

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780040

研究課題名 (和文) 植物ウイルス間の干渉効果に関与する宿主遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Investigation of host genes involved in cross-protection between plant viruses

研究代表者

竹下 稔 (TAKESHITA MINORU)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00304767

研究成果の概要 (和文)：

*A. thaliana*の遺伝子破壊システムを用いて干渉効果に関与する宿主遺伝子の探索を実施した。接種試験ではキュウリモザイクウイルスの蛍光タンパク質発現ベクターを同時混合接種した。蛍光顕微鏡を用いた感染植物個体の葉組織の観察を行ったところ、干渉効果を反映するウイルス間の競合を緩和、あるいは示さない*A. thaliana*系統を発見するには至らなかった。

さらにウイルス抵抗性に関与する宿主遺伝子の中からRDR1やIVR遺伝子を選び解析した。その中でRDR1遺伝子は*Potato virus Y*の増殖を阻害することが明らかとなったが、ウイルス間の競合関係に顕著な影響を与えなかった。さらにRNAサイレンシングを抑制する低温下や異種ウイルス間の相乗作用でも干渉効果は認められた。これらの結果から、干渉効果は完全にはRNAサイレンシングに起因しないことが示された。

研究成果の概要 (英文)：

To dissect the molecular mechanisms of plant viral interference, host genes were screened using the T-DNA tagged lines of *Arabidopsis thaliana*. Cucumber mosaic virus (CMV) vectors expressing fluorescent proteins were used for inoculation onto the *A. thaliana* lines. All the *A. thaliana* lines examined in this study showed neither break down nor compromise of virus interference.

We further examined the roles of the RDR1 and the IVR genes in virus resistances. The RDR1 gene showed inhibitory acts multiplication of *Potato virus Y*. However the RDR1 gene did not affect plant viral interference. Low temperature and plant viral synergism also did not compromise the interference. The results suggested that RNA silencing machinery does not contribute greatly to the phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：植物ウイルス, 干渉効果, 宿主, 遺伝子, 競合

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスにおいては、あらかじめあるウイルス（一次ウイルス）を植物に接種し、

一定期間の後、そのウイルスに近縁のウイルス（二次ウイルス）を再接種した場合、後から接種した二次ウイルスが全く感染増殖で

きないかあるいは増殖が種々の程度に制限される現象があることが古くから知られている。この現象はウイルスの干渉効果 (cross-protection) と呼ばれ、塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制するジーンサイレンシング現象の発見により、植物におけるウイルス RNA 分解作用と本現象との深い関連性が注目されるようになった。しかしながら、干渉効果を決定する宿主因子は同定されていない。

2. 研究の目的

植物ウイルス間の干渉効果を決定する宿主因子を探索し、現象の根本的理解に資する

3. 研究の方法

(1) 干渉効果に関与する宿主遺伝子の探索

Arabidopsis thaliana の遺伝子破壊系統に異種蛍光タンパク質遺伝子を発現するキュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターを混合接種し、すみ分けに関する蛍光顕微鏡観察を行う。ウイルス間のすみ分けを緩和、あるいは示さない *A. thaliana* 変異体が発見された場合は、変異した染色体領域さらには遺伝子領域の解析を行い、干渉効果に関与する宿主遺伝子の単離を目指す。

(2) ウイルス抵抗性に関与する宿主遺伝子群についての解析

既知の宿主抵抗性関連遺伝子についてウイルス間のすみ分けとの関連性を調べる。RDR, IVR 遺伝子等のノックダウン植物を解析し、また交配による複数遺伝子破壊系統の作出も実施する。その後、異種蛍光タンパク質遺伝子を発現する CMV ベクターを混合接種し、すみ分けに関する蛍光顕微鏡観察を行う。得られた結果から既知のウイルス抵抗性遺伝子の干渉効果における関与の程度を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 干渉効果に関与する宿主遺伝子の探索

米国から *A. thaliana* の遺伝子破壊系統を入手し、蛍光顕微鏡観察によるスクリーニングを実施したが、いずれの系統群においてもウイルス間のすみ分けを緩和、あるいは示さない変異体が含まれていなかった。

(2) ウイルス抵抗性に関与する宿主遺伝子群についての解析

RDR1, *IVR* 遺伝子等のノックダウン植物とそれらの交配による複数遺伝子破壊系統について検討した。EGFP と DsRed2 を発現する CMV ベクターを感染させた結果、接種葉、上位葉ともに干渉効果に変化が認められなかった。したがって、抵抗性干渉効果の分子機構に直接関与しないことが示唆された (図 1)。

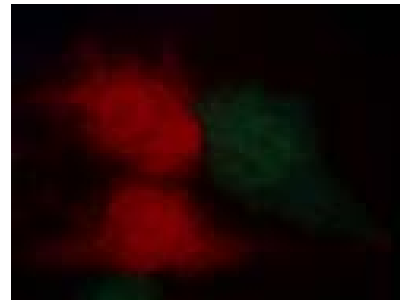


図 1 干渉効果の様子

しかしながら、*RDR1* 遺伝子のノックダウン植物に *Potato virus Y* (PVY) を感染させると野性型植物と比べて PVY の蓄積量を上昇させることが明らかとなった。一方、CMV を *RDR1* 遺伝子のノックダウン植物に感染させても病徴の激化や移行の促進等は観察されなかった。以上の結果から、これらの抵抗性遺伝子は干渉効果とは異なる分子機構でウイルス抵抗性に関与することが示唆された (図 2)。

また、RNA サイレンシングを緩和する低温下あるいはカブモザイクウイルスとの混合感染下による相乗効果においても干渉効果は成立したため、RNA サイレンシングに関与する分子機構は干渉効果を完全には制御していないことが示された。

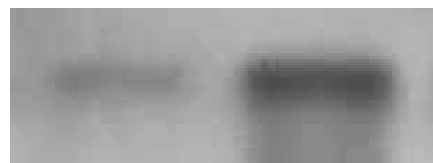


図 2 wild-type と *RDR1* mutant に感染した PVY

さらに、CMV 欠損の RNA3 はヘルパーウイルスの RNA3 とも干渉作用があることを明らかにした(図 3)。この結果は、同じウイルスのゲノム RNA 同士がウイルスの移行増殖中に空間的競合を引き起こしていることを強く示唆した。このことはウイルスがゲノム複製などに必要とする宿主因子の競合あるいは共通するウイルス抵抗性の誘導によっても干渉効果が引き起こされる可能性を示した。

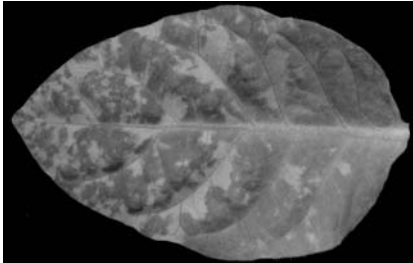


図 3 ウイルス RNA 間の競合作用

以上の結果から、植物ウイルスの干渉効果は少なくとも RNA サイレンシングの分子機構によって完全に決定されているわけではないこと、そして *IVR*, *RDRI* といった既報のウイルス抵抗性遺伝子も直接的には関与しないことが推察された。

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 3 件)

- ① Minoru Takeshita, Yuka Matsuo, Masashi Suzuki, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya and Yoichi Takanami
Impact of a defective RNA 3 from cucumber mosaic virus on helper virus infection dynamics.
Virology, 389:59-65, 2009
- ② F. Rakhshandehroo, M. Takeshita, J. Squires, and P. Palukaitis
The Influence of RNA-Dependent RNA Polymerase 1 on *Potato virus Y* Infection and on Other Antiviral Response Genes.
Molecular Plant-Microbe Interactions, 22:1312-1318, 2009
- ③ Minoru Takeshita, Yuka Matsuo, Naruto Furuya, and Kenichi Tsuchiya
Molecular characterization of a defective RNA from Cucumber mosaic virus.
The 6th International Joint Symposium between Japan and Korea, 2009

[学会発表] (計 9 件)

- ① 西山 舞・竹下 稔・長野佑美・大島一里
日本におけるカブモザイクウイルスとキュウリモザイクウイルスの混合感染
平成 22 年度植物感染生理談話会
- ② 西山 舞・竹下 稔・副島健太・大島一里
我が国のカブモザイクウイルスが感染した罹病アブラナ科植物から採集したキュウリモザイクウイルス
日本植物病理学会大会
- ③ 後藤一法・志村華子・竹下 稔・古川亜矢子・永田 崇・片平正人・増田 税
サブグループ II に属するキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質の siRNA 結合活性とホモロジーモデリング解析
平成 22 年度日本植物病理学会大会
- ④ 高橋英樹・庄子紘美・安藤杉尋・竹下 稔・鈴木 匡・増田 税
キュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 RCY1 を導入した *Nicotiana benthamiana* の作出とウイルス感染に対する応答
平成 22 年度日本植物病理学会大会
- ⑤ 庄子紘美・安藤杉尋・竹下 稔・鈴木 匡・増田 税・高橋英樹
キュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 RCY1 導入 *Nicotiana benthamiana* と CMV ベクターによる VIGS システムの構築と RCY1-CMV 抵抗性シグナル伝達系解析への利用
平成 22 年度日本植物病理学会大会
- ⑥ Minoru Takeshita, Yuka Matsuo, Naruto Furuya, Kenichi Tsuchiya
Molecular characterization of a defective RNA from Cucumber mosaic virus,
The 6th International Joint Symposium between Japan and Korea
- ⑦ 竹下 稔・松尾由香・古屋成人・土屋健一
黄斑系 CMV 由来の欠損 RNA3 の派生と維持宿主について
平成 21 年度日本植物病理学会九州部会
- ⑧ 後藤一法・志村華子・竹下稔・増田税,
サブグループ II に属するキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質のサイレンシング抑制活性とし siRNA 結合活性の解析
平成 21 年度植物感染生理談話会
- ⑨ 後藤一法・志村華子・竹下稔・増田税
サブグループ I と II のキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質のサイレンシ

グ抑制活性の比較
平成21年度日本植物病理学会大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 稔 (TAKESHITA MINORU)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：
00304767

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし