

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880005

研究課題名(和文) ウイルスサテライトRNAが引き起こす黄化病徴に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanism of yellow symptoms induced by Cucumber mosaic virus Y satellite RNA

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリモザイクウイルス(CMV)とそれに寄生するY-satRNA(Y-sat)がタバコに感染するとCMV単独感染では見られない鮮やかな黄化病徴が観察される。この黄化病徴誘導にCMVやY-satの増殖、siRNAを生産する2本鎖RNA分解酵素DCL2やDCL4、そしてsiRNA量を増幅させる役割を持つRDR6がどのように関わっているかについて様々な解析を行った。DCLの発現抑制実験やY-sat siRNA蓄積量の観察から、DCL4がDCL2よりも黄化誘導に重要であることが分かった。また、RDR6は間接的にY-sat siRNAのレベルに影響を与えるが黄化誘導に必須ではないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Cucumber mosaic virus (CMV) Y satellite RNA (Y-sat) specifically induces a bright yellow mosaic on tobacco through RNA silencing machinery. In this study, I investigated the roles of major RNA silencing components such as DCLs and RDR6 in the Y-sat-mediated yellow induction. By using a virus-induced gene silencing strategy against DCLs and RDR, I found that the accumulation levels of CMV RNAs, Y-sat, DCL2, DCL4 and RDR6 mRNAs changed in a complicated manner interfering with each other. Based on transcript analyses, it was found that DCL4 was more important than DCL2 in affecting the accumulation levels of CMV and Y-sat and thus to generate 21-nt siRNAs of Y-sat. It was also found that Y-sat siRNA levels were positively correlated with the degree of yellowing. In addition, the yellow induction by Y-sat was apparently independent of RDR6, but RDR6 indirectly affects the yellow symptoms because decreased levels of RDR6 enhanced Y-sat siRNA levels and eventually enhanced yellowing.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：ウイルス サテライトRNA RNAサイレンシング 病徴誘導

1. 研究開始当初の背景

サテライト RNA (satRNA) はウイルスに寄生して増殖する低分子 non-coding RNA である。宿主ウイルス (ヘルパーウイルス) の増殖機構に依存して satRNA も増えるため、satRNA が寄生するとヘルパーウイルスの病原性が弱まることが多い。しかし、キュウリモザイクウイルス (CMV) に寄生する satRNA は、CMV の病徴や病原性を強めることが知られており、Y-satRNA (Y-sat) の場合は CMV 単独感染で起こるタバコなどへの緑色モザイク病徴を Y-sat の同時感染により鮮やかな黄化病徴へと変化させる。近年我々は Y-sat はタバコのクロロフィル合成経路の主要遺伝子 (ChII) に 22 塩基の相同配列をもつことを見出した。さらに、Y-sat 感染タバコでは Y-sat 由来の siRNA が生じ、それが RNA サイレンシング機構を通じて ChII mRNA を分解しクロロフィル合成量を低下させることで黄化病徴が生じるということを示した。Y-sat 感染時の黄化誘導は、Y-sat 由来の siRNA が大量に生成されることが引き金となるが、ウイルス感染防除機構として機能する RNA サイレンシングにおいて、二本鎖 RNA 特異的分解酵素 DCL、二本鎖 RNA 複製酵素 RDR などがどのように Y-sat の siRNA 生成に関わるのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、Y-sat 黄化誘導に関わる詳細な分子メカニズムを解明するために、RNA サイレンシングを構成する重要酵素である DCL 及び RDR さらに AGO に着目し、それらが Y-sat の増殖をどのように制御しそして黄化症状の誘導に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 黄化病徴へ及ぼす DCLs の影響の解析 : CMV ベクターを用いた Virus-induced gene silencing (VIGS) により、RNA サイレンシングを構成する各遺伝子の発現を抑制し、それがどのように CMV や Y-sat の増殖そして黄化病徴に影響するのかを調べた。まず、RNA サイレンシング経路の重要な遺伝子である DCL2、DCL4 をそれぞれ組み込んだ CMV ベクターを作製した (CMV-A1:DCL2、CMV-A1:DCL4)。用いる CMV ベクターには、RNA サイレンシングサブプレッサーである 2b タンパク質をもつ CMV-A1 を用いた。作製したサイレンシングベクターを *Nicotiana benthamiana* に接種し、DCL2 および DCL4 の発現量、CMV および Y-sat の増殖量、ChII 発現量をリアルタイム RTPCR により定量した。黄化病徴への影響は目視で観察しコントロールとの病徴を比較した。

(2) 黄化病徴へ及ぼす RDR の影響の解析 : DCL による primary siRNA の生成後、RDR によって合成される secondary siRNA は RNA サ

イレッシングを増強することが知られている。RDR6 はウイルスゲノム RNA から大量の secondary siRNA を生成するとされるが、Y-sat からの siRNA 増幅に関与するかは不明である。そこで VIGS による RDR の発現抑制および *N. benthamiana* RDR6 発現抑制組換え体 (RDR6i) を用いて RDR6 の影響も解析した。*N. benthamiana* の野生型 (WT) および RDR6i に CMV や Y-sat を接種した時の黄化誘導への影響を調べた。Y-sat 増殖量、Y-sat の siRNA 蓄積量はノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。

(3) Y-sat と ChII mRNA の相補性による分解メカニズムの解析 : Y-sat と ChII mRNA の相補性による分解は主に AGO1 が関わりと推定されるが、DCL によっても認識される可能性もある。そこでその仮説を検証するため、in vitro 転写で合成した ChII mRNA と Y-sat、Y-sat の siRNA、精製した DCL あるいは AGO1 の組み合わせで ChII mRNA の切断がおきるかを調べた。また、wheat germ in vitro 翻訳系を利用して Y-sat が ChII mRNA の翻訳阻害を起こしている可能性についても調べた。

4. 研究成果

(1) DCL2 および DCL4 を導入した CMV-A1:DCL2、CMV-A1:DCL4 を作製し野生型 *N. benthamiana* に接種したところ、コントロール個体に比べて DCL2 と DCL4 発現量が減少しており、実際にサイレンシングが誘導できていることを確認した (表 1)。また、コントロールと比較すると VIGS 個体の方が CMV の蓄積量が多かった。これは DCL2 もしくは DCL4 のどちらかの転写量が減少したことによって CMV に対する抵抗性が減衰したからではないかと考えられる。VIGS ベクターとともに Y-sat を接種すると、特に CMV-A1:DCL4 接種個体では CMV 量および Y-sat 量の大きな増加がみられ、RNA サイレンシング経路では DCL2 よりも DCL4 のほうが CMV と Y-sat の分解に影響が大きいことが分かった (表 1)。また、CMV-A1:DCL4 感染個体では DCL2 レベルが増加しているのが確認できたが、DCL2 を VIGS したものでは DCL4 に対して大きな影響を与えなかった。したがって DCL2 は DCL4 の減少を補うために増加することが考えられ、一方で DCL2 を VIGS した際には DCL4 は DCL2 を補わないことが考えられた。さらに、Y-sat 感染個体において、DCL2、DCL4 量の変化で興味深いことがわかった。Y-sat の感染は DCL2 と DCL4 発現を促進し、特に DCL4 発現量は Y-sat の存在下で著しく増加していた (表 1)。この Y-sat 感染による DCL2 および DCL4 の発現量増加は、健全株との発現量を比較すると VIGS による影響をキャンセルするほどであった。ChII 発現量をみたところ、CMV+Y-sat 接種区に比べて、VIGS ベクター+Y-sat 接種区の方が ChII 量は高かったが、それでも CMV 単独感染個体に比べると 50% 低い値であった。そ

して CMV-A1:DCL2 や CMV-A1:DCL4 と Y-sat を接種した試験区では、CMV+Y-sat 接種区と同等の黄化病徴を示していたことから、50%の ChII 発現量低下でも十分に黄化病徴を示すことが分かった。Y-sat を同時に接種した VIGS 個体において VIGS していない個体と同様に鮮やかな黄化症状が起きたのは、Y-sat の感染により DCL2 および DCL4 の発現量が増加し VIGS の効果を打ち消してしまったためであると考えられた。そのため CMV と Y-sat をそれぞれ別の段階で接種することにした。CMV が感染してから 5 日目に Y-sat を感染させることで黄化症状にどのような影響を与えるかを観察した。その結果、CMV-A1:DCL2、CMV-A1:DCL4 と Y-sat を接種した植物体では、CMV+Y-sat 接種区よりも黄化病徴の出現が遅延し(図1) DCL2 および DCL4 は黄化誘導に必要であることが示された。

表1 DCL2およびDCL4をVIGSしたときのDCL2, DCL4, CMVおよびY-sat量の比較

VIGSベクター	Y-satの有無	mRNA量*		CMV RNAs量†	Y-sat量‡
		DCL4	DCL2		
Mock	-	1	1	-	-
CMV-A1:DCL4	-	0.2	1.4	9.1	-
	+	2.6	-	28	64
CMV-A1:DCL2	-	0.8	0.2	12.6	-
	+	-	0.7	3.5	4.3
CMV-A1	-	1.6	0.8	1	-
	+	4.8	1.4	0.5	1

*Mockの値を1としたときの相対値。Y-sat感染時のDCL4量はVIGS影響下でもMockの約3倍であった。

†CMV-A1感染個体の値を1としたときの相対値。Y-sat感染時でも、DCL2のVIGS個体ではCMV量は3.5倍、DCL4のVIGS個体では28倍増加した。

‡CMV-A1+Y-sat感染個体の値を1としたときの相対値。Y-satはDCL2のVIGS個体では約4倍、DCL4のVIGS個体では64倍にも増加した。

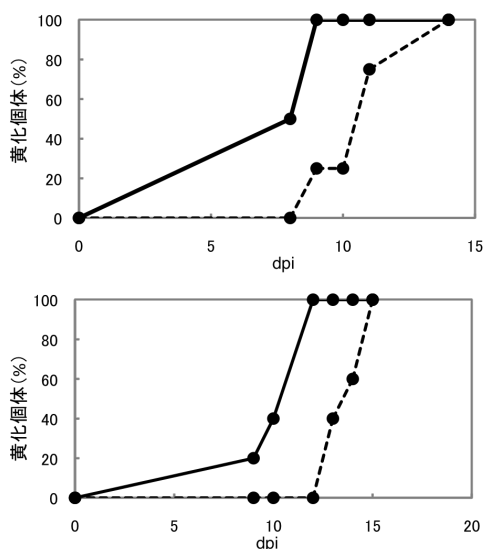


図1. CMV接種後5日目にY-satを接種したときの黄化病徴がでるまでの日数。実線: CMV-A1+Y-sat接種、破線: CMV-A1:DCL2+Y-sat接種(上段)、CMV-A1:DCL4+Y-sat接種(下段) dpi: days post inoculation

(2) RDR6 を導入した CMV ベクター (CMV-A1:RDR6)、RDR6 ノックダウン *N. benthamiana* を用いることで黄化誘導における RDR6 の役割を解析した。CMV-A1:RDR6 を Y-sat とともに *N. benthamiana* (WT) に接種したところ、DCL2 や DCL4 の時のように Y-sat の存在によって RDR6 発現量が上昇した。そこで、*N. benthamiana* (RDR6i) に同様に接種したところ、RDR6 発現量を低く維持できることが分かった。この状態で黄化病徴を観察したところ、CMV-A1:RDR6+Y-sat 接種 RDR6i で、他の接種区よりも顕著な黄化病徴を呈していた。この条件での CMV 量、Y-sat 量をみると、CMV-A1:RDR6+Y-sat 接種 RDR6i では CMV 量、Y-sat 量とも著しく高い値を示していた。他の個体 (CMV-A1+Y-sat 接種 WT、CMV-A1+Y-sat 接種 RDR6i、CMV-A1:RDR6+Y-sat 接種 WT) では、CMV 量と Y-sat 増殖はお互いに複製機構を競合する関係において増殖と減少を繰り返す過程にあったが、CMV-A1:RDR6+Y-sat 接種 RDR6i では、ウイルス感染防御として機能するために必要な RDR6 量を下回るほどに RDR6 量が低下したために、著しい CMV と Y-sat の増殖を引き起こしたと考えられる。また、RDR6 量が非常に低い状態でも Y-sat の高い増殖 (すなわち Y-sat 由来の siRNA の高い蓄積) が起こり黄化病徴を誘導したことから、RDR6 は CMV 量に影響するという間接的な影響を持つが、黄化誘導自体は RDR6 とは独立して生じることが分かった。また、DCL4 や RDR6 の発現量を抑制したときの Y-sat 由来の siRNA の蓄積への影響をノーザンブロットにより解析した。その結果、DCL4 を VIGS した個体では 21nt の Y-sat siRNA が減少しており、DCL4 は Y-sat から 21nt の siRNA 生成に関与することが確認できた(図2)。また、著しい黄化を示した CMV-A1:RDR6+Y-sat 接種 RDR6i では Y-sat 由来の 21nt siRNA、また、ChII との相補配列である SYR 領域の siRNA を多く蓄積していたことから、黄化病徴は Y-sat SYR 領域の siRNA 量を相関していることを確認できた。

(3) In vitro wheatgerm 系を用いて合成した AGO1-FLAG と、YR (ChII 内にある Y-sat に相補的な 22mer の配列) を含む ChII mRNA の部分配列(約 40mer、3 末端側に biotin 修飾) さらに 22nt の SYR (Y-sat 内にある ChII に相補的な 22mer の配列) siRNA を加えて ChII の切断が AGO1 によって起きるかどうかを解析した。その結果、一本鎖の SYR RNA を入れた場合でも、二本鎖の SYR RNA を入れた場合でも ChII の切断産物を確認することができた。このことから Y-sat が誘導する黄化病徴は SYR siRNA を取り込んだ AGO1 によって ChII mRNA が確かに切断されることによって起きているということを示すことができた。Y-sat が引き起こす黄化病徴のメカニズムには ChII タンパクの翻訳阻害も関わっているのではないかと考えたことが

た、wheatgerm 内に ChII mRNA と SYR を加えた場合に翻訳阻害が起きるかどうかを調べた。その結果、SYR RNA を加えた際に ChII タンパク量は減少することがわかったが、RNA 量を解析したところ ChII の RNA もまた減少していた。Wheatgerm 内の AGO1 はすでに sRNA を取り込んだ状態とされスライサー活性がないことから、SYR RNA の存在下で ChII mRNA 量が減少したのは AGO1 を介さない分解メカニズムがあるのではないかと考えた。そこで ChII mRNA の in vitro 切断実験を DCL4-DRB4 免疫沈降画分を用いた場合についても検討した。その結果、DCL4-DRB4 免疫沈降画分と Y-sat との共存培養でも ChII が切断されることを確認し、Y-sat と ChII の相補的結合は AGO 以外に DCL によっても認識される可能性が示唆された。

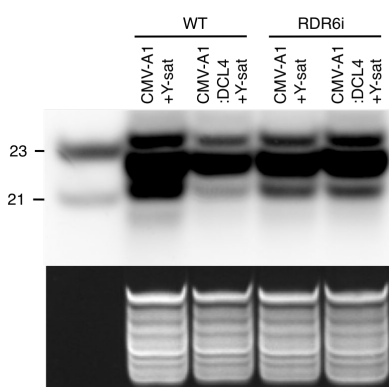


図2. ウイルス接種後4日目のY-satのsiRNA蓄積量。CMV-A1:DCL4接種個体(WT)では21ntのsiRNA量の減少が確認された。RDR6iに接種した場合にはCMV量、Y-sat量の増加量が高いため21nt siRNA量に違いはみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Masuta C, Shimura H. RNA silencing against viruses: molecular arms race between Cucumber mosaic virus and its host. (2013) *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 227-232. (査読有り)

志村華子, 増田税. CMV-Y サテライト RNA による黄化誘導メカニズム. (2013) ウイルス病研究会レポート 11 (ISSN 0919-2956), 29-36. (査読なし)

Shimura H, Masuta C, Yoshida N, Sueda K, Suzuki M. The 2b protein of Asparagus virus 2 functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. (2013) *Virology.* 442: 180-188. (査読有り)

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

(査読有り)

志村華子, 増田税. 植物の RNA サイレンシングとウイルスの病徴誘導. (2012) *ウイルス* 62(1), 19-26. (査読有り)

Wang MB, Masuta C, Smith NA, Shimura H. RNA silencing and plant viral diseases. (2012) *Mol Plant Microbe Interact.* 25 (10): 1275-1285. (査読有り)

Masuta C, Inaba J, Shimura H. The 2b proteins of Cucumber mosaic virus generally have the potential to differentially induce necrosis on *Arabidopsis*. (2012) *Plant Signal. Behav.* 7:43-45. (査読有り)

Takeshita M, Koizumi E, Noguchi M, Sueda K, Shimura H, Ishikawa N, Matsuura H, Ohshima K, Natsuaki T, Kuwata S, Furuya N, Tsuchiya K, Masuta C. Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between Cucumber mosaic virus and Turnip mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* (2012) 25:18-27. (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

内尾圭文, 志村華子, 増田 税「キュウリモザイクウイルスYサテライト RNA によるタバコ黄化誘導機構: DCL4 および RDR6 の役割」日本植物細胞分子生物学会 2013.9.10~2013.9.12.北海道大学

増田税, 志村華子「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(招待講演) 2013.3.30. 岐阜大学

〔図書〕(計1件)

Shimura, H., Masuta, C. Structural and Functional Analysis of CMV Satellite RNAs in RNA silencing. In *Antiviral Resistance in Plants: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Edited by J.M. Watson and M.-B. Wang, The Humana Press Inc., New Jersey, USA, (2012) Vol. 894.p273-p286.

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 華子 (SHIMURA, Hanako)

北海道大学大学院農学研究院・助教

研究者番号: 20507230