

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04879

研究課題名(和文) 全身獲得抵抗性の新しい概念の証明とそれを利用した抵抗性育種戦略の例証

研究課題名(英文) Novel aspects of plant priming and its use for crop breeding

研究代表者

中原 健二 (Nakahara, Kenji)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：90315606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスのRNAサイレンシング抑制タンパク質と相互作用を介したウイルス防御機構は全身獲得抵抗性に関わる。本研究でこのウイルス防御機構に、6つのカルモジュリン様タンパク質(CML)およびそれらに結合する内生因子が関わるということが分かった。これらのCMLと結合内生因子の機能解析の結果から考えられる全身獲得抵抗性の分子機構モデルを構築した。本研究の知見を利用したゲノム編集によりトマトにウイルス抵抗性を付与することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身獲得抵抗性は繰り返し襲来する病原体感染により強い抵抗性を示すために植物が獲得した防御機構で100年前から知られているが、そのメカニズムは未だ不明の点が多い。本研究でこの全身獲得抵抗性に関わる新たな因子を同定し、それらによる分子メカニズムを解明した。これらの成果は、学術的に重要なだけでなく、全身獲得抵抗性を病害防除や抵抗性育種に活用するための基礎的な知見として農産物生産への貢献も期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We found that 6 calmodulin-like proteins (CML) and endogenous factors that binding to the CMLs interact with virus RNA silencing suppressors and are involved in systemic acquired resistance. Based on the results obtained in this study, we hypothesize the molecular mechanism involving these CMLs and endogenous factors underlying systemic acquired resistance. Moreover, genome editing the gene that were selected according to the results of this study confer antiviral resistance on tomato.

研究分野：植物の分子免疫学・ウイルス学分野

キーワード：全身獲得抵抗性 カルモジュリン様タンパク質 ウイルス防御機構 RNAサイレンシング抑制タンパク質 オートファジー 転写促進

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は根を張った場所から容易に動くことは出来きないため、環境変化に柔軟に適応して強靭な耐性を獲得していると考えられる。環境適応力を高める手段として、二度目の環境ストレスに対してより早く・強く応答することでより強い耐性を獲得する仕組みを備えている。このストレスに備えた全身状態の変化はプライミングと呼ばれ、特にストレスが病原体感染の場合には全身獲得抵抗性と呼ばれ、現象としては100年前から知られている。学術的にも農産物生産への応用の面でも興味深い現象であり、精力的に研究されているが、細胞の多様な分子機構の変化を伴うと思われ、不明な点が多い。

(2) 申請者は以前の研究で、タバコのカルモジュシユン様タンパク(CML)の一つ、rgs-CaMが多くのウイルスがコードするRNAサイレンシング抑制タンパク質(RSS)との相互作用を介してウイルス防御に働くことを報告した。さらにrgs-CaMが全身獲得抵抗性誘導および全身獲得誘導後のウイルス防御に関わることを報告した。rgs-CaMは当初、宿主植物自身がコードするRNAサイレンシング抑制タンパク質と報告されたことと我々の結果を考慮すると、全身獲得抵抗性の前には植物はrgs-CaMの働きでウイルス感染を促進し、全身獲得抵抗性誘導後にはウイルス防御に働くよう機能の相変化が起きている可能性を考えた。

(3) rgs-CaMも含め他のCMLもカルモジュリンもカルシウムが結合するEFハンド以外の明らかな機能ドメインは存在しないため、rgs-CaMを介したウイルス防御の背景メカニズムやどのような機作で全身獲得抵抗性に関わるのか分かっていなかった。また、シロイヌナズナのCMLは50遺伝子からなる遺伝子集団を形成しており、アミノ酸配列による系統解析およびタバコのrgs-CaMとの同一性解析から、同じクレードに属する5つのシロイヌナズナは同程度にrgs-CaMに似ており、複数のCMLがウイルスRSSとの相互作用を介してウイルス防御に関わる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

全ゲノムの解読が終了し、変異体のストックが抱負で、遺伝子の過剰発現体やゲノム編集のための形質転換も容易なシロイヌナズナを用いて、以下の疑問を解消するために研究を遂行した。仮説で考えたとおりCMLは全身獲得抵抗性誘導前にはウイルス増殖を促進するのか。複数のCMLがウイルスRSSとの相互作用を介してウイルス防御に関わるとしたら、どのCMLがどのような役割で、また、その役割を果たす背景メカニズムを解明することが本研究の目的の一つである。仮説が正しければ、全身獲得抵抗性誘導前には、rgs-CaMはウイルス増殖に働く。遺伝子破壊することで作物に抵抗性が付与出来るのかについても調べるのが研究目的である。

3. 研究方法

(1) どのCMLがウイルス防御に関わるのか、そしてどのような役割を果たしているのか調べるために、シロイヌナズナのCMLの変異体および二つのCMLの二重変異体を作成して、キュウリモザイクウイルス(CMV)および灰色カビを接種して、ウイルス増殖やシロイヌナズナの遺伝子応答を調査した。

(2) CMLによるウイルス防御機構の分子メカニズム解明のため、CMLに結合する内生因子やオートファジー因子Atg8とCMLおよびウイルスRSSとの結合を酵母ツーハイブリッド法で検証した。

(3) CML43の結合内生因子として選抜されたCITEが転写促進活性を持つのか調べるために、*Nicotiana benthamiana* 葉へのアグロインフィルトレーション法による一過発現系で35Sプロモーター制御下のGFPをCITEと共発現してGFPの蛍光強度で検証した。

(4) トマトの11番染色体上のrgs-CaM遺伝子をCRISPR/Cas9で編集してノックアウト変異体を作成し、蛍光タンパクiLOVで標識したCMVを作成して接種した。CMVの感染性をiLOV蛍光とRT-PCRによるCMVゲノムの検出により確かめた。

4. 研究成果

(1) アミノ酸配列の同一性からシロイヌナズナのCML37-41がタバコrgs-CaMに近いと思われ、このうち、CML37-39のT-DNAタグ変異体と、それらを交配して作成したCML37とCML38およびCML39の2重変異体を準備して、CMV-Y(黄化系統)を接種して、接種10日目に接種個体全体からRNAを抽出してリアルタイムPCRによりCMVゲノムRNAの蓄積を比較した(図1)。その結果、各CMLの変異体何れでも、野生型のCol-0に比べて、CMVゲノム蓄積量が増加し、CML33-39の3つCMLに関してはウイル

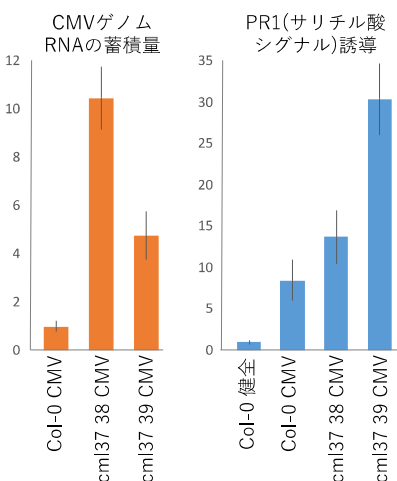


図1. CML変異体へのCMV接種試験。CMVゲノムRNAとPR1 mRNAの蓄積レベルのリアルタイムPCR。

ス増殖を促進することはなかった。2重変異体では、何れも一遺伝子変異体に比べてCMVゲノム蓄積量がより増加したが、特にCML37とCML38がCMVに対するウイルス防御に大きな役割を果たしていることが分かった。一方、サリチル酸シグナルの指標遺伝子であるPR1の発現を比較すると一遺伝子変異体ではいずれもPR1 mRNAの発現レベルが上昇し、CML37-39の3つのCMLは何れもCMV感染時のサリチル酸を介した防御誘導を負に制御していると思われ、2重変異体の結果から、特にCML37とCML39がその活性が高いことが分かった。以上の結果から、3つのCMLでCMVの感染を促進するCMLはなかったが、特にCML37とCML39はサリチル酸を介した誘導防御を負に制御しウイルス感染に貢献する可能性が見出された。

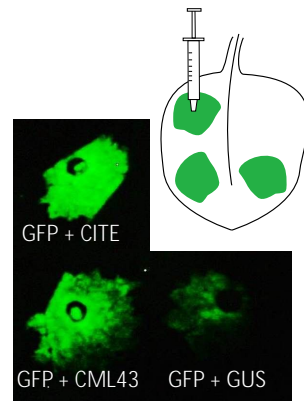


図2. *N. benthamiana* 葉での一過発現実験。

(2) 本研究の関連として国際共同研究加速事業のプロジェクトで申請者がカナダのクイーンズ大学 Wayne Snedden 教授のラボに滞在して行った解析で、CMVのRSSである2bに結合するCMLを検証し、上記、CML37-39に加え、CML40、CML41が結合すること、さらにCML43が弱いながら結合することが分かった。この結果は(1)の接種試験の結果を裏付ける結果である。また、CML43に結合する内生因子のスクリーニングで二つのタンパク質、CITEとTOCが選抜され、これらが、CML43だけでなく他の2bに結合するCML37-41にも結合することが、帰国後の再実験でも確認され、さらにウイルス2bがそれら内生因子に結合することが見出された。オートファジー必須因子であるAtg8はCML37-41に結合するがCML43には結合しなかった。

(3) CMLの内生結合因子TOCは、葉緑体外包膜タンパク質であるが、CITEについては機能未知のタンパク質であるが、予想されるアミノ酸配列から転写促進活性がある可能性が見出された。そこで、*N. benthamiana* 葉へのアグロインフィルトレーションによる一過発現系で、CITEとGFPを共発現して、コントロールのGUS遺伝子と共発現したGFPと比較したところ(図2)、蛍光強度が増強し、転写促進活性が確認された。さらに、CML43とGFPを共発現しても、同様の蛍光共同の増強が観察され、共発現したCML43が*N. benthamiana*自身のCITE遺伝子を活性化してGFPの蛍光が増強した可能性が考えられた。

(4) 本研究の結果では、ウイルス増殖を促進するシロイヌナズナCMLは見つからなかったが、それらはサリチル酸を介した誘導防御を負に制御していた。そこで、作物で関連CMLをノックアウトすれば、サリチル酸誘導防御が強く誘導され抵抗性が付与される可能性があると考え、世界的に栽培されている重要作物トマトのrgs-CaMのノックアウト変異体を作成してiLOV標識CMVを接種した。その結果、rgs-CaM変異体16個体中、12個体ではiLOV蛍光は観察されず、RT-PCRでもウイルスゲノムRNAは検出されなかった。一方、同じく接種した野生型のマニーメーカートマト6個体では全個体で蛍光が観察され、RT-PCRでもウイルスゲノムが検出された。これらの結果は、rgs-CaMの変異でトマトにCMV抵抗性が付与されたことを示している。そしてrgs-CaMはトマトではCMVの感染増殖を促進することが示唆された。

(5) 以上が本研究の結果で、まだ、解析が必要であるが、現時点で、CMVの感染に対する全身獲得抵抗性におけるCMLやその結合因子の役割について図3のモデルを考えた。すなわち、全身獲得抵抗性には、CML43とそれに結合するCITE(TOC)を介した防御と、他のCMLにオートファジーが関与する防御が関わり、全身獲得抵抗性誘導前では、CML43以外のCMLがカルシウム結合下で2bに結合し、オートファジーによる分解に導く防御が弱いながら働いている。そして、CML43が通常は葉では発現レベルが非常に低いこと、さらに、他のCMLの方が2bとの親和性が高いことから、CML43-CITEの防御機構は働かない。しかしながら、二次感染やサリチル酸塗布などにより全身獲得抵抗性を誘導後は、CML43の発現が誘導され、さらに、サリチル酸でオートファジーが活性化することが知られていることから、両防御機構が同時にCMVに対して働いて、CMVの感染が強く阻害される。そして、トマトのCML43以外のCMLであるrgs-CaM変異体では、CML43-CITEを介した防御が2bがCITEに直接結合して誘導され全身獲得抵抗性誘導後のような強い感染阻害効果によりトマトにCMV抵抗性が付与されたのではないかと考えている。本研究でCMLを介した全身獲得抵抗性の新たなメカニズムが示唆され、作物のrgs-CaMのゲノム編集による遺伝子破壊で抵抗性を付与する新たな手構成育種技術の基礎となる知見が得られた。

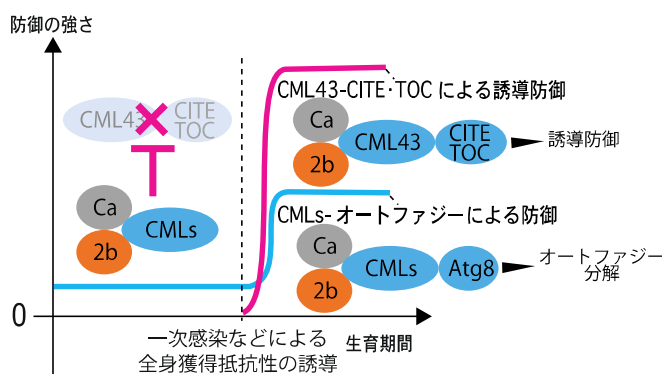


図3. CMLを介した全身獲得抵抗性のモデル

図3. CMLを介した全身獲得抵抗性のモデル。一次感染などによる全身獲得抵抗性の誘導。防御の強さ。CML43-CITE-TOCによる誘導防御。Ca, CML43, CITE, TOC。CMLs-オートファジーによる防御。Ca, CMLs, Atg8。オートファジー分解。一次感染などによる全身獲得抵抗性の誘導。生育期間。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Y., Xu W., Abe J., Nakahara K. S., Hajimorad M. R.	4. 巻 110
2. 論文標題 Precise Exchange of the Helper-Component Proteinase Cistron Between Soybean mosaic virus and Clover yellow vein virus: Impact on Virus Viability and Host Range Specificity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 206 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTO-06-19-0193-FI	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 Taninaka Yosuke, Nakahara Kenji S., Hagiwara Komoda Yuka	4. 巻 64
2. 論文標題 Intracellular proliferation of clover yellow vein virus is unaffected by the recessive resistance gene <i>cyv1</i> of <i>Pisum sativum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12755	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 Abe Junya, Wang Yongzhi, Yamada Tetsuya, Sato Masako, Ono Takuya, Atsumi Go, Abe Jun, Hajimorad M. R., Nakahara Kenji S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Recessive Resistance Governed by a Major Quantitative Trait Locus Restricts Clover Yellow Vein Virus in Mechanically but Not Graft-Inoculated Cultivated Soybeans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-12-18-0331-R	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
1. 著者名 Osmani Zhila, Jin Shinnosuke, Mikami Masafumi, Endo Masaki, Atarashi Hiroki, Fujino Kaien, Yamada Tetsuya, Nakahara Kenji S.	4. 巻 2028
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-Mediated Editing of Genes Encoding rgs-CaM-like Proteins in Transgenic Potato Plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 153 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9635-3_9	査読の有無 無
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 Jeon Eun Jin, Tadamura Kazuki, Murakami Taiki, Inaba Jun-ichi, Kim Bo Min, Sato Masako, Atsumi Go, Kuchitsu Kazuyuki, Masuta Chikara, Nakahara Kenji S.	4. 巻 91
2. 論文標題 rgs-CaM Detects and Counteracts Viral RNA Silencing Suppressors in Plant Immune Priming	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00761-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00761-17	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 中原 健二	4. 巻 89
2. 論文標題 トレードオフを利用した植物のウイルス防御戦略	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 436-440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890436	査読の有無 無
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 Murakami, T., Tayama, R., Nakahara, K.S	4. 巻 82
2. 論文標題 Microperforated leaf blotting on polyvinylidene difluoride and nylon membranes to analyze spatial distribution of endogenous and viral gene expression in plant leaves	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 254 - 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-016-0671-x	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 Miyashita, Y., Atsumi, G., Nakahara, K.S	4. 巻 29
2. 論文標題 Trade-offs for viruses in overcoming innate immunities in plants	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 595-598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-05-16-0103-CR	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 Atsumi, G., Suzuki, H., Miyashita, Y., Choi, S.H., Hisa, Y., Rihei, S., Shimada, R., Jeon, E.J., Abe, J., Nakahara, K.S., Uyeda, I	4. 巻 90
2. 論文標題 P3N-PIP0, a frameshift product from P3, pleiotropically determines the virulence of clover yellow vein virus in both resistant and susceptible peas.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 7388 - 7404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00190-16	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakahara, K., H. Teresinski, M. Suto, S. Jin, W. Snedden
2. 発表標題 Interaction of Arabidopsis calmodulin-like proteins with the protein 2b, an RNA silencing suppressor of cucumber mosaic virus
3. 学会等名 Plant Canada 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神 慎之介、佐藤雅子、須藤深雪、中原健二
2. 発表標題 キュウリモザイクウイルス感染シロイヌナズナにおけるカルモジュリン様タンパク質37, 38, 39欠損の影響
3. 学会等名 日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野卓哉、山田哲也、中原健二
2. 発表標題 ダイズとツルマメ間の組換え自殖系統におけるクローバ葉脈黄化ウイルスに対する抵抗性の再評価
3. 学会等名 日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原健二・山田哲也
2. 発表標題 ダイズ栽培化で選抜されたかもしれないクローバ葉脈黄化ウイルス抵抗性について
3. 学会等名 第13回 植物ウイルス病研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウイルス抵抗性植物及びその作成方法	発明者 新子泰規、中原健二、山田哲也、増田 税	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2017-117	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>プレスリリース「ウイルスの強毒化を防ぐエンドウの仕組みを発見」（中原 健二 講師） http://www.agr.hokudai.ac.jp/news/2016/06/post-677.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
研究分担者	山田 哲也 (Yamada Tetsuya) (70374618)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	