

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：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850026

研究課題名(和文)小分子RNA型エフェクターを介した宿主-病原微生物相互作用の解明

研究課題名(英文)host-pathogen interactions via noncoding RNA

研究代表者

前島 健作(Maejima, Kensaku)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：20726062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトプラズマに適したRNA-seq技術の開発によりORF領域及びORFが存在しないゲノム領域からも多数の転写産物が生じていることを明らかにした。また、ファイトプラズマ感染植物からファイトプラズマのRNAのみを取り出し、ゲノム上における転写起点を網羅的に特定する手法を確立し、ORFが存在しないゲノム領域から転写されるRNAにも転写開始点が見出されることを明らかにするとともに、ファイトプラズマに共通して見出される複数のプロモーター配列を特定した。いずれも初の知見であり、ファイトプラズマの遺伝子および小分子RNAの発現制御の解明に直接的に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：The development of RNA-seq technology suitable for phytoplasma revealed that a large number of transcripts are generated from the genomic region where ORF region and ORF do not exist. We also established a method to extract only phytoplasma RNA from phytoplasma-infected plants and comprehensively identify transcription start sites on the genome. The sites are also found in RNA transcribed from noncoding regions. Some putative promoter sequences commonly found in phytoplasmas. These data are the first findings and directly contribute to elucidation of expression control of phytoplasma genes and small RNAs.

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

病原微生物(ウイルス、細菌、菌類)は宿主への感染を成立させるために、宿主との複雑な相互作用をおこない、多層的な抵抗性機構を回避する必要がある。病原微生物が宿主に分泌する病原性因子「エフェクター」は相互作用の実行因子であり、これまでに多数同定され機能が解明されてきた。これまでに病原微生物から単離されたエフェクターのほとんどはタンパク質であり、これらエフェクターは宿主細胞内に分泌され、感染に有利になるように宿主の代謝系を操作している [Nat Rev Genet, 2005. 6:206-220; FEMS Microbiol Rev, 2011. 35:1100-1125; Curr Opin Plant Biol, 2012. 15:477-482]

RNAサイレンシングは小分子RNAを介した遺伝子発現制御機構であり、真核生物に広く保存されている。小分子RNAは相補的配列を持つ mRNA 特異的な切断・分解をもたらすほか、相補的配列を持つゲノム DNA 領域のメチル化を介した転写抑制にも関与する [Cell, 2009. 136:642-655] RNAサイレンシングは病原体との相互作用においても重要な働きを担っており、ウイルスに対する防御機構でもある [Nat Rev Genet, 2005. 6:206-220] また逆に、ウイルス由来の小分子RNAが宿主の遺伝子発現を抑制し、病原性に関わる事例も知られている [PLoS Pathog, 2011. 7:e1002021] 近年、植物と植物病原菌類の間でも小分子RNAのやり取りがおこなわれることが明らかになってきた [Plant Cell, 2010. 22:3130-3141] 特に、植物病原菌類が生産する小分子RNAにより、植物側の抵抗性関連遺伝子の発現が抑制されたことから [Science, 2013. 342:118-123] 菌類の小分子RNAがエフェクターとして機能することが示された。一般に、塩基配列はアミノ酸配列よりも変異頻度が高いため、小分子RNA型エフェクターはタンパク質型エフェクターと比較して配列の最適化が生じやすく、エフェクターとしての進化的優位性は高いと考えられる。

しかしながら、病原細菌における小分子RNA型エフェクターの報告はこれまでのところ存在しない。原因の一つとして、細菌は真核生物のようなRNAサイレンシングの機構を持たず、小分子RNAの機能に関する研究分野が大きく遅れていることが考えられる。近年ではCRISPRのようなRNAサイレンシングに準ずる機構の存在が明らかになるなど [Nat Rev Microbiol, 2008. 6:181-186] 小分子RNAの役割が注目され始めているが、まだ真核生物におけるRNAサイレンシングと比べると不明な点が多く残されている。

ファイトプラズマは昆虫媒介性の重要植物病原細菌であり、幅広い植物の篩部細胞内に寄生し、萎縮、叢生、花の葉化などユニークな病徴を引き起こす。近年いくつかの分泌タンパク質が病徴に関わるエフェクターと

して報告されているが [Curr Opin Microbiol, 2012. 15:247-254] 感染性に関わるエフェクターは発見されておらず、その感染成立メカニズムは依然として謎に包まれている。申請者はこれまで、ファイトプラズマのエフェクタースクリーニングにより、花の葉化を引き起こす分泌タンパク質を単離し、その機能解明をおこなっている [日植病報, 2012. 79:36] その過程において、ファイトプラズマは既知のエフェクターのホモログを持たないこと、感染性に関わるエフェクターが未だ見出されないことを確認してきた。これらのことは、従来分泌タンパク質型のエフェクターとは異なる病原性因子の存在を示唆すると考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、申請者はファイトプラズマの新規病原性因子として小分子RNA型エフェクターの存在を想定して、まずファイトプラズマに感染した植物の小分子RNAの大規模シーケンスおよびファイトプラズマゲノム情報とのマッチングにより、ファイトプラズマから生産される小分子RNAを網羅的に特定することを目的とした。次に、それら候補配列について、発現制御機構を解析することにより、機能に関する知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

ファイトプラズマのゲノム情報をもとに、ファイトプラズマ感染植物から、網羅的に転写開始点の予測をおこなった。つづいて、従来の知見ではファイトプラズマのRNAを大量に解読する技術がなかったため、ファイトプラズマに適した大規模RNAシーケンス解析技術の開発をおこなった。さらに、ファイトプラズマの転写開始点を網羅的に特定する大規模RNAシーケンス解析技術の開発をおこなった。

4. 研究成果

ファイトプラズマのゲノム上には、様々な位置でRNAの転写開始点が予測され、転写制御系についても明らかになった。また、従来の方法と比較して、きわめて高効率にファイトプラズマの転写産物を解読することができた。その結果、ファイトプラズマゲノム上のORFの多くから転写産物が検出されるとともに、ORFが存在しないゲノム領域からも多数の転写産物が検出された。さらに、転写開始点の網羅的特定により、ORFが存在しないゲノム領域から転写されるRNAにも転写開始点が見出されることを明らかにするとともに、ファイトプラズマに共通して見出される複数のプロモーター配列を特定した。いずれも初の知見であり、ファイトプラズマの遺伝子及び小分子RNAの発現制御の解明に直接的に寄与するものである。

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 5 件)

(1) 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 phytoplasmata via an in vitro transcription assay.

Scientific Reports 5: 11893, 2015.

(2) 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.

(3) Minato N., Himeno M., Hoshi A., Maejima K., Komatsu K., Takebayashi Y., Kasahara H., Yusa A., Yamaji Y., Oshima K., Kamiya Y., Namba S.

The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways.

Scientific Reports 4: 7399, 2014.

(4) Neriya Y., Maejima K., Nijo T., Tomomitsu T., Yusa A., Himeno M., Netsu O., Hamamoto H., Oshima K., Namba S.

Onion yellow phytoplasma P38 protein plays a role in adhesion to the hosts.

FEMS Microbiology Letters 361: 115-122, 2014.

(5) 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, phylogen, induces phyllody.

The Plant Journal 78: 541-554, 2014.

〔学会発表〕(計 25 件)

(1) 前島健作・三浦千裕・岩淵望・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) 鯉沼宏章・岩淵望・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

(3) 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

(4) 岩淵望・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

(5) 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

(6) 二條貴通・三浦千裕・岩淵望・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

(7) 鯉沼宏章・岩淵望・根津修・宮崎彰雄・岡野夕香里・姫野未紗子・前島健作・難波成任

FTA カードを用いた LAMP 検出用の効率的ファイトプラズマ DNA 調整法

平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015 年 9 月、栃木県

(8) 岩淵望・鯉沼宏章・根津修・宮崎彰雄・姫野未紗子・二條貴通・岡野夕香里・前島健作・難波成任

Direct Tissue Stamp 法を用いた簡易高感度なファイトプラズマ感染植物組織内分布可視化技術の開発

平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015 年 9 月、栃木県

(9) 笹野百花・前島健作・西田萩子・遊佐礼・北沢優悟・煉谷裕太郎・姫野未紗子・大島研郎・難波成任

花葉化因子ファイロジェン「PHYL1」はシロ

イヌナズナの class E MADS 転写因子の分解を誘導する

平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015 年 9 月、栃木県

(10) 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 PHY1 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

(11) 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

(12) 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

(13) 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

(14) 福岡美里・姫野未紗子・湊菜未・藤田尚子・前島健作・友光達哉・北沢優悟・小松健・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマの葉化誘導因子 PHY1 は MADS-box 転写因子と結合し機能を阻害する

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(15) 北沢優悟・前島健作・福岡美里・石川一也・友光達哉・姫野未紗子・小松健・大島研郎・難波成任

PHY1 は宿主のユビキチンプロテアソーム系を介して MADS-box 転写因子の分解を誘導する

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(16) 友光達哉・北沢優悟・前島健作・福岡美里・岩淵望・姫野未紗子・小松健・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマに広く保存される葉化誘導因子 ファイロジェン

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(17) 原慎一郎・湊菜未・星朱香・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病原性因子 TENGU が誘導する不稔症状について

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(18) 湊 菜未・笠原博幸・竹林裕美子・前島健作・山次康幸・大島研郎・神谷勇治・難波成任

ファイト プラズマのエフェクター TENGU による植物の不稔症状誘導機構の解析

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

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

パープルトップ症状はファイトプラズマ感染による細胞死の誘導 を抑制する

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(20) 煉谷裕太郎・友光達哉・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膜タンパク質 P38 の MAM 領域は昆虫宿主への接着に重要である

平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月、東京都

(21) 前島健作・難波成任

ナノ病原体の病原性シグナル

植物の中をめぐる多様なシグナル分子、2014 年 11 月、奈良県

(22) 北沢優悟・吉田哲也・菅原杏子・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病原性因子 TENGU の機能領域と切断部位の特定

平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月、北海道

(23) 北沢優悟・吉田哲也・菅原杏子・友光達哉・原慎一郎・煉谷裕太郎・姫野未紗子・前島健作・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマのてんぐ巣症状誘導因子の植物内プロセッシング

第 41 回日本マイコプラズマ学会、2014 年 5 月、東京都

(24) 姫野未紗子・北沢優悟・吉田哲也・遊佐礼・宮崎彰雄・煉谷裕太郎・前島健作・大島研郎・難波成任

ファイトプラズマ感染によるパープルトップ症状誘導メカニズムに関する解析

第 41 回日本マイコプラズマ学会、2014 年 5 月、東京都

(25) 前島健作・北沢優悟・吉田哲也・福岡美里・松田健太郎・煉谷裕太朗・姫野未紗子・大島研郎・難波成任
ファイトプラズマの病原性因子が引き起こす植物の形態変化
第41回日本マイコプラズマ学会、2014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.

〔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/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前島 健作 (MAEJIMA, Kensaku)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 20726062

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし