

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780030
 研究課題名（和文）
 ウイルス移行タンパク質と相互作用する植物因子 K E L P による感染抑制作用の研究
 研究課題名（英文）
 Study on inhibitory effects of plant K E L P proteins interacting with virus movement proteins on virus infection
 研究代表者
 佐々木信光（SASAKI NOBUMITSU）
 東京農工大学・学術研究支援総合センター・助教
 研究者番号：70431971

研究成果の概要（和文）：植物ウイルスに対する抵抗性植物の開発には、植物が本来もつウイルス抵抗性遺伝子の作用機序を分子レベルで明らかにする必要がある。本研究では、ウイルスの感染拡大を抑制する作用をもつ植物遺伝子 *KELP* の機能解析を進めた。その結果、多くの植物に保存されている *KELP* は、少なくとも 2 種のウイルス因子（移行タンパク質）と細胞内で相互作用して、その因子の本来の機能を阻害することにより、ウイルスの感染を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to develop resistance plants for virus attacks, it is necessary to elucidate at molecular levels how inherent plant resistance genes act. In this study, we performed functional analyses of *KELP* genes, which had been shown to restrict virus infection spread. Our results have suggest that *KELPs*, conserved in a wide range of plant species, interact with a viral factor (movement protein) from at least two different viruses, interfere with their innate function, and consequently restrict virus spread.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：植物とウイルスとの相互作用機構の研究

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物ウイルス・細胞間移行・ウイルス抵抗性・移行タンパク質・転写活性化補助因子・阻害因子

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは農作物に甚大な病害を引き起こすが、駆除に有効な手段がないため、植物の抵抗性遺伝子を利用したウイルス耐性植物の開発が重要である。我々は、ウイル

スの感染拡大（細胞間移行）に抑制的に作用する植物因子の研究を進めてきた。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がもつ *KELP* と呼ばれる植物タンパク質はトマトモザイクウイルスとキュウリモザイクウイルスの

移行タンパク質と *in vitro* で結合する。KELP をボンバードメント法により一過的に過剰発現させた植物葉では、トマトモザイクウイルスの感染拡大（細胞間移行）が著しく抑制されることが分かっていた。KELP を有用遺伝子として十分に活用していくためには、ウイルス感染抑制作用の分子機構を明らかにする必要があった。そこで、本研究では、(1) 一過的過剰発現実験において KELP がウイルスの移行を阻害している分子機構を明らかにする、(2) KELP を発現していないシロイヌナズナ変異体を用いて、当該遺伝子のウイルス感染における役割を調べる、(3) 他の単子葉・双子葉植物に保存されている KELP の類似遺伝子がウイルス感染抑制作用を持っているかどうかを検証する、ことを計画した。

2. 研究の目的

(1) 一過的過剰発現実験において、KELP は移行タンパク質の機能にどのような影響を与えているのか分子レベルで検証する。

植物細胞内で KELP と移行タンパク質が実際に相互作用しているのかどうかを調べる。

KELP が過剰発現している細胞において、ウイルス感染時に移行タンパク質が正常に機能しているのかについて検証する。

(2) KELP 本来の機能およびウイルス感染における本来の役割を調べる。

(3) KELP のウイルス感染抑制作用がシロイヌナズナ以外の植物にも保存されている一般的な作用であるのかについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を用いることで KELP とトマトモザイクウイルス移行タンパク質の *Nicotiana benthamiana* 細胞内での相互作用を検証した。

GFP と融合した移行タンパク質をコードするトマトモザイクウイルスのプラスミドを用いて、ボンバードメント法により KELP と共発現させ、移行タンパク質の局在の変化を調べた。

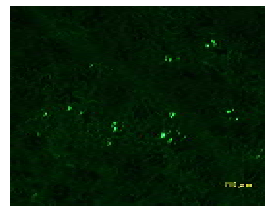
(2) KELP 遺伝子が破壊されたシロイヌナズナの T-DNA 挿入変異体を使って、生育時における形態形成への影響を観察した。また、トマトモザイクウイルスを接種し、ウエスタン解析によりウイルス蓄積量を測定した。

(3) ブラシカ科植物 (*Brassica campestris*)、トマト (*Solanum lycopersicum*)、イネ (*Oryza*

sativa)、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) から KELP 類似遺伝子をクローニングした。ボンバードメント法によりウイルスのプラスミドと *Nicotiana benthamiana* で共発現させ、ウイルス感染抑制効果を調べた。ウイルスには、トマトモザイクウイルスおよびキュウリモザイクウイルスの移行タンパク質遺伝子に置換したトマトモザイクウイルス変異体を用いた。

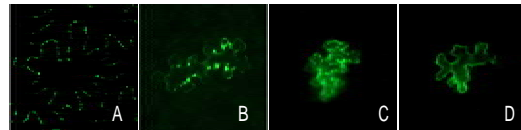
4. 研究成果

(1) これまでの研究から、KELP と移行タンパク質が細胞内で共局在していることが分かっていたが、今回の BiFC 法を用いた実験から、両タンパク質が直接的に相互作用していることを示唆するデータ (図 1) を得ることができた。



(図 1) BiFC 法による KELP と移行タンパク質との相互作用を示す蛍光

本来、感染細胞では移行タンパク質は主に細胞間連絡（プラズモデスマタ）に局在する (図 2 A) が、KELP が発現している細胞では、凝集や拡散している様子 (図 2 B・D) が見られた。このことから、KELP との相互作用により、移行タンパク質は正しく細胞内で局在することができず、本来の機能を発揮できない状態にあることが示唆された。



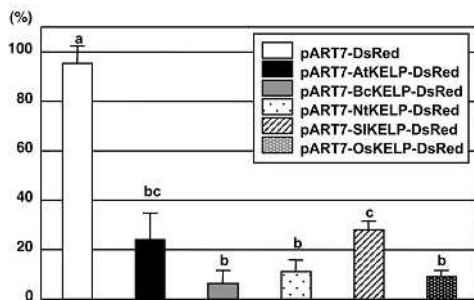
(図 2) KELP 発現下での移行タンパク質の局在の変化 (A) 通常の細胞内局在 (細胞間連絡への局在) (B-D) KELP 発現下での細胞内局在 (凝集や拡散)

と の結果を踏まえ、今後は、KELP と移行タンパク質の相互作用がどの細胞内部位で起こっており、その結果として移行タンパク質にどのような変化が起こっているのか、なぜウイルスを移行させることができなくなっているのかという点について解析を進めていく必要がある。

(2) T-DNA 変異体と野生型シロイヌナズナの生育時の形態を比較したところ、両者に差は見られなかった。また、野生型と比較して、感染初期 (接種数日間) では T-DNA 変異体でウイルスへの感受性が高まっている傾向が

見られた。このことから、KELP は通常の生育には必須の遺伝子ではなく、自然界において弱いながらもウイルス抵抗性因子として機能している可能性が示唆された。ただし、データのばらつきが大きいことから、さらに実験を重ねて結論を得る必要がある。

(3) KELP 類似遺伝子を一過的に過剰発現させた細胞では、KELP の時と同様に、トマトモザイクウイルスの細胞間移行が著しく抑制された。この結果は、KELP およびその類似遺伝子には、共通して、ウイルス抑制作用があることが分かった(図3)。また、キュウリモザイクウイルスの移行タンパク質遺伝子と置換したトマトモザイクウイルス変異体を用いた実験でも、KELP に感染抑制作用があることが分かった。このことから KELP は異なるウイルスに対しても感染抑制作用をもつことが示唆された。



(図3) KELP および KELP 類似遺伝子のウイルス感染抑制効果
縦軸：トマトモザイクウイルスの細胞間移行率
横軸：共導入した KELP および類似遺伝子

以上の結果は、植物に広く保存されている KELP 遺伝子群は、広汎なウイルスに対して感染抑制効果をもつ有用な遺伝子である可能性を支持するものであり、さらに研究を重ねることにより、ウイルス耐性植物の開発に貢献できると考えられる。

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3件)

Nobumitsu Sasaki, Tatsuro Odawara, Masakazu Deguchi, Yasuhiko Matsushita, Hiroshi Nyunoya. Interference with cell-to-cell movement of Tomato mosaic virus by transient overexpression of Arabidopsis thaliana KELP homologs from different plant species. Journal of General Plant Pathology. 査読あり. 76. 2010. 69-73.

Md. Ashraful Haque, Nobumitsu Sasaki, Hiromi Kanegae, Seisuke Mimori, Jun-Shan Gao and Hiroshi Nyunoya. Identification of a Tobacco mosaic virus elicitor-responsive sequence in the resistance gene N. Physiological and Molecular Plant Pathology. 査読あり. 73. 2009. 101-108

Nobumitsu Sasaki, Takuya Ogata, Masakazu Deguchi, Shoko Nagai, Atsushi Tamai, Tetsuo Meshi, Shigeki Kawakami, Yuichiro Watanabe, Yasuhiko Matsushita, Hiroshi Nyunoya. Over-expression of putative transcriptional coactivator KELP interferes with Tomato mosaic virus cell-to-cell movement. Molecular Plant Pathology. 査読あり. 10. 2009. 161-173.

[学会発表](計9件)

小田原達郎、佐々木信光、丹生谷博. Arabidopsis thaliana KELP ホモログの一過的過剰発現による Tomato mosaic virus の細胞間移行に対する抑制効果. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日. 横浜

Tatsuro Odawara, Hiroshi Nyunoya, Nobumitsu Sasaki. Interference with Tomato mosaic virus cell-to-cell movement by transient overexpression of Arabidopsis thaliana KELP homologs from different plant species. The 2009 KSPF Fall Meeting and the 1st Japan-Korea Joint Symposium. 2009年10月29日. Jeju, Korea

Md. Ashraful Haque, 佐々木信光, 鐘ヶ江弘美, 高俊山, 丹生谷博. Study on the regulation of the elicitor-responsive expression of Tobacco mosaic virus resistance gene N. 動物と植物の免疫系: その共通性と多様性. 2009年9月14日. 明治大学

Md. Ashraful Haque, Nobumitsu Sasaki, Hiromi Kanegae, Junshan Gao, Hiroshi Nyunoya. Elicitor-responsive 20-bp element of the Tobacco mosaic virus resistance gene N. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2009年7月19日. Quebec City, Canada

小田原達郎・佐々木信光・丹生谷博.

KELP ホモログの一過的過剰発現によるトマ
トモザイクウイルスの細胞間移行に対す
る抑制効果.平成21年度 日本植物病理
学会大会. 2009年3月27日. 山形
大学

Md. Ashraful Haque, Nobumitsu Sasaki,
Hiroshi Nyunoya. Identification of a cis
regulatory element of the Tobacco mosaic
virus resistance gene N. 第31回日本分
子生物学会年会 第81回日本生化学会大
会 合同大会. 2008年12月10日. 横浜

Nobumitsu Sasaki, Takuya Ogata,
Masakazu Deguchi, Shoko Nagai, Atsushi
Tamai, Tetsuo Meshi, Shigeki Kawakami,
Yuichiro Watanabe, Yasuhiko Matsushita,
Hiroshi Nyunoya. Overexpression of
putative transcriptional coactivator
KELP interferes with virus movement. 9th
International Congress of Plant
Pathology. 2008年8月27日.
International Society for Plant
Pathology. Torino, Italy

Jun-Shan Gao, Nobumitsu Sasaki,
Hiromi Kanegae, Kenichi Konagaya, Kaori
Takizawa, Naomi Hayashi, Yosuke Okano,
Masahiro Kasahara, Yasuhiko Matsushita,
Hiroshi Nyunoya. Two novel N-like genes
encoding functionally competent domains
to induce hypersensitive response. 9th
International Congress of Plant
Pathology. 2008年8月27日.
International Society for Plant
Pathology. Torino, Italy

佐々木信光、小賀田拓也、松下保彦、丹
生谷博. KELPの一過的過剰発現によるトマ
トモザイクウイルス移行タンパク質の細胞
内局在の変化. 平成20年度日本植物病理
学会大会. 2008年4月27日. 島根

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.tuat.ac.jp/identshi/Japanese
%20Files/Kenkyu_Folder/kenkyu2.html](http://www.tuat.ac.jp/identshi/Japanese%20Files/Kenkyu_Folder/kenkyu2.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木信光 (SASAKI NOBUMITSU)
東京農工大学・学術研究支援総合センター・
助教

研究者番号：70431971

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

