

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580001

研究課題名(和文) 抵抗性反応と連動したアスコルビン酸による抗ウイルス機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of induction mechanism for ascorbic acid accumulation as antiviral reaction

研究代表者

犬飼 剛 (Inukai, Tsuyoshi)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：90223239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハクサイ・カブ及びアラビドプシスにおいて内生AsA量とウイルス耐性の関係を調べたところ、これら間に有意な相関が認められ、またAsA合成の基質を投与して一過的にAsA量を増加させたところウイルス耐性が増加した。これらの結果から内生AsAに抗ウイルス作用があることが明らかになったため、次にハクサイ・カブにおいてウイルス感染に反応してAsAが蓄積するかどうか調べたところ、抵抗性品種において50%程度の増加が認められた。このAsAの増加は、JAシグナル伝達経路を介した、AsAの酸化酵素APX及びAOの発現抑制並びにAsAのリサイクルに働くDHARの発現促進によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first showed that endogenous ascorbic acid (AsA) functioned as an antiviral chemical to TuMV in *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*. Next, it was shown that the AsA accumulation was induced by TuMV infection in the *B. rapa* resistant cultivar Aki-masari. This AsA accumulation was due to suppression of AsA oxidation by ascorbate peroxidase (APX) and ascorbate oxidase and activation of AsA recycling by dehydroascorbate reductase (DHAR). Because methyl jasmonate (MeJA) suppressed the APX activity and enhanced the DHAR activity; JA derivatives including JA-isoleucine, tuberonic acid and tuberonic acid glucoside were increased together with AsA, the induction of the AsA accumulation in Aki-masari appeared to be mediated by the JA-dependent signaling pathway suggesting that the AsA accumulation was induced as a defense reaction against virus.

研究分野：植物育種学

キーワード：アスコルビン酸 ウイルス 抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物は RNA サイレンシングによってウイルスの増殖を抑制する機構を進化させたが、ウイルスはこのサイレンシングを阻害するためにサプレッサータンパクを獲得した。このサプレッサーのサイレンシング抑制機構の一つとしてウイルス RNA を標的とする siRNA をトラップする働きがあるが、我々のグループでは、*in vitro* の実験からアスコルビン酸 (AsA) がサプレッサーの siRNA への結合を阻害すること (Shimura et al. 2008) また AsA を植物に直接処理することによってウイルス感染が阻害されることを報告した (Fujiwara et al. 2013)。一方、植物は光合成や環境ストレスなどによって発生する活性酸素を消去するため還元剤である AsA を mM レベルで生成し、細胞内外の酸化還元状態を制御している。そのため、植物はウイルスの攻撃に対しても AsA の細胞内濃度を増加させ、これによりウイルスの感染を防ぐ機構を備えているのではないかと考えられた。そこで、我々のグループでは本研究に先立っていくつかの予備的な実験を行ったところ、ウイルス抵抗性と連動して AsA の蓄積が誘導されることを示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

上述の予備実験の結果から、植物はウイルスに対する防御応答の一つとして他の抵抗性反応と同様に植物ホルモンを介した AsA の蓄積誘導を行い、これによりウイルスのサプレッサーの働きを阻害してサイレンシングの抗ウイルス作用を活性化させているのではないかと考えられたことから、本研究では 1) 内生 AsA 量とウイルス耐性との関係、2) ウイルス抵抗性の発現に連動した AsA の蓄積、3) ウイルス抵抗性と連動した AsA 蓄積の制御メカニズムについて明らかにする実験を行った。

3. 研究の方法

材料

(1) 供試ウイルス

Turnip mosaic virus (TuMV) のアブラナ系統 (UK1) 及び UK1 に由来する突然変異系統 UK1m2 系統を用いた。また、TuMV のダイコン系統 (TuR1) に黄色蛍光タンパク質 (YFP) を導入した TuMV-TuR1-YFP を用いた。

(2) 供試植物

ハクサイ品種として「秋まさり」₁、「空海 65」₁、「優春」の 3 品種、カブ品種として「CR もちばな」₁、「CR ゆきばな」₁、「雪姫かぶ」₁、「京の雪」₁、「早生大蕪」₁、「福小町」₁、「白露」₁、「京千舞」₁、「夏小町」の 9 品種を用いた。*Arabidopsis thaliana* については生態型 Columbia (Col-0) 及び Col-0 由来のアスコルビン酸酸化酵素遺伝子 (AO) 欠損変異体 SALK_108854 を用いた。

方法

(1) 植物個体の養成

植物は MLR-350 グロースチャンバー (SANYO) で 21℃、12 時間日長、150 μmol/m/s で育成した。

(2) ウイルスの接種

ハクサイ及びカブは播種後約 1 週間の展開した子葉、*A. thaliana* は播種後約 4 週間の展開したロゼッタ葉に汁液接種法でウイルスを接種した。

(3) 還元型アスコルビン酸 (AsA) 及び酸化型アスコルビン酸 (DHA) の定量

植物組織の 5 倍量の 6% メタリン酸溶液で植物組織を磨砕し、室温、14,000rpm で 20 分間遠心した。上清を取り、AsA+DHA 測定時はこれを 5% メタリン酸で 10 倍希釈、DHA 測定時は 5% メタリン酸で 5 倍希釈して 60 μl の検液とした。AsA+DHA 測定時には 0.2% の 2,6-ジクロロインドフェノール溶液、DHA 測定時には 5% メタリン酸を 10 μl 加えて 5 分間静置し、その後 1% 塩化第一すず-5% メタリン酸溶液を加えた。検体にヒドラジン液を 30 μl 加え、

37 で3時間インキュベートした。インキュベート後、氷中で冷却し、85%濃硫酸を150 μ l 加えた。室温で30分間放置した後、530 nmで吸光値を測定した。

(4)ELISA

抗TuMV -グロブリンを0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)で1000倍に希釈し、マイクロプレート1穴当り200 μ l ずつ分注後、37 で3-4時間静置した。PBS-T溶液でプレートを洗浄した後、葉組織の磨砕上清液を200 μ l ずつ分注した。マイクロプレートを4 で一晩インキュベートした後、磨砕上清液を捨て、PBS-T溶液で洗浄した。抗TuMV -グロブリンアルカリフォスファターゼコンジュゲートをマイクロプレート1穴当り200 μ l ずつ分注した後、37 で3-4時間インキュベートした。抗体溶液を捨て、PBS-T溶液でプレートを洗浄後、基質溶液を200 μ l ずつ分注した。37 でインキュベートし、発色させた後405 nmにおける吸光値を測定した。

(5)定量 RT-PCR

RNAの抽出はTRIzolを用いて行った。定量RT-PCRはGenomeLAB GeXP Start Kit(BeckmanCoulter)を用いて行った。定量はBeckman CEQ8800により行った。解析したデータは内部標準として設定した3遺伝子PP2A, actin8及びTIP41の数値の幾何平均を算出し、この値を用いて標準化した。

(6)APX, DHAR, A0及びMDHARの活性測定

APX活性測定

サンプルを10倍量の磨砕バッファーで磨砕し、遠心後の上清を粗酵素液とした。0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH7.0) 1ml、5mM AsA 100 μ l、50mM EDTA 40 μ l、dH₂O 535 μ l、1 mM H₂O₂ 200ml、粗酵素液125 μ lを混合し、直ちに290nmの吸光値を測定した。AsAの酸化による値の減少をAPXの活性として算出した。1分間で1 μ molのAsAを酸化する酵素量を1ユニットとした。

DHAR活性測定

サンプルを10倍量の磨砕バッファーで磨砕し、遠心後の上清を粗酵素液とした。0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH7.0) 1ml、5mM DHA 200 μ l、50mM還元型グルタチオン200 μ l、50mM EDTA 40 μ l、dH₂O 497.5 μ l、粗酵素液62.5 μ lを混合し、直ちに265nmの吸光値を測定した。DHAが還元されAsAが生成されることによる数値の増加をDHARの活性として算出した。1分間で1 μ molのAsAを生成する酵素量を1ユニットとした。

A0活性測定

サンプルを10倍量の磨砕バッファーで磨砕し、遠心後の上清を粗酵素液とした。0.5mM EDTAを含む0.1Mリン酸バッファー(pH5.6) 1.775ml、5mM AsA 100 μ l、粗酵素液125 μ lを混合し、直ちに265nmの吸光値を測定した。AsAの酸化による値の減少をA0の活性として算出した。1分間で1 μ molのAsAを酸化する酵素量を1ユニットとした。

MDHAR活性測定

サンプルを10倍量の磨砕バッファーで磨砕し、遠心後の上清を粗酵素液とした。0.1M TES バッファー1 ml、5mM NAD(P)H 40 μ l、10mM AsA 500 μ l、8 U/ml AsA 酸化酵素溶液250 μ l、dH₂O 85 μ l、粗酵素液125 μ lを混合し、直ちに340nmの吸光値を測定した。NAD(P)Hの酸化による吸光値の減少をMDHARの活性として算出した。1分間で1 μ molのNAD(P)Hを酸化する酵素量を1ユニットとした。

(7)植物ホルモン及び類縁体蓄積量の測定

植物ホルモン及び類縁体の蓄積量測定は、タンデム質量分析法を用いた高速液体クロマトグラフィにより、Matsuura et al. (2009)の方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 内生AsA量とウイルス耐性との関係

カブやハクサイにAsAを処理することによってカブモザイクウイルスの感染が阻害さ

れる (Fujiwara et al. 2013)。そこで内生 AsA 量とウイルス耐性との関係を調べる目的で、以下の異なる 3 種類の実験を行った。実験 1 では、AsA 含量が 1280 から 1675 $\mu\text{g/g}$ FW まで異なる値を示すカブ品種 9 品種に対して YFP を組み込んだ TuMV-TuR1-YFP を接種し、接種葉における感染点の数を比較した。その結果、AsA 含量と感染点数の間に有意な負の相関が認められた ($R^2=-0.605$)。すなわち AsA 含量が高いほどウイルス耐性が高い傾向にあった。実験 2 では、AsA 酸化酵素遺伝子(A0)の突然変異によって AsA 含量が野生型よりも約 30%増加したアラビドプシスの系統を用い、突然変異系統と野生型に TuMV-TuR1-YFP を接種してウイルス耐性を比較した。接種後 3 日目におけるウイルス蓄積量を ELISA 法により定量したところ、突然変異系統では野生型に比べウイルス蓄積量が約 20%、統計的に有意なレベルで減少していた。実験 3 では、AsA 合成経路上の酵素の 1 つである L-galactose-1-phosphate phosphatase の基質 L-ガラクトース (10mM) を植物に処理し、一過的に AsA 含量を増加させた場合にウイルス耐性がどのように変化するか調べた。その結果、L-ガラクトース (10mM) の処理によって AsA 含量が約 2 倍に増加するとともにウイルスの感染点数も有意に減少した。以上の結果より、内生 AsA には抗ウイルス性があり、AsA 含量が多いほどウイルス耐性は増大することが明らかとなった。

(2) ウイルス抵抗性の発現に連動したアスコルビン酸の蓄積

内生 AsA に抗ウイルス性があることが明らかになったことから、次にウイルス感染にตอบสนองして植物が内生 AsA 量を増加させているか

どうかについて調べた。ここでは TuMV に対する反応が異なる *B. rapa* 5 品種を用いた。ハクサイ品種「秋まさり」及び「空海 65」は抵抗性遺伝子 *Rnt1-1* をもち、供試した TuMV 系統 UK1 に対し抵抗性を示す。これに対し *rnt1-2* をもつハクサイ品種「優春」は UK1 に感染して全身えそを示す一方、*rnt1-3* をもつカブ品種「CR もちばな」及び「雪姫かぶ」は UK1 に全身感染しモザイクを示す。これらの品種における UK1 接種後 4 日目における AsA 量を定量したところ、「秋まさり」及び「空海 65」でのみ 40-60%の AsA 蓄積量の増加が認められた。次に、「秋まさり」に非病原性の UK1 系統及び病原性の UK1m2 系統を接種し、その後の AsA 含量の推移を調査した。その結果、非病原性の UK1 系統を接種した時のみ AsA の蓄積が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、*B. rapa* では TuMV に対する抵抗性が発現する場合にのみ特異的に AsA 蓄積が誘導されると考えられた。

(3) ウイルス抵抗性と連動した AsA 蓄積の制御メカニズム

「秋まさり」の *Rnt1-1* によるウイルス抵抗性と連動した AsA 蓄積の誘導経路を明らかにする目的で、AsA 合成及び酸化・還元に関わる遺伝子の発現が TuMV-UK1 接種後どのように変化するか解析した。AsA 合成系の遺伝子で TuMV-UK1 接種後その発現が増加したものは無かったが、AsA の酸化や酸化型 AsA の還元に関わる遺伝子の発現パターンには明らかな変化が認められた。AsA の酸化に働く過酸化酵素遺伝子 (APX) や A0 遺伝子の発現が抑制される傾向にあった一方、酸化型 AsA の還元に関わるデヒドロアスコルビン酸還元酵素遺伝子 (DHAR) の発現は増加した。APX,

A0 及び DHAR の酵素活性を測定したところ、酵素活性レベルでも同様の傾向が確認された。これらの結果から、「秋まさり」におけるウイルス抵抗性と連動した AsA 蓄積は、APX や A0 の発現低下による AsA の酸化抑制及び DHAR の発現増加による AsA リサイクルの促進によるものと考えられた。

Rnt1-1 抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加は、ウイルスに対する防御反応の 1 つとして考えられることから、次にその誘導シグナルを同定するため抵抗性誘導シグナルとして報告のある過酸化水素、サリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)、アブシジン酸(ABA)に関してそれらの AsA 蓄積誘導能について調べた。25mM の過酸化水素を処理して酸化ストレスを与えた場合には処理後 1, 6, 12, 24 時間のいずれにおいても AsA 蓄積量が増加する傾向にあった。1, 10, 50, 100mM の SA 処理では 24 時間後に AsA 蓄積量を測定した場合、いずれの濃度でも大きな変化は認められなかった。一方、ジャスモン酸メチル (MeJA) を同じ濃度で処理したところ、10mM 処理で最も AsA 蓄積量の増加が認められ、17%増加した。また、ABA 処理ではいずれの濃度でも AsA 蓄積量が Mock 区よりも減少する傾向にあり、50mM 処理で最大 32%減少した。以上の結果より、過酸化水素及び MeJA 処理によって AsA 蓄積量は増加すると考えられた。

抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加に関与する AsA 酸化・還元経路が過酸化水素や MeJA によってどのように制御されているのか遺伝子の発現レベルで調べたところ、過酸化水素による処理では A0 の発現増加やモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDAHR) の発現低下などが観察されたが、これらは UK1 を接種した場合とは異なる発現パターンで

あった。一方、MeJA 処理の場合は APX の発現量が有意に減少するとともに、DHAR の発現量が有意に増加しており、UK1 を接種した場合の発現パターンと類似した結果となった。MeJA 処理によるこれら遺伝子の発現パターンの変化は酵素活性レベルでも確認された。以上の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性と連動した AsA 蓄積量の増加にはシグナル物質として JA が関与していることが示唆された。しかし、UK1 を接種した場合と異なり MeJA 処理では A0 の活性増加が認められたことから、JA 以外の未知の因子も働いていることが示唆された。

前述の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性と連動した AsA 蓄積量増加には JA がシグナルとして働いていると考えられたことから、JA、JA の類縁体であるジャスモン酸イソロイシン (JA-IIIe) 並びに JA に由来するチュベロン酸 (TA) 及びチュベロン酸グルコシド (TAG) に関して UK1 接種後の蓄積量の変化を調べた。JA は Mock 区、ウイルス接種区とも処理 24 時間後に上昇し、その後 48 時間後の時点では Mock 区に比べてウイルス接種区では蓄積量が 73%低下した。一方で、JA-IIIe や JA から合成される TA 及び TAG はウイルス接種区で蓄積量が高く推移していることが明らかとなった。Mock 区に比べてウイルス接種区で JA-IIIe は接種後 24 時間で約 1.8 倍、TA は接種後 24 時間で約 2.7 倍、TAG は接種後 48 時間で約 3.6 倍の蓄積量を示した。これは、一過的に生合成された JA が速やかにこれらの物質へ変換されていることを示唆していると考えられた。以上の結果から、*Rnt1-1* による抵抗性誘導時においては JA が一過的に増加し、これにより AsA の酸化経路が抑制されるとともに AsA のリサイクル経路が活性化され AsA に蓄積量が増加するものと考えられた。

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2件)

Liu J, Kim B, Kaneko Y, Inukai T and Masuta C. 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* (査読有) 81:180-191(2015)

Fujiwara A, Shimura H, Masuta C, Sano S and Inukai T. Exogenous ascorbic acid derivatives and dehydroascorbic acid are effective antiviral agents against *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa*. *Journal of General Plant Pathology* (査読有) 79:198-204(2013)

[学会発表](計6件)

劉 錦妍・犬飼 剛・増田 税

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 2015 年度日本植物病理学会大会口頭発表

2015 年 3 月 31 日 明治大学(東京都千代田区)

氷川貴大・藤原綾香・犬飼 剛・増田 税
植物におけるアスコルビン酸のウイルス及び糸状菌に対する増殖抑制作用 2014 年度日本植物病理学会北海道部会口頭発表

2014 年 10 月 17 日 かでる 2.7 (北海道札幌市)

劉 錦妍・犬飼 剛・増田 税

カブモザイクウイルスに対するアラビドプシスえそ誘導遺伝子 *TuNI* のプロモーター領域の解析 2014 年度日本植物病理学会大会口頭発表

2014 年 6 月 3 日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

十川聡子・藤原綾香・松浦英幸・犬飼 剛・増田 税

Brassica rapa における抗ウイルス反応とし

てのアスコルビン酸蓄積の誘導メカニズム

2014 年度日本植物病理学会大会口頭発表

2014 年 6 月 3 日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

藤原綾香・氷川貴大・松浦英幸・犬飼 剛・増田 税

ハクサイのカブモザイクウイルスに対する抵抗性と連動したアスコルビン酸の蓄積 2013 年度日本植物病理学会大会口頭発表

2013 年 3 月 28 日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)
藤原綾香・氷川貴大・志村華子・佐野慎亮・増田 税・犬飼 剛

Turnip mosaic virus に感染した *Brassica rapa* におけるアスコルビン酸の抗ウイルス性 2012 年度日本植物病理学会北海道部会口頭発表

2012 年 10 月 19 日 北海道大学(北海道札幌市)

[その他]

日本植物病理学会論文賞受賞 2015 年 3 月 29 日 明治大学(東京都千代田区)

対象論文: Fujiwara A, Shimura H, Masuta C, Sano S and Inukai T. Exogenous ascorbic acid derivatives and dehydroascorbic acid are effective antiviral agents against *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa*. *Journal of General Plant Pathology* 79:198-204(2013)

6. 研究組織

(1)研究代表者

犬飼 剛 (INUKAI, Tsuyoshi)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号: 90223239

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

(4)研究協力者

藤原 綾香 (FUJIWARA, Ayaka)