

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14754

研究課題名(和文)植物ウイルス病原性蛋白質の生体における長距離移動の新規な仕組みの研究

研究課題名(英文)A novel mechanism of long distance transfer of plant virus pathogenic protein in a plant

研究代表者

町田 泰則 (Machida, Yasunori)

名古屋大学・理学研究科・名誉教授

研究者番号：80175596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：トマト黄化葉巻病ウイルスの病原性タンパク質 C1は、シロイヌナズナにおいては、AS1に結合し RNA サイレncingを誘導し、ウイルスの病徴を強化する。タバコ植物の下位葉に C1を一過的に発現させると、病徴は感染葉ではなく上位葉に出現することから、C1関連分子が植物内を長距離移動する可能性が考えられた。本研究では C1による上位葉における病徴出現にAS1が必要であることがわかった。さらに接ぎ木実験により、AS1が移動に必要なのか、その後の上位葉における病徴の出現に必要なのかを研究した。しかしAS1の重要性はわかったが、接ぎ木そのものが病徴の出現に阻害的であることから、答えが得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AS1のC末端側領域が C1に結合することを明らかにし、さらにその領域のペプチドを、C1をトラップするデコイとして利用でき、ウイルスの感染に強い植物を作成する方が開けた。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic protein C1 of tomato yellow leaf curl virus binds to AS1 in *Arabidopsis thaliana* and enhances the symptoms of the virus by inducing RNA silencing in the plant. When C1 is transiently expressed in the lower leaves of tobacco plants, symptoms appear in the upper leaves, not in the infected leaves. Therefore, it is possible that C1-related molecules (proteins and RNAs) might be transported long distances in the plants. We here have shown that tobacco AS1 is also necessary for the appearance of symptoms in the upper leaves due to C1. In addition, grafting experiments were conducted to investigate whether AS1 was necessary for migration or for the appearance of symptoms in the upper lobes thereafter. However, although the importance of AS1 was understood, the answer was not obtained because the graft itself is inhibitory to the appearance of the symptom.

研究分野：分子植物生理学

キーワード：植物ウイルス 病徴タンパク質 病徴の伝搬 葉の発生・分化

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

1. 研究開始当初の背景

トマト黄化葉巻病ウイルスの病原性タンパク質 $\beta C1$ は、シロイヌナズナにおいては、AS1 に結合し RNA サイレncing を誘導し、ウイルスの病徴を強化する。*Nicotiana benthamiana* 植物 (Nb: このウイルスの宿主となるタバコ植物の一種) の下位葉に $\beta C1$ を一過的に発現させると、病徴は感染葉ではなく上位葉に出現することから、 $\beta C1$ タンパク質などが植物内を移動する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまでの研究により、 $\beta C1$ の NbAS1 への結合が病徴出現に必要であること、 $\beta C1$ を *N. benthamiana* 植物の下位葉で過剰発現させると、上位葉に病徴が出現することがわかっていた。本研究では $\beta C1$ による上位葉における病徴出現の仕組みを知るために、AS1 が移動に必要なのか、移動先での病徴発現に必要なのかを調べることにした。

3. 研究の方法

野生型植物 (WT) と Nbas1 (AS1 ノックダウン) 株を用いて、4 通りの接ぎ木植物 (WT-Nbas1, Nbas1-WT, WT-WT, Nbas1-Nbas1) を作製し、台木の葉にウイルスを摂取し、穂木の葉における病徴の程度を調査した。また、 $\beta C1$ に結合する NbAS1 の領域を、AS1 の欠失変異体を作成して同定した。

4. 研究成果

野生型-Nbas1 と Nbas1-野生型では、どちらにおいても病徴レベルが低く、ともに同程度のレベルの病徴を示した。この結果は接ぎ木そのものが、 $\beta C1$ の移動あるいは病徴発現を阻害する可能性が考えられ、AS1 が長距離移動そのものに関わるのか、移動後の葉における病徴発現に参与するのかについては、答えが得られなかった。しかしこの研究により、AS1 の C 末端側ペプチドを植物体内で発現させることにより、 $\beta C1$ による病徴を軽減でき、ウイルスの感染に強い植物を作成できる (つまりこのペプチドを、 $\beta C1$ をトラップするデコイとして利用できる) 方法が開けた。これに関する国際特許 (PCT) を出願した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Luong, T.-Q., Keta, S., Asai, T., Kojima, S., Nakagawa, A., Micol, J-L., Xia, S., Machida, Y., Machida, C.: A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and DNA replication factors in establishment of adaxial-abaxial leaf polarity of *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* 35, 39–49 (2018) doi: 10.5511/plantbiotechnology.18.0129b. 査読有

Vial-Pradel, S., Keta, S., Nomoto, M., Luo, L., Takahashi, H., Suzuki, M., Yokoyama, Y., Sasabe, M., Kojima, S., Tada, Y., Machida, Y., Machida, C.: *Arabidopsis* zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) and two nucleolar proteins maintain gene body DNA methylation in the leaf polarity gene ETTIN (ARF3). *Plant & Cell Physiology* 59 (7), 1385–1397 (2018) doi: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy031> 査読有

Ohbayashi, I., Lin, C.-Y., Shinohara, N., Matsumura, Y., Machida, Y., Horiguchi, G., Tsukaya, H., Sugiyama, M. (2017) Evidence for a Role of ANAC082 as a Ribosomal Stress Response Mediator Leading to Growth Defects and Developmental Alterations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 29, 2644–2660 (2017) doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00255> 査読有

Li, H., Sun, B., Sasabe, M., Deng, X.-G., Machida, Y., Lin, H., Lee, Y.-R., Liu, B.: *Arabidopsis* MAP65-4 Plays A Role in Phragmoplast Microtubule Organization and Marks the Cortical Cell Division Site. *New Phytologist* 215, 187–201 (2017) doi: 10.1111/nph.14532. 査読有

Suzuki, T., Matsushima, C., Nishimura, S., Higashiyama, T., Sasabe, M. Machida, Y.: Identification of Phosphoinositide-binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of *Arabidopsis* MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* 57(8), 1744-55 (2016) doi: 10.1093/pcp/pcw098. 査読有

Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., Kojima, S., Ishibashi, N., Keta, S., Nakagawa, A., Hayashi, R., Saéz-Vásquez, J., Echeverría, M., Sugiyama, M., Nakamura, K., Machida, C. and Machida, Y.: A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*. *Biology Open* 5(7), 942-954 (2016) doi: 10.1242/bio.019109. 査読有

[学会発表] (計 37 件)

Simon Vial-Pradel, Mika Nomoto, Hiro Takahashi, Sayuri Ando, Masataka Suzuki, Shoko Kojima, Yasuomi Tada, Yasunori Machida, Chiyoko Machida: *Arabidopsis* zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) bound exon1 of ETTIN(ARF3) and maintain gene body DNA methylation in ETTIN together with nucleolar proteins, 第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

安藤沙友里、小川拓海、後藤秀一朗、小島晶子、坂本勇貴、松永幸大、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるZinc-finger-likeタンパク質AS2の核局在における核小体タンパク質の役割、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

小島晶子、西本珠美、香田加那、石橋奈々子、小嶋美紀子、高橋広夫、榊原均、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナのAS2を介した葉の発生に関わるサイトカニン合成酵素遺伝子の解析、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

鈴木崇紀、松尾憲総、尾松正人、田中美香、笹部美知子、町田千代子、町田泰則: 葉巻ウイルスの病原性因子 $\beta C1$ とその宿主受容体ASYMMETRIC LEAVES1(AS1)との相互作用と細胞内局在性、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

鈴木雅貴、ヴィアルブラデルシモン、高橋広夫、杉山宗隆、氣多澄江、小島晶子、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナのzinc-finger-like-protein AS2が関わる葉の向背軸分化とDNAメチル化における核小体タンパク質の役割の解明、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

山川美里、神谷翔子、安藤沙友里、町田泰則、小島晶子、町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸分化に関わるAS1-AS2とMET1、及びHDA6の遺伝学的相互作用の解析、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

神谷翔子、安藤沙友里、小島晶子、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生に関わるジンクフィンガータンパク質AS2のAS2 body形成の仕組みの解明、第60回日本植物生理学会, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市), 2019年3月13日~3月15日

Simon Vial Pradel, Mika Nomoto, Hiro Takahashi, Sayuri Ando, Masataka Suzuki, Shoko Kojima, Yasuomi Tada, Yasunori Machida, Chiyoko Machida: *Arabidopsis* zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2(AS2) bound exon 1 of ETTIN(ARF3) and maintain gene body DNA methylation in ETTIN together with nucleolar proteins, 第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市) 2018年11月28日~11月30日

町田千代子、中川彩美、高橋広夫、ピアル-ブラデル・シモン、山川美里、小島晶子、町田泰則: シロイヌナズナの葉の極性確立においてAS1-AS2とTOP1 α はETTIN (ARF3) を介してCDKインヒビターを抑制する、第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市) 2018年11月28日~11月30日

安藤沙友里、小川拓海、神谷翔子、山川美里、小島晶子、坂本勇貴、松永幸大、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるZinc-finger-likeタンパク質AS2の核小体局在性の解析、第41回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜市) 2018年11月28日~11月30日

町田泰則、Luo Lilan、安藤沙友里、笹部美知子、鈴木崇紀、石橋奈々子、中本大輔、山本興太郎、町田千代子: 葉の発生に関わるジンクフィンガー蛋白質AS2による核小体スペックル形成の仕組み、日本植物学会第82回大会(広島)、広島国際会議場(広島市)、2018年9月14日~9月16日

Simon Vial-Pradel, Mika Nomoto, Hiroo Takahashi, Sayuri Ando, Masataka Suzuki, Shoko Kojima, Yasuomi Tada, Yasunori Machida, Chiyoko Machida: *Arabidopsis* zinc-finger-like protein ASYMMETRIC LEAVES2(AS2) bound exon 1 of ETTIN(ARF3) and maintain gene body DNA methylation in ETTIN together with nucleolar proteins, 日本植物学会第82回大会(広島)、広島国際会議場(広島市)、2018年9月14日~9月16日

安藤沙友里、小川拓海、小島晶子、坂本勇貴、松永幸大、町田泰則、町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるzinc-finger-likeタンパク質AS2の細胞内局在性の解析、日本植物学会第82回大会(広島)、広島国際会議場(広島市)、2018年9月14日~9月16日

山川美里、神谷翔子、安藤沙友里、町田泰則、小島晶子、町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸分化に関わるAS1-AS2とDNAメチル化酵素遺伝子MET1の遺伝学的分子的相互作用の解析、日本植物学会第82回大会(広島)、広島国際会議場(広島市)、2018年9月14日~9月16日

鈴木崇紀、松尾憲総、尾松正人、田中美香、笹部美知子、町田千代子、町田泰則: シロイヌナズナの転写因子ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)に由来する“おとり分子”を利用した葉巻ウイルス病抵抗性技術、第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会、金沢商工会議所会館(金沢市) 2018年8月26日~8月28日

Iwai ohbayashi, Shun Sasaki, Chung-yi Lin, Naoki Shinohara, Yoko Matsumura, Yasunori Machida, Gorou Horiguchi, Hirokazu Tsukaya, Masahiro Furutani, Hitoshi Onouchi, Munetaka Sugiyama: A Critical Role of the NAC transcription Factor ANAC082 in Ribosomal Stress Signaling of Plant Cells, 第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター(札幌市) 2018年3月28日

～30日

町田千代子、Simon Vial-Pradel、高橋広夫、鈴木雅貴、安藤沙友里、小島晶子、町田泰則：シロイヌナズナのzinc-finger様タンパク質AS2と核小体タンパク質は葉の裏側化因子ETT/ARF3のgene body DNAメチル化維持に関わる、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター（札幌市）、2018年3月28日～30日

町田泰則、Simon Vial-Pradel、野元美佳、多田安臣、小島晶子、町田千代子：Zinc-finger様タンパク質であるAS2はETT/ARF3遺伝子のコード領域にあるCpGリピートに結合する、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター（札幌市）、2018年3月28日～30日

小島晶子、吉田みのり、水野翠、吉野有紀、笹部美知子、町田泰則、町田千代子：AS2相同遺伝子の解析

笹部美知子、桧垣匠、西田結花、森岡祉門、鈴木怜奈、植村知博、安原裕紀、馳澤盛一郎、上田貴志、町田泰則：細胞板形成におけるM期キネシンNACK1と細胞内輸送、第59回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター（札幌市）、2018年3月28日～30日

- ⑳ 町田泰則：葉形成に関わるepigenetic因子AS2の核顆粒と核への局在におけるzn-finger様motifの領域の役割、第40回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（神戸市）、2017年12月6日～9日
- ㉑ 大林祝、林忠逸、篠原直貴、松村葉子、町田泰則、堀口吾朗、塚谷裕一、杉山宗隆：シロイヌナズナのリポソームストレス応答とNAC転写因子ANAC082の役割、日本植物学会第81回大会（野田）、東京理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）、2017年9月8日～10日
- ㉒ 小島晶子、西本珠美、石橋奈々子、高橋広夫、中川彩美、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナの葉形成におけるAS1-AS2-ETT/ARF3下流因子の解析、日本植物学会第81回大会（野田）、東京理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）、2017年9月8日～10日
- ㉓ Simon Vial Pradel, Sumie Keta, Yoko Matsumura, Hiroo Takahashi, Shoko Kojima, Yasunori Machida, Chiyoko Machida：Epigenetic repressor AS1-AS2 and nucleolar factors control ARF3 in leaf development of *Arabidopsis*, 日本植物学会第81回大会（野田）、東京理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）、2017年9月8日～10日
- ㉔ 笹部美知子、伊藤千尋、樋口奈々美、高橋雛子、佐野亮輔、倉田哲也、出村拓、町田泰則：細胞の伸長と分裂の方向を決める因子の探索：プロトプラストと化合物の利用、日本植物学会第81回大会（野田）、東京理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）、2017年9月8日～10日
- ㉕ 鈴木崇紀、笹部美知子、町田千代子、町田泰則：葉の形態形成を司るシロイヌナズナのMYB転写因子ASYMMETRIC LEAVES1(AS1)タンパク質の細胞内局在における新たな知見、第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会、大宮ソニックシティ（さいたま市）、2017年8月29日～31日
- ㉖ Simon Vial Pradel, Sumie Keta, Takamasa Suzuki, Yoko Matsumura, Shoko Kojima, Yasunori Machida, Chiyoko Machida：Genetic and molecular interactions between nucleolar factors and AS1-AS2 for regulation of ARF3 expression in establishment of leaf polarity in *Arabidopsis thaliana*., 第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）大会、大宮ソニックシティ（さいたま市）、2017年8月29日～31日
- ㉗ 中川彩美、高橋広夫、ピアル-ブラデル シモン、森本麻莉、小島晶子、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナのAS1-AS2による葉の向背軸分化と細胞分裂制御、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島市）、2017年3月16日～3月18日
- ㉘ 西本珠美、石橋奈々子、中川彩美、高橋広夫、町田泰則、町田千代子、小島晶子：シロイヌナズナのAS1-AS2-ETT経路を介した葉形成におけるKRP5の役割、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島市）、2017年3月16日～3月18日
- ㉙ 小島晶子、石橋菜々子、西本珠美、香田佳那、中川彩美、小嶋美紀子、高橋広夫、榊原均、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナの葉の向背軸性の確立にはAS1-AS2-ETT経路を介したIPT3の転写抑制が必要である、第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島市）、2017年3月16日～3月18日
- ㉚ 高橋広夫、中川彩美、伊藤卓馬、小島晶子、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナの葉の細胞分化と分裂の制御機構の解明における発現解析データのデータマイニングの方法の開発、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2016年11月30日～12月2日
- ㉛ Simon Vial-Pradel, Ayami Nakagawa, Shoko Kojima, Yasunori Machida, Chiyoko Machida：Epigenetic regulator AS1-AS2 and modifiers control the level of DNA methylation of the ETTIN locus in establishment of leaf adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis thaliana*, 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2016年11月30日～12月2日
- ㉜ Yasunori Machida, Yoko Matsumura, Iwai Ohbayashi, Hiroo Takahashi, Shoko Kojima, Ayami Nakagawa, Sumie Keta, Rika Hayashi, Munetaka Sugiyama, Kenzo Nakamura, Chiyoko Machida：The nucleolus and plant-specific nuclear protein complex AS1-AS2 play a critical role in establishment of the dorso-ventral polarity of *Arabidopsis* leaves, 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2016年11月30日～12月2日
- ㉝ 中川彩美、高橋広夫、Simon Vial-Pradel、小島晶子、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナの葉の向背軸分化と細胞周期進行におけるAS1-AS2の役割の解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2016年11月30日～12月2日

- ③⑤ 町田泰則、松村葉子、大林祝、高橋広夫、小島晶子、中川彩美、林里香、石橋奈々子、杉山宗隆、町田千代子：シロイヌナズナの葉の極性確立におけるAS1-AS2複合体と核小体の役割、日本植物学会第80回大会、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）、2016年9月16日～19日
- ③⑥ 小島晶子、石橋奈々子、香田佳那、西本珠美、小嶋美紀子、中川彩美、高橋広夫、榊原均、町田泰則、町田千代子：シロイヌナズナの葉の発生・分化に関わるAS1-AS2-ETT経路とその下流因子の解析、日本植物学会第80回大会、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）、2016年9月16日～19日
- ③⑦ 笹部美知子、大和田理恵、中野理恵、中田美果子、町田泰則：植物の細胞分裂を制御するキネシンと相互作用するプロテインホスファターゼの解析、日本植物学会第80回大会、沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）、2016年9月16日～19日

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ジェミニウイルス病の防除に有効なペプチドとその利用法
発明者：町田泰則、他 4 名（松尾憲総、尾松正人、鈴木崇紀、田中美香）
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2017/026196
出願年：2017/ 7/20 (Year/Month/Day)
国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等
名古屋大学理学研究科生命理学専攻発生メカノ・セル・バイオロジー
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~yas/dmcb/dmcb.html>

中部大学応用生物学部町田千代子研究室
http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Bio_Chem/labo/machida_lab/index.html

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：町田 千代子
ローマ字氏名：Machida Chiyoko
所属研究機関名：中部大学
部局名：応用生物学部応用生物化学科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：70314060

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 崇紀
ローマ字氏名：Suzuki Takanori

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。