

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20580049

研究課題名 (和文) タバコモザイクウイルス抵抗性のシグナル伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of the signal transduction mechanism of tobacco mosaic virus resistance

研究代表者

瀬尾 茂美 (SEO SHIGEMI)

独立行政法人農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット 主任研究員

研究者番号：80414910

研究成果の概要 (和文)：MAP キナーゼは真核生物に広く存在するシグナル伝達因子である。タバコモザイクウイルス (TMV) 抵抗性に果たすタバコ MAP キナーゼ WIPK と SIPK の役割を明らかにするために、これら MAPK の機能が喪失したタバコの TMV 応答を解析した。WIPK と SIPK の機能喪失タバコでは、TMV 抵抗性が弱まることがわかった。この結果は、従来の説とは異なり、WIPK と SIPK は TMV 抵抗性に対して阻害的に働くことを示した。

研究成果の概要 (英文)：Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are signal factors that exist ubiquitously in eukaryotes. To define the exact roles of WIPK and SIPK, tobacco MAPKs, in tobacco mosaic virus (TMV) resistance, we analyzed transgenic tobacco plants in which WIPK and SIPK were silenced. Resistance to TMV was suppressed in these silenced plants, suggesting that WIPK and SIPK negatively regulate resistance to TMV, a result different from that previously shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：植物病理学・植物生理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物病理・ウイルス・シグナル伝達・MAP キナーゼ・ジャスモン酸・サリチル酸・抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原体に感染した細胞が自殺し様々な防御反応を発動させることで全身への蔓延を阻止する過敏感反応は、植物特有の感染防御システムであり、主に病原体に対する宿主側の抵抗性遺伝子の応答が引き金となるものと考えられている。死んだ細胞は通常、壊死斑として肉眼もしくは顕微鏡で観察できる。

タバコモザイクウイルス (TMV) とその抵抗性遺伝子 *N* を有するタバコ品種の組合せは過敏感反応研究の古典的モデル系のひとつとして使われている。

(2) これまで、タンパク質リン酸化酵素 MAP キナーゼ (MAPK) であるタバコの WIPK と SIPK が TMV 抵抗性に関与することを示唆する結果が幾つかの国外の研究グループによって報

告されていた。すなわち、1) TMV 感染後の *NV* タバコにおいて WIPK と SIPK は活性化される、2) 上流の活性化因子である MAPKK の恒常的活性化を一過的に発現させた *NV* タバコでは、TMV 非存在下でも WIPK と SIPK の活性化を伴う細胞死が起こる、3) *N* 遺伝子を導入した形質転換 *Nicotiana benthamiana* 植物においてウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) によって WIPK と SIPK の発現を抑制させると、TMV の増殖増大と全身移行が起こる。これらの結果は「WIPK と SIPK は過敏反応を介して TMV の増殖と移行を阻害することで TMV 抵抗性に貢献している」ことを示唆しており、この説が広く信じられていた。

2. 研究の目的

TMV 抵抗性に果たす WIPK 及び SIPK の役割を調査することを目的として行われてきたこれまでに研究において用いられていた *N* 遺伝子導入 *N. benthamiana* 植物を宿主として使う場合、*NV* タバコに比べて、不均一な大きさや形状の壊死斑が生じやすく、定量的な壊死斑形成の測定に支障をきたすことが知られている。また、*N. benthamiana* 植物では TMV を含むある種のウイルスの増殖や移行が起こりやすいことが知られている。さらに、VIGS 法で用いられるアグロバクテリウムは植物にある種の防御反応を引き起こす能力を有している。したがって、*N. benthamiana* 植物と TMV の組合せを用いて得られた過敏反応に関する実験結果の解釈には注意が必要である。事実、筆者らは、RNA 干渉によってこれら MAPK の発現を抑えた stable な形質転換 *NV* タバコを用いた最近の予備的実験から、WIPK 及び SIPK の抑制は TMV 増殖をむしろ阻害することを示唆するデータを得た。したがって、筆者らは、TMV 抵抗性 (TMV の増殖と全身移行の阻害) に果たす WIPK と SIPK の役割に関して提唱されている説については再考を要すると考えた。そこで本研究では、TMV 抵抗性における WIPK と SIPK の機能を直接証明することを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) TMV 抵抗性 (TMV の増殖と全身移行の阻害) に WIPK 及び SIPK が関与しているのか否かを明らかにするために、*N* 遺伝子を保有するタバコ品種 (*N. tabacum* cv. SamsunNN) を用い、WIPK と SIPK の発現をそれぞれ単独で或は同時に抑制させたタバコを作出した (WIPK 抑制タバコ、SIPK 抑制タバコ、WIPK/SIPK 抑制タバコ)。これらタバコの葉に TMV を接種し、接種後に形成される壊死斑の

大きさを光学顕微鏡下で計測した。また、一般に、生じる壊死斑のサイズは TMV 量を反映することから、接種葉における TMV 量を定量 RT-PCR 法で分析した。なお、対照区として、ベクターのみを SamsunNN タバコに導入した形質転換タバコを用いた。

(2) TMV の全身移行に対する抗性に果たす WIPK と SIPK の役割を明らかにするために、上記各形質転換タバコの葉に TMV を接種し、過敏反応の起こる温度「20℃」でその植物体を培養、上位未接種葉に壊死病徴が出現するかどうかを形態学的観察で検証するとともに、ウイルスの存在をノーザン解析により検証した。

(3) TMV 抵抗性への WIPK 及び SIPK の関与が *N* 遺伝子依存性的か否かを検証するために、*N* 遺伝子を保有しないタバコ品種で WIPK と SIPK の発現を抑制した形質転換タバコを複製、作出した本タバコに TMV を接種し、ウイルス増殖に変化が起こるか否かをウイルス量を定量することにより調べた。

(4) TMV 抵抗性にはサリチル酸やジャスモン酸などの植物ホルモンがシグナル物質として働いていると考えられている。そこで、TMV 抵抗性におけるこれらシグナル物質の生産に WIPK と SIPK が関与しているのか否かを明らかにするために、上記各形質転換タバコにおける TMV 感染後のサリチル酸、ジャスモン酸の内生量の変動を機器分析により定量した。また、WIPK と SIPK がこれらのホルモンの生合成の引き金に関与しているのか否かを検証するために、TMV 感染に伴う過敏反応の誘導時における WIPK と SIPK の活性化とサリチル酸・ジャスモン酸の蓄積の時間的關係を野生型タバコを用いて解析した。

(5) サリチル酸は、TMV 抵抗性の正の制御因子と考えられている。そこで、WIPK と SIPK の発現を抑制させた *NahG* タバコ (サリチル酸低含量タバコ) における TMV 感染後の壊死斑形成の形態学的観察及び TMV の増殖の定量分析を行なった。

4. 研究成果

(1) WIPK と SIPK の発現がそれぞれ単独もしくは両方抑制されたタバコの葉に TMV を接種し、接種葉に形成された壊死病斑の直径を測定するとともに、接種葉における TMV の量を定量した結果、ベクターのみを導入したコン

トロール植物と比較して、両方抑制された系統では小さなサイズの壊死病斑の形成が確認された。この抑制体では、病斑サイズの減少と相関して TMV の蓄積量も減少していた。一方、各 MAPK が単独で抑制された系統における壊死病斑のサイズと TMV 量はコントロールと同程度であった。

(2) 各発現抑制体の葉に TMV を接種し、TMV 抵抗性遺伝子 *N* 非許容温度 20 度で培養、未接種上位葉における壊死病斑形成の有無を調べた。その結果、単独及び両方抑制のいずれの系統においても、未接種上位葉における壊死病斑の形成が認められた。また、この systemic 病斑を形成した葉には TMV が存在することをノーザン解析により確認した。そのような systemic 病斑はコントロール植物では全く形成されなかった。

(3) WIPK と SIPK を抑制した *N* 非保有タバコの接種葉における TMV 量は非抑制体と同程度であった。

(4) WIPK と SIPK を抑制した *N* 保有タバコでは、野生型タバコと比較して高含量のサリチル酸の蓄積が観察されたのに対し、低含量のジャスモン酸の蓄積がみられた。WIPK と SIPK の活性化とサリチル酸・ジャスモン酸の蓄積の時間的関係を野生型タバコを用いて解析した結果、最初にサリチル酸の蓄積が起こり、次いで WIPK と SIPK の活性化、ジャスモン酸の蓄積が起こることが判明した。

(5) WIPK と SIPK を抑制した *N* 保有タバコに SA 加水分解酵素をコードする *NahG* 遺伝子を再導入してサリチル酸蓄積を抑制、あるいはジャスモン酸を外生的に与えると、TMV 増殖抑制は打破されることが判明した。

(6) 以上の結果を考え合わせると、WIPK と SIPK はサリチル酸の生合成の段階ではなくその後の蓄積を、ジャスモン酸についてはおそらく生合成の段階をコントロールすることで TMV の増殖阻害に関わることが示唆された (図 1)。また、WIPK と SIPK は全身移行に対する抵抗性に関しては逆に正の制御因子として働くと考えられた。通常、*N* 遺伝子を保有する野生型タバコに TMV が感染すると、接種葉で過敏感反応が起こることによってウイルスの全身移行が阻害される。一方、WIPK と SIPK を抑制したタバコでは、小さな局部壊死斑の形成によって TMV の増殖は抑えられたにも関わらず全身移行が起きた (図

1)。これらの結果は、TMV の増殖と全身移行の抑制は必ずしも関連していないという、定説を覆す新しい考えを提唱しており、TMV 抵抗性の機構に関して新たな知見を与えたものとなった。

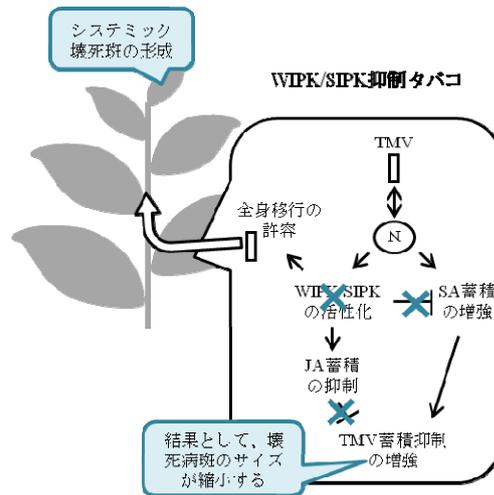


図 1. TMV 抵抗性に果たす WIPK と SIPK の予想される役割を示す図。WIPK と SIPK が抑制されたタバコにおいて観察される TMV 感染応答を模式的に示している。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kobayashi, M., Seo, S.***, Hirai, K., Yamamoto-Katou, A., Katou, S., Seto, H., Meshi, T., Mitsuhashi, I., and Ohashi, Y. (2010) Silencing of WIPK and SIPK mitogen-activated protein kinases reduces Tobacco mosaic virus accumulation but permits systemic viral spread in tobacco possessing the *N* resistance gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 : 1032-1041. (*co-first authors; ***corresponding author) 査読有

2. 小林光智衣、光原一郎、瀬尾茂美 (2011) タバコモザイクウイルス抵抗性に果たす MAP キナーゼの予期せぬ役割 *化学と生物* Vol. 49 pp226-228 査読無

〔学会発表〕(計2件)

1. 小林 光智衣 MAPKであるWIPKとSIPKを抑制したタバコにおけるタバコモザイクウイルス増殖抑制機構の解析 **日本植物生理学会** 平成22年3月20日 熊本大学

2. 瀬尾茂美 タバコMAPKであるWIPKとSIPKはタバコモザイクウイルスの全身移行を阻害するがウイルス増殖は高める **日本植物生理学会** 2009年3月21日 名古屋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 茂美 (SEO SHIGEMI)

独立行政法人 農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任
研究員

研究者番号：80414910