

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04880

研究課題名(和文)キュウリモザイクウイルスサテライトRNAによるタバコ黄化誘導機構の全容解明

研究課題名(英文) Analysis on the mechanism for the yellow induction on tobacco by cucumber mosaic virus and its satellite

研究代表者

増田 税 (Masuta, Chikara)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：60281854

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)：キュウリモザイクウイルス(CMV)のY-satellite RNA (Y-sat)がタバコに感染するとクロロフィル合成遺伝子(ChII)へのRNAサイレンシング(RS)によってタバコは黄化する。この黄化にはRS経路の因子RDR6によるsecondary siRNA増幅システムが重要であった。ChIIは気孔の開閉にも関わるが、黄化植物ではサリチル酸を活用して健全植物よりも優れた乾燥耐性を示した。また、この黄化現象はアブラムシによってCMVが伝搬されることに有利に作用している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物におけるウイルス病の病徴発現メカニズムを分子レベルで理解できれば、ウイルス病の防除対策の立案に大きく貢献できる。本研究で、一見偶然にみえるウイルス感染によるタバコの黄化が、実は、アブラムシを介したウイルス伝搬に有利な状況を作り出すウイルス側の巧緻な戦略であることが明らかになった。このような研究成果は、植物とウイルスの闘い(共生)と生き残り戦略の理解につながり、現在我々が食料として利用している作物の栽培を最大限に高度化するための基盤知見として高い学術的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tobacco plants infected with Y-satellite RNA (Y-sat) in the presence of cucumber mosaic virus (CMV) show yellowing symptoms due to RNA silencing (RS) against the host ChII gene mRNA. For this symptom induction, the secondary siRNA amplification by RDR6 in the RS pathway was found to be important. The yellow tobacco was found to be more tolerant to drought stress than the healthy control although ChII is also involved in stoma regulation. In addition, the yellow color was demonstrated to be advantageous for aphid transmission of CMV+Y-sat and thus for their survival.

研究分野：植物病理学

キーワード：RNAサイレンシング キュウリモザイクウイルス サテライトRNA 病徴誘導

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キュウリモザイクウイルス (CMV) のサテライト RNA (satRNA) は CMV の複製酵素を利用して増殖する 300-400 塩基の短い RNA である。タンパク質をコードしておらず、CMV のゲノム RNA との間に相同性は全くない。CMV の増殖には satRNA は必要でないことから、satRNA は CMV の寄生分子であると見なされている。多くの satRNA は CMV の病徴を軽減する一方、いくつかの satRNA は CMV の病徴を逆に悪化させる。例えば、トマトに全身壊死を誘導するものがあり、時折、トマト産地に壊滅的な被害を及ぼす。1980 年にタバコを黄化させる satRNA が四国で発見され、Y-sat と命名された。CMV に寄生した Y-sat によるタバコの葉は鮮黄色を呈する。申請者はこのメカニズムを解明することを目的に、四半世紀にわたって研究テーマとしてきた。2011 年に申請者らはいつに「Y-sat によるタバコの黄化が、クロロフィル合成のキー酵素である *ChlI* 遺伝子の mRNA が RNA サイレンシングによって分解された結果である」ことを報告した。以下にその流れを簡単に説明する。Y-sat と *ChlI* mRNA との間に 22 塩基 (nt) の連続した相補的配列が存在する (その相補部分を Y-sat では SYR、そして *ChlI* では YR 配列と呼ぶことにする)。Y-sat は複製時に大量の 2 本鎖 RNA (dsRNA) を生産する。これを宿主の dsRNA 分解酵素 (DCL) が認識・分解し、21-nt~24-nt の siRNA を生産する。Y-sat の SYR 部分から生じた siRNA (siSYR) は AGO タンパク質にとりこまれ、1 本鎖になり (YR に相補的なものが維持される) もう片方 (passenger strand と呼ばれる) は放出される。siSYR-AGO 複合体は *ChlI* mRNA に YR 部分で結合し、その部分を切断して、*ChlI* mRNA を減少させる。その結果、クロロフィル合成がストップして、最終的にタバコはクロロシスによってカロチノイドやキサントフィルが目立つようになり黄化する。

2. 研究の目的

前述のように CMV の Y サテライト RNA (Y-sat) はタバコに感染して黄化症状を誘導する。この病徴誘導の分子メカニズムについては、宿主の RNA サイレンシング (RS) によって生じた Y-sat の siRNA がクロロフィル合成のキー酵素遺伝子である *ChlI* をターゲットした結果であると理解している。しかし、RS のどの因子が重要であるのか知りたいと考えた。すなわち、本研究では、RS 経路の重要因子 (RS プレーヤー) である DCL や RDR6 が具体的にどのようにタバコの黄化誘導に関わっているのか解析し、Y-sat によるタバコの黄化誘導に関するメカニズムの全容を解明することを目的とした。さらには、Y-sat がタバコを黄化させたことに何らかの生物学的意味が存在するのか知りたいと考えた。タバコの黄化は偶然に生じたとする一方、その結果が CMV、Y-sat そして宿主のタバコの 3 者の関係にどのような影響を及ぼしたのであるのか。Y-sat のタバコの黄化のメカニズムの詳細を解明し、最終的には、この現象のもつ生物学的意味、そしてウイルスや宿主の生き残り戦略 (進化学的意味) を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DCL2/DCL4 のノックダウン形質転換タバコ (ベンタミアーナ) の性状解析を行い、「RS プレーヤーを RS でノックアウト」する矛盾の上に立った解析を進めるにあたって、十分信頼に足る結果が出せる組換え植物体が得られたのか判断する。次に、DCL2/DCL4 植物に Y-sat を接種し、DCL2 と DCL4 のいずれが黄化病徴誘導に重要であるのか決定する。最終的に、CMV や Y-sat の siRNA を解析し、DCL やさらに RDR6 などの RS プレーヤーがどのように Y-sat によるベンタミアーナでの黄化誘導に関与するのか分子機構の全容を解明する。

(2) クロロフィル合成酵素 ChII にはもう一つの機能がある。気孔で発現すると植物ホルモンである ABA のリセプターとして機能し、気孔の開閉調節に関与している。したがって、ChII を失った Y-sat 感染の黄化タバコでは気孔の開閉に障害が出ているものと予想され、乾燥ストレスに無防備になっているものと考えられる。この予想を検証するために、乾燥ストレス時の気孔の開口率、気孔コンダクタンスを測定する。また、気孔の開閉を調節するもう一つの植物ホルモンであるサリチル酸(SA)の蓄積レベルを測定し、ABA が機能しない場合の SA の挙動を観察し、Y-sat 感染タバコが SA を代用する可能性を検証する。

(3) CMV はアブラムシによって伝搬される。アブラムシが黄色に誘引されることはよく知られており、Y-sat 感染タバコにアブラムシが誘引される可能性がある。しかし、Y-sat は CMV の蓄積を 1/10~1/20 程度に減少させるため、そもそもアブラムシが吸汁によってウイルスを獲得することができない可能性もある。この仮説を検証するために、健全タバコと Y-sat 感染黄色タバコを離して設置し、この中央にアブラムシを放して、どちらに誘引されるか観察する(アブラムシ誘引試験)。次に、黄化タバコから発する揮発性成分によるアブラムシ誘引の可能性を検証するために、ポンプによって強制的に揮発成分をアブラムシにかがせて誘引率を導き出す(Yチューブ試験)。最後に、アブラムシ1頭が吸汁によって口針内に獲得できるウイルス量を推定するために、1頭から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によってウイルス量を定量する。

4. 研究成果

RS 経路の重要な因子の中から dsRNA 分解酵素である DCL2 と DCL4 が Y-sat の黄化病徴誘導にどのように関わるのか解析するため、DCL2/DCL4 のノックダウンタバコを作出した。Real-time RT-PCR によってそれらの発現が低下していることを確認した後、DCL2/4 によって生成される 21-nt と 22-nt の siRNA を解析した。その結果、これらの蓄積が著しく減少しており、それとは対照的に 24-nt の siRNA が相補するように増加していた。この形質転換植物に Y-sat を接種したところ、予想に反してタバコが黄化したことから、21-nt や 22-nt siRNA が存在しない場合でも *ChII* mRNA に対する RS は 24-nt siRNA によって起きるものと考えられ、これまで *Arabidopsis* の研究からわかっていた知見とは異なる新現象である。すなわち、DCL2/4 のノックダウンタバコにおいて、21-nt と 22-nt siRNA に代わり DCL3 によるものと思われる 24-nt



Wild/H1-RDR6+Ysat D24/H1-RDR6+Ysat
図1 DCL2/4でRDR6を抑制しY-satを接種した

siRNA が出現し、これが *ChII* mRNA の切断を行っているとは推定される現象を明らかにした。また、RS 経路に重要な secondary siRNA 増幅システムの担い手である RDR6 を CMV H1 ベクターによって発現抑制し、黄化への影響を観察した。H1 ベクターは転写後サイレンシング (PTGS) を効率よく誘導できないため、siRNA を使用せず、アンチセンスによる遺伝子の発現制御に使用できる。このベクターに組み込んだ RDR6 の配列をアンチセンス RNA として RDR6 の発現をターゲットすることにした。その結果、

DCL2/4 形質転換ペンタミアーナに H1-RDR6 を感染させ、RDR6 をノックダウンすると Y-sat を感染させても黄化が観察されなかった(図1)。これは、Y-sat の黄化誘導メカニズムに RDR6 を介した siRNA の secondary 増幅システムが重要であることを示唆する。

一方、Y-sat のターゲットである ChII 遺伝子がクロロフィル合成のキー遺伝子であると同時に、気孔においては ABA のレセプターとして機能することがわかっており、これが Y-sat 感染時にどのように影響を受けるのか解析した。Y-sat の増殖の影響が ChII 消去によるクロロシスのみではなく、植物の耐乾燥性にも影響するのか調査することが目的であった。具体的には、気孔の開閉、気孔コンダクタンスの測定、さらには、ABA の測定を行った。その結果、Y-sat に感染した個体では、予想に反して乾燥ストレス下、気孔が閉じることが判明した。Y-sat の感

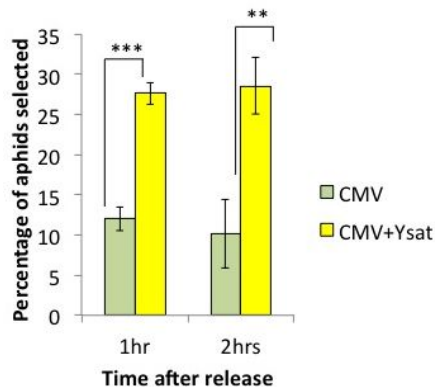


図2 アブラムシは黄色の植物を選ぶ

染によって SA レベルが上昇したことから、Y-sat 感染植物は、ABA レセプターの欠如で ABA に応答できないため、SA を代用して気孔を閉じているものと考えられる。Y-sat に感染して黄化したタバコがすぐに枯死せずに長期間生き残ることを考えると Y-sat の感染が必ずしもタバコに不利に働いていない。この発見は Y-sat の増殖によって植物が乾燥ストレスに特段弱くなるデメリットが生じていないことを意味する。

次に、「黄化したタバコにはアブラムシが好んで飛来し、Y-sat を周囲の植物に伝搬する」という仮説の実証

をするために、アブラムシが Y-sat 感染タバコに誘引されるか調べることにし、健全タバコと黄化したタバコの間アブラムシを放って嗜好性を観察した。その結果、アブラムシは確かに Y-sat 感染植物に好んで飛来することが明らかになった(図2)。

この現象が揮発性成分によるものではないことを証明するために Y 字チューブ実験を行ったところ、アブラムシはいずれの植物にも誘引されないことがわかった。Y-sat 感染植物では、CMV の蓄積レベルが CMV 単独感染の 1/10 以下になる。この植物を使って、アブラムシ伝搬試験を行ったところ、CMV 単独感染植物から 8 割が伝搬された時に、Y-sat 感染植物からは、5 割ほどの伝搬が確認され、Y-sat 感染タバコからもアブラムシ伝搬は十分起きることが証明された。アブラムシ 1 頭が吸汁後に獲得するウイルス量について、リアルタイム RT-PCR で測定した結果、CMV 単独感染と Y-sat 感染植物で大差がないことが判明した。

以上の実験結果を総合して、Y-sat はタバコを黄化させることによって、アブラムシによる伝搬を効率化させており、これは、ウイルスの恐るべき生き残り戦略であると結論した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Matsunaga, W., Shimura, H., Shirakawa, S., Isoda, R., Inukai, T., Matsumura, T., and Masuta, C. (2019). Transcriptional silencing of 35S driven-transgene is differentially determined depending on promoter methylation heterogeneity at specific cytosines in both plus-and minus-sense strands. *BMC Plant Biology* **19**, 24. DOI: 10.1186/s12870-019-1628-y. 査読有

Fukuzawa N., Masuta, C., and Matsumura, T. (2018). Rapid transient protein production by the coat protein-deficient cucumber mosaic virus vector: non-packaged CMV system, NoPaCS. *Plant Cell Reports* **37**, 1513-1522. DOI: 10.1007/s00299-018-2322-5. 査読有

Jeon, E.J., Tadamura, K., Murakami, T. Inaba,, J., Kim, B.-M., Sato, M., Atsumi, G., Kuchitsu, K., Masuta, C., and Nakahara, K. (2017). rgs-CaM Detects and Counteracts Viral RNA Silencing Suppressors in Plant Immune Priming. *Journal of Virology* **91**, e00761-17. DOI: 10.1128/JVI.00761-17. 査読有

Murota, K., Shimura, H., Takeshita, M. and Masuta, C. (2017). Interaction between *Cucumber mosaic virus* 2b protein and plant catalase induces a specific necrosis in association with proteasome activity *Plant Cell Reports* **36**, 37-47. DOI: 10.1007/s00299-016-2055-2. 査読有

Fujiwara, A., Togawa, S., Hikawa, T., Matsuura, H., Masuta, C. and Inukai, T. (2016). Ascorbic acid accumulates as a defense response to Turnip mosaic virus in resistant *Brassica rapa* cultivars. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4391-402. DOI: 10.1093/jxb/erw223. 査読有

総件数：11件（上記以外6件、すべて査読有）

[学会発表]（計10件）

国内学会 計7件

増田税他、タバコの黄化症状はウイルスに対するサイレンシングを宿主遺伝子に偶然発動した結果である、第41回日本分子生物学会年会、2018年（招待講演）

松永航他、35Sプロモーターのプラス鎖とマイナス鎖の特定位置でのシトシンメチル化の不均一性が転写型ジーンサイレンシングに影響する、第41回日本分子生物学会年会、2018年

林勇作他、S19サテライトRNAはキュウリモザイクウイルスに感染した *Nicotiana benthamiana* の病徴を激化させる、日本植物病理学会大会、2018年

Kim, H. et al. Phosphorylation of cucumber mosaic virus 2b protein is crucial for nuclear localization and disease severity. 日本植物病理学会大会、2018年

増山翔太他、キュウリモザイクウイルスサテライトRNAが感染したベンタミアーナにおいて観察される乾燥耐性の発現機構、日本植物病理学会北海道部会、2017年

白川千里他、キュウリモザイクウイルス2bタンパク質によるゲノムワイドなメチル化に関する *in silico* 解析、日本植物病理学会北海道部会、2016年

妙中駿之他、Cucumber mosaic virus 感染後のトウガラシにおけるアスコルビン酸代謝関連遺伝子群のエピジェネティクス発現制御、日本植物病理学会北海道部会、2016年

総件数：13件（上記以外6件）

国際学会 計3件

Jayasinghe, W. H. et al. Cucumber mosaic virus Y satellite turns tobacco yellow to attract aphids in favour of its survival. 14th International Virus Epidemiology Symposium (IVES), Seoul, Korea, 2019.

Matsunaga, W. et al. A technique to reduce DNA methylation in a sequence-specific manner by using a ribozyme-expressing cucumber mosaic virus vector. International Congress of Plant Pathology 2018, Boston, USA, 2018.

Togawa, Y. et al. Cucumber mosaic virus 2b protein alters the plant epigenomes. The Plant Biotech 2016, 2016.

総件数：6件（上記以外3件）

[図書]（計1件）

Shimura, H. et al. Satellite RNAs: Their Involvement in Pathogenesis and RNA Silencing. In Viroids and Satellites Edited by A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, P. Palukaitis. Academic Press, London, United Kingdom, 587-596, 2018.

総件数：4件（上記以外3件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。