

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14434

研究課題名(和文)新規劣性免疫因子の機能解析による抗植物ウイルス免疫ダイナミクスの解明

研究課題名(英文)Revealing interplay between antiviral immunity and recessive resistance in plants

研究代表者

橋本 将典 (Hashimoto, Masayoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：20615273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、RNAウイルスに対して複数の免疫システムを備えている。これらの免疫システムは、相互に影響し合うことが示唆されつつあるが、その仕組みは明らかになっていない。本研究では、抗ウイルス免疫の一つ「劣性免疫」を決定する植物側因子「劣性免疫因子」の機能を調べ、免疫システム間の相互作用を理解することを目指した。その結果、劣性免疫因子は、複数の植物側因子と結合し、その機能からNMD免疫との関連性が示唆された。さらに、劣性免疫植物ではホルモン性免疫が上昇したが、ウイルス増殖阻害には関与しなかった。以上から、ウイルスに対する劣性免疫は、ウイルス以外の他の病原体に対する免疫に影響す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

植物ウイルスの防除法の一つに、植物の抗ウイルス免疫を利用した抵抗性育種がある。なかでも、劣性免疫は一部のウイルス種の防除に利用されているが、その適用範囲は限定的である。本研究では、研究代表者らが特定した新たな劣性免疫因子について、抵抗性育種への応用可能性を検討するため、植物が持つ複数の抗ウイルス免疫への影響を調べた。また、劣性免疫因子は、植物細胞内でウイルスが増殖する際に利用する宿主因子という側面を持つ。本研究により、劣性免疫がウイルス以外の他の病原体に対する免疫機構に影響する可能性を明らかにするとともに、ウイルス増殖における宿主因子の機能について基礎的な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Plants deploy multiple innate immune systems against RNA viruses. Although recent studies suggested the interplay among the anti-viral immune systems, the molecular mechanisms of such interplay remain elusive. This study aims to reveal the molecular function of a plant factor governing recessive immunity, also referred to as recessive resistance, and thereby to understand the interplay between recessive immunity and other anti-viral immune systems. As results, we successfully isolated several plant factors which interacts with the recessive immune factor, some of which implied a molecular link between recessive immunity and nonsense-mediated decay (NMD) immunity. Moreover, the results demonstrated that upregulation of plant hormone-mediated immunity is dispensable for the impairment of viral accumulation in recessive immunity, suggesting that recessive immunity against a plant virus may affect other innate immune systems targeting other plant pathogenic microbes than viruses.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：植物ウイルス 劣性抵抗性 植物免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、細菌、糸状菌などの病原微生物に対抗するため、「植物免疫」と総称される一連の免疫システムを備えている。植物免疫は、主に細菌や菌類を用いた研究がさかんに行われ、病原体由来の共通分子パターン(PAMPs)により誘導される PAMPs-triggered immunity (PTI)と、病原体から分泌されるエフェクタータンパク質により誘導される Effectors-triggered immunity (ETI)の2つに大別される[Nature, 2006. 444:323-329]。両者は、認識をになう受容体構造の違いや、シグナル伝達のタイミングや強度が異なることから明確に区別される。しかし誘導される植物 mRNA 群や植物ホルモンなどで共通しており、2つの免疫機構は複雑に相互作用することが知られている[EMBO J, 2017. 36:2758-2769]。

他方で、ウイルスに対する植物免疫(抗ウイルス免疫)は、ウイルスが独特のライフサイクルを持つことなどから、細菌や菌類の場合と大きく異なっている。抗ウイルス免疫には、サリチル酸などの植物ホルモンを駆動力とし、ETIに類似した「ホルモン性免疫」に加えて、ウイルスの増殖に必須な翻訳開始因子 eIF4E や eIF4G などの宿主因子の欠損による「劣性免疫」、ウイルスゲノム複製の中間産物である二本鎖 RNA を分解する「RNA サイレンシング」がある。さらに最近になって、RNA 代謝機構の1つである nonsense-mediated decay (NMD)を介した免疫「NMD 免疫」[CellHostMicrobe, 2014. 16:391-402]や、糖鎖に結合するレクチンタンパク質が受容体となる「レクチン抵抗性」が発見された。これまで、それぞれの抗ウイルス免疫に関する研究が進められ、認識されるウイルス由来の構造、認識をになう植物側の受容体、その下流で働くシグナル伝達経路などが明らかにされている。さらに最近になって、NMD 関連因子 *smg7* 変異体で ETI が活性化すること[CellHostMicrobe, 2014. 16:376-390]などが相次いで報告され、PTI と ETI の相互作用と同じように、抗ウイルス免疫システム間の相互作用が示唆されている。しかし、抗ウイルス免疫システム間の相互作用については知見が限られており、その分子実態は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗ウイルス免疫システム間の相互作用を明らかにし、副作用のないウイルス耐性植物の作出に向けた知見を得ることである。研究代表者らは、植物ウイルスの一群であるポテックスウイルスに対して劣性免疫を示すシロイヌナズナ変異体から、劣性免疫因子 EXA1 を特定した[Plant J, 2016. 88:120-131]。本研究では、EXA1 が抗ウイルス免疫のうち劣性免疫・ホルモン性免疫・NMD 免疫に関わり、複数の抗ウイルス免疫の相互作用を制御するのではないかという仮説のもと、抗ウイルス免疫における EXA1 の多面的な機能の解明を通じて、抗ウイルス免疫システムの相互作用を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)酵母ツーハイブリッド法による劣性免疫因子との結合因子のスクリーニング

酵母ツーハイブリッド法では、EXA1 全長を bait として、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーに対して、結合因子のスクリーニングを行った。選択培地上で生育したコロニーの塩基配列を解読し、特定された植物側因子について RT-PCR により全長の mRNA を取得した。その後、全長 mRNA を用いて、酵母ツーハイブリッド法により結合を確認した。

(2)EXA1 結合因子の細胞内局在解析

酵母ツーハイブリッド法で同定した結合因子について細胞内局在解析を行った。結合因子に *green fluorescence protein (GFP)* 遺伝子を融合させ、アグロインフィルトレーション法により植物の表皮細胞で発現させた。蛍光観察にはレーザー顕微鏡を用いた。

(3)EXA1-結合因子間の結合領域の特定

EXA1 のアミノ酸配列に予測される結合モチーフに着目し、結合モチーフを改変した EXA1 変異遺伝子を作成した。結合モチーフを改変した EXA1 と結合因子間の結合の有無を、酵母ツーハイブリッド法により評価した。

(4)*exa1* 変異体における各坑ウイルス免疫の遺伝子変動解析

exa1 変異体において、ホルモン性免疫および NMD 免疫それぞれのマーカー遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR により調べた。マーカー遺伝子の発現変動の算出には、野生型植物をコントロールとして用いた。

(5)劣性免疫における他の抗ウイルス免疫の影響の評価

ホルモン性免疫変異体と劣性免疫変異体を交配させた二重変異体に対して、ウイルス接種を行った。ホルモン性免疫のマーカー遺伝子の発現を調べるとともに、劣性免疫の単独変異体におけるウイルス増殖量の違いにより、ホルモン性免疫による劣性免疫への影響を評価した。NMD 免疫については、EXA1 と結合する NMD 因子の変異体に対してウイルス接種を行い、ウイルス増殖への影響を評価した。

4. 研究成果

(1)劣性免疫因子との結合因子のスクリーニング

劣性免疫因子 EXA1 の機能について手がかりを得るため、EXA1 と結合する植物側因子のスクリーニングを酵母ツーハイブリッド法により行った。選択培地に生育したコロニーについて、塩基配列の解読を行ったところ、多数の結合因子候補を得ることができた。なかでも、NMD 関連因子で

ある SMG7 が同定されたことから、EXA1 による劣性免疫と NMD 免疫との関連性が予想された。また、*smg7* 変異体の一部のアリルは、ETI と類似した反応を自発的に起こす表現型が知られており、この結果はホルモン性免疫との関連性も示唆している。EXA1 には、そのアミノ酸配列から 2 つの推定結合モチーフ (GYF ドメインおよび YLL モチーフ) が予測されるが、酵母ツーハイブリッド法により同定された結合因子の多くが、いずれかの推定結合モチーフに対応するアミノ酸配列上の特徴を有していた。以上のことから、同定された結合因子には、EXA1 の機能の発現に関わる重要な因子が含まれていると予想している。

(2) EXA1 結合因子の細胞内局在解析

EXA1 が細胞内でどのような因子と機能するのかを明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法で特定した結合因子について細胞内局在を調べた。まず、いくつかの結合因子について GFP 遺伝子を融合させ、アグロインフィルトレーション法により発現させ、レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、EXA1 の場合と同様に、いくつかの結合因子は細胞質内で特徴的な顆粒状の構造に局在することが分かった。顆粒状構造がどのような機能や特徴を持った構造なのかは引き続き検討が必要であるが、EXA1 の細胞内局在を観察した際にも似た構造が観察されることから、ウイルス増殖に関わる宿主因子を含んだ重要な構造であるかもしれない。

(3) EXA1-結合因子間の結合領域の特定

酵母ツーハイブリッドで同定されたいくつかの結合因子では、EXA1 に推定される特有の結合モチーフ (GYF ドメインおよび YLL モチーフ) に対応すると予想されるアミノ酸配列を有している。EXA1 のなかで結合因子との相互作用に重要なモチーフを特定するため、推定結合モチーフに変異を導入し、酵母ツーハイブリッド法により結合因子との結合を評価した。その結果、推定結合モチーフに変異を導入した EXA1 変異遺伝子は、結合因子との結合を失うことが示された。

(4) *exa1* 変異体における各坑ウイルス免疫の遺伝子変動解析

exa1 変異体におけるホルモン性免疫および NMD 免疫の変動を明らかにするため、ホルモン性免疫あるいは NMD 免疫の指標となるマーカー遺伝子の発現解析を行った。ホルモン性免疫の評価には植物ホルモンであるサリチル酸により発現誘導される *PR-1* 遺伝子を用いた。NMD 免疫の評価には、NMD により mRNA の 5' 末端構造が異なる variant が生じることが知られている遺伝子 (*AT2G45670* など) を用いた。その結果、*exa1* 変異体においては、ウイルス接種を行った条件もしくは行っていない条件のいずれでも、野生型植物に比べて *PR-1* の発現が上昇することが分かった。また、*exa1* 変異体と野生型植物では、NMD 発動の程度を示す指標で顕著な違いは見られなかった。以上のことから、*exa1* 変異体においては、ホルモン性免疫が活性化されるのに対して、NMD 免疫は変動していないことが示唆された。

(5) 劣性免疫によるウイルス蓄積低下における他の抗ウイルス免疫の影響の評価

劣性免疫によるウイルス蓄積量の低下に対して、他の抗ウイルス免疫がどのように影響するのかを調べた。ホルモン性免疫の影響を評価するため、*exa1* 変異体とホルモン性免疫の欠損変異体を交配させた二重変異体を用い、ホルモン性免疫のマーカー遺伝子の発現を調べるとともに、ウイルス蓄積量を *exa1* 単独変異体と比較した。その結果、二重変異体ではウイルス接種条件下で単独変異体に比べて *PR-1* の発現量が著しく低下したが、ウイルス蓄積量は単独変異体を比較しても同程度であった。このことから、劣性免疫によるウイルス蓄積量低下には、ホルモン性免疫は影響しないことが示唆された。次に、NMD 免疫の影響を評価するため、EXA1 の結合因子のうち NMD 関連因子である SMG7 の変異体に対してウイルス接種を行った。EXA1 が SMG7 を介して劣性免疫および NMD 免疫に影響する場合、*smg7* 変異体でも *exa1* 変異体と同様にウイルス蓄積低下が起こると予想した。しかし、*smg7* 変異体では野生型に比べてウイルス蓄積に顕著な変化が見られなかった。この結果から、劣性抵抗性におけるウイルス蓄積低下に NMD 免疫は関与しない可能性が示唆された。

本研究では、EXA1 の欠損により生じる劣性免疫について、EXA1 との結合因子のスクリーニングや、劣性免疫に対する他の抗ウイルス免疫の影響を調べることにより、抗ウイルス免疫間の相互作用に迫った。その結果、EXA1 は NMD 関連因子の SMG7 と結合し、*exa1* 変異体ではホルモン性免疫のマーカー遺伝子の発現が上昇することが分かった。その一方で、NMD 免疫とホルモン性免疫は、劣性免疫におけるウイルス蓄積抑制には影響しないことが示唆された。以上のことから、ウイルスに対する劣性免疫は、ウイルス以外の他の病原体に対する免疫に影響する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Yusa A, Neriya Y, Hashimoto M, Yoshida T, Fujimoto Y, Hosoe N, Keima T, Tokumaru K, Maejima K, Netsu O, Yamaji Y, Namba S. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Functional Conservation of EXA1 Among Diverse Plant Species for the Infection by a Family of Plant Viruses | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 5958 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42400-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Maejima K, Hashimoto M, Hagiwara-Komoda Y, Miyazaki A, Nishikawa M, Tokuda R, Kumita K, Maruyama N, Namba S, Yamaji Y. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Intra-strain Biological and Epidemiological Characterization of Plum Pox Virus | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology | 6. 最初と最後の頁 475-488 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12908 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤本祐司・煉谷裕太郎・橋本将典・吉田哲也・桂馬拓也・徳丸海・前島健作・根津修・山次康幸 |
| 2. 発表標題 EXA1を介した植物ウイルス抵抗性が作用するウイルス効果範囲に関する解析 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 煉谷裕太郎・遊佐礼・橋本将典・吉田哲也・藤本祐司・前島健作・根津修・山次康幸 |
| 2. 発表標題 植物で広く保存される劣性抵抗性遺伝子EXA1のポテックスウイルス感染に対する普遍性 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Masayoshi Hashimoto, Kensaku Maejima, Yasuyuki Yamaji, Shigetou Namba | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Elsevier | 5. 総ページ数 none |
| 3. 書名 Plant Resistance to Viruses: Natural Resistance Associated With Recessive Genes. In Reference Module in Life Sciences | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|