

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02198

研究課題名(和文) MAPKカスケードを巡る植物-ウイルス間相互作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of the host MAPK pathways in plant-virus interactions

研究代表者

兵頭 究 (Hyodo, Kiwamu)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：80757881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物ウイルス感染におけるmitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の機能解析を目的とする。red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) をモデルウイルスとした解析から、ウイルス増殖を正に制御するMAPK経路の存在が示唆された。また、RCNMVは複製酵素タンパク質を介してMAPK経路の構成因子と相互作用し、細菌エリシター誘導性MAPK活性化を抑制した。本成果は、植物ウイルスが植物の抗細菌/糸状菌免疫において重要なMAPK経路の構成因子をむしろウイルス増殖に利用するという、新規のウイルス増殖戦略を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルスが感染に利用する宿主因子の同定・機能解析はウイルス感染の分子メカニズム解明に必須であり、ひいては、ウイルス感染に対する新規防除法開発に向けた分子基盤整備に貢献する。本研究では、植物の抗細菌/糸状菌免疫において重要なMAPK経路の一部が、red clover necrotic mosaic virusを含むいくつかの植物ウイルス増殖をむしろ促進することを見出した。本知見は、植物-ウイルス間相互作用におけるMAPK経路の新たな役割を示唆する。今後、ウイルスがどのようにして植物MAPK経路を利用しウイルス増殖を促進するのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：Plant viruses are significant phytopathogens that cause substantial crop losses worldwide. Due to their limited number of encoded proteins, plant viruses need to exploit the host cell machinery to support their functions, ultimately creating a cellular environment favorable to infection. To achieve this, plant viruses co-opt a range of host-derived factors, known as proviral host factors, to establish infection. These viruses remodel the functions of these proviral host factors to facilitate every step of their life cycle. Understanding the global landscape of plant-virus interactions at the molecular level enhances our knowledge of the viral infection process and may aid in developing novel antiviral strategies. This study aims to investigate the role of the host MAPK pathways in plant-virus interactions.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物RNAウイルス ゲノムRNA複製 MAPK

1. 研究開始当初の背景

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は広く真核生物に保存され、上流に位置する少なくとも 2 つのキナーゼ {MAPK キナーゼ (MAPKK) および MAPK キナーゼキナーゼ (MAPKKK)} とともに MAPK カスケードを構成し、分化・発生あるいは環境変動に対する応答など様々なシグナル伝達系の中核を担う (Komis et al., 2018)。植物では、MAPK カスケードの構成因子は複数の分子種ファミリーを形成し、一部冗長性を持ちつつ特異的なシグナル経路を形成する。MAPK 経路を中心とする植物免疫シグナル伝達系は、抗細菌/糸状菌免疫の要を担う。例えば、細菌鞭毛タンパク質フラジェリン (flg22 エピトープ) に代表される微生物由来エリシター (PAMPs ; pathogen-associated molecular patterns) の認識において、MAPK 活性化は活性酸素種 (ROS) 産生と並ぶ重要な初期応答の一つである (Yu et al., 2017)。一方で、様々な植物病原細菌・糸状菌はエフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を介して MAPK 経路に干渉し、植物免疫を抑制することが知られている (Bi and Zhou, 2017)。従って、MAPK 経路は植物-細菌/糸状菌間の分子攻防 (= ディフェンス・カウンターディフェンス) において中心的な役割を担うと言える。一方で、植物-ウイルス間相互作用においては、低分子 RNA を介した RNA 干渉機構とそれに対してウイルスが持つカウンターディフェンス機構 (Yang and Li, 2018) が分野の関心の中心であった経緯があり、植物-ウイルス間相互作用における MAPK の役割に関する知見は極めて限られていた。

植物ウイルスは絶対寄生性の病原体であり、そのゲノムサイズの制約からわずかな数の遺伝子しかコードできず、宿主由来の様々なタンパク質、脂質などの宿主因子をハイジャックしウイルス感染に転用することではじめて効率的な増殖が可能となる (Hyodo and Okuno, 2020)。しかしながら、そのような宿主因子の全容は未だ明らかではない。植物ウイルスが感染に利用する宿主因子を同定し、ウイルス感染サイクルにおけるそれらの機能を明らかにすることは、植物ウイルス感染の分子メカニズムの解明のみならず、植物ウイルス感染に対する新規防除法開発に向けた分子基盤整備への貢献も期待できる。以前の研究において、研究代表者はプロテオミクス解析を用いて、モデル植物の 1 つであるベンサミアナタバコから、トンバスウイルス科に属する red clover necrotic mosaic virus (RCNMV; 一本鎖プラス鎖 RNA ウイルス) 複製酵素複合体を構成する p27・p88 に結合する宿主因子候補を同定している。興味深いことに、その中には植物免疫に関与することが知られている MAPK 経路の構成因子が含まれていた。また、RCNMV の p27 複製酵素タンパク質は MAPK 経路の足場タンパク質として機能する receptor for activated C kinase 1 (RACK1) (Cheng et al., 2015) と相互作用し、ウイルス複製複合体へリクルートする (Hyodo et al., 2019)。これらのことから、宿主 MAPK 経路は RCNMV 感染において何らかの機能を有する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

植物の抗細菌/糸状菌免疫における MAPK 経路の重要性は確立しつつある一方で、植物-ウイルス間相互作用における宿主 MAPK 経路の機能には未だ不明な点が多い。本研究では、RCNMV を一本鎖プラス鎖 RNA ウイルスのモデルウイルスとして用い、植物ウイルス感染時における宿主 MAPK 経路の役割について知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

ウイルス感染に関わる MAPKKK、MAPKK、MAPK 遺伝子を同定するため、各遺伝子をクローニングし、virus-induced gene silencing (VIGS) 法によるノックダウンを行い、RCNMV 蓄積量に及ぼす影響を解析した。次に、RCNMV 複製酵素タンパク質 p27 あるいは p88 と植物 MAPK

経路構成因子との相互作用を共免疫沈降法あるいは bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を用いて解析した。また、植物ウイルス感染が宿主の MAPK 経路活性化に及ぼす影響をイムノブロット法によって解析した。さらに、RCNMV で見られた結果の一般性・特異性を検証するため、2種類の本鎖プラス鎖 RNA ウイルスに対する宿主 MAPK 経路の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) RCNMV 感染に関与する宿主 MAPK 経路の同定

植物の MAPKKK、MAPKK、MAPK はいずれも遺伝的冗長性が高く、シロイヌナズナでは 60 個の MAPKKK、10 個の MAPKK、20 個の MAPK 遺伝子を持つことが知られている。植物ウイルス感染実験のモデルとしてよく使用されるベンサミアナタバコでは少なくとも 8 個の MAPKK 遺伝子が同定されている。RCNMV 感染に関与する MAPK 経路を絞り込むため、まず遺伝的冗長性の比較的少ない MAPKK に着目した。VIGS 法によりベンサミアナタバコの MAPKK 遺伝子をそれぞれノックダウンした後、RCNMV を接種し、その蓄積量を RT-qPCR によって解析した。その結果、接種葉レベルでのウイルス感染に正に働く MAPKK 遺伝子が 3 個同定された。一方で、ノックダウンによって RCNMV 蓄積量が増加する MAPKK 遺伝子は見られなかった。また、ベンサミアナタバコプロトプラストを用いた一細胞ウイルス増殖系において、RCNMV 複製量は MAPKK 阻害剤 U0126 によって顕著に阻害された。一方で、RCNMV の翻訳をモニター可能なレポーター実験から、U0126 は RCNMV の翻訳には顕著な影響を及ぼさなかった。以上の結果から、RCNMV 感染において、少なくとも 3 個の MAPKK 遺伝子が RCNMV 感染に正に関与することが示唆された。それぞれの MAPKK 遺伝子を MAPKK-1、MAPKK-2、MAPKK-3 と仮称する。次に、共免疫沈降法あるいは BiFC 法を用いて、これら MAPKK と RCNMV 複製酵素タンパク質 p27、p88 あるいは RCNMV の宿主因子として同定済みの MAPK 経路足場タンパク質 RACK1 との相互作用を解析した。その結果、p27 とこれら MAPKK との相互作用は検出されなかったが、RACK1 と MAPKK-1 との相互作用、p88 と MAPKK-2 との相互作用を確認することができた。

次に、RCNMV 感染に関与する MAPK 経路に関してさらなる知見を得るため、MAPKKK および MAPK 遺伝子について解析を行った。ベンサミアナタバコの全ての MAPKKK あるいは MAPK 遺伝子を解析することは困難なため、植物免疫への関与が示唆されている遺伝子をそれぞれ 4 個ずつクローニングし、VIGS 法によるノックダウンを行った。その後、それぞれの遺伝子ノックダウンが RCNMV 感染に及ぼす影響を RT-qPCR により解析した。その結果、接種葉レベルでの RCNMV 感染を正に制御する MAPKKK 遺伝子を 1 個、MAPK 遺伝子 2 個をそれぞれ同定することができた。MAPKK 遺伝子の場合と同様、ノックダウンによって RCNMV 感染を負に制御する MAPKKK あるいは MAPK 遺伝子は見られなかった。

(2) RCNMV 感染植物におけるエリシター誘導性 MAPK 活性化

RCNMV は MAPK 経路の足場タンパク質 RACK1 や MAPKK-2 と相互作用することから、RCNMV は宿主の MAPK 経路に作用し、シグナル伝達経路に干渉する可能性が考えられた。本可能性を検証するため、RCNMV 感染葉における MAPK 活性化をリン酸化 MAPK 特異的抗体を用いたイムノブロット法によって解析した。その結果、RCNMV 感染葉では細菌由来エリシター-flg22 を含む、複数のエリシターによって誘導される MAPK 活性化の阻害が見られた。

(3) 植物 MAPK 経路は複数の植物ウイルス感染に正に関与する

最近の研究から、植物ウイルス感染を負に制御する MAPK カスケードが報告され (Ding et al., 2022; Lin et al., 2024)、植物の抗ウイルス免疫においても MAPK 経路の重要性が示唆されている。しかしながら、上述の研究代表者の成果は、ある種の植物ウイルスは MAPK 経路

を利用し、感染を有利に進めるウイルス増殖戦略を持つ可能性を示唆する。このようなウイルス増殖戦略が他の植物ウイルス感染でも見られるかどうかを検証するため、トンバウイルス科に属する cucumber leaf spot virus (CLSV) およびブロモウイルス科に属する brome mosaic virus (BMV) 感染における MAPK 経路の機能解析を行なった。ここでは、遺伝的冗長性の比較的少ない MAPKK に特に着目した。まず、プロトプラストにおける MAPKK 阻害剤 U0126 を用いた実験から、CLSV、BMV とともに、高効率のウイルスゲノム RNA 複製には MAPKK 活性が必要であることが明らかとなった。CLSV は RCNMV と同じ科に属する比較的近縁のウイルスであることから、両者は共通の MAPK 経路を感染に必要とする可能性が考えられた。そこで RCNMV 感染を正に制御する MAPKK 遺伝子を VIGS 法によってノックダウンし、CLSV 感染への影響を RT-qPCR によって解析した。しかしながら、CLSV はこれら MAPKK 遺伝子ノックダウンの影響を受けなかった。また、BMV は RCNMV と同様に flg22 誘導性 MAPK 活性化を阻害したが、CLSV 感染葉ではそのような阻害効果は認められなかった。以上のことより、宿主 MAPK 経路は複数の植物ウイルス感染を正に制御し得るが、その影響はウイルス種によって特異的である可能性が示唆された。CLSV や BMV 感染を正に制御する MAPK 経路構成因子の同定が今後の課題として挙げられる。

<参考文献>

- Bi G, Zhou JM. (2017) MAP kinase signaling pathways: A hub of plant-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 21(3):270-273. doi: 10.1016/j.chom.2017.02.004.
- Cheng Z, Li JF, Niu Y, Zhang XC, Woody OZ, Xiong Y, Djonović S, Millet Y, Bush J, McConkey BJ, Sheen J, Ausubel FM. (2015) Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature* 521(7551):213-216. doi: 10.1038/nature14243.
- Ding ZH, Gao Q, Tong X, Xu WY, Ma L, Zhang ZJ, Wang Y, Wang XB. (2022) MAPKs trigger antiviral immunity by directly phosphorylating a rhabdovirus nucleoprotein in plants and insect vectors. *Plant Cell* 34(8):3110-3127. doi: 10.1093/plcell/koac143.
- Hyodo K, Okuno T. (2020) Hijacking of host cellular components as proviral factors by plant-infecting viruses. *Adv Virus Res* 107:37-86. doi: 10.1016/bs.aivir.2020.04.002.
- Hyodo K, Suzuki N, Okuno T. (2019) Hijacking a host scaffold protein, RACK1, for replication of a plant RNA virus. *New Phytol* 221(2):935-945. doi: 10.1111/nph.15412.
- Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Šamaj J. (2018) Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 69:237-265. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040314.
- Lin J, Zhao J, Du L, Wang P, Sun B, Zhang C, Shi Y, Li H, Sun H. (2024) Activation of MAPK-mediated immunity by phosphatidic acid in response to positive-strand RNA viruses. *Plant Commun* 5(1):100659. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100659.
- Yang Z, Li Y. (2018) Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Curr Opin Virol* 32:88-99. doi: 10.1016/j.coviro.2018.08.003.
- Yu X, Feng B, He P, Shan L. (2017) From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu Rev Phytopathol* 55:109-137. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035649.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo H, Sugahara H, Fujita M, Hyodo K, Andika IB, Hisano H, Suzuki N	4. 巻 12
2. 論文標題 Discovery and Genome Characterization of a Closterovirus from Wheat Plants with Yellowing Leaf Symptoms in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 358 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens12030358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hyodo K	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification and characterization of host factors involved in plant RNA virus replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gen Plant Pathol	6. 最初と最後の頁 415-417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-01022-9	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 兵頭 究	4. 巻 87
2. 論文標題 植物RNAウイルスの複製に関わる宿主因子の研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本植物病理学会報	6. 最初と最後の頁 131
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 無
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 Kondo H, Yoshida N, Fujita M, Maruyama K, Hyodo K, Hisano H, Tamada T, Andika IB, Suzuki N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a Novel Quinvirus in the Family Betaflexiviridae That Infects Winter Wheat.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 715545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.715545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 近藤 秀樹、兵頭 究、鈴木 信弘
2. 発表標題 黄葉症状を呈するコムギから見出されたクロステロウイルス
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hyodo K, Sudo K, Kondo H, Suzuki N
2. 発表標題 Autophagy promotes the replication of red clover necrotic mosaic virus
3. 学会等名 42nd Annual Meeting American Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Telengech P, Hyodo K, Ichikawa H, Suzuki N
2. 発表標題 Replication of single partitiviruses in hosts across three kingdoms; Fungi, Plantae and Animalia
3. 学会等名 42nd Annual Meeting American Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kiwamu Hyodo
2. 発表標題 A virus infection modulates plant immunity against bacterial and fungal pathogens
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiwamu Hyodo
2. 発表標題 A plant virus infection affects secondary bacterial/fungal infections through plant innate immunity
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会・Neo Virology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭 究
2. 発表標題 宿主因子から見るウイルスと植物の相互作用
3. 学会等名 第52回岡山植物病理セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭 究・首藤 丘宇・近藤 秀樹・鈴木 信弘
2. 発表標題 宿主液胞型H ⁺ -ATPaseのハイジャックによるダイアンソウイルスの増殖戦略
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学(大学院環境生命科学研究科)資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ ホームページ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html 岡山大学(大学院環境生命科学研究科)資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ ホームページ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html</p>

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0件

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
---------	---------