

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	昆虫媒介性病原体のホストスイッチング機構の解明と新規防除戦略の構築
研究機関・部局・職名	東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授
氏名	大島 研郎

【研究目的】

地球上で生産可能な食糧の約12%、8億人分の食糧が毎年作物の病気により失われている。中でも、昆虫によって媒介される植物病原体は、地球の気候変動とともに、その感染範囲を拡大させており、こうした植物の病気を防ぐことが近年の重要な課題となっている。

ファイトプラズマ (Phytoplasma 属細菌) は、植物の篩部細胞内に寄生する病原微生物であり、世界中で多くの農作物に被害を与えている。

ファイトプラズマは、ヨコバイなどの昆虫により媒介され、動物-植物の宿主間を水平移動する「ホストスイッチング」により感染を拡大する(図1)。本研究は、ファイトプラズマをモデルとして、ホストスイッチングの分子メカニズムを解明し、防除技術の確立のための基盤構築を目的としている。

具体的には、近年、課題担当者らによって初めて明らかにされたファイトプラズマの全ゲノム情報や昆虫宿主の特異性機構に加え、植物における病原性因子などの知見に基づき、マイクロアレイ・比較ゲノム解析・分泌タンパク質の機能解析などの手法を総合的に用いることで、ファイトプラズマは、なぜホストスイッチングを行い、それをどのようにして達成しているのか？ すなわちホストスイッチング機構の分子メカニズムの解明を目的とした。

また、このホストスイッチング機構は、ファイトプラズマが自身の感染拡大のために進化させてきたシステムであると考えられる。そこで、この機構を阻害・抑制する方法を探索し、ファイトプラズマ病の新規防除技術に向けた知見を得ることを目指した。

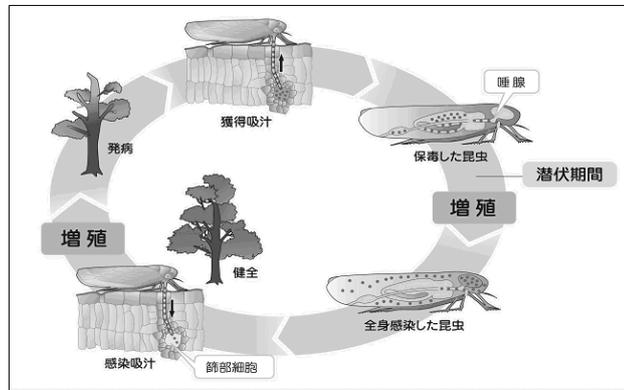


図1 ファイトプラズマのライフサイクル
ファイトプラズマは、植物・昆虫に細胞内寄生するユニークな特徴を持ち、両者を行き来することで感染を拡大する

【総合評価】	
○	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】	
① 総合所見	
<p>本研究課題は、植物病原であるファイトプラズマ属細菌が昆虫－植物という2つの宿主を移動する「ホストスイッチング」の分子機構解明を目的とし、この機構を阻害・抑制することによる新規防除技術の構築を目指して展開された。</p> <p>本研究課題においては、具体的な達成目標として以下3項目を掲げ、研究を展開した。</p> <p>(1) 植物・昆虫の宿主特異的に発現するファイトプラズマ遺伝子群、すなわちホストスイッチングに関わる分子ネットワークを特定する。</p> <p>(2) ファイトプラズマが持つ RpoD と FliA という2種類の転写因子の機能解析を行う。</p> <p>(3) 宿主操作に関わるものが推測されるファイトプラズマの分泌タンパク質に焦点を当てて解析を進めるとともに、相互作用する宿主因子についても同定する。</p> <p>いずれの目標についても、それを達成していると評価できる。</p> <p>また、研究全体の応用面として、ホストスイッチング機構を阻害することにより、ファイトプラズマ感染を抑制する技術につなげることについても、実際に植物感染時に働く浸透圧調節チャンネルの機能の阻害により、ファイトプラズマの増殖を部分的に抑えることに成功しており、ホストスイッチングの阻害がファイトプラズマ病の新規防除技術の開発につながる可能性を初めて示すことができた。</p> <p>本研究は、課題担当者らのこれまでの研究実績を基盤に展開され、目的の達成状況に述べるように、植物の形態形成に関わるホメオティック遺伝子群の発現、分解が影響を受けることを明らかにしたことなど、当初の目標を超える新たな発見を加え、目標を十分に達成している。研究計画の緻密さと遂行能力を高く評価したい。一方、本研究課題の範囲を超えているが、課題担当者らが指摘しているように、ファイトプラズマの極限にまで切り詰められてもなお生命として存在する代謝系の動植物宿主との物質のやり取りを通じた動的解明はまだ不十分と言えよう。今後の研究の進展に向けて、引き続きリーダーシップを発揮していくことを期待したい。</p>	

② 目的の達成状況	
<p>・ 所期の目的が</p> <p>(<input checked="" type="checkbox"/> 全て達成された ・ <input type="checkbox"/> 一部達成された ・ <input type="checkbox"/> 達成されなかった)</p>	
<p>本研究課題においては、従来全く解明されていなかったファイトプラズマがいかに植物と昆虫という全く異なった生物内で自分の代謝をスイッチできるかを解析するという目的に対して、新たに全ゲノムデータやアレイ解析などを駆使することにより</p>	

制御因子を特定することができている。また、植物体の遺伝子発現変動についても解析できており、当初の目標を達成している。部分的には、所期の目的を上回る成果が得られていると言える。

当初の研究計画では、以下の3つの解析を柱とすることを予定していた。

- (1) 植物・昆虫の宿主特異的に発現するファイトプラズマ遺伝子群、すなわちホストスイッチングに関わる分子ネットワークを特定する。
- (2) ファイトプラズマが持つ RpoD と FliA という2種類の転写因子の機能解析を行う。
- (3) 宿主操作に関わるものが推測されるファイトプラズマの分泌タンパク質に焦点を当てて解析を進めるとともに、相互作用する宿主因子についても同定する。

(1) については、当初の計画通り、ファイトプラズマ研究では初めてとなる網羅的遺伝子発現解析系を確立し、宿主特異的な遺伝子発現の解析に成功した。また、ファイトプラズマが昆虫・植物それぞれの宿主に感染しているときに発現する遺伝子群を特定することができた。

(2) についても、当初の計画通り、ファイトプラズマの転写因子の活性を *in vivo* で測定するための実験系を確立することに成功し、RpoD および FliA の2つの転写因子がそれぞれ特異的に遺伝子発現を調節することを明らかにすることができた。

(3) については、ファイトプラズマ感染に伴う宿主側の遺伝子発現変動について解析を行い、ファイトプラズマ感染により、植物の形態形成に関わるホメオティック遺伝子群の発現が影響を受けることを明らかにした。また、当該現象に関わる分泌タンパク質 Phy11 を同定し、Phy11 が植物の花形成に関わる MADS ドメイン転写因子を分解に導くことで、宿主の形態異常を引き起こしていることを明らかにした。

また、研究全体の応用面として、ホストスイッチング機構を阻害することにより、ファイトプラズマ感染を抑制する技術につなげる点については、実際に植物感染時に働く浸透圧調節チャネルの機能の阻害により、ファイトプラズマの増殖を部分的に抑えることに成功しており、ホストスイッチングの阻害がファイトプラズマ病の新規防除技術の開発につながる可能性を初めて示すことができた。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

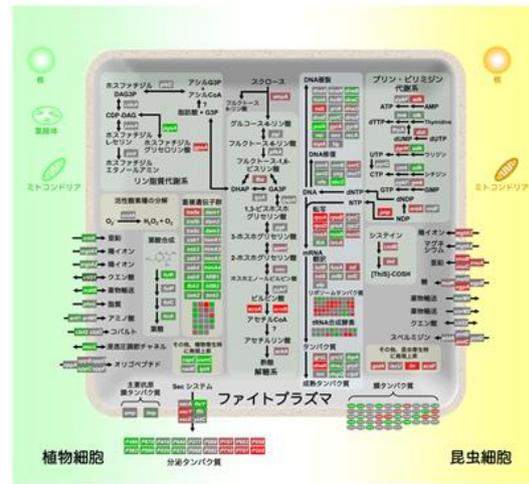
・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

本研究により得られた成果を、当初の達成目標ごとに下記に記す。

(1) ホストスイッチングに伴う網羅的遺伝子変動解析

ファイトプラズマのゲノムデータをもとにファイトプラズマの DNA マイクロアレイを作製し、ファイトプラズマの遺伝子発現を網羅的に調べた。その結果、ファイトプラズマは植物宿主と昆虫宿主とを交代するたびに、ゲノム全体の約 1/3 に相当する遺伝子の発現量を変化させていることが明らかになった (図 2)。特に、ファイトプラズマはそれぞれの宿主に合わせて、物質輸送を行うトランスポーターや浸透圧を調節するチャネル、糖を分解する酵素、宿主細胞内で働く分泌タンパク質などを巧みに使い分けていた。これらの結果は、ファイトプラズマが自身の遺伝子発現を変化させることにより、異なる生物界の宿主に適応していることを示している。また、このホストスイッチング機構は、ファイトプラズマが宿主に感染するために必要な重要なシステムであると考えられる。そこでホストスイッチングに関わるタンパク質の機能を阻害することにより、ファイトプラズマの増殖を抑えることができるかどうかを検証した。実際に植物感染時に働く浸透圧調節チャネルの機能を、阻害剤を用いて抑制したところ、ファイトプラズマの増殖を部分的に抑えることに成功した。これは、ホストスイッチングを阻害・抑制することがファイトプラズマ病の新規防除技術の開発につながる可能性を示すものである。



植物寄生時に発現上昇 昆虫寄生時に発現上昇
図 2 ホストスイッチングに伴うファイトプラズマ遺伝子の発現変動。ファイトプラズマの代謝経路に関わる各遺伝子を、植物感染時に発現するもの (緑)、昆虫感染時に発現するもの (赤) とで色分けして示している。

(2) ホストスイッチングを制御する転写因子の解析

ファイトプラズマのホストスイッチング機構の解明には、ファイトプラズマがどのようにして遺伝子発現を調節し、昆虫と植物という異なる生物界の宿主に適応しているのかを知る必要がある。(1) の解析により、ファイトプラズマは植物宿主と昆虫宿主とを交代するたびに、ゲノム全体の約 1/3 に相当する遺伝子の発現量を変化させていることが明らかになったが、この遺伝子発現を制御する転写因子の解析を行った。ファイトプラズマゲノムには 2 つの転写因子 (*rpoD*、および *fliA*) がコードされており、これらの転写因子が遺伝子発現を調節していると考えられる。これらの転写因子が制御するプロモーター領域を調べるために、大腸菌を利用して、ファイトプラズマの RpoD、および FliA の転写活性を *in vivo* で測定するための実験系を確立した。解析の結果、RpoD は PAM289 など主に植物で発現上昇する遺伝子のプロモーターを活性化し、一方、FliA は *md1B* など主に昆虫で発現上昇する遺伝子のプロモーターを活性化することが明らかとなった。ファイトプラズマの転写因子の機能を解明したのは本研究が初めてである。

(3) 分泌タンパク質による宿主操作機構の解明

① ファイトプラズマ感染に伴う宿主側の遺伝子発現変動

ファイトプラズマに感染した植物は様々な病徴を示すが、特に花が葉になる「葉化」

や、花から若芽が出現する「つき抜け」などのユニークな病徴を引き起こすことが知られている。被子植物の花は一般に、がく、花びら、雄しべ、雌しべの4つの独立した花器官からなり、植物細胞がどの花器官になるかは、ホメオティック遺伝子と呼ばれる5種類の遺伝子（A、B、C、D、E遺伝子）の組み合わせで決まると考えられている。ファイトプラズマ感染植物よりRNAを抽出して各ホメオティック遺伝子の発現量を測定した結果、萼片、花弁、雌蕊では、それぞれの器官形成に必要なAクラス、Bクラス、Dクラスの遺伝子が有意に発現減少していた。これらの結果から、ファイトプラズマ感染によるホメオティック遺伝子の発現変動は花器官ごとに異なり、葉化症状を伴う花器官の形態異常は、その器官形成に必要なホメオティック遺伝子が発現抑制によって引き起こされることが示唆された。

②宿主を操作する因子（エフェクター）の同定

ファイトプラズマは、植物・昆虫という全く異なる宿主環境に合わせて、自身の遺伝子発現を変化させるとともに、宿主をコントロールしていると考えられる。ホストスイッチング機構の解明には、ファイトプラズマがどのようにして宿主を制御しているのかを知る必要がある。そこで、宿主感染時に発現量が増加する遺伝子産物の中から、宿主操作に関与する因子（エフェクター）を探索した。特に、ファイトプラズマは細胞内に寄生するため、宿主の相互作用には分泌タンパク質が深く関与することが示されている。そこで、ゲノムにコードされる約100個の分泌タンパク質を標的としたスクリーニングを行った。また、ファイトプラズマの特徴として、植物宿主に葉化症状などの「形態異常」を伴うユニークな病害をおこす点が挙げられるため、ファイトプラズマの分泌タンパク質遺伝子を植物において恒常的に発現させ、形態異常を引き起こすことを指標にしたスクリーニング系を構築した。その結果、分泌タンパク質の一つであるPhy11を発現するシロイヌナズナにおいて、萼片の葉化および萼片の内側近傍や雌蕊から新たに花が発生する突き抜け、それに伴う不稔など葉化症状に酷似した花器官の表現型が観察された。また、他のファイトプラズマ種からPhy11ホモログをクローン化し、形質転換植物を作出したところ、いずれも同様の表現型を示した。以上の結果から、Phy11がこれまで花器官の葉化誘導エフェクターであると考えられた。

③Phy11エフェクターによる宿主操作の分子メカニズムの解明

宿主を操作するエフェクターは、病原体の感染過程に重要な働きをすることが予想されるため、エフェクターの機能を明らかにすることは、ホストスイッチングの阻害剤の開発につながる重要な基礎的知見になると考えられる。そこで、新葉化誘導エフェクターであるPhy11について、相互作用する宿主側因子のスクリーニングを行い、

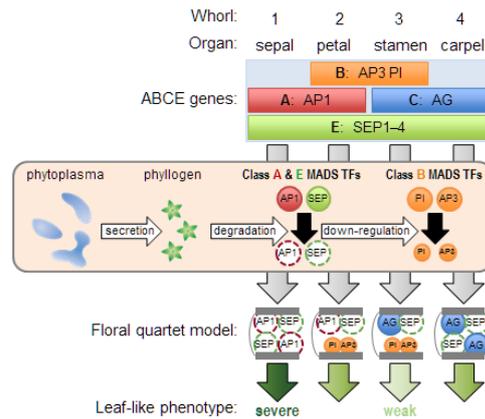


図3 ABCモデルとPhy11の作用メカニズム。植物の花器官形成を制御するMADSドメイン転写因子のうち、AP1、SEPがPhy11により分解される。また、AP1とSEPにより制御されるPIとAP3の発現が抑制される。その結果、転写因子四量体の形成が阻害され、花器官が葉の形態に変化する。

エフェクターによる宿主操作の分子メカニズムの解明に取り組んだ。Phy11 をベイトとして宿主 cDNA ライブラリーに対する酵母ツーハイブリッドスクリーニングの系を確立し、エフェクターと相互作用する因子を調べたところ、Phy11 は花の形態形成に重要な役割を果たす MADS ドメイン転写因子群のうち、A クラス、および E クラスの転写因子に結合する性質を持っていることが明らかとなった。そこで、実際に A・E クラスの転写因子を Phy11 とともに植物細胞に導入したところ、それら転写因子が分解されることが示唆された。また、プロテアソーム阻害剤であらかじめ処理すると A・E クラスの転写因子の分解が阻害されたため、Phy11 は植物のプロテアソームを利用して MADS ドメイン転写因子群を分解していることが示唆された。また、A・E クラスの転写因子は B クラスの転写因子の発現を誘導することが知られているが、Phy11 を発現させた植物では逆に B クラスの転写因子の発現が抑制されていた。これは、A・E クラスの転写因子が細胞内で分解されたため、B クラスの転写因子の誘導が阻害されたと推定される。以上の結果から、ファイトプラズマは Phy11 を分泌することで、植物の花器官の形成に必要な転写因子を分解または発現抑制し、これによって花器官の葉化が起こるといふ宿主操作のメカニズムが明らかとなった (図 3)。本成果は、花器官の葉化という宿主操作のメカニズムを初めて明らかにしただけでなく、植物の形態を操る新規ツールとしての応用の可能性を示すものである。

先進性・優位性

本研究課題で明らかになったホストスイッチングを司る制御因子の特定と実際の遺伝子発現解析はこれまで難培養性植物病原微生物では前例がなく、きわめて先進性に富んでいる上、諸外国研究者との競争の上で優位に研究を進める強い武器になることは明らかである。

ブレークスルーと呼べる成果

培養ができない病原体の遺伝子発現を網羅的に解析する系を確立したことも、他の難培養性病原体への応用を可能にする大きな手がかりとなるブレークスルーであると言える。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・本研究により、ファイトプラズマでは初めてとなる網羅的遺伝子発現解析系や転写因子解析系が確立されたことで、これまで難培養性で研究が困難であった当該微生物の研究分野が大きく進展する可能性がある。

・ファイトプラズマの特徴として、植物の「形態異常」を伴うユニークな病害をおこす点が挙げられる。本研究によりホメオティック遺伝子群との関連性の一端が明らかにされた。今後、ファイトプラズマ-宿主植物間の相互作用をさらに明らかにすることができれば、「植物の形を変えるメカニズム」に迫る知見が得られ、新たな応用へ

の道が拓ける可能性が期待される。

・本研究により、花を葉に変化させる分泌タンパク質 Phy11 を同定することに成功した。本成果は、花器官の葉化というメカニズムを初めて明らかにしたものであるとともに、微生物によるユニークな宿主操作の一例であるとも言え、植物科学、微生物学、感染症学など様々な学問分野への波及効果が期待される。また今後、植物の形態を操る新規ツールとして応用できる可能性も考えられる。

・近年、地球の温暖化に伴い昆虫が活発化するため、昆虫媒介性病原体のアウトブレイクが危惧されている。本研究により、ホストスイッチングに関わるタンパク質の機能を阻害することにより、ファイトプラズマの増殖を部分的に抑えることに成功しているが、今後さらに効果的なターゲットを同定することでできれば、これまで防除が困難であった病害の防除戦略構築に寄与できる可能性がある。

一方、社会的、経済的課題の解決への貢献に関しては、現時点では可能性を期待させる段階である。本研究の成果が直接的に経済的課題の解決、すなわち当初の目的としていた『ファイトプラズマ病の新規防除技術の構築』に結びつくにはもう一段の研究が必要と感じられ、今後の課題と言えよう。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究マネジメントについては、研究計画、実施体制ともに適切である。計画は具体的で目標が明確であり、それらが年度ごとに計画的に実施され目標を達成してきている。適切なマネジメントが行われたと言える。助成金についても、高額な備品などが購入されているがそれらを駆使してデータを得て解析がなされている。特に遺伝子の発現解析は十二分になされていると言える。

また、研究の独自性を発揮することを目的として、新たな研究材料を導入することとの指摘への対応として *Phytoplasma oryzae* と培養細胞系の確立しているツマグロヨコバイ (宿主) の系を導入して研究を展開したことなど、指摘事項へ対応も適切におこなわれた。

助成金の活用については、適切に活用されている。

成果の公表については、下記に示すように積極的に行われた。国民との科学・技術対話についても、所属機関と連携して適切に行われている。

雑誌論文：合計 25 件（掲載済、査読有 20 件、査読無 5 件）

会議発表：合計 25 件（専門家向け、23 件、一般向け 2 件）

新聞・一般雑誌等掲載：合計 5 件

知的財産権：0 件

国民との科学・技術対話：合計 8 件

その他：

所属機関の広報を通じた報道機関へのプレスリリース

研究室ならびに所属機関のホームページ