

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06060

研究課題名(和文) ウイルスタンパク質複合体形成による植物生体防御の回避

研究課題名(英文) Evasion of plant innate immunity by complex formation between host and viral proteins

研究代表者

井村 喜之 (IMURA, Yoshiyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50366621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポテivirusに対するキュウリ近交系A192-18の抵抗性は、Vps4遺伝子の変異に起因する。Vps4タンパク質は、酵母細胞内にてウイルスタンパク質であるP3N-PIPOおよびCI(細胞質管状封入体)と相互作用したが、A192-18由来の変異型Vps4とは相互作用しなかった。キュウリA192-18の本葉に接種したポテivirusの時間的・空間的な動向を顕微鏡下で観察したところ、接種細胞内では複製を可能としたものの、隣接する細胞への移行が阻害されることが判明した。このことはウイルスの細胞間移行に關する上記のタンパク質とVps4の相互作用が、変異によってキャンセルされたことを裏付ける結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の新品種育成の現場では、病害抵抗性を付与する手段として優性の抵抗性遺伝子を導入することが主となっているが、その抵抗性は数年で打破されることが問題視されている。対して、病原体が感染に必要とする宿主因子が変異または欠損した抵抗性は、極めて打破されにくい。本研究では、キュウリにおいて1遺伝子の1塩基の変異がウイルス抵抗性を決定づけることを明らかにし、この成果を基盤にゲノム編集技術を用いて優良品種へのウイルス抵抗性付与が期待できる。さらに、ウイルスの細胞間移行に液胞へのタンパク質輸送因子が關することを世界に先駆けて明らかにし、ウイルス感染とタンパク質輸送の關係についての新たな知見が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The mutation of the gene encoding vacuolar protein sorting-associated protein (Vps) 4 in cucumber near-isogenic line A192-18 determines resistance to Zucchini yellow mosaic virus which is a member of family Potyviridae. In yeast the viral proteins, P3N-PIPO and CI interacted with the Vps4 protein from susceptible cucumber, but not from A192-18. The temporal and spatial analyses of the viral infection in the leaves of A192-18 revealed that the virus enabled to replicate in infected cells, whereas cell-to-cell movement of the virus was inhibited. The observation supported that cucumber resistance to the virus was determined by the changes of interaction of P3N-PIPO and CI, the viral proteins involved in cell-to cell movement, with Vps4.

研究分野：植物保護科学

キーワード：潜性抵抗性 ウイルス ウリ科植物 宿主因子 タンパク質間相互作用 細胞間移行

1. 研究開始当初の背景

ウリ科作物の栽培適期は害虫の活動が活発化する時期と重なることから、害虫による食害に加えてウイルス媒介性害虫によるウイルス病の被害が日本国内のみならず世界中で問題となっている。ウイルス病害による食料の損失を防ぐとともに、病虫害防除を目的とした化学合成農薬の多用による環境負荷を軽減させるためには、ウイルス抵抗性の形質を優良品種に付与させたウリ科植物を育成することが望まれている。現在、病原体に対する優性の抵抗性遺伝子を導入することによって、対象とする病原体に対して抵抗性を示す品種が数多く作製されており、農作物の安定的供給に大きく貢献している (Bai and Lindhout 2007; Jia et al. 2016)。しかしながら、本抵抗性は病原体自体または病原体の分泌する物質を認識する能力を植物に付与させることで、防御反応を迅速に誘導させるというメカニズムであるため、病原体側の認識を回避するマイナーな進化によって、その抵抗性は数年で打破されてしまう (Bera et al. 2017; Kwon et al. 2021)。このため、病害抵抗性遺伝子の導入とは異なる戦略でかつ、遺伝子組換え技術ではない新たな手段により、ウイルス病抵抗性を示し、さらに持続的で安定的な効果をもたらす新品種の作出が期待されている。

本研究では、これまでにウリ科作物全般に感染し、世界中で甚大な被害を与えるズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) に対して高度な抵抗性を示す自然発生突然変異体のキュウリを見出し、その抵抗性メカニズムを解析してきた。その結果、本抵抗性は単一の劣性 (潜性) 因子によって支配されること、さらには液胞へのタンパク質輸送に関与する因子 vacuolar protein sorting-associated protein の一つである Vps4 をコードする遺伝子の塩基変異が抵抗性を決定づけることが判明した (Amano et al. 2013)。そこで、キュウリ Vps4 遺伝子の変異がもたらす ZYMV に対する高度抵抗性の詳細な分子機構を明らかにするため、Vps4 タンパク質とウイルスタンパク質との相互作用を明らかにすることとした。さらに、Vps4 遺伝子の変異したキュウリ、またはドミナントネガティブ効果によってウイルスとの相互作用を拮抗阻害させた罹病性キュウリにおけるウイルスの時間的および空間的な感染パターンについて蛍光タンパク質を指標に蛍光顕微鏡下で詳細に観察することとした。また、ウイルスとともに Vps4 遺伝子を過剰に発現誘導させたキュウリ組織では、細胞死が誘起され、ウイルス蓄積量が顕著に低減することも明らかにしており、ウイルスが宿主細胞から奪取する因子と防御誘導因子との関連性を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

Vps4 遺伝子の変異がもたらすウイルス抵抗性の分子機構を明らかにするとともに、ウイルスが感染に必要な宿主因子がウイルスの攻撃に対する本来の役割・機能を明らかにすることを目指して、以下の4点を研究の目的とした。

(1) キュウリ Vps4 タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質の特定

ZYMV に対して高度抵抗性を示す自然発生突然変異体のキュウリは、Vps4 遺伝子の変異により抵抗性を獲得していることが判明しており、本抵抗性は劣性 (潜性) の遺伝様式を示す。換言すると、ウイルスはキュウリ罹病性品種において感染を成立させるために Vps4 タンパク質を利用するが、本タンパク質をコードする遺伝子の変異した自然突然変異体ではウイルスが利用できない構造へと変化していると考えられる。そこで、Vps4 タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質を特定し、この相互作用が Vps4 遺伝子の変異によって変化するかを明らかにすることを目的とした。

(2) Vps4 遺伝子の変異したキュウリにおけるウイルスの時間的・空間的感染パターン

Vps4 遺伝子の変異がもたらすウイルスに対する高度抵抗性のメカニズムを明らかにするために、自然発生突然変異体を6代にわたり自家交雑して得たキュウリのホモ個体 (A192-18) における ZYMV の細胞内複製、細胞間移行を中心とした時間的・空間的感染パターンについて蛍光タンパク質を指標に観察することを目的とした。

(3) Vps4 遺伝子の N 末端領域の発現によるウイルス蓄積量の変化

Vps4 遺伝子の変異したキュウリにおける ZYMV の複製および移行を含めたウイルス蓄積量の変動を調べることを目指した。また、A192-18 由来の Vps4 遺伝子において変異が見られる N 末端領域 (MIT 領域) を罹病性キュウリにてウイルスと共発現させることで、ドミナントネガティブ作用と同様にキュウリの内在性 Vps4 の機能を干渉するかどうかについて、ウイルスの感染パターンおよび蓄積量の変化を調べることで明らかにすることとした。

(4) ウイルスと Vps4 タンパク質を共発現させた組織で発現変動する遺伝子群の解析

ウイルスは複製または移行に関与するタンパク質を自身のゲノム上にコードしているが、これらのタンパク質は単独で機能を発揮させることはできない。つまり、複製または移行の各ステップにおいてさまざまな因子を宿主細胞から奪取することで感染を成立させている。本研究での解析対象としている Vps4 タンパク質は、ウイルスの感染成立に必須であると考えられるが、本タンパク質を過剰発現させた組織にウイルスを接種すると、接種後 7 日目から細胞死が観察され、ウイルス蓄積量が劇的に低下することを明らかにしている。すなわち、ウイルスは植物との共進化の過程で宿主植物からリクルートする因子を取捨選別している、換言すればウイルスへの攻撃に寄与する因子を優先的に奪取できるように進化を遂げてきたのではないかとの作業仮説を立て、Vps4 タンパク質と細胞死との関係性を調べることにした。

3. 研究の方法

(1) キュウリ Vps4 タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質の特定

酵母 Gal4 転写因子のアクティベーションドメインと DNA 結合ドメインを分離して作製された pGADT7 および pGBKT7 ベクター (TaKaRa Bio) にそれぞれ Vps4 遺伝子および各種ウイルスタンパク質遺伝子を挿入し、2 分子間の相互作用をレポーター遺伝子の発現による栄養要求性を指標に調べた。Vps4 タンパク質と相互作用したウイルスタンパク質の中で、ウイルス抵抗性キュウリ由来の変異型 Vps4 タンパク質とは相互作用しないタンパク質をスクリーニングした。

(2) Vps4 遺伝子の変異したキュウリにおけるウイルスの時間的・空間的感染パターン

自然発生突然変異体を自家交雑して得られた劣性 (潜性) ホモ個体である A192-18 の本葉に、ZYMV の感染性 cDNA をパーティクルボンバードメント法により接種した。感染性 cDNA 内に込みこまれた蛍光タンパク質 CFP 遺伝子の発現を指標に、蛍光顕微鏡下でウイルスの時間的・空間的な感染パターンを調べた。また、ウイルスを接種した葉の準超薄切片を作製し、罹病性キュウリとの感染パターンの相違を観察した。

(3) Vps4 遺伝子の N 末端領域の発現によるウイルス蓄積量の変化

キュウリ A192-18 の葉に ZYMV の感染性 cDNA をパーティクルボンバードメント法により接種し、経時的なウイルス蓄積量の変動を RT-qPCR 法により定量し、ウイルス罹病性キュウリでの変動と比較した。

また、罹病性キュウリと A192-18 由来の Vps4 遺伝子の間で変異が生じている領域 (MIT 領域) のみを罹病性キュウリにて発現誘導させたキュウリにウイルスを接種し、接種後 11 日目のウイルス蓄積量を RT-qPCR にて定量した。罹病性キュウリ由来の Vps4 タンパク質の MIT 領域 (S-MIT) が、ウイルスタンパク質と特異的に相互作用するが、キュウリ A192-18 由来の Vps4 タンパク質は MIT 領域内の変異 (A-MIT) によってこの相互作用がキャンセルされるのであれば、S-MIT を発現させると内在性 Vps4 タンパク質との相互作用が拮抗的に阻害されるが、A-MIT の発現では阻害されないものと考え (図 1) 解析を行った。

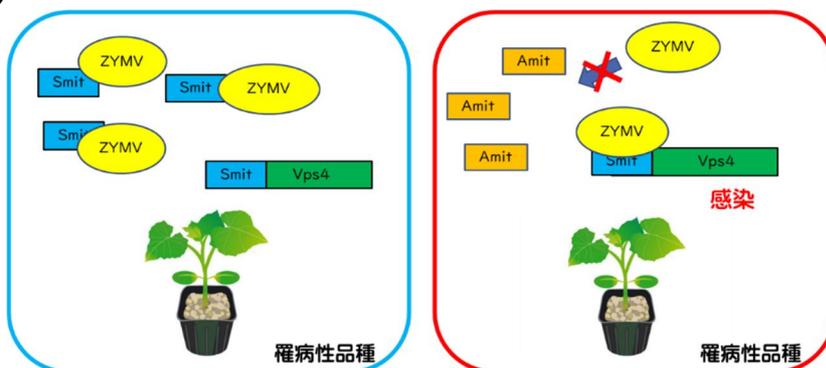


図 1. MIT 領域の発現による内在性 Vps4 とウイルスタンパク質の相互作用の拮抗的阻害の検証

(4) ウイルスと Vps4 タンパク質を共発現させた組織で発現変動する遺伝子群の解析

キュウリ Vps4 タンパク質は、ZYMV の感染に必須の宿主因子である。しかしながら、Vps4 を過剰発現させた罹病性キュウリの葉ではウイルスの感染によって細胞死が誘起され、ウイルスの蓄積量が顕著に低減した。そこで、Vps4 タンパクとウイルスを共発現させたキュウリ組織にて、細胞死が誘起される前段階で発現変動する遺伝子を RNA-seq 解析により網羅的に調べることとした。

4. 研究成果

(1) キュウリ Vps4 タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質の特定

ZYMV がゲノム RNA 上にコードしている 11 種のタンパク質遺伝子を pGBK7T ベクターに挿入し、pGADT7 ベクターに組み込んだ Vps4 との相互作用について酵母の栄養要求性株を用いて調べた。11 種類のウイルスタンパク質のうち、細胞質管状封入体 (CI) および P3 タンパク質の翻訳途中からフレームシフトによって合成される P3N-PIPO は罹病性キュウリ由来の Vps4 タンパク質と相互作用したものの、キュウリ A192-18 由来の変異型 Vps4 とは相互作用し

なかった。これらの相互作用は、Vps4 タンパク質の MIT ドメインのみを bait とした場合にも同様の結合特異性が確認された。

(2) Vps4 遺伝子の変異したキュウリにおけるウイルスの時間的・空間的感染パターン

ウイルス罹病性キュウリの葉に接種した ZYMV は、接種後 3 日目から感染した細胞から隣接する細胞への移行が顕著に見られ、接種後 11 日目では接種葉の全体にウイルスの感染に伴う強い蛍光が観察された(図 2)。これに対して、キュウリ A192-18 では、接種した細胞内で蛍光が確認されたものの、隣接細胞への移行は顕著に制限され、接種後 11 日目の時点でもウイルスの広がりが抑制されることが判明した(図 2)。

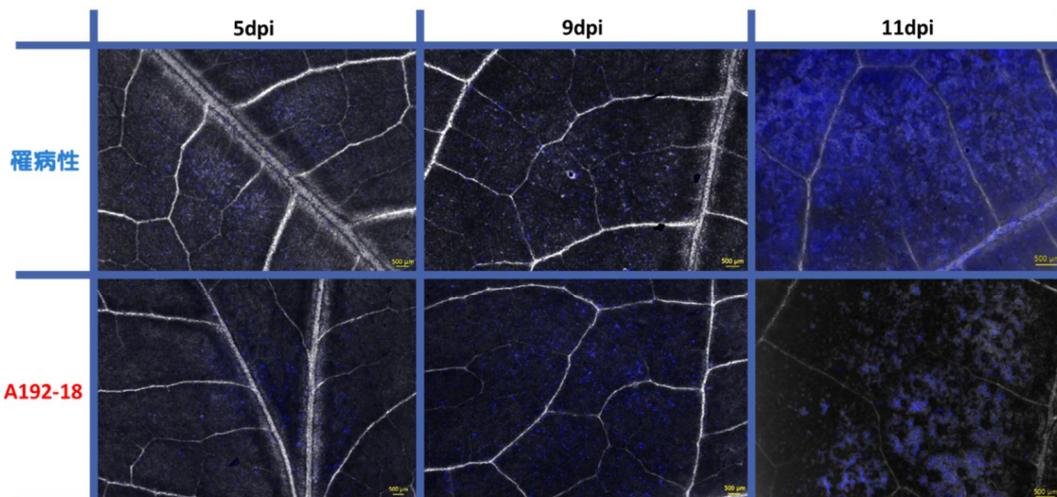


図 2. ウイルス罹病性キュウリ (上) と高度抵抗性A192-18 (下) におけるウイルスの時間的・空間的感染パターンの比較

これらの観察結果は、Vps4 の変異によりウイルスの感染細胞から隣接する細胞への移行、すなわち細胞間移行が阻害され、このことがウイルス抵抗性を示すのではないかと考えられた。ZYMV と近縁のカブモザイクウイルスは、細胞間移行にウイルスがコードする P3N-PIPO が深く関与することが報告されている (Vijayapalani et al. 2012; Chai et al. 2020)。そこで、P3N-PIPO をコードする領域に変異を導入した ZYMV の感染性 cDNA (P3N-PIPO) を作製し、細胞間移行能が欠損したウイルスの感染パターンを観察した。P3N-PIPO は、罹病性キュウリおよび A192-18 の両者において接種した細胞内で蛍光が観察されたが、隣接する細胞への移行は強く制限されていた(図 3)。P3N-PIPO による細胞間移行阻害は、A192-18 における ZYMV の細胞間移行阻害よりも強い効果を示した(図 3)。さらに、P3N-PIPO の蓄積量は、罹病性キュウリと A192-18 間で有意な差異が認められなかった(図 4) 以上の一連の結果から、A192-18 における Vps4 遺伝子の変異がもたらす抵抗性は、細胞内でのウイルス複製を阻害するものではなく、隣接する 1~2 細胞への移行は許容するもののそれ以上の拡大化を抑制することに起因することが判明した。

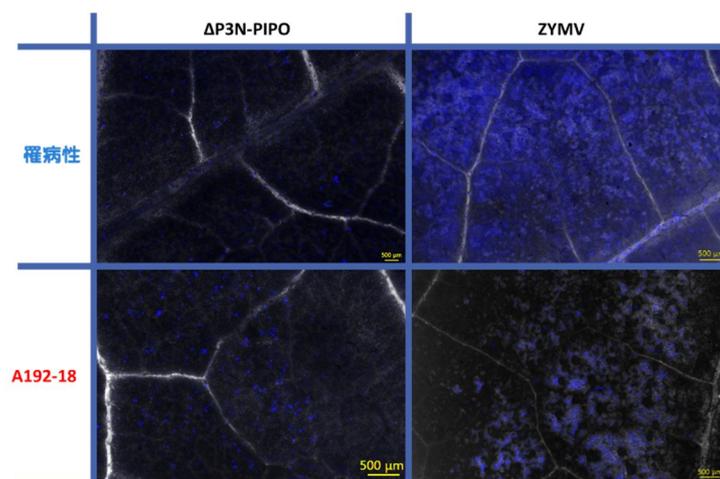


図 3. 細胞間移行能を欠損させたウイルス (ΔP3N-PIPO) のウイルス罹病性キュウリ (上) と高度抵抗性A192-18 (下) におけるウイルスの時間的・空間的感染パターンの比較

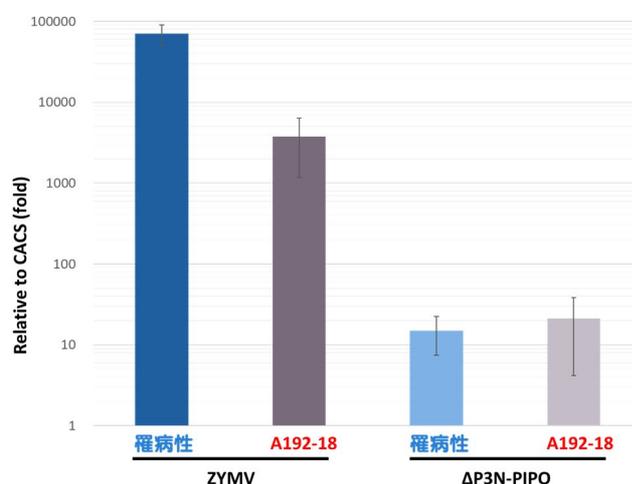


図 4. 細胞間移行能を欠損させたウイルス (ΔP3N-PIPO) のウイルス罹病性キュウリと高度抵抗性A192-18におけるウイルスの蓄積量

(3) Vps4 遺伝子の N 末端領域の発現によるウイルス蓄積量の変化

栄養要求性の酵母を用いてタンパク質間相互作用を調べた結果、Vps4 タンパク質の N 末端領域 (MIT ドメイン) とウイルスタンパク質である CI および P3N-PIPO が相互作用し、A192-18 由来の Vps4 遺伝子に見られる本領域内の変異によって、これらの相互作用がキャンセルされることが判明した。そこで、罹病性キュウリと A192-18 の Vps4 遺伝子の間で塩基配列の相違が認められた MIT 領域を発現させたキュウリにおけるウイルスの感染と蓄積量の変化を調べることにした。

罹病性キュウリ由来の MIT 領域 (S-MIT) を発現させたキュウリでは、ZYMV 感染による病徴が観察されず、蛍光タンパク質の発現を指標としたウイルスの蓄積も認められなかった (図 5)。これに対して A192-18 由来の変異型 MIT (A-MIT) を発現させた場合では、ZYMV 単独接種と同様の病徴が観察され、ウイルスの葉全体における増殖も確認できた (図 5)。RT-qPCR に

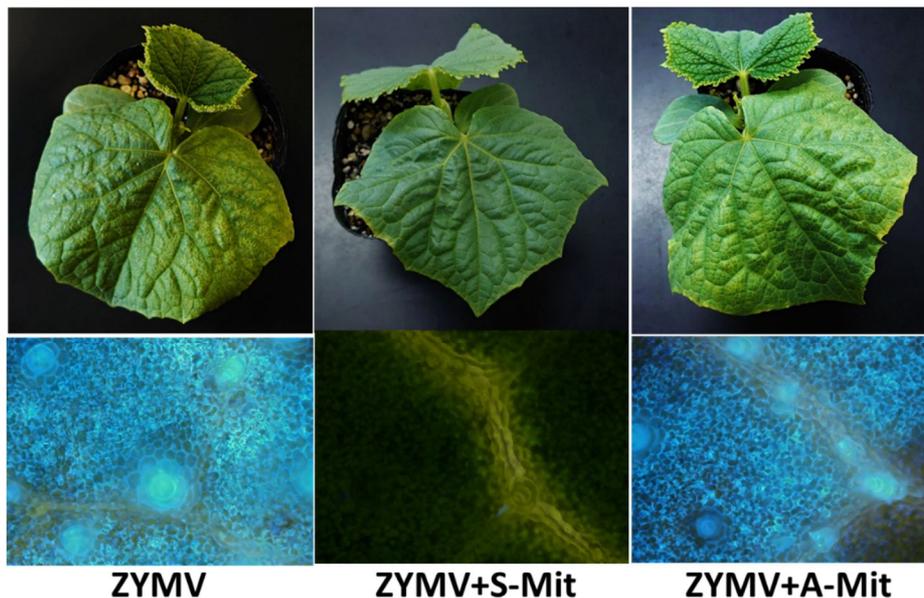


図 5. 罹病性キュウリ由来の MIT 領域 (S-MIT) または A192-18 由来の変異型 MIT 領域 (A-MIT) を発現誘導したキュウリにおける病徴 (上) とウイルス感染 (下)

より MIT 領域の発現によるウイルス量を定量した場合にも、S-MIT の発現によってウイルスの蓄積量が顕著に低減することが判明した (図 6)。以上の結果から、Vps4 タンパク質の MIT 領域が細胞間移行に關与するウイルスタンパク質 CI および P3N-PIPO と相互作用することで、ウイルスはキュウリでの細胞から細胞への移行を可能として感染部位を拡大させることができるが、MIT 領域に変異が導入された A192-18 では、CI および P3N-PIPO との相互作用がキャンセルされるため、複製した細胞での封じ込めにより抵抗性を示すことが明らかとなった。

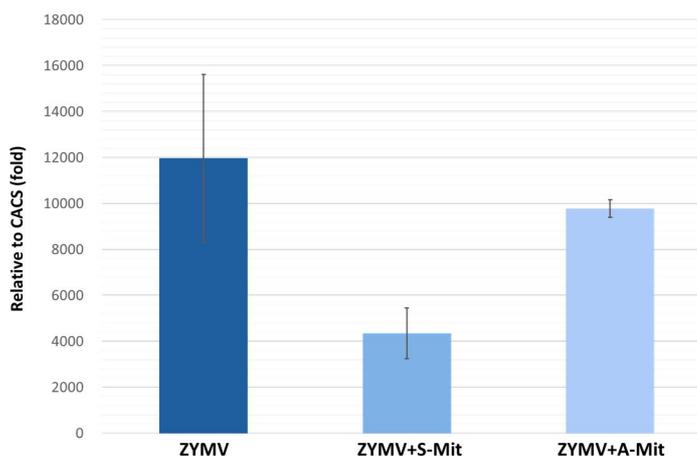


図 6. 罹病性キュウリ由来の MIT 領域 (S-MIT) または A192-18 由来の変異型 MIT 領域 (A-MIT) を発現誘導したキュウリにおけるウイルス蓄積量の変化

(4) ウイルスと Vps4 タンパク質を共発現させた組織で発現変動する遺伝子群の解析

Vps4 タンパク質を過剰発現させた組織に ZYMV を接種すると、接種後 7 日目から細胞の壊死が観察され始めるが、MIT 領域のみを発現させた場合には細胞死は誘起されない。そこで、Vps4 とウイルスを共発現させた後、7 日目の本葉を採取し、MIT 領域とウイルスを共発現させた対象区に対して発現変動する遺伝子を RNA-seq 解析により網羅的に調べた。

細胞死の誘導と同調的に発現変動する複数の遺伝子が見いだされ、その中には熱ショックタンパク質をコードする遺伝子や二次代謝系酵素遺伝子などが含まれていた。トマトとトマト黄化葉巻ウイルスの関係において、熱ショックタンパク質の一つである HSP90 が細胞死およびウイルスの蓄積量の変化と密接に關与することが報告されており (Moshe et al. 2016)、発現変動した遺伝子と細胞死との関係、さらにはウイルスが奪取する宿主因子と抵抗性関連タンパク質との関係を引き続き調べることを計画している。

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 0件）

1. 著者名 井村 喜之	4. 巻 3
2. 論文標題 植物のウイルス抵抗性を支配する新奇な劣性因子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 井村 喜之	4. 巻 5
2. 論文標題 植物のウイルス抵抗性を支配する新奇な劣性因子（第2報）	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 92-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Imura, Masashi Amano, Nobuhiro Kita
2. 発表標題 Recessive resistance to potyviruses in cucumber is determined by a single mutation in the Vps4 gene
3. 学会等名 2019 International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI) XVIII (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村友紀・高松海斗・落合剛流・影山達哉・天野政史・北宜裕・井村喜之
2. 発表標題 キュウリVPS4遺伝子の変異はウイルスの細胞間移行を抑制する
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高松海斗・中村友紀・長谷川康平・落合剛流・影山達哉・天野政史・北宜裕・井村喜之
2. 発表標題 キュウリVPS4遺伝子の突然変異によるウイルスの細胞間移行阻害
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 2019 International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions(IS-MPMI) XVIII	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------