

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04881

研究課題名(和文) 植物ウイルスに対する非宿主抵抗性の多層性と新規特異的抵抗性の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of multi-layered nonhost resistance against virus and a novel cultivar-specific virus resistance in plants

研究代表者

三瀬 和之 (MISE, Kazuyuki)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90209776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：Brome mosaic virus (BMV)とシロイヌナズナ間の非宿主抵抗性には、ウイルス因子として2a複製酵素タンパク質のC末端のアミノ酸残基や3a移行タンパク質の発現量、また植物因子としてDicer-like 2と4が多層的に関与していることが明らかとなった。また、BMVに対するイネの抵抗性遺伝子としてCoiled-coil型のNLRタンパク質が同定され、さらに別の抵抗性遺伝子の存在も強く示唆された。この新規な抵抗性遺伝子はBMVの3a移行タンパク質が機能する際に相互作用する植物因子の状態をモニターして抵抗性を発動している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物と病原体間の相互作用において、ある植物種は大多数の病原体に種レベルで抵抗性である。このような非宿主抵抗性は植物ウイルスの抵抗性機構の解明に残された大きな課題のひとつである。本研究においてシロイヌナズナが植物RNAウイルスのひとつのBMVに対して示す非宿主抵抗性の多層性に関する宿主植物因子とウイルス因子の一端が初めて明らかとなった。また、イネのウイルス抵抗性メカニズムには不明な点が多いが、その主動抵抗性遺伝子ひとつの単離に成功し、さらに他の抵抗性遺伝子の存在が示唆されたことは、今後イネにとどまらず、重要穀物を含む単子葉植物の抗ウイルス育種の遺伝子素材の探索という点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：Brome mosaic virus (BMV) cannot infect *Arabidopsis thaliana* due to RNA silencing mediated by Dicer-like 2 and 4 and some strains of BMV are restricted their infection due to additional unknown resistance mechanisms. Specific amino acid residues in the C-terminal region of the 2a polymerase protein and high level accumulation of 3a movement protein are revealed to be solutions to overcome such unknown multi-layered resistance in a non-host. In rice-BMV system, we have identified a rice protein, RBM1, belonging to the class of coiled-coil, nucleotide-binding and leucine-rich repeat domain proteins, which confers the resistance in rice against BMV. Moreover, GWAS analysis using World Rice Collection strongly suggests that an additional resistance gene exists other than the RBM1 gene. RBM1 protein may initiate resistance against BMV by monitoring plant factor(s) that interact with 3a movement protein as the avirulence factor.

研究分野：農学

キーワード：適応変異 RNAサイレンシング 複製 細胞間移行 移行タンパク質 非宿主抵抗性 NLR型遺伝子 細胞死

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

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスは、作物における重要な病原体のひとつである。ウイルスが植物に感染する際、ウイルス因子と宿主因子が相互作用し、感染が成立する。これらの相互作用はウイルスの複製、細胞間移行、全身感染、病徴発現や宿主の抵抗反応の誘起に影響する。近年、各過程に關するウイルス因子は急速に解析されてきたが、宿主因子の実体や因子間の相互作用に関する報告は少なく、それはウイルスの感染機構解明やウイルス病の防除法開発の大きな障壁となっている。

(2) 植物RNAウイルスである *Bromovirus* 属のタイプ種である brome mosaic virus (BMV)ではRNA複製に関する多くの先駆的研究がなされてきた。我々は BMV および近縁の cowpea chlorotic mottle virus を用い、ササゲでの全身感染性の違いに重要な感染過程の同定(文献4)やウイルス因子中の重要なアミノ酸残基の同定(文献6)に成功してきた。しかし、ササゲの扱いにくさから宿主因子に関する知見を全く得られなかった。

(3) そのような中、我々は同じ *Bromovirus* 属の spring beauty latent virus (SBLV)がモデル植物シロイヌナズナに効率よく全身感染することを発見した(文献2)。この SBLV と BMV を用い、BMV 抵抗性を崩壊させる *cpr5* という遺伝子変異を同定し、一細胞における増殖能力が全身感染性に大きく貢献することを明らかにした(文献3)。BMV はいずれの系統もシロイヌナズナに感染せず、両者にはいわゆる非宿主抵抗性が存在する。一方、植物はRNAサイレンシングという強力な抵抗性でウイルスに対抗するが、BMV ではこれに対して他の多くのウイルスが持つ抑制(サプレッサー)遺伝子や抑制機構が見つかっていない。サイレンシング欠損シロイヌナズナへの感染性を複数の BMV 系統で調査した結果、全身感染する BMV 系統が見つかった。さらに非感染系統や変異体の出現で感染性を獲得する系統も同定されつつある。このように非宿主抵抗性が崩壊し BMV の感染を許容する現象が複数見つかったが、その背景にある抵抗性の分子メカニズムやそれらの関連性は不明である。

(4) 一方、米国の Ding ら(文献1)は BMV-F 系統がイネに感染することを報告した。我々はこれまでに、BMV に対する優性の抵抗性遺伝子をジャポニカイネに同定しており、単離までもう一步である。以上のような学術的背景を受け、プロモウイルスと2種のモデル植物(シロイヌナズナとイネ)を用い、相互作用研究を推進していくとの着想に至った。

2. 研究の目的

(1) BMV-シロイヌナズナ間の非宿主抵抗性に関わるウイルス因子と植物因子の特定: *Dicer-like (DCL)*遺伝子の3重変異体シロイヌナズナに感染する BMV 系統および非感染系統から出現した変異体を非感染系統と比較解析し、感染特異性に関わるウイルス因子を特定する。BMV 抵抗性の主動 *DCL* 遺伝子を特定すると共に *DCL* 遺伝子経路の下流に位置する *Argonaute (AGO)*遺伝子等、既知の関連因子の関与を調査する。

(2) BMV-イネ間の特異的抵抗性に関わる植物遺伝子の単離とウイルス因子の解析: BMV 抵抗性イネ遺伝子を単離するとともにイネの BMV 抵抗性の性状を明らかにする。この抵抗性に関与するウイルス因子を同定し、単離した抵抗性遺伝子との相互作用について解析する。

3. 研究の方法

(1) BMV-シロイヌナズナ間の非宿主抵抗性の解析

DCL 遺伝子3重変異体植物に感染する BMV 変異体の解析: RNAサイレンシング因子の内 *DCL2*, *DCL3*, *DCL4* を欠損した3重変異体植物に感染できない BMV-M2 系統から感染できるようになった変異体ウイルスを分離・構造解析し、適応変異の作動する感染ステップを調査する。3a を発現する形質転換植物を作製し、ウイルス骨格からでなくとも 3a の高発現・高蓄積が BMV/シロイヌナズナ間の非宿主抵抗性を乗り越える戦略のひとつであるとの仮説を検証する。また、野生型 BMV の元々の宿主であるキノアやササゲに、適応変異体 BMV を接種し、感染性を調べる。3a の高発現ウイルスは自然界に存在しないことから、今回得られた適応変異体はむしろ自然宿主においては感染性が低いことが予想され、非宿主と宿主への感染には 3a の発現に関してトレードオフの関係があるとの仮説の検証を進める。

DCL 遺伝子3重変異体植物への感染性の異なる BMV 系統間の比較解析: 感染系統と非感染系統の間でゲノム交換変異体や遺伝子断片置換体等を作成し、植物体やプロトプラストにおけるゲノム RNA や各遺伝子産物の蓄積量調査を行い、3重変異体植物における感染性に関わるウイルス因子を特定する。

BMV 系統間感染性に関与する植物因子の探索: 3重変異の中で BMV の感染系統の感染に寄与する遺伝子を特定する。また、*DCL* 遺伝子の下流で機能する *AGO* 遺伝子等のサイレンシング関連遺伝子の変異体植物における BMV 感受性を調査する。

質を発現するように *RBM1* 遺伝子を改変し感受性イネに形質転換した。その結果、幾つかのタグ配列を C 端に付加したコンストラクトで抵抗性を付与することができたことから、それらのタグは *RBM1* の機能に影響せず有効利用可能なことが示された。

つぎに、農林水産省農研機構の World Rice Collection の様々なイネ品種に関して候補遺伝子の塩基配列やアミノ酸配列の品種間差異を調査した結果、K 型でも感受性の品種があり、また H 型でも抵抗性の品種があることが判明した。この結果、初年度に単離した抵抗性遺伝子以外にも新規な抵抗性遺伝子が存在することが強く示唆された。最終年度には、岩手生物工学研究センターとの共同研究によって、イネ 2 品種間の組み換え自殖集団の BMV 感受性試験を行った結果、*RBM1* が座乗する第 8 染色体以外の染色体に新規な抵抗性遺伝子が存在することが示唆された。酵母 2 ハイブリッド法によって抵抗性遺伝子産物全長あるいは部分的な機能ドメインと全 4 種の BMV タンパク質の相互作用を調査した結果、いずれの組合せでも相互作用は認められなかった。一方、*N. benthamiana* における Agroinfiltration 法の利用によって NB-LRR タンパク質と共発現させた際に細胞死を誘導するウイルス因子の同定を試みた結果、3a 移行タンパク質が見出された。これら 2 つの実験系の結果から、*RBM1* は 3a 移行タンパク質が機能する際に相互作用する植物因子の状態をモニターして抵抗性を発動している可能性が示唆された (図 2)。

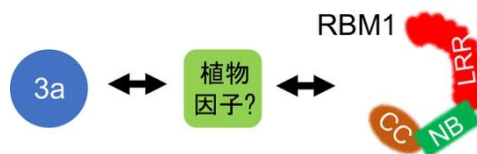


図 2 BMV_3aタンパク質は未知の植物因子を介してRBM1に認識される

<引用文献>

- Ding, X. S., Schneider, W. L., Chaluvadi, S. R., Mian, M. A., and Nelson, R. S. (2006). Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19(11): 1229-1239.
- Fujisaki, K., Hagihara, F., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003). Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Virol.* 148(1): 165-175.
- Fujisaki, K., Iwahashi, F., Kaido, M., Okuno, T., and Mise, K. (2009). Genetic analysis of a host determination mechanism of bromoviruses in *Arabidopsis thaliana*. *Virus Res.* 140(1-2): 103-111.
- Fujita, Y., Fujita, M., Mise, K., Kobori, T., Osaki, T., and Furusawa, I. (2000). Bromovirus movement protein conditions for the host specificity of virus movement through the vascular system and affects pathogenicity in cowpea. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13(11): 1195-1203.
- Kojima, Y., Ebana, K., Fukuoka, S., Nagamine, K., and Kawase, M. (2005). Development of an RFLP-based rice diversity research set of germplasm. *Breeding Science* 55(4): 431-444.
- Sasaki, N., Fujita, Y., Mise, K., and Furusawa, I. (2001). Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid bromovirus are required for adaptation to a nonhost. *Virology* 279(1): 47-57.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- Kaido, M., Nagano, H., Omote, K., Mise, K., Okuno, T., and Takano, Y. (2019). 5'-Terminal stem-loop of carnation ringspot virus RNA1 is required for the efficient amplification of viral RNAs. *Virus Res.* 265: 138-142.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.009>
- Hamada, T., Mise, K., Kiba, A., and Hikichi, Y. (2019). Systemic necrosis in tomato induced by a Japanese isolate of rehmanna mosaic virus in a temperature sensitive manner. *Plant Pathol.* 68(5): 1025-1032.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13006>
- Azmi, N. S. A., Singkaravanit-Ogawa, S., Ikeda, K., Kitakura, S., Inoue, Y., Narusaka, Y., Shirasu, K., Kaido, M., Mise, K., and Takano, Y. (2018). Inappropriate expression of an NLP effector in *Colletotrichum orbiculare* impairs infection on cucurbitaceae cultivars via plant recognition of the C-terminal region. *Mol. Plant Microbe Interact.* 31(1): 101-111.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-04-17-0085-FI>
- Tajima, Y., Iwakawa, H.-O., Hyodo, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2017). Requirement for eukaryotic translation initiation factors in cap-independent translation differs between bipartite genomic RNAs of red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 509: 152-158.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.015>
- Hyodo, K., Suzuki, N., Mise, K., and Okuno, T. (2017). Roles of superoxide anion and hydrogen peroxide during replication of two unrelated plant RNA viruses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signaling & Behavior* 12(6): e1338223.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1338223>
- Yasui, Y., Hirakawa, H., Oikawa, T., Toyoshima, M., Matsuzaki, C., Ueno, M., Mizuno, N.,

Nagatoshi, Y., Imamura, T., Miyago, M., Tanaka, K., Mise, K., Tanaka, T., Mizukoshi, H., Mori, M., and Fujita, Y. (2016). Draft genome sequence of an inbred line of *Chenopodium quinoa*, an allotetraploid crop with great environmental adaptability and outstanding nutritional properties. *DNA Res.* 23(6): 535-546.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsw037>.

〔学会発表〕(計 17 件)

- 大竹竜馬・大矢卓明・市邊愛佳・嶋本果穂・寺石政義・海道真典・高野義孝・奥本 裕・三瀬和之．Brome mosaic virus (BMV)抵抗性に関わるイネ NLR タンパク質 RBM1 によって認識される BMV 因子の同定．平成 31 年度日本植物病理学会大会，2019 年 3 月 20 日，つくば市，つくば国際会議場．
- 藤崎恒喜・館田知佳・阿部善子・岩井摩莉・海道真典・三瀬和之．リンドウから単離された gentian virus A の低温依存的増殖機構の解析．平成 31 年度日本植物病理学会大会，2019 年 3 月 20 日，つくば市，つくば国際会議場．
- 高田昌汰・三瀬和之・高野義孝・海道真典．Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)二本鎖 RNA の感染植物細胞内における動態．平成 31 年度日本植物病理学会大会，2019 年 3 月 19 日，つくば市，つくば国際会議場．
- 嶋本果穂・大矢卓明・寺石政義・海道真典・奥本 裕・三瀬和之．World Rice Collection (WRC) における *Brome mosaic virus* (BMV) 抵抗性に関わる NB-LRR 型イネ遺伝子の品種間比較．日本植物病理学会平成 30 年度(第 53 回)植物感染生理談話会，2018 年 8 月 21 日，南国市，高知大学農林海洋科学部．
- 嶋本果穂・大矢卓明・寺石政義・海道真典・高野義孝・奥本 裕・三瀬和之．World Rice Collection (WRC)における *Brome mosaic virus* (BMV) 抵抗性に関わる NB-LRR 型イネ遺伝子の品種間比較．平成 30 年度日本植物病理学会大会，2018 年 3 月 26 日，神戸市，神戸国際会議場．
- 浜田拓弥・三瀬和之・木場章範・曳地康史．Rehmannia mosaic virus 日本株のトマトへの全身壊疽誘導能に対する温度の影響．平成 30 年度日本植物病理学会大会，2018 年 3 月 25 日，神戸市，神戸国際会議場．
- 井上泰彦・尾崎紗恵・三瀬和之・高野義孝・海道真典．一過的過剰発現系を利用した Red clover necrotic mosaic virus の細胞間移行に関連する宿主タンパク質の探索．平成 30 年度日本植物病理学会大会，2018 年 3 月 25 日，神戸市，神戸国際会議場．
- 辻川峻平・尾崎紗恵・三瀬和之・高野義孝・海道真典．Carnation ringspot virus のシロイヌナズナにおける感染性に関する研究．平成 30 年度日本植物病理学会大会，2018 年 3 月 25 日，神戸市，神戸国際会議場．
- 市邊愛佳・中林優貴・海道真典・高野義孝・三瀬和之．Cassia yellow blotch virus の 2a 複製酵素タンパク質は *Nicotiana benthamiana* に細胞死を誘導し，外被タンパク質はその細胞死を抑制する．平成 30 年度日本植物病理学会大会，2018 年 3 月 25 日，神戸市，神戸国際会議場．
- 中村光希・三瀬和之・高野義孝・海道真典．Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) 移行タンパク質における推定 β -ストランドの欠失変異解析．平成 29 年度日本植物病理学会関西西部会，2017 年 9 月 19 日，堺市，大阪府立大学中百舌鳥キャンパス．
- Kitasaka, K., Mise, K., Okuno, T., Takano, Y., and Kaido, M. Bipartite genomic RNA segments of a plant virus can move from cell to cell in a different manner. 17th International Congress of Virology, July 18, 2017, Singapore.
- Nakagawa, S., Yazaki, K., Okuno, T., Kaido, M., Takano, Y., and Mise, K. Infection strategy of Brome mosaic virus in host and non-host plants. 17th International Congress of Virology, July 18, 2017, Singapore.
- Oya, T., Nitta, K., Xu, Q., Yasuda, K., Kaido, M., Teraishi, M., Okuno, T., Takano, Y., Okumoto, Y., and Mise, K. Isolation of an NB-LRR gene involved in rice resistance against Brome mosaic virus. 17th International Congress of Virology, July 18, 2017, Singapore.
- 北尾晃一・三瀬和之・高野義孝・海道真典．Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) 移行タンパク質 (MP)のアラニン置換変異が細胞内局在とウイルスの細胞間移行に及ぼす影響の解析．平成 29 年度日本植物病理学会大会，2017 年 4 月 27 日，盛岡市，マリオス アイーナ・いわて県民情報交流センター．
- 大矢卓明・新田浩志・Xu Quan・安田加奈子・寺石政義・海道真典・奥野哲郎・高野義孝・奥本 裕・三瀬和之．Brome mosaic virus (BMV) 抵抗性に関わる NB-LRR 型イネ遺伝子の品種間比較．平成 29 年度日本植物病理学会大会，2017 年 4 月 27 日，盛岡市，マリオス アイーナ・いわて県民情報交流センター．
- 大矢卓明・新田浩志・Xu Quan・安田加奈子・海道真典・奥野哲郎・高野義孝・奥本 裕・三瀬和之．Brome mosaic virus (BMV)抵抗性に関わる NBS-LRR 型イネ遺伝子の単離．平成

28年度日本植物病理学会関西支部会，2016年9月30日，静岡市，静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ。

尾崎紗恵・高野義孝・三瀬和之・奥野哲郎・海道真典 .Red clover necrotic mosaic virus MP-GFP 融合タンパク質を用いた MP と結合する宿主タンパク質の同定．平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会，2016年9月30日，静岡市，静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.plant-pathology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：奥本 裕

ローマ字氏名：OKUMOTO, Yutaka

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：9 0 1 5 2 4 3 8

(2)研究分担者

研究分担者氏名：海道 真典

ローマ字氏名：KAIDO, Masanori

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：2 0 3 1 4 2 4 7

(3)連携研究者

研究分担者氏名：谷口 寿章

ローマ字氏名：TANIGUCHI, Hisaaki

所属研究機関名：徳島大学

部局名：疾患酵素学研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：1 0 2 5 7 6 3 6

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。