

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380025

研究課題名(和文) ウイルス感染シロイヌナズナで観察された非HR型えそ症状誘導のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for non-HR type necrosis of Arabidopsis infected by a virus

研究代表者

増田 税 (Masuta, Chikara)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60281854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリモザイクウイルス(CMV)がArabidopsisに誘導するえそ症状の病徴誘導メカニズムを解析したところ、CMVの2bタンパク質が宿主のカタラーゼ(Cat3)に結合することが原因であることが判明した。2b-Cat3複合体の細胞内蓄積は、細胞内でタンパク質分解系によって調節されており、安定な複合体を形成すればするほどえそ症状は激しくなるものと予想された。Cat3は2bに結合することによって2bの機能を阻害し、CMVの増殖に抑制的に機能するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the molecular mechanism by which Cucumber mosaic virus (CMV) induces necrosis on inoculated leaves of Arabidopsis. We could show direct evidence of the protein-protein interaction between the 2b protein of CMV (2b) and host catalase (Cat3). The stability of the 2b-Cat3 complex seems to be regulated by cellular proteasome; the more stable the complex is, the more rapidly it is degraded. For the host plant, Cat3 may function as an anti-CMV factor that can interfere with the function of 2b.

研究分野：植物病理学

キーワード：Cucumber mosaic virus catalase necrosis

1. 研究開始当初の背景

キュウリモザイクウイルス (CMV) 黄斑系統 (CMV-Y) は *Arabidopsis Col-0* に軽いモザイク症状を誘導する。一方、ユリ系統の CMV-HL を *Col-0* に接種すると上葉に明瞭なえそが現れる。*Col-0* と CMV-HL の組み合わせで観察されるえそは、過敏反応死 (HR) とは異なりウイルス抵抗性と直接にリンクしない。また、CMV-Y と CMV-HL との間で作出したシュードリコンビナントウイルスの接種試験の結果、RNA2 が CMV-HL 由来の時に *Col-0* にえそ症状を誘導しやすいことから、CMV-HL が *Arabidopsis* に特異的にえそ病徴を誘導する分子メカニズムが存在するものと考えられた。RNA2 にコードされる 2 つのタンパク質 (2a と 2b) のうち、2b タンパク質 (CMV2b) に結合する *Arabidopsis* の宿主因子を酵母 two-hybrid assay によって探索した結果、7 つの候補遺伝子が得られ、その中に、病原体による感染や光障害時に H_2O_2 除去酵素 (スカベンジャー) として細胞を活性酸素 (ROS) の攻撃から守るカタラーゼ (Cat3) 遺伝子が存在した。一般に細胞内に生成する ROS は、ストレス応答、老化、アポトーシス、細胞分化さらにはがん化などに深く関与している。カタラーゼ (Cat) は ROS を除去 (スカベンジ) するために重要な役割を果たしている。植物の Cat の機能についてはモデル植物において詳細な解析が進められている。例えば、*N. tabacum* の NtCat1 がサリチル酸 (SA) に結合することが報告されると SA が Cat 活性を阻害した結果、 H_2O_2 が上昇して HR によるえそ斑が誘導されるという仮説が提唱されたが、その生物学的な意義は明瞭ではない。CMV の 2b は宿主植物の RNA silencing (RS) を抑制するサブプレッサータンパク質 (RSS) として知られている。RS は宿主のウイルス感染に対する防御機構であるが、

CMV は 2b によって RS 経路を阻害する。その上、2b は宿主の SA を介して誘導される抵抗性機構も直接に阻害すると報告されている。これまで得られた CMV 2b に関する研究成果や予備実験の結果に基づき、以下の 2 つの作業仮説を立てて、研究計画を立案した。

仮説 1 : 「*Arabidopsis* に CMV-HL を接種したときに、2b が catalase に細胞内で結合し、CMV 感染で誘導される H_2O_2 の処理が阻害される。その結果、蓄積した ROS によって細胞死が誘導され、葉にえそ症状が現れる」

仮説 2 : 「2b と catalase の結合によって 2b の RSS 活性もまた阻害される。そのため、2b の蓄積量が少ない状態では、ウイルス感染は遅れる」

2. 研究の目的

CMV-HL を *Arabidopsis* に接種したところ、上葉に拡張性のえそ症状が観察された。この時 PR1 などの防御応答遺伝子の発現は認められたものの、ウイルスはえそ斑に閉じ込められなかったため、HR とは異なるタイプのえそと考えられた。CMV の 2b タンパク質によって特異的に誘導されるえそ症状であることが判明し、CMV2b を介した特異的なえそ誘導メカニズムが存在するものと予想された。本研究では、CMV-*Arabidopsis* の pathosystem において“非 HR 型のえそ”誘導の分子メカニズムを解明することを目的とする。HR 型のえそとは対照的に、宿主の抵抗反応とリンクしない非 HR 型のえそについては、病徴発現のメカニズムまで踏み込んだ研究は皆無であった。

3. 研究の方法

(1) 2b-Cat の相互作用の解析

微量なターゲットタンパク質の特異的な検出を可能にする増感技術 (Duolink in situ

PLA)を用いて、細胞内の内在性タンパク質の2分子間相互作用や局在解析を行うことができる。すなわち、*Arabidopsis*のプロトプラストを作出・調整し、2つのタンパク質を同時に発現させて、それぞれを特異的に識別する2種類の抗体を反応させ、2bとCat3の細胞内局在やタンパク質間相互作用を検出する。*Arabidopsis*には3種類のCat遺伝子(AtCat1, AtCat2, AtCat3)が存在するため、AtCat3のみを特異的に認識できるペプチド抗体をまず作出する。次に、この抗体を使用してCat3がCMV-Y以外の系統(例えば、subgroup IIのCMV)の2bと相互作用するのか酵母 two-hybrid 法などを用いて観察する。もし、いかなるCMVの系統にも*Arabidopsis*にえそ症状を誘導する能力があり、その程度は2bの性質によって決まるとしたら、このえそ誘導のメカニズムはCat3と2bの直接結合によって説明できる。

(2) 2b-Cat 結合に及ぼす宿主因子の影響とCMVによるえそ誘導との関連

Arabidopsis Cat3のCol-0ノックアウトミュータント(Cat3KO)を入手し、これにCMVを接種して、えそ誘導を観察する。この時、CMVの異なる分離株において、えそ病徴誘導に違いがあるものを選抜し、えそ症状の程度を決める宿主因子を探索する。また、Colと比較してLerではきびしいえそ症状が観察される。両エコタイプにはCat3の配列に違いがないことから、えそ病徴の程度の決定には別の宿主因子の関与が示唆される。ColとLerに蛍光タンパク質Ds-Redを発現するCMV(CMV-Ds)を接種し、両者のえそ病徴の違いがウイルス量の蓄積の差やウイルス移行の程度の差とリンクするのか明らかにする。あるいは、CMVの分離株を調査し、Colやそのミュータントに明らかに異なるえそ症状を誘導するものを選

抜して、どのような宿主/ウイルス因子がこのえそ病徴誘導に関与するのか明らかにする。

(3) *Arabidopsis* エコタイプ及び2b/Catを発現する形質転換体(Col)の解析

抗2b抗体を用いてウエスタンブロットを行い、2b発現形質転換体から高発現の数ラインを選抜し、生育中のえそ症状の有無を観察して、2bの発現との相関関係を明らかにする。さらに、抗Cat3抗体を用いてCat発現形質転換体のウエスタンブロット解析を行い、Cat3を高発現する形質転換体を数ライン選抜する。これらの2b/Cat発現形質転換体にCMVを接種し、病徴の進展を観察する。この時、Cat3のmRNAの蓄積量をノーザンブロット法やreal-time RT-PCR法によって確認する。2bとCat3はタンパク質の蓄積はウエスタンブロット法によって確認する。これらの形質転換体でのえそ症状を総合的に解析し、宿主のえそ誘導メカニズムを明らかにする。過敏反応死ではタンパク質分解系が関与することが明らかになっており、この*Arabidopsis*のえそでも同様な現象が存在するのか興味深い。

4. 研究成果

(1) 上述の背景に記載したとおり、CMV-HLがCol-0にえそ病徴を引き起こす原因について*Arabidopsis*のCat3にCMV2bが結合することが原因であると推測していた。CMVは大きくsubgroup IとIIに分類され、2bの配列も大きく異なる。CMV-HLはsubgroup Iに属しており、subgroup IIの2bにえそ症状を誘導できるのか興味深いところであった。まず、酵母 two-hybrid 法によって解析した結果、subgroup IIの2bもCat3に弱く結合し、えそを誘導する能力があることが判明した。これによってCMV2bとCat3の結合によって誘導されるえそ症状はCMV-*Arabidopsis* pathosystemにおいて一

一般的な現象であることがわかった。次に、このえそ症状が 2b と Cat3 の直接の複合体形成によるものなのか解析するために、Cat3 に対するペプチド抗体を作出し、抗体の特異性を確認した後、以後のウエスタン解析や免疫沈降 (IP) などに使用した。IP によって検出された Cat3 は高分子領域に検出されるものがあり、タンパク質の修飾を受けている可能性を示唆するものであった。

(2) Cat3 を発現しない Cat3KO に CMV-Ds を接種して、ウイルスの移行をモニターした結果、Cat3 を発現する野生種の Col-0 に比較して、接種葉で CMV は明らかに早く拡散した (図 1)。この時、ELISA 法によってウイルスの蓄積を測定したところ、Cat3KO で CMV の蓄積は増加していた。これらは Cat3 が CMV に対して抑制的に作用することを示唆する結果である。さらにプロトプラスト実験によって、Cat3 が CMV2b の機能である RSS 活性に及ぼす影響について調べたところ、Cat3 が 2b の機能を阻害することが判明した。

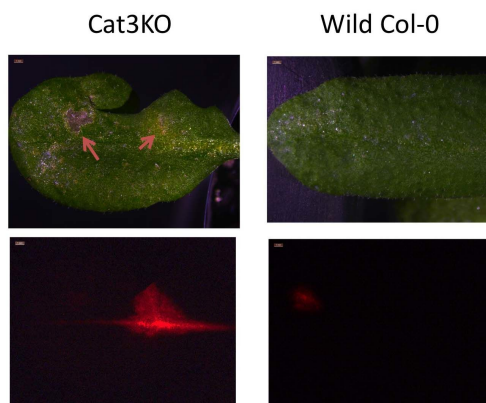


図1 CMV-Ds接種後11目のウイルス蓄積赤く染まっているところにウイルス存在 (下)。上: 接種葉の写真。Cat3KOでは野生種に比較してウイルスの拡散が大きい

(3) 当初、えそ症状の程度の差異を宿主のエコタイプ (Ler など) や様々な遺伝子のノックアウトミュータントの反応で調べる予定であったが、偶然得られた CMV の

2b ミュータント (N2b) が *Arabidopsis* に極めて興味深いえそ症状を誘導したために、この N2b をもつ CMV (CMV-N) の解析がえそ症状に関連する宿主因子の解明に役立つだろうと判断し、以後このミュータント CMV-N を使用した一連の実験を行った。CMV-N を Cat3KO に接種すると非常に弱いえそ症状を接種葉に現す。一方、Cat3 を発現する野生種 Col-0 に接種すると接種葉は激しいえそ症状を現し、ほとんど枯れてしまった (図 2)。Cat3 が活性酸素を消去し細胞のえそに抑制的に働くことを考えるとこれは矛盾する結果であった。この結果を説明するために、Cat3 は CMV2b と結合したときに、それらのタンパク質がどのように蓄積・分解されるのか調べることにした。

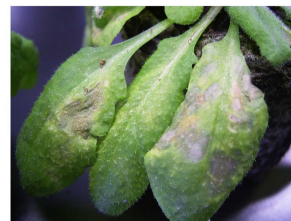


図2. CMV-N接種後5日目の Cat3KOの接種葉で観察されたえそ症状

(4) 2b-Cat3 複合体がどのようなメカニズムでえそを誘導するのか明らかにする目的で 2b と Cat3 タンパク質の相互作用について解析した。アグロインフィルトレーションによってペンタミアータバコに 2b を発現させると内在性の Cat が消失した。この時、2b も同時に検出されなくなった。同様に Cat3 を 2b と一過性に共発現させると Cat3 は外来性・内在性ともに宿主細胞のタンパク質分解系によって速やかに分解されることが判明した。すなわち、2b は細胞で行われている Cat3 のタンパク質分解を促進する働きがあることが明らかになった。換言すれば、2b-Cat3 複合体が宿主因子によって認識され、タンパク質分解が加速するものと考えられた。Cat3 は活性酸素

を消去することが細胞内での主な役割であることから、Cat3 の分解によって活性酸素の濃度が上昇し、細胞死が誘発されるものと思われる。CMV による *Arabidopsis* でのえそ病徴は 2b-Cat3 複合体の形成によって促進されるタンパク質分解によって誘導されると結論した。そもそも Cat はタンパク質分解系（プロテアソーム系）によって分解され、細胞内蓄積量が調節されることが報告されていることから、2b の共発現はプロテアソーム系による Cat3 分解を促進するものと考えられる。現在、当初の計画をさらに発展させて、プロテアソームインヒビターを使用して 2b-Cat3 のタンパク質分解メカニズムを解析している。もし、これが証明されれば、宿主の CMV に対する抵抗反応として Cat3 が機能していることになる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

以下の論文はすべて査読有り。

Liu, J., Kim, B.M., Kaneko, Y., Inukai, T. and Masuta, C. (2015). Identification of the *TuNI* gene causing systemic necrosis in *Arabidopsis* ecotype Ler infected with *Turnip mosaic virus* and characterization of its expression. *Journal of General Plant Pathology* 81, 180-191.

Nakahara, S.K. and Masuta, C. (2014). Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Current Opinion of Plant Biology* 20C, 88-95.

Takagi, K., Nishizawa, K., Hirose, A., Kurauchi, T., Senda, M., Masuta, C., and Ishimoto, M. (2013). Seed coat pigmentation in transgenic soybean expressing the silencing suppressor 2b gene of Cucumber mosaic virus. *Plant*

Cell Reporter 32, 1903-12.

Masuta, C. and Shimura, H. (2013). RNA silencing against viruses: molecular arms race between Cucumber mosaic virus and its host. *Journal of General Plant Pathology* 79, 227-232.

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.

Nakahara, K.S., Masuta, C., Yamada S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T.S., Meguro, A., Goto, K., Tadamura, K., Sueda, K., Sekiguchi, T., Shao, J., Itchoda, N., Matsumura, T., Igarashi, M., Ito, K., Carthew, R.W. and Uyeda, I. (2012). A tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109, 10113-10118.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 劉錦妍, カブモザイクウイルス (TuMV) 感染で全身えそを誘導するアラビドプシスの *TuNI* 遺伝子の転写調節の解析, 平成 27 年度日本植物病理学会大会, 2015 年 3 月 29 日~31 日, 明治大学 (東京都千代田区)
2. 小田裕太, 混合感染における植物ウイルス間の局部干渉に関する解析, 平成 27 年度日本植物病理学会大会, 2015 年 3 月 29 日~31 日, 明治大学

- (東京都千代田区)
3. Maneechoat, P., Comparative analyses on virus accumulation and activity of RNA silencing suppressor of Cucumber mosaic virus-m1 in *Nicotiana benthamiana*, 平成 26 年度日本植物病理学会九州部会, 2014 年 11 月 12 日, ジェイドガーデンパレス (鹿児島県鹿児島市)
 4. 兵頭紋佳, アシベンゾラル S メチル(ASM)処理による宿主抵抗性関連遺伝子の転写物レベルの推移, 平成 26 年度日本植物病理学会九州部会, 2014 年 11 月 12 日, ジェイドガーデンパレス (鹿児島県鹿児島市)
 5. 劉錦妍, カブモザイクウイルスに対するアラビドプシスエソ誘導遺伝子 TuNI のプロモーター領域の解析, 平成 26 年度日本植物病理学会大会, 2014 年 6 月 2 日~4 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)
 6. 室田勝功, シロイヌナズナのカタラーゼ CAT3 はキュウリモザイクウイルスの 2b タンパク質の認識とウイルス抵抗性反応に關与する, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日~3 月 20 日, 富山大学 (富山県富山市)
 7. 寺田寛之, ユリ科へ感染する新規 VIGS ベクターの開発, 日本ウイルス学会北海道支部会, 2013 年 7 月 20 日~21 日, ホテル北の湯 (北海道奈井江町)
 8. 増田税, CMV-Y サテライト RNA による黄化誘導メカニズム, 植物ウイルス病研究会, 2013 年 3 月 30 日, 岐阜大学 (岐阜県岐阜市)
 9. 高橋英樹, キュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 RCY1 に対応するウイルス非病原性因子の解析, 平成 25

年度日本植物病理学会大会, 2013 年 3 月 27 日~29 日, 岐阜大学 (岐阜県岐阜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 税 (MASUTA, Chikara)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 60281854

(2) 研究分担者

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