

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658044

研究課題名(和文) 病原体認識機構に基づく新規植物病害抵抗性遺伝子探索法の開発

研究課題名(英文) Development of novel method for searching plant disease resistance gene based on the pathogen perception mechanism

研究代表者

小林 括平 (KOBAYASHI, Kappei)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：40244587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：植物病害抵抗性遺伝子と相互作用する因子を用いて新規の抵抗性遺伝子を取得することができかどうか検討した。トウガラシのトバモウイルス抵抗性遺伝子Lと相互作用する因子、LIPM1およびLIPM2を用い、ナスのL遺伝子相同配列ライブラリーをスクリーニングした。その結果、LIPM1およびLIPM2ともにL遺伝子相同配列のコードするタンパク質と非特異的に相互作用し、病原体特異性を規定するものではないことが分かった。相互作用因子の機能を発現抑制法で検討した結果、LIPM2は細胞死のシグナルの制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tested whether or not it is possible to isolate novel plant disease resistance gene based on the interaction with protein factors known to interact with known resistance protein. Partial cDNA sequences homologous to pepper tobamovirus resistance gene, L, from an eggplant cultivar were screened for the interaction with LIPM1 and LIPM2, both of which were identified as interaction partners of pepper L resistance protein. The results suggest that the both LIPM1 and LIPM2 interact with diverse L-homolog sequences from eggplant and that they are unlikely to be involved in the determination of pathogen specificity of resistance protein. Gene-silencing study suggest that LIPM2 has a role in the regulation of cell-death signaling.

研究分野：植物ウイルス学

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 抵抗性 タンパク質間相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルス病の防除法のうち、抵抗性品種の利用は最も経済的かつ省力的であるが、全ての作物種で抵抗性品種が利用可能な訳ではなく、また抵抗性を打破するウイルス変異株の出現によって利用不能なる品種群もある。それゆえ、抵抗性品種の育成に必要な抵抗性育種素材とその抵抗性遺伝子に関する情報を数多く提供していくことは、環境負荷の少ない持続的農業の確立に向けて重要である。

我々は、これまでにトウガラシ属作物で利用されているトバモウイルス抵抗性遺伝子、*L* のアレルを7種類単離し、さらにそれらとの塩基配列の相同性を利用してタバコの *N'* 遺伝子を単離した。しかし、*L* および *N'* と同様にトバモウイルスの外被タンパク質 (CP) を認識するナスの抵抗性遺伝子は、塩基配列の相同性に基づく方法では単離できていない。*L* や *N'* と塩基配列の類似性を示す部分断片をナスから多数得たが、同様な抵抗性遺伝子やその偽遺伝子は多数有り、それらを一つずつ単離して機能解析するのは、たとえ一過性発現系を用いるにしても非効率的で長時間と多くの投資を必要とする。

植物の病害抵抗性タンパク質による病原体認識に関する仮説のうち、Collier と Moffett (2009, Trends Plant Sci 14:521) によるベイト&スイッチモデルは、これまでに様々な系で報告された結果を最も矛盾なく説明できる。このモデルでは抵抗性タンパク質に加え、ベイトと呼ばれるコファクターが病原体認識に中心的な役割を果たす。ベイトによって動員された病原体タンパク質を抵抗性タンパク質が認識し、その結果分子スイッチが働き、抵抗性シグナルが発生されるとするモデルである。

我々は、このモデルを参考に *L* タンパク質による病原体認識機構を解析している。その過程で *L* タンパク質と再現性よく相互作用するタンパク質の cDNA、LIPM1 および LIPM2 を既に得ており、これらは *L* タンパク質によるトバモウイルス CP 認識に関わるベイトの有力候補である。そこで、例えばナスの cDNA ライブラリーから LIPM1 と相互作用するタンパク質をスクリーニングすることによって、ナスのトバモウイルス抵抗性遺伝子を効率的に単離できるのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究は、既知のウイルス抵抗性遺伝子産物である *L* による病原体認識機構の解析に基づき、上述の LIPM1 とのタンパク質間相互作用を利用して新規の抵抗性遺伝子探索・単離法を開発することを目的とした。まず、LIPM1 を用いた酵母ツーハイブリッド法によってトウガラシ cDNA ライブラリーから *L* 遺伝子を、他のホモログと識別して単離することができるかどうか検討し、その条件を用いて、これまで未同定であるナスのトバモウイル

ス抵抗性遺伝子を単離することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *L* タンパク質における LIPM1 および LIPM2 相互作用領域の特定

LIPM1 および LIPM2 は、*L* タンパク質の coiled-coil (CC) ドメインを含む N-末端側 200 アミノ酸の配列と相互作用するタンパク質として得られた。*L* タンパク質における LIPM1 および LIPM2 と相互作用する領域を特定する目的で、*L* タンパク質の N-末端側 200 アミノ酸の配列を、N-末端側および C-末端側から 20 アミノ酸ずつ欠失させたものを作製した。それらを LIPM1 あるいは LIPM2 と混合した DNA で酵母を形質転換し、SD-LWH 培地上におけるコロニー形成を指標として相互作用の有無を判定した。

#### (2) *L* 遺伝子ホモログ cDNA ライブラリーの作製と特徴付け

*L* 遺伝子は、トマトのフザリウム抵抗性遺伝子、*I2*、やジャガイモの疫病抵抗性遺伝子、*R3a*、と高い相同性を示し、ナス科植物ゲノム中に多くの構成メンバーをもつ多重遺伝子族 (*I2*-ファミリー) を形成する。そこで、これと近縁の種々の抵抗性遺伝子様配列を取得する目的で、開始コドンから 20 塩基の高度に保存された配列、および、Nucleotide binding ドメインの保存された 5 種類の配列、P-loop, Kinase2, Kinase3, GxP および MHD の領域にプライマーを設計した。増幅産物をクローニングしたのち、塩基配列を決定して *L* 遺伝子ホモログ cDNA ライブラリーの多様性を検討した。

#### (3) LIPM1 および LIPM2 と相互作用するタンパク質をコードする *L* 遺伝子ホモログの選抜

上述の *L* 遺伝子ホモログ cDNA ライブラリーを酵母ツーハイブリッドシステム用のベクター、pLexA-C に酵母の形質転換時に導入できるように、足場となる配列を付加して増幅した。pLexA-C に導入した *L* 遺伝子ホモログ cDNA ライブラリーから LIPM1 あるいは LIPM2 との相互作用によって陽性クローンを選抜する方法として、二種類の方法を用いた。第一の方法では、同ベクターおよびライブラリーと、LIPM1 または LIPM2 配列を導入した酵母ツーハイブリッドシステム用のベクター、pGAD-HA に挿入したものを同時に酵母に形質転換した。第二の方法では、pLexA-C とライブラリーで酵母 NMY51 系統を、pGAD-HA に LIPM1 または LIPM2 を挿入したもので酵母 Y187 系統を形質転換し、それぞれの菌を接合させることによって二倍体細胞内で共存させ、SD-LWH 培地上でのコロニー形成によって LIPM1 あるいは LIPM2 との相互作用の有無を判定した。

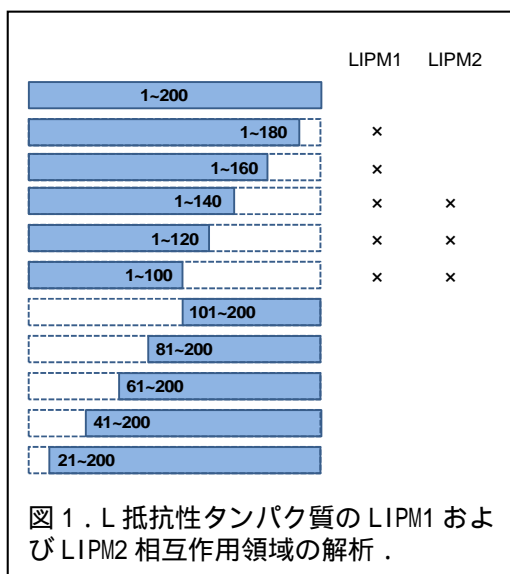
(4) LIPM1 および LIPM2 の発現抑制による機能解析

LIPM1 および LIPM2 が, *L* 遺伝子およびその他の抵抗性遺伝子による過敏反応 (HR) において果たす役割を明らかにする目的で, リング小球形潜在ウイルス (ALSV) ベクターに LIPM1, LIPM2, または両方の配列を挿入し, つまようじを用いたアグロインフェクション法によって, *Nicotiana benthamiana* に感染させた. 陰性対照として ALSV からベクターを, 陽性対照としてはフィットエン脱水素酵素 (PDS) 遺伝子断片を持つ ALSV ベクターを用いた. PSD の発現抑制によって白化した葉と同じ葉齢の葉を用いて抵抗性遺伝子の一過性発現実験を行った. *L* 遺伝子とトマトモザイクウイルス (ToMV) の CP, *Tm-2* 遺伝子とタバコモザイクウイルス (TMV) の移行タンパク質 (MP) および PTO と AVR-PTO の三種の組み合わせをアグロインフィルトレーション法によって一過性に発現させ, 3~5 日後に HR を観察した.

4. 研究成果

(1) L タンパク質における LIPM1 および LIPM2 相互作用領域の特定

LIPM1 および LIPM2 と相互作用する L 抵抗性タンパク質の領域を特定する目的で, L 抵抗性タンパク質の N-末端側 200 アミノ酸の領域において欠失変異解析を行った. その結果, LIPM1 との相互作用には, 101 番から 200 番

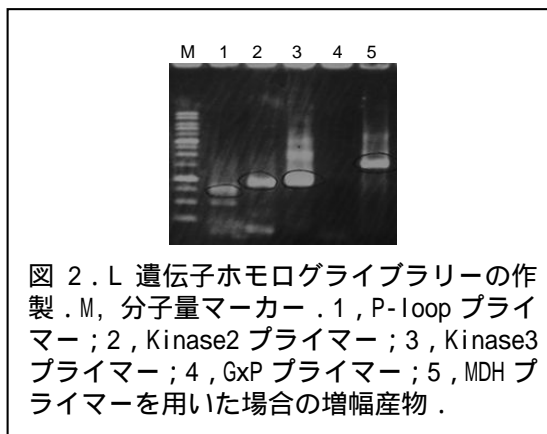


までのアミノ酸残基が必要十分であり, LIPM2 との相互作用には, 101 番から 160 番までのアミノ酸残基が重要であることが示された (図 1). 以上のことから, LIPM2 との相互作用には 12-ファミリーで保存された CC ドメインが関与すること, LIPM1 ではさらにその下流の領域が重要であることが示唆された.

(2) L 遺伝子ホモログ cDNA ライブラリーの作製と特徴付け

トウガラシ (*Capsicum annuum* PI159236)

から 12-ファミリー遺伝子断片の増幅を試みたところ, P-loop, Kinase2, Kinase3, および MHD のプライマーを用いた場合に明確な増幅が認められた (図 2). それらの PCR 増幅産物をクローニングすることを試みたが, MDH ではクローンが得られなかった. 得られたクローンの塩基配列を解析したところ, P-loop のプライマーで最も多様な配列を増幅できたことが分かった.



(3) LIPM1 および LIPM2 と相互作用するタンパク質をコードする L 遺伝子ホモログ

(2) に示したように N-末端保存領域プライマーおよび P-loop プライマーを用いて多様な L 遺伝子ホモログ配列を取得できることが分かったので, これに酵母に導入し, LIPM1 または LIPM2 と相互作用するものの単離を試みた. 当初, ライブラリー用ベクターである pLexA-C, 上述のように PCR 増幅したライブラリー, および LIPM1 または LIPM2 配列を導入した酵母ツーハイブリッドシステム用のベクター, pGAD-HA に挿入したものを同時に酵母に形質転換した. このとき, pGAD-HA からベクターを陰性対照として用いた. この方法では, 陰性対照においても多数のコロニーが SD-LWH 培地上に形成されたことから, ベクター間の組換えなどの予想外の DNA 配列の再編成が起こったと考えられた. そこで, ライブラリー用ベクターの pLexA-C と PCR 増幅したライブラリーを NMY51 株に, LIPM1 または LIPM2 プラスミドを Y187 に形質転換し, それらを接合させることによって, 酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った. その結果, 多数のコロニーが SD-LWH 培地上に形成された. それらの塩基配列を検討したところ, 元のライブラリーと同程度の塩基配列の多様性が認められ, 少なくとも LIPM1 及び LIPM2 を用いて病原体特異的な抵抗性遺伝子を単離することは困難であると考えられた.

(4) LIPM1 および LIPM2 の発現抑制による機能解析

上述の結果から, LIPM1 および LIPM2 は多様な 12-ファミリー抵抗性タンパク質と相互作用する可能性が示唆された. そこで, LIPM1 および/または LIPM2 を, ALSV ベクターを用

いて発現抑制させ、その植物における L 抵抗性遺伝子による HR が影響を受けるかどうか検討した。その結果、LIPM2 を発現抑制すると、HR が促進される傾向が認められた。このことから、少なくとも LIPM2 は L タンパク質からの HR シグナル伝達に關与する可能性が考えられた。この機能が L 遺伝子に特異的なものであるかどうかを明らかにする目的で、12-ファミリー以外の抵抗性遺伝子による HR を LIPM2 発現抑制植物において検討した。その結果、Tm-2 と TMV-MP および PTO と AVR-PTO

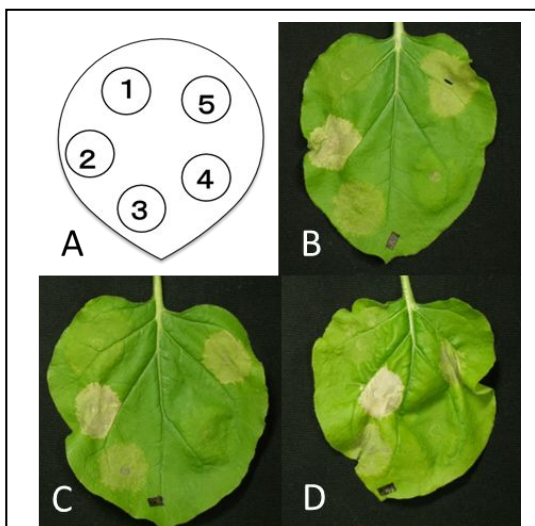


図 3. 発現抑制法による LIPM1 および LIPM2 の機能解析。B, 対照；C, LIPM1 発現抑制植物；D, LIPM2 発現抑制植物。A の 1~5 の部位でそれぞれ、N と p50, Tm-2 と TMV-MP, L と ToMV-CP, GUS および PTO と AVR-PTO を発現させ、各植物における HR 誘導を比較した。

の組み合わせによる HR も促進されることを見出した(図 3)。LIPM2 を発現抑制すると植物体が黄化することから、葉緑体機能と HR の関連を考えるうえで LIPM2 は重要な因子であると考えられる。一方、LIPM1 を発現抑制した場合にも抵抗性遺伝子による HR は影響を受けなかった。このことは LIPM1 が HR とは異なるシグナル伝達に關与するか、抵抗反応において補助的な機能しか果たさない可能性が示唆された。

## 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 2 件)

Kobayashi, K., Sekine, K.-T. and Nishiguchi, M. (2014) Breakdown of plant virus resistance: Can we predict and extend the durability of virus resistance? Journal of General Plant Pathology. 80, 印刷中, 査読有.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10327-014-0527-1>

Sekine, K.-T., Tomita, R., Takeuchi, S., Atsumi, G., Saitoh, H., Mizumoto, H., Kiba, A., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Hikichi, Y. and Kobayashi, K. (2012) Functional differentiation in the LRR domains of closely related plant virus resistance proteins that recognize common Avr proteins. Molecular Plant-Microbe Interactions 25, 1219-1229, 査読有.

[学会発表](計 1 件)

Sekine K.-T., Tomita R., Atsumi G., Chen H., Kaido M., Yamaoka N., Nishiguchi M., Okuno T. and Kobayashi K. The binding affinity to viral coat proteins determines the recognition specificity of allelic L tobamovirus resistance proteins. PS01-076, International congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012 年 7 月 29 日~8 月 2 日, 京都.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 括平 (KOBAYASHI, Kappei)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号: 40244587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし