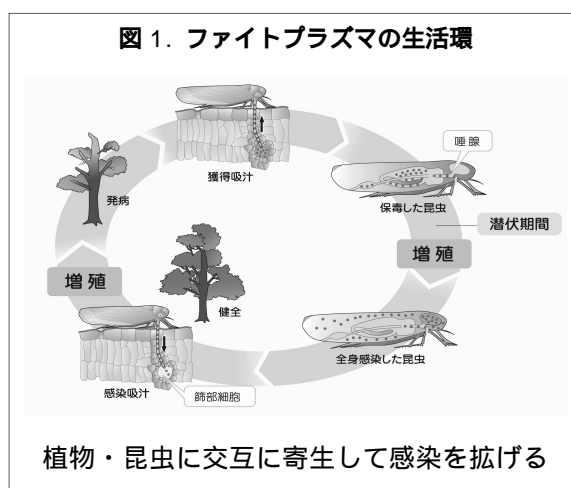
### 1. 研究開始当初の背景

ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma* 属細菌) は植物の細胞内に寄生して病気を引き起こす病原細菌である。世界中で 700 種以上もの農作物や園芸植物、樹木に感染することが報告されており、日本でもイネ、タマネギ、ネギ、トマト、ニンジンなどの作物や、キリ、クリ、アジサイなどの樹木においてファイトプラズマ病による被害が報告されている。ファイトプラズマ病によってイタリアのリンゴ生産だけでも年間 1 億ユーロの被害が出るなど海外での被害も大きく、予防法の確立が切望されている。しかし、ファイトプラズマの発見から 40 年以上が経つものの、未だ人工培養が困難であることから、現在でも研究が難しい病原体の一つである。

ファイトプラズマが感染した植物は花が葉に変化する葉化や、種子形成が異常になる不稔症状などの特徴的な病徴を呈する。これは宿主植物が生殖ステージに移行するのを抑制し、宿主を延命させるためのファイトプラズマによる宿主操作ではないかと考えられている。また、ファイトプラズマは植物以外に昆虫(ヨコバイ類)にも細胞内寄生し、昆虫を介して植物から植物へと伝搬される(図1)。ファイトプラズマが感染した媒介昆虫は寿命が伸びたり、高齢になっても産卵数が維持される。このようなファイトプラズマのアンチエイジング効果に関わるメカニズムには興味を持たれているが、その全容は謎に包まれていた。

### 2. 研究の目的

ファイトプラズマが感染した植物は葉化や不稔症状などの特徴的な病徴を呈する。これは宿主植物が生殖ステージに移行するのを抑制し、宿主を延命させるためのファイトプラズマによる宿主操作ではないかと考えられている。また、ファイトプラズマが感染した媒介昆虫には寿命の伸長や産卵数の増加が認められる。本研究は、こうしたファイトプラズマのアンチエイジング効果に関わる宿主操作のメカニズムを解明することを目的とする。



### 3. 研究の方法

(1)ファイトプラズマの分泌タンパク質遺伝子の同定とクローニング

ファイトプラズマは植物・昆虫の細胞内に寄生するため、ファイトプラズマから分泌されたタンパク質は宿主の細胞質で直接的に機能する。分泌シグナルを持つタンパク質は宿主を操作するアンチエイジング因子の最有力候補であるため、ファイトプラズマゲノム上にコードされる分泌タンパク質を探索し、その機能を解析する。本研究では、*Candidatus Phytoplasma japonicum* JHP 系統を材料に用いて、ファイトプラズマの分泌タンパク質の探索を試みた。

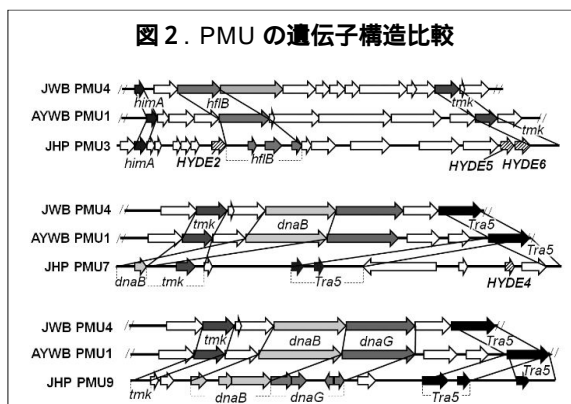
(2)分泌タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の同定

分泌タンパク質と相互作用する昆虫側の宿主因子を調べるために、シグナル配列を取り除いた分泌領域を PCR 増幅し、酵母ツーハイブリット法用のプラスミドと GeneArt を用いて反応させ、bait プラスミドベクターを作成した。このプラスミドを酵母に導入した後、Normalized Mate & Plate Library の入った prey ベクターを持つ酵母とメーティングを行い、両プラスミドを持つ酵母を作出し、SD (-Trp, -Leu, -His, -Ade / X / A)培地上で生育するかどうかを観察した。

### 4. 研究成果

(1)ファイトプラズマの分泌タンパク質遺伝子の同定とクローニング

ファイトプラズマは難培養性であるため、次世代シーケンサーを用いてゲノム解読しても、その多くは植物由来の DNA であり、ファイトプラズマの分泌タンパク質を効率的に探索することが困難であった。そこで分泌タンパク質の多くが PMU (potential mobile unit)と呼ばれるゲノム領域にコードされることを利用して、PMU にコードされる *tmk*, *tra5*, *dnaB*, *hflB*, *ssb* 遺伝子のコンセンサス配列をもとにプライマーを設計し、JHP ゲノムに存在する PMU 領域の塩基配列を解読した。その結果、9 つの PMU 領域のクローニングに成功した。他のファイトプラズマ属細菌のゲノムと遺伝子構造を比較したところ、*dnaB*, *tmk*, *tra5*, *hflB* などの遺伝子が共通してコードされてい



る一方、それらの遺伝子間にコードされる機能未知遺伝子はファイトプラズマによって異なっており、多様性が認められた(図2)。これらの PMU 領域の中から計7個の分泌タンパク質遺伝子を発見し、HYDE1~7と命名した。HYDE1、および HYDE2 の細胞内局在を調べるために、YFP-HYDE1、YFP-HYDE2 融合タンパク質をそれぞれ *Nicotiana benthamiana* で一過的に発現させたところ、HYDE1 は核と細胞質に、HYDE2 はおもに細胞質に局在することが示唆された。

#### (2) 分泌タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の同定

分泌タンパク質を bait として用いた酵母ツーハイブリットシステムを構築し、分泌タンパク質と相互作用する宿主側因子を探索することを試みた。その結果、分泌タンパク質の一つである PW38 が昆虫の Tep と相互作用することが示唆された。Tep はエンドペプチダーゼ活性を持ち、細菌に対する細胞性免疫応答に関与するタンパク質であり、ファイトプラズマが分泌タンパク質を使って細胞性免疫を抑制している可能性が考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nijo, T., Iwabuchi, N., Tokuda, R., Suzuki, T., Matsumoto, O., Miyazaki, A., Maejima, K., Oshima, K., Namba, S. & Yamaji, Y.	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 Oshima, K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Molecular biological study on the survival strategy of phytoplasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-021-01027-4	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 Kitazawa Yugo, Iwabuchi Nozomu, Maejima Kensaku, Sasano Momoka, Matsumoto Oki, Koinuma Hiroaki, Tokuda Ryosuke, Suzuki Masato, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 34
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 1709 ~ 1723
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bertaccini Assunta, Arocha-Rosete Yaima, Contaldo Nicoletta, Duduk Bojan, Fiore Nicola, Montano Helena Guglielmi, Kube Michael, Kuo Chih-Horng, Martini Marta, Oshima Kenro, Quaglino Fabio, Schneider Bernd, Wei Wei, Zamorano Alan	4. 巻 72
2. 論文標題 Revision of the 'Candidatus Phytoplasma' species description guidelines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 5353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005353	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 該当する

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 遠藤藍、石曾根翔子、鈴木杏奈、前島健作、山次康幸、大島研郎
2. 発表標題 アジサイ葉化病ファイトプラズマの分泌タンパク質HYDE5の機能解析
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 今川基、遠藤藍、前島健作、山次康幸、大島研郎
2. 発表標題 キク緑化病ファイトプラズマの偽遺伝子PHYLBの祖先遺伝子の復元
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

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 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 ファイトプ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 大島研郎
2. 発表標題 花を葉に変える微生物ファイトプラズマはどのように宿主をあやつるのか？
3. 学会等名 第62回植物バイテクシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oshima, K
2. 発表標題 Review and perspective on the survival strategy of phytoplasma
3. 学会等名 The 8th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本旺樹、岩淵望、北沢優悟、鈴木拓海、鈴木誠人、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 葉化誘導能をもたないファイロジェングループと葉化誘導能を制御する1アミノ酸多型の特定
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
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、鈴木寛人、前島健作、大島研郎、難波成任、山次康幸
2. 発表標題 網羅的探索法による多様なファイロジェン遺伝子の同定
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北沢優悟、岩淵望、宮武秀行、徳田遼佑、鯉沼宏章、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花器官葉化誘導因子ファイロジェンの立体構造解析
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木拓海、二條貴通、徳田遼佑、岩淵望、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 アジサイ葉化病ファイトプラズマHP系統のドラフトゲノム解析
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二條貴通、鈴木拓海、岩淵望、徳田遼佑、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 効率的なゲノム解読に向けたファイトプラズマDNA濃縮系の構築
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大島研郎
2. 発表標題 植物も感染症と闘っている
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第48回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤藍，石首根翔子，鈴木杏奈，阪田さわ子，前島健作，山次康幸，大島研郎
2. 発表標題 アジサイ葉化病ファイトプラズマの分泌タンパク質HYDE5はGATA転写因子HANを分解する
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 梶結利加，御船淳紀，磯邊優太，遠藤藍，前島健作，山次康幸，大島研郎
2. 発表標題 ファイトプラズマの低温ショックタンパク質は植物免疫を誘導しにくい性質を持っている
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 徳田遼佑，岩淵望，二條貴通，北沢優悟，鈴木誠人，前島健作，大島研郎，難波成任，山次康幸
2. 発表標題 全ゲノム情報の比較に基づくファイトプラズマの近縁性の評価
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 ファイトプ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 Oshima, K.
2. 発表標題 Molecular characterization of phytoplasma by genomic research
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤藍, 岩淵望, 前島健作, 難波成任, 大島研郎
2. 発表標題 日本各地に被害をもたらすホルトノキ萎黄病のファイトプラズマ種の同定
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第49回学術集会
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に結合する
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第49回学術集会
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 ファイロジェンはユビキチン非依存的プロテアソーム分解により標的を分解するユニークな病原性因子である
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第49回学術集会
4. 発表年 2022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 ファイトプラズマの葉化誘導因子ファイロジェンは2種類の宿主因子の相互作用を仲介する
3. 学会等名 日本マイコプラズマ学会第49回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 濱本宏, 鍵和田聡, 前島健作, 難波成任, 大島研郎, 山次康幸	4. 発行年 2022年
2. 出版社 養賢堂	5. 総ページ数 544
3. 書名 植物医科学	

〔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
---------	---------