

平成 23 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009-2010
 課題番号：21780035
 研究課題名 (和文) 植物ウイルスと NCAP のクロストークを介した細胞間移行メカニズムの
 解明
 研究課題名 (英文) Analysis on the cell-to-cell movement mechanism mediated by
 cross-talk of a plant virus and NCAPs
 研究代表者
 山次 康幸 (YAMAJI YASUYUKI)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
 研究者番号 40345187

研究成果の概要(和文):植物ウイルスが植物体に感染するための最重要ステップである細胞間移行は植物ウイルス研究におけるブラックボックスである。本研究では植物の細胞間移行性タンパク質 NCAPs に着目し、植物タンパク質の細胞間移行とウイルスの細胞間移行の間のクロストークを解析した。その結果、NCAPs の代表的なファミリーである KN1 ファミリータンパク質に含まれるタバコ NTH201 がタバコのヒートショックタンパク質 NtMPIP1 と協調的に働いて、TMV の移行タンパク質 (MP) と相互作用しながら TMV の細胞間移行を促進する働きを持つことが示した。以上の成果により、ウイルス細胞間移行メカニズムの一端を明らかにし、ウイルスの細胞間移行を阻害する耐性戦略の基盤構築を行った。

研究成果の概要(英文):In the researches of plant viruses, the molecular machinery of the cell-to-cell movement process is poorly understood. In this study, we focused plant non-cell autonomous proteins (NCAPs) and analyzed the cross-talks between the cell-to-cell movement of NCAPs and tobacco mosaic virus (TMV). We showed that a tobacco NTH201, a KN1 family protein, and a tobacco NtMPIP1, a heat-shock protein, cooperatively promote the cell-to-cell movement of TMV via the interaction with TMV MP. These results elucidated a part of the cell-to-cell movement mechanism and established the basis of anti-viral strategy to inhibit the cell-to-cell movement.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスが関わる種々の現象において、ウイルスと植物の相互作用が分子レベルで明らかにされ続けている。しかし、植物ウイルスが植物体に感染するための最重

要ステップである植物体内移行については、ウイルス側因子である細胞間移行タンパク質 (MP) は同定されているものの、MP の機能や関与する植物側因子はほとんど明らかにされていない現状にあり、細胞間移行

は植物ウイルス研究におけるブラックボックスとなっている。一方、植物自身がコードする一連のタンパク質が MP と同様に植物細胞内を移行可能であることが示されており、これらのタンパク質は植物細胞間の情報伝達を担うシグナル分子であると考えられ、NCAPs (non-cell autonomous proteins) と名付けられている。このような背景のもとで、研究代表者らは NCAPs の代表的なファミリーである KN1 ファミリータンパク質 (KNFP) とタバコモザイクウイルス (TMV) の細胞間移行の關係に着目し、KNFP に含まれるタバコ NTH201 が TMV の細胞間移行を促進することを明らかにしており、本研究において発展的な解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究は植物の細胞間移行性タンパク質 NCAPs に含まれる KNFP が TMV の細胞間移行を促進するという研究成果を起点とし、その詳細なメカニズムを明らかにすることにより、植物タンパク質の細胞間移行とウイルスの細胞間移行の間の共通メカニズムやクロストークを解明し、新たな切り口からウイルス細胞間移行メカニズムの本質に迫ることを目的とし、ウイルスの細胞間移行を阻害する耐性戦略の開発基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

まず KNFP の細胞内局在ならびに細胞間移行能の解析を行う。GFP を融合させた NTH201 をパーティクルガンによりタバコ表皮細胞で発現させ、細胞内局在を調べる。また、NTH201:GFP が隣接細胞に移行する割合を解析することにより、細胞間移行能の有無を調べる。さらに GFP と NTH201 の組み合わせで発現させ、GFP が細胞間移行する割合を解析することにより、NTH201 が PD の GFP 透過能に与える影響を解析する。

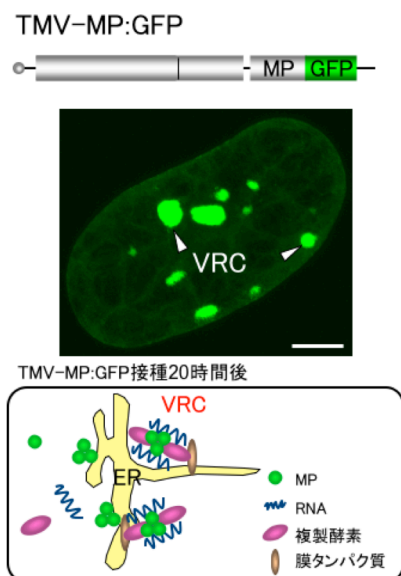


図. TMV 複製複合体 VRC の観察

次いで、ウイルスタンパク質発現時における NTH201 の細胞内局在を解析する。赤色蛍光タンパク質 DsRed を融合させた TMV MP (MP:DsRed) を NTH201:GFP と同時に発現させることにより、NTH201 と MP の局在を観察して、植物細胞内で共局在するかどうかを調べる。さらに、MP は TMV の複製複合体 VRC の構成成分であり、MP:GFP を発現する TMV(TMV-MP:GFP)を用いて、VRC を可視化できることから、タバコプロトプラストに TMV-MP:GFP を感染させ、VRC を観察する手法を確立する。その上でタバコプロトプラストに NTH201 を発現させ、NTH201 が VRC の形成にどのような影響を与えるかをダイナミックに観察する。

さらに、NTH201 と TMV MP の結合解析を行う。NTH201 と TMV MP の間の相互作用を酵母 two-hybrid 法ならびに免疫沈降法により明らかにする。NTH201 と TMV MP の直接的な相互作用が検出されない場合も想定されるが、NTH201 と TMV の細胞間移行の共通メカニズムに興味を持たれるため、NTH201 と MP が共通で相互作用する植物因子の解析を試みる。そのような因子が得られた場合は、NTH201 が MP と直接相互作用せず、第3の植物因子を介して間接的に相互作用する可能性が想定されるため、酵母 three-hybrid 法により3者間の結合を解析する。

4. 研究成果

2009 度は植物の細胞間移行性タンパク質 (NCAP) である KNFP の機能解析をおこない、さらに KNFP と TMV MP の相互作用について解析した。

まず、KNFP の細胞内局在ならびに細胞間移行能の解析を行った。NTH201 に GFP を融合させた NTH201:GFP をパーティクルガンによりタバコ表皮細胞で発現させ、細胞内局在を調べた。NTH201 は核局在シグナル配列を含んでおり、NTH201:GFP は核に局在した。また MP:GFP は隣接細胞への移行能を有していたのに対して、NTH201:GFP は隣接細胞に移行しなかった。さらに GFP と MP を同時にタバコ表皮細胞で発現させると GFP の隣接細胞への移行割合が増加したのに対して、NTH201 は GFP を隣接細胞へ移行させる能力を持たなかった。従って、NTH201 は隣接細胞への移行能を持たず、PD の GFP 透過能も持たないと考えられた。

次いで、KNFP と TMV MP の結合解析を行った。NTH201 と TMV MP の間の相互作用を酵母 two-hybrid 法で解析したところ結合性を示さなかった。そこで、第3の植物因子を介して NTH201 と MP が間接的に相互作用する可能性を考え、NTH201 と相互作用する因子の探索を行った。その結果、タバコの

ヒートショックタンパク質を単離し、このタンパク質が MP とも相互作用したことから NtMPIP1 と名付けた。さらに酵母 three-hybrid 法により NtMPIP1 が NTH201 と MP を架橋することにより、NTH201 と MP が間接的に相互作用していることを明らかにした。

2010 年度は NtMPIP1 の機能解析を行った。VIGS 法を用いて *Nicotiana benthamiana* において NtMPIP1 の発現抑制を行い、TMV-GFP を接種したところ、ウイルス RNA の蓄積量が減少した。また、NtMPIP1 のサイレンシングにより TMV-GFP の蛍光斑の面積が顕著に減少した。以上の結果より、NtMPIP1 は TMV の細胞間移行に必要な因子であることが示された。

また、ウイルスタンパク質発現時における NTH201 の細胞内局在を解析した。パーティクルガンにより赤色蛍光タンパク質 DsRed を融合させた TMV MP (MP:DsRed) を NTH201:GFP と同時に *N. benthamiana* の表皮細胞に導入した。その結果、NTH201:GFP の局在が変化し、導入細胞の細胞質において MP:DsRed と共局在することが分かった。MP は TMV の複製複合体 VRC の構成成分であり、MP:GFP を発現する TMV(TMV-MP:GFP)を用いて、VRC を可視化できることから、タバコプロトプラストに NTH201 を発現させ、NTH201 が VRC の形成にどのような影響を与えるかを観察した。その結果、NTH201 発現プロトプラストにおいて VRC の形成が促進されることが明らかになった。

以上を要するに、NTH201 は NtMPIP1 と協調的に働いて、TMV の MP と相互作用しながら TMV の細胞間移行を促進する働きを持つことが示唆された。

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 10 件)

(1) Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Yoshida, A., Yoshii, A., Shimizu, T., Namba, S., Hibi, T. (2010) Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. Arch Virol. 155 : 263-268. (査読有り)

(2) Yamaji, Y., Hamada, K., Yoshinuma, T., Sakurai, K., Yoshii, A., Shimizu, T., Hashimoto, M., Suzuki, M., Namba, S. and Hibi, T. (2010) Inhibitory effect on the tobacco mosaic virus infection by a plant RING finger protein. Virus Res. 152 : 50-57. (査読有り)

(3) Komatsu, K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y., Maejima, K., Senshu, H., Himeno, M., Okano, Y., Kagiwada, S., Namba, S. (2010)

Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. Mol. Plant-Microbe Interact. 23 : 283-293. (査読有り)

(4) Okano, Y., Maejima, K., Shiraishi, T., Hashimoto, M., Senshu, H., Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Yamaji, Y., Namba, S. (2010) Genetic heterogeneity found in the replicase gene of poinsettia mosaic virus isolates. Arch Virol. 155 : 1367-1370. (査読有り)

(5) Hirata, H., Yamaji, Y., Komatsu, K., Kagiwada, S., Oshima, K., Okano, Y., Takahashi, S., Ugaki, M., Namba, S. (2010) Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication. Virus Res. 152 : 1-9. (査読有り)

(6) Maejima, K., Hoshi, H., Hashimoto, M., Himeno, M., Kawanishi, T., Komatsu, K., Yamaji, Y., Hamamoto, H., Namba, S. (2010) First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 76 : 229-231. (査読有り)

(7) Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Himeno M, Senshu H, Kagiwada T, Yamaji Y, Namba S. (2009) The N-terminal region of the *Plantago asiatica* mosaic virus coat protein is required for cell-to-cell movement, but is dispensable for virion assembly. Mol. Plant-Microbe Interact. 22 : 677-685. (査読有り)

(8) Shimizu T, Yoshii A, Sakurai K, Hamada K, Yamaji Y, Suzuki M, Namba S, Hibi T. (2009) Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. Arch Virol. 154 : 959-967. (査読有り)

(9) Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Yamaji Y, Okano Y, Shiraishi T, Takahashi S, Kagiwada S, Namba S. (2009) Complete nucleotide sequence and genome organization of butterbur mosaic virus. Arch Virol. 154 : 1955-1958. (査読有り)

(10) Himeno M, Maejima K, Komatsu K, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. (2009) Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. Virology. 396 : 69-75. (査読有り)

[学会発表] (計 7 件)

(1) 山次康幸・桜井慶太郎・小松 健・難波成任・日比忠明、タバコモザイクウイルスの感染における翻訳伸長因子 eEF1A の機能解析、2010.4.18-4.20、国立京都国際会館（京都府）

(2) Yamaji Y, Okano Y, Shiraishi T, Komatsu K, Hashimoto M, Namba S, Hibi T、Role of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection、2010 European molecular biology organization workshop、2010.6.12-6.16、トリノ (イタリア)

(3) Hashimoto M, Komatsu K, Ozeki J, Yamaji Y, Maejima K, Senshu H, Himeno M, Okano Y, Shiraishi T, Namba S、Viral-Induced Systemic Necrosis in Plants Involves Both Programmed Cell Death and the Inhibition of Viral Multiplication, Which are Regulated by Independent Pathways、2010 European molecular biology organization workshop、2010.6.12-6.16、トリノ (イタリア)

(4) 千秋博子・尾関丈二・小松健・橋本将典・青山倫子・畑田康司・山次康幸・難波成任、植物ウイルスの RNA サイレンシング抑制タンパク質の抑制能の比較解析、平成 21 年度日本分子生物学会、2009 年 12 月 9-12 日、横浜

(5) 尾関丈二、橋本将典、青山倫子、小松健、川西剛史、岡野夕香里、山次康幸、難波成任、Potexvirus 属ウイルスの細胞間移行には外被タンパク質の 3 番目のロイシン残基が必須である、平成 21 年度日本分子生物学会、2009 年 12 月 9-12 日、横浜

(6) 萱野佑典・小野 剛・前島健作・星 秀男・川西剛史・山次康幸・橋本光司・濱本 宏・難波成任、わが国のウメにおいて初めて感染が確認された plum pox virus (PPV) (ウメ輪紋ウイルス：和名新称) について、平成 21 年度日本植物病理学会関東部会、2009 年 9 月 10-11 日、藤沢

(7) 前島健作・萱野佑典・姫野未紗子・小松健・白石拓也・山次康幸・北村暢夫・大上光明・濱本 宏・難波成任、イムノクロマト法によるウメ輪紋ウイルス (plum pox virus, PPV) の簡易迅速高感度検出キットの開発、平成 21 年度日本植物病理学会関東部会、2009 年 9 月 10-11 日、藤沢

6. 研究組織

(1)研究代表者

山次 康幸 (YAMAJI YASUYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：40345187

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし