

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380028

研究課題名(和文)キメラ抵抗性遺伝子を用いたウイルス・卵菌類複合抵抗性の分子機構の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanism of dual resistance to virus and oomycete using their chimeric resistance genes

研究代表者

高橋 英樹 (TAKAHASHI, Hideki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20197164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：RCY1とRPP8は、キュウリモザイクウイルス(CMV)とアブラナ科へと病菌の抵抗性を支配する対立遺伝子である。RCY1、RPP8、および両遺伝子の各ドメインを交換したキメラ遺伝子を、*N. benthamiana*葉で一過的発現し、抵抗性発現を解析したところ、CMVに対する抵抗性応答には、RCY1タンパク質のLRRドメインが関与していた。次に、両遺伝子の発現制御機構の解析では、いずれもイントロンが、RCY1とRPP8タンパク質の高蓄積と病害抵抗性の増強を決定していた。抵抗性タンパク質の機能ドメイン解析とその蓄積量の制御に関わるこれらの新知見は、病害抵抗性の分子基盤の理解に寄与する。

研究成果の概要(英文)：RCY1 confers the hypersensitive resistance (HR) response to Cucumber mosaic virus [CMV(Y)] in *A. thaliana*, whereas its allelic RPP8 does the resistance to *H. arabidopsidis*. When RCY1, RPP8 and a series of chimeric constructs between RCY1 and RPP8 were transiently expressed in *N. benthamiana*, respectively, HR cell death was induced in the leaf tissue expressing chimeric construct carrying CC-NB of RPP8 and LRR of RCY1, suggesting that LRR domain of RCY1 determines the recognition of CMV(Y). Furthermore, to study on the regulatory mechanism of RCY1/RPP8 gene expression, we analyzed the contribution of each structural element of the gene. As the result, we can find that the presence of intron in RCY1/RPP8 genes is indispensable for higher level of RCY1/RPP8 protein accumulation. Those findings regarding pathogen recognition specificity and the role of intron for the resistance to pathogens will give new insight to understand the plant immune system against pathogen infection.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルス抵抗性 キュウリモザイクウイルス 病害抵抗性遺伝子 NB-LRRタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 病害から植物を守り農業生産を維持するため、化学農薬による防除技術の確立や交配による耐病性形質の栽培植物への導入が行われてきたが、病害による農産物の減収は、依然として農業上大きな問題である。病害防除の手段を見出には、植物の感染防御システムを根本的に制御する分子機構を解明し、それを活用する具体的な手法の提示が必要である。防御システムの鍵を握る病害抵抗性遺伝子については、現在までに約 40 種類が単離されており、その多くは NB-LRR (Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat) という特徴的なドメインを有するタンパク質をコードしていた。この NB-LRR タンパク質は、病原体が生産するエフェクター[(非)病原性因子]が作用する標的分子を監視することにより、植物体が具備する防御システムを始動させる役割を果たしていると考えられている(Takken and Tameling, *Science*, 324, 744-746, 2009)。しかし、その具体的な分子機構は、ほとんど解明されていない。

(2) 現在、抵抗性遺伝子の多くが国外で単離された経緯から、その機能解析が欧米で精力的に進められている。一方、国内で単離された抵抗性遺伝子は少なく、研究の遅れが深く懸念される。そこで、本応募者が独自に単離したウイルス抵抗性遺伝子 *RCY1* 及びその対立遺伝子であるべと病菌抵抗性遺伝子 *RPP8* の利点を生かして、国外の当該研究に対して優位に抵抗性分子機構の研究を展開する。応募者のこれまでの研究から、*RCY1* タンパク質へのアミノ酸変異導入による機能ドメイン解析、過剰発現による高度抵抗性誘導、*RCY1* の下流で機能するシグナル伝達系の解析 (Takahashi *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 45: 803-809, 2004) がなされ、さらに *RCY1* が抵抗性遺伝子 *RPP8* の対立遺伝子であることが見出されている(McDowell *et al.*, *Plant Cell*, 10, 1861-1874, 1998; Takahashi *et al.*, *Plant J.*, 32, 655-667, 2002)。加えて応募者は、べと病菌と同じく卵菌綱に属する *Pythium* 属菌の生産するエフェクターによる誘導抵抗性を研究してきたため、同誘導抵抗性の分子機構解析と卵菌類の取扱いに豊富な経験を持つ。そこで、本研究では、ひとつの遺伝子

座が異なる病原体(ウイルスと卵菌類)に対する抵抗性遺伝子に分化したユニークな *RCY1/RPP8* 遺伝子座について、ウイルスと卵菌類抵抗性を制御する分子機構を徹底的に比較解析することにより、抵抗性遺伝子が制御する防御システムの解明の新たな展開が可能との着想に至った。

2. 研究の目的

病害抵抗性を制御する抵抗性遺伝子が単離されても、コードされるタンパク質の機能と抵抗性の分子機構は未だに明らかではない。応募者が独自に単離・研究してきた *RCY1/RPP8* 抵抗性遺伝子座は、対立遺伝子がウイルスと卵菌類の抵抗性遺伝子(*RCY1* と *RPP8*)に分化していることが報告されている唯一の遺伝子である。本研究では、そのユニークな特徴に基づいて、*RCY1* と *RPP8* の間でキメラを作出し、(1)同キメラ形質転換植物のウイルス・卵菌類抵抗性と、(2) *RCY1/RPP8* 遺伝子の発現制御機構を徹底的に比較解析する。*RCY1/RPP8* 遺伝子座の特性を活用し、国内外おける他の研究とは異なる新規かつ斬新なアプローチから、病害抵抗性の分子機構解明に迫る。

3. 研究の方法

- (1) *RCY1*、*RPP8*、*RCY1*・*RPP8* キメラ cDNA を合成し、3'末端に H-epitop を付加するように Binary vector pRI201 にクローニング後、*Agrobacterium* LBA4404 に形質転換した。
- (2) 同アグロバクテリウムを *N. benthamiana* 葉において agro-infiltration 法により一過的に発現し、*RCY1*、*RPP8* および各キメラタンパク質の蓄積を、WB 法により検出した。
- (3) CMV(Y)を接種した *N. benthamiana* 葉で(2)と同様に一過的発現実験を行い、過敏細胞死の有無を指標とし、抵抗性誘導を解析した。
- (4) *A. thaliana* ecotype Col-0 に(1)で作出したベクターを形質転換し、*RCY1*、*RPP8* および各キメラタンパク質の蓄積を WB 法で検出した。
- (5) (4)の形質転換体に、CMV(Y)あるいは *Hpa* Emco5 を接種し、抵抗性誘導を解析した。
- (6) タグ付き genomic *RCY1* と *RCY1*cDNA を Binary vector pRI201 へクローニングし、agro-infiltration 法により *N. benthamiana* 葉で一過的発現を行い、*RCY1*mRNA と *RCY1* タンパク質の蓄積量と解析した。
- (7) *RCY1* のゲノムプロモーターを CaMV35S プロ

モーターに置換したコンストラクト、*RCY1* ゲノムから 5', 3'-UTR を欠出させてコンストラクト、*RCY1* ゲノムからイントロンを欠出させてコンストラクトを、それぞれ作出し(6)と同様に一過的発現させ、*RCY1*mRNA と *RCY1* タンパク質の蓄積量と解析した。

(8) (6)と(7)の一過的発現実験において、HR 細胞死、防御関連遺伝子マーカー発現、 H_2O_2 生成を解析し、抵抗性誘導について評価を行った。

4. 研究成果

(1) CMV(Y)接種 *N. benthamiana* 葉で *RCY1* を一過的に発現させると、過敏反応(HR)抵抗性が誘導されたが、対立遺伝子であるべと病菌抵抗性遺伝子 *RPP8* を同様に発現させても HR 抵抗性は誘導されなかった(図 1, 図 2)。



図1 *RCY1*-HAと*RPP8*-HAのキメラタンパク質

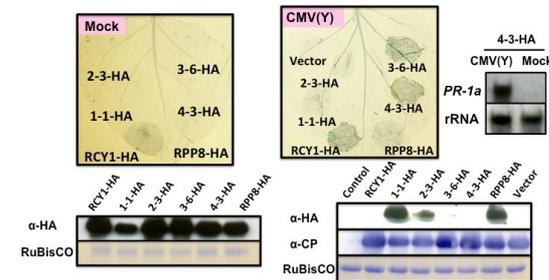


図2 CMV(Y)感染および非感染 *N. benthamiana* における *RCY1*-HA/*RPP8*-HA キメラコンストラクトの一過的発現と応答。

Mock接種した *N. benthamiana* では、いずれのキメラコンストラクト(図1参照)を発現させた場合も、細胞死は誘導されない。CMV(Y)接種した *N. benthamiana* では、*RCY1*-HA 以外に3-6-HAと4-3-HAで細胞死が誘導され、同時にタンパク質が分解された。

タグを付加した *RCY1* (*RCY1*-HA)と *RPP8* (*RPP8*-HA)の間で、CC または LRR ドメインを相互に交換したキメラを作製し、同様に *N. benthamiana* 葉で発現させたところ、*RCY1* の LRR ドメインをもつキメラのみが HR 細胞死を誘導した(図 2)。したがって、LRR ドメインと CMV(Y)が相互作用することによる防御応答システムの誘導が示された。

(2) *RCY1* の LRR ドメインをもつキメラ遺伝子を発現する形質転換 *A. thaliana* は、同様に CMV(Y)抵抗性を示した。

(3) *N. benthamiana* 葉における同キメラタンパク質の蓄積について、HA タグ抗体を用いて調べたところ、HR 誘導と同タンパク質の自己分解に明瞭な相関が認められた。防御システムの活性化に伴って、抵抗性タ

ンパク質 *RCY1* の自己分解が誘導されることが明らかになった(図 2)。

(4) *RCY1* と *RPP8* の LRR ドメイン内で部分的にアミノ酸置換を誘導したキメラ *RCY1*/*RPP8* 遺伝子 10 種類を *N. benthamiana* 葉で一過的に発現させ、CMV(Y)の特異的認識と抵抗性誘導に関わる領域について解析を行ったところ、LRR ドメイン内の特定のアミノ酸配列に基づく局所的な高次構造ではなく、LRR ドメインの全体的な高次構造が、CMV(Y) 特異的認識と抵抗性誘導に関わっていることが明らかになった(図 3, 図 4)。

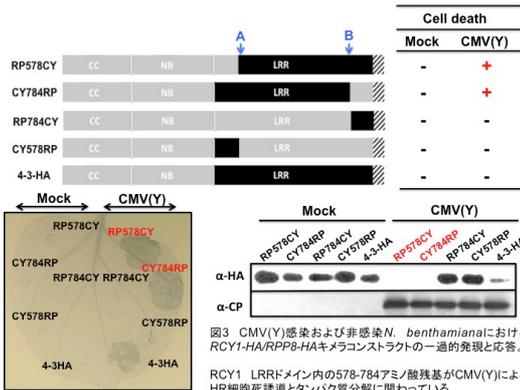


図3 CMV(Y)感染および非感染 *N. benthamiana* における *RCY1*-HA/*RPP8*-HA キメラコンストラクトの一過的発現と応答。

RCY1 LRRドメイン内の578-784アミノ酸残基がCMV(Y)によるHR細胞死誘導とタンパク質分解に関わっている。

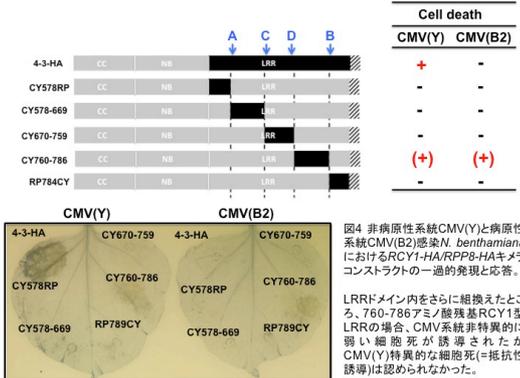


図4 非病原性系統CMV(Y)と病原性系統CMV(B2)感染 *N. benthamiana* における *RCY1*-HA/*RPP8*-HA キメラコンストラクトの一過的発現と応答。

LRRドメイン内さらに相換えたところ、760-786アミノ酸残基 *RCY1* 型 LRRの場合、CMV系統非特異的に弱い細胞死が誘導されたが、CMV(Y)特異的な細胞死(=抵抗性誘導)は認められなかった。

(5) アブラナ科べと病菌 (*Hpa*) isolate Emco5 に対する応答を、同キメラ抵抗性遺伝子を発現する *A. thaliana* 形質転換体を用いて解析したところ、*Hpa* 抵抗性は、CC-NB ドメインが *RCY1* で LRR ドメインが *RPP8* に由来するキメラタンパク質の発現では誘導されず、*RPP8* タンパク質の全体構造が必要であることが明らかになった(図 5, 図 6)。

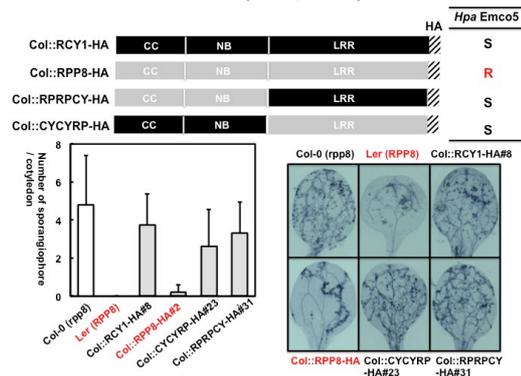


図5 *RCY1*/*RPP8*キメラ抵抗性遺伝子を形質転換したシロイヌナズナ (*A. thaliana*) のべと病菌 (*Hpa* Emco5) に対する応答

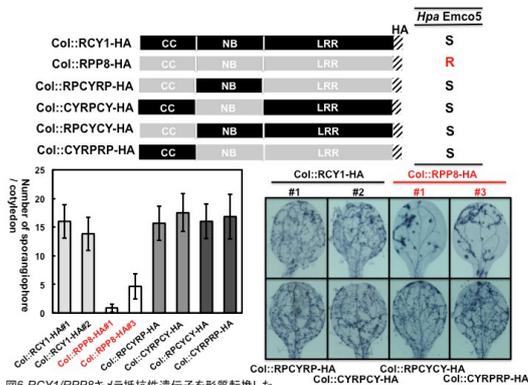


図6 RCY1/RPP8キメラ抵抗性遺伝子を形質転換したシロイヌナズナ(*A. thaliana*)のべと病菌(*Hpa Emco5*)に対する応答

(6) RCY1 と RPP8 の発現を制御する機構を解析したところ、両遺伝子とも、RCY1・RPP8 mRNA 量が低下するものの、

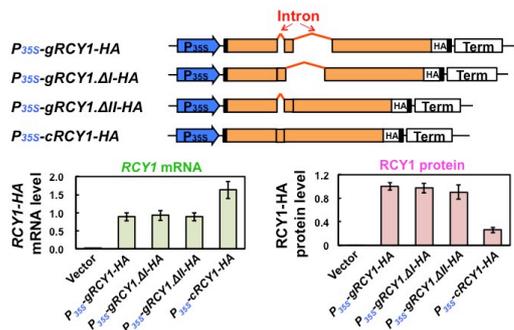


図7 イントロンによるRCY1タンパク質蓄積の上昇効果

イントロンによりRCY1 mRNA量は減少するものの、RCY1タンパク質蓄積量は顕著に

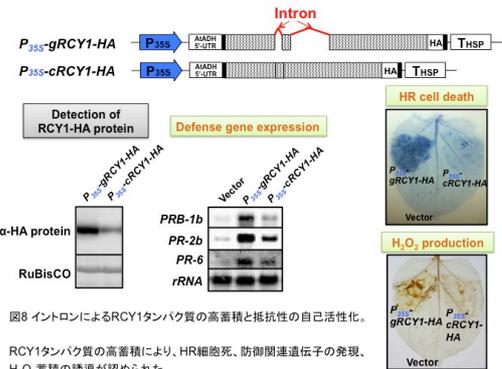


図8 イントロンによるRCY1タンパク質の高蓄積と抵抗性の自己活性化。

RCY1タンパク質の高蓄積により、HR細胞死、防御関連遺伝子の発現、H₂O₂蓄積の誘導が認められた。

イントロンに存在が RCY1・RPP8 タンパク質の高蓄積 (Intron-mediated enhancement) と(図 7)、それに伴う抵抗性の増強に関わっていることが明らかになった(図 8)。

<引用文献>

Takken and Tameling, To nibble at plant resistance proteins. *Science*, 324, 744-746, 2009.

Takahashi *et al.*, Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to *Cucumber mosaic virus*. *Plant Cell Physiol.*, 45: 803-809, 2004.

McDowell *et al.*, Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1861-1874, 1998.

Takahashi *et al.*, *RCY1*, an *Arabidopsis*

thaliana *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J.*, 32, 655-667, 2002.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- Sato, Y., Ando, S. and Takahashi, H. (2014) Role of intron-mediated enhancement on accumulation of an Arabidopsis NB-LRR class R-protein that confers resistance to *Cucumber mosaic virus*. *PLoS ONE* 9(6): e99041. (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0107185
- Ando, S., Obinata, A. and Takahashi, H. (2014) WRKY70 interacting with RCY1 disease resistance protein is required for resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 85: 8-14. (査読あり)
- Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Wada, T., Kanayama, Y., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S. and Hyakumachi, M. (2014) Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* 33: 99-110. (査読あり)
- Takahashi, H., Kai, A., Yamashita, M., Ando, S., Sekine, K.-T., Kanayama, Y. and Tomita, H. (2012) Cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated cell death may not be critical for R gene-conferred resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 40-48. (査読あり)
- Takahashi, H., Shoji, H., Ando, S., Kanayama, Y., Kusano, T., Takeshita, M., Suzuki, M. and Masuta, C. (2012) *RCY1*-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* is regulated by LRR domain-mediated interaction with CMV(Y) following degradation of RCY1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1171-1185. (査読あり)

[学会発表] (計 26 件)

- Takahashi, H., Sato, Y., Ando, Y. and Ando, S. (2014) Molecular basis of *RCY1/RPP8* locus conferred dual resistance to *Cucumber mosaic virus* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Plant Pathology October 23-24, Mirae Bldg. Pukyong National University, Daeyeon Campus, Busan, Korea.
- Takahashi, H., Hyakumachi, M., Shimizu, M., Iwamoto, Y., Aino, M., Matsuura, K., Goto, S., Nakano, K., Ando, S., Arie, T., Tsushima, S. and Yoshida, S. (2014) Molecular basis of a bioinsecticide-activated plant defense system to suppress bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. 248th American Chemical Society (ACS) National Meeting, August, 10-14, San Francisco, CA, USA.
- Takahashi, H., Ando, Y. and Ando, S.,

Analysis of pathogen-recognition domain in NB-LRR class *RCY1/RPP8* locus conferring dual resistance to *Cucumber mosaic virus* and *Hyaloperonospora arabidopsidis* in *Arabidopsis thaliana*. (2014) XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (July 6-13, Rhodos, Greece)

- 4) Sato, Y., Ando, S. and Takahashi, H. Role of intron-mediated enhancement on accumulation of an Arabidopsis NB-LRR class R-protein that confers resistance to *Cucumber mosaic virus*. (2014) XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (July 6-13, Rhodos, Greece)
- 5) Ando, S., Jaskiewicz, M., Takahashi, H. and Conrath, U. Study on priming and chromatin modification in plant immune systems. (2014) XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (July 6-13, Rhodos, Greece)

〔図書〕（計 3 件）

- 1) Ishihara, T, Sato, Y. and Takahashi, H. (2014). “Microarray Analysis of R-Gene-Mediated Resistance to Viruses”. Plant Virology Protocols Methods in Molecular Biology (Eds. I. Uyeda and C. Masuta), Springer, Vol. 1236, 292 (197-218).
- 2) 安藤杉尋・Michal Jaskiewicz・高橋英樹・Uwe Conrath (2014) 「植物免疫におけるプライミングとクロマチン修飾機構の解析」日本植物病理学会第 49 回植物感染生理談話会論文集 (Proceedings of 49th PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium) 49, 132 (77-86).
- 3) 高橋英樹・安藤杉尋 (2012) 「キュウリモザイクウイルス防御応答における NB-LRR タンパク質の機能解析」植物感染生理談話会論文集 (Proceedings of PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium) 47, 155 (135-144).

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 英樹 (TAKAHASHI, Hideki)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20197164

(2) 研究分担者

安藤 杉尋 (ANDO, Sugihiro)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10442831

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし