

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580045

研究課題名（和文）植物の細胞死によるウイルス封じ込め戦略に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the strategy for virus-containment by cell death in plants

研究代表者

松下 保彦（MATSUSHITA YASUHIKO）

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号：40291348

研究成果の概要：

抵抗性遺伝子 *N* をもつタバコにタバコモザイクウイルスが感染した際におこる細胞死誘導をモデルシステムとして、植物がもつウイルス封じ込め戦略について研究した。エチレン応答性の転写抑制因子 ERF3 が細胞死誘導情報伝達経路に含まれることを明らかにすると共に、ERF3 をはじめとする細胞死誘導特性のある遺伝子をウイルスの局所封じ込めに利用できる可能性を示した。本研究の成果はウイルス抵抗性植物作出のための新しい技術開発に活用されるものと期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：細胞死，植物ウイルス，病害抵抗性，植物免疫，タバコモザイクウイルス，TMV，*N* 遺伝子，ERF3

## 1. 研究開始当初の背景

植物はウイルスによる病害から身を守る手段のひとつとしてウイルスに対する抵抗性遺伝子を進化させてきた。タバコモザイクウイルスの場合、それに対する抵抗性遺伝子 *N* をもつタバコに感染すると、ウイルス由来の複製酵素のヘリカーゼドメインが *N* 遺伝子産物によって認識され、植物は自らの細胞に細胞死を誘導する。この細胞死誘導に関連し

てウイルスは局所に封じ込められることが知られている。ヘリカーゼドメインと *N* 遺伝子産物が細胞死誘導のスイッチをオンにすると、未知の情報伝達経路を介して、液胞のプロテアーゼ VPE1 に情報が伝えられ、液胞の崩壊を伴って細胞死が誘導される (Hatsugai et al., A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. Science 305, 855-858 (2004))。VPE1 は、動物で細胞死誘導に関与することが知られているカスパー

ぜと同様の活性をもつことから、細胞死誘導の情報伝達経路の下流に位置すると考えられる。ウイルスベクターを用いた遺伝子サイレンシング法により EDS1, RAR1, SGT1, Hsp90, SCF タイプの E3 ユビキチンリガーゼ, COP9 シグナロソームの構成因子が細胞死誘導に重要であることが示されている。また MEK2, WIPK, SIPK などの MAP キナーゼカスケードの因子や SIPK によりリン酸化される転写因子 WRKY の関与も示されているが, VPE1 に至る情報伝達経路には依然として未知の部分が多い (Menke et al., Tobacco transcription factor WRKY is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. Mol. Plant-Microbe Int. 18, 1027-1034 (2005))。研究代表者は、この細胞死情報伝達経路に関わる因子の中から、単独で過剰発現した時に細胞死を誘導する正の制御因子を見つけられることができれば、その遺伝子を利用して、細胞死によりウイルスを局所に封じ込めるような新しいタイプの病害抵抗性植物を作出できると考えていた。近年、菌類による植物の細胞死誘導に *NbCD1* と呼ばれる遺伝子が関与し、この遺伝子を過剰発現すると病原非存在下でも細胞死が誘導されることが示された (Nasir et al., High-throughput *in planta* expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance. Plant J. 43, 491-505 (2005))。研究代表者はこの遺伝子に着目し、タバコの相同遺伝子 *ERF3* をタバコで過剰発現するとヘリカーゼドメインと *N* 遺伝子産物による上流からの情報が来なくても、細胞死が誘導されることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

これらをもとに、本研究課題では研究期間内に、

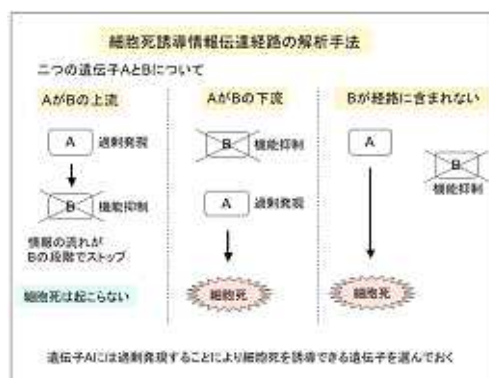
- (1) *ERF3* が *N* 遺伝子を介した細胞死誘導の情報伝達経路に関与するかどうか、
- (2) 関与が示唆される他の因子のうち、過剰発現することにより細胞死を誘導できるものがあるかどうか、
- (3) *ERF3* は、関与が示唆される他の因子と、細胞死情報伝達経路においてどのような位置関係にあるのか、
- (4) 抵抗性遺伝子をもたない植物にウイルスを感染し、ウイルス感染細胞で *ERF3* 等を過剰発現して細胞死を誘導した場合、ウイルスは局所に封じ込められるかどうか、

を明らかにすることを目的とした。このような研究を通して、将来的には、感染部位に誘導される植物細胞死に関連して植物ウイルスが局所に封じ込められる機構の解明や食料増産を目標とした病害抵抗性植物開発への利用を目指したいと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞死誘導情報伝達経路の解析

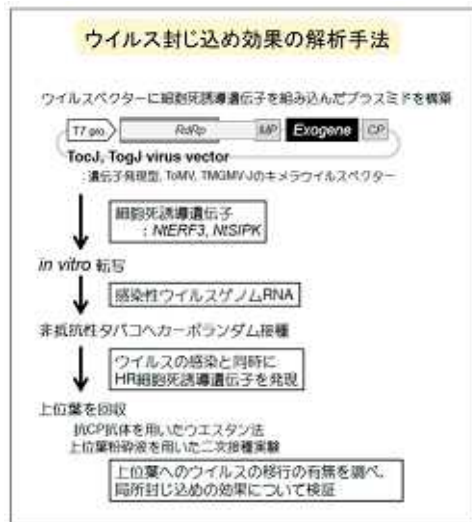
抵抗性遺伝子 *N* から細胞死誘導情報伝達経路に含まれる遺伝子あるいはその可能性がある遺伝子について、調べたい 2 種の遺伝子の組み合わせを決める。その際、一方の遺伝子には過剰発現することにより細胞死を誘導することができる遺伝子「細胞死誘導遺伝子」を選んでおく。もう一方の遺伝子について、RNAサイレンシング法やドミナントネガティブ型変異タンパク質の発現による機能抑制等の手法により、その機能を抑制できるようにしておく。「細胞死誘導遺伝子」を過剰発現することにより誘導される細胞死が、もう一方の遺伝子を機能抑制した場合にどのような影響を受けるか（細胞死が起こらなくなる等）を解析することにより、*N* 遺伝子からの細胞死誘導情報伝達経路に供試遺伝子が含まれるかどうか、両遺伝子の情報伝達経路での位置関係について知見を得る。細胞死誘導遺伝子の過剰発現には、アグロバクテリウム浸潤法を用いた一過的遺伝子発現系を利用する。



### (2) 細胞死誘導によるウイルス封じ込めの解析

アグロバクテリウム浸潤法を用いて過剰発現することにより細胞死を誘導することができる遺伝子「細胞死誘導遺伝子」を、トマトモザイクウイルス由来の組換えウイルス用ベクターに挿入したプラス

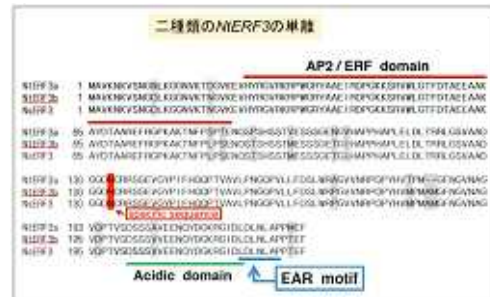
ミドを構築する。このプラスミドを用いて、細胞死誘導遺伝子を組み込んだウイルスのゲノムRNAを *in vitro* 転写により合成し、抵抗性遺伝子 *N* をもたないタバコ及び *Nicotiana benthamiana* の葉に接種する。ウイルス接種葉での壊死斑形成の有無や、ウイルスを接種していない上位葉でのウイルスの有無を調べ、細胞死誘導遺伝子を組み込んだことによるウイルス封じ込め効果について解析する。本解析法では、植物側ではなくウイルス側（病原側）に細胞死誘導遺伝子を組み込んだ場合の病原封じ込め効果について解析することになる。細胞死誘導遺伝子を植物側に組み込む場合には、ウイルス感染により植物側の細胞死誘導遺伝子が適切なタイミングで発現するように発現プロモーターを探索する必要があるが、ウイルス側に組み込む場合は、組み込んだ遺伝子がウイルス感染細胞で効率よく発現するため発現プロモーターを探索することなく細胞死誘導遺伝子のウイルス封じ込め効果について解析することができる。



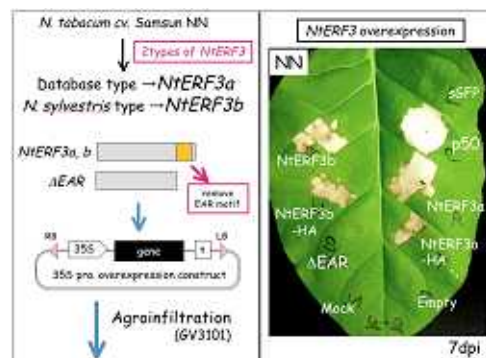
#### 4. 研究成果

(1) タバコからの *ERF3* 遺伝子の単離 ethylene-responsive element (ERE)-binding factor (ERF) は、エチレン応答性遺伝子の転写を調節する。タバコでは4種類の転写活性化因子 (*NtERF1*, *NtERF2*, *NtERF4* 及び *NtERF5*) と1種類の転写抑制因子 (*NtERF3*) が同定されている。近年、*NtERF3* の *Nicotiana benthamiana* における相同遺伝子 *NbCD1* を過剰発現すると、過敏細胞死が誘導

されることが示された。我々は、抵抗性遺伝子 *N* をもつ *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (NNタバコ) にタバコモザイクウイルス (TMV) が感染した際におこる細胞死誘導に *NtERF3* が関与するかどうかに興味をもち、NNタバコより *ERF3* の単離を行った。*NtERF3a* (DDBJ accession no.: D38124) に加え、配列の若干異なる遺伝子 *NtERF3b* を新たに同定した。*NtERF3b* は *NtERF3a* よりも *Nicotiana sylvestris* の *NsERF3* (DDBJ accession no.: AB016265) に対する塩基配列との



相同性が高く、*N. sylvestris* タイプの *ERF3* 遺伝子であると考えられた。アグロインフィルトレーション法により *NtERF3* をタバコの葉で一過的に過剰発現すると、活性酸素種の産生を伴った細胞死が誘導された。この細胞死は *N* 遺伝子をもたないタバコでも誘導されたことから、*NtERF3* 過剰発現による細胞死誘導には *N* 遺伝子は必要ないと考えられた。



(2) 過剰発現により細胞死を誘導できる因子の探索

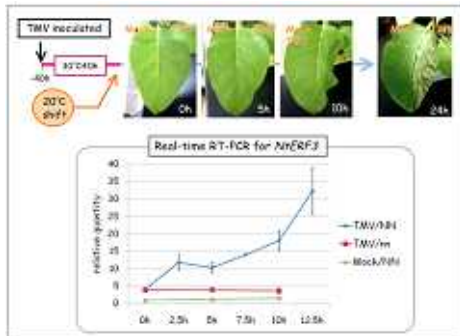
マップキナーゼキナーゼの1種である MEK2 の変異型で恒常的に活性をもつ MEK<sup>DD</sup> を過剰発現した場合や、マップキナーゼの1種である SIPK とそれによりリン酸化される WRKY1 を共に過剰発現した場合に、細胞死が誘導され壊死斑が観察されることが知られている。まず、MEK<sup>DD</sup>、SIPK と WRKY1 の過剰発現プラスミドを構築し、これらを過

剰発現した場合に細胞死が誘導されるかどうかを確認した。これにより、細胞死誘導に利用可能な手持ちの遺伝子を増加させることができた。本研究成果は、植物に病害抵抗性を付与する研究に役立つ遺伝子資源を確保できたという点で意義があると思われる。

(3) *N* 遺伝子を介した細胞死情報伝達経路における *ERF3* の関与及び位置関係についての解析

① 過敏感細胞死誘導時の *NtERF3* の発現解析

TMVを接種したNNタバコでは、過敏感細胞死の誘導に伴い *NtERF3* の mRNA 量が上昇した。これらのことから、*NtERF3* が病害抵抗性及び細胞死誘導経路に関与していることが考えられた。



② ドミナントネガティブ型 *ERF3* を利用した *ERF3* の機能抑制の影響

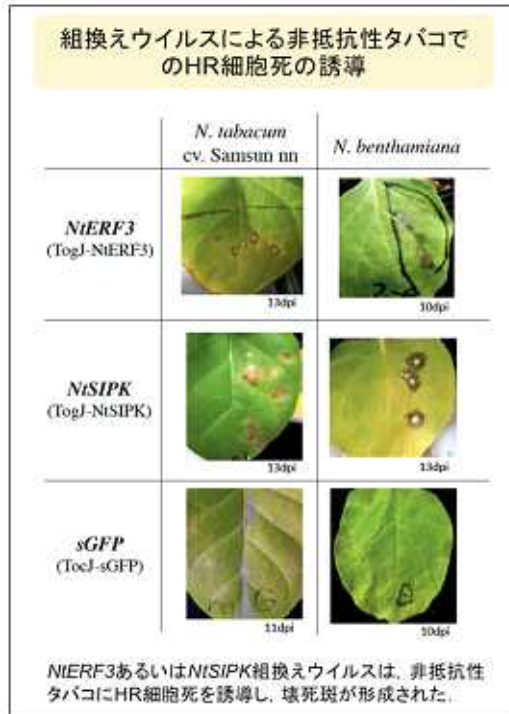
*N* 遺伝子からの細胞死誘導情報伝達経路に含まれることが知られている *SIPK* と *WRKY1* の両遺伝子を用い、その共発現により誘導される細胞死に対して、ドミナントネガティブ型 *ERF3* を利用した *ERF3* の機能抑制の影響を調べた。その結果、*SIPK* と *WRKY1* によって誘導される細胞死はドミナントネガティブ型 *ERF3* を共発現する



ことにより起こらなくなることがわかった。これらのことから、*ERF3* は、*N* 遺伝子を介した細胞死情報伝達経路に関与し、*SIPK* と *WRKY1* の下流に位置することが示唆された。

(4) *ERF3* の過剰発現によりウイルスを局所に封じ込めることができるかについての解析

細胞死誘導遺伝子として *ERF3* を導入したトマトモザイクウイルス由来の組換えウイルスを、抵抗性遺伝子 *N* をもたないタバコ及び *Nicotiana benthamiana* に接種することにより、病原側に細胞死誘導遺伝子を組み込んだ場合の病原封じ込め効果について解析した。その結果、接種した個体のすべての接種葉で壊死斑が観察され、多くの個体においてウイルスは局所に封じ込められ、本遺伝子をウイルスの局所封じ込めに利用できることが示唆された。



(5) ウイルス封じ込めに利用できる遺伝子の検討

過剰発現により細胞死が誘導されることが知られている *SIPK* について、(4) の *ERF3* と同様の方法で解析したところ *ERF3* と同様にウイルス封じ込め効果が確認された。このことから、細胞死誘導活性をもつ遺

伝子であればウイルスの局所封じ込めに利用できることが示唆された。本研究は、細胞死誘導活性をもつ遺伝子をウイルス抵抗性植物作出のための新しい技術開発に活用する道が開かれたという点で意義があると思われる。

非抵抗性タバコにおける組換えウイルスの封じ込め

<i>N. tabacum</i> cv. Samsun r11					
Exogene	HR cell death inducibility	recombinant virus inoculation			
		n	Lesion appearance		Systemic infection
			inoculated leaf	upper leaves	
<i>NtERF3</i>	Yes	12	12	0	1* (8%)
<i>NtSIPK</i>	Yes	19	19	0	2* (11%)
<i>sGFP</i>	No	11	0	0	11 (100%)

<i>N. benthamiana</i>					
Exogene	HR cell death inducibility	recombinant virus inoculation			
		n	Lesion appearance		Systemic infection
			inoculated leaf	upper leaves	
<i>NtERF3</i>	Yes	19	19	0	7* (37%)
<i>NtSIPK</i>	Yes	16	10**	0	0 (0%)
<i>sGFP</i>	No	9	0	0	9 (100%)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5件)

- ①小賀田拓也, 抵抗性遺伝子をもたない植物における細胞死誘導遺伝子組換えウイルスの封じ込め, 平成 21 年度日本植物病理学会大会, 2009 年 3 月 27 日, 山形
- ②新井智幸, タバコ *NtERF3* 組換えウイルスによる抵抗性遺伝子をもたない植物での細胞死誘導とウイルス封じ込め, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 10 日, 神戸
- ③Yasuhiko Matsushita, Overexpression of the tobacco *NtERF3* gene induces hypersensitive response-like cell death in plants., XIV. International Congress of Virology, 2008年8月13日, イスタンブール(トルコ共和国)
- ④小賀田拓也, タバコモザイクウイルス感染時のタバコ *NtERF3* 遺伝子の発現解析と一過的過剰発現による過敏感細胞死の誘導, 平成 20 年度日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 27 日, 松江
- ⑤小賀田拓也, タバコ *NtERF3* 遺伝子の一過的過剰発現による植物過敏感細胞死の誘導, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007

年 12 月 12 日, 横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松下 保彦

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号: 40291348

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし