

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26450052  
研究課題名(和文)細胞死に依存しない植物抵抗性誘導系を活用したウイルス細胞間移行の抑止機構の研究  
  
研究課題名(英文) Study on mechanisms of inhibition of virus cell-to-cell movement by using cell death-independent plant resistance  
  
研究代表者  
佐々木 信光 (Sasaki, Nobumitsu)  
  
東京農工大学・学術研究支援総合センター・助教  
  
研究者番号：70431971  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タバコの抵抗性因子Nとタバコモザイクウイルス因子p50との相互作用によってタバコ近縁種(ニコチアナ・ベンサムアナ)に誘導されるウイルス増殖抑制作用の分子機構を調べた。その結果、このウイルス増殖抑制は、細胞死誘導に依存していないこと、活性酸素種の急激な発生が関与していること、ウイルスの細胞間移行タンパク質の機能が阻害されていること、およびテルペノイド合成系遺伝子の発現上昇が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, molecular mechanisms to inhibitory effects on virus amplification that are induced in a tobacco-related species (*Nicotiana benthamiana*) by the interaction between the tobacco resistant factor N and the tobacco mosaic virus factor p50 are investigated. Results indicate the possibilities that the virus resistance is independent of cell death induction, may require rapid production of reactive oxygen species, may interfere with the function of virus cell-to-cell movement protein, and may involve the upregulation of genes for terpenoid biosynthesis.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルス抵抗性 過敏反応 細胞死 エリシター 細胞間移行 移行タンパク質 トバモウイルス  
プラズモデスマータ

## 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスが感染細胞から非感染細胞へと移行する過程である「細胞間移行」は、ウイルスの感染量や感染範囲を決定する重要な感染過程である。一方、ウイルス感染に対する植物の代表的な抵抗反応の一つとされている「過敏感反応(以下、HR)」は、植物の抵抗性因子と病原体の誘導因子(エリシター)との相互作用の結果、ウイルス感染組織が細胞死を誘起し、当該ウイルスを局所的に封じ込める現象とされる。ところが、実際には、細胞死が起きていない周辺組織にもウイルスは存在することから、HRにおけるウイルス抵抗性の本質は、単なる細胞死によるウイルス封じ込めではなく、ウイルスの細胞間移行を抑制する(移行抑制)作用にあると言える。近年、HRの分子機構の解明が国際的に盛んに行われ、細胞死誘導に関与する遺伝子が多数報告されてきているが、HRによって細胞間移行がどのように抑制されるのかという疑問はほとんど解明されていない。細胞死という目に見える現象に注目が集まりがちであるが、細胞死の裏に潜む移行抑制作用の分子機構を理解することが効果的なウイルス防除法の開発を行う上で極めて重要となっていた。タバコモザイクウイルス(TMV)とタバコ(*Nicotiana tabacum*)の抵抗性因子であるN因子は、HR研究の代表的なモデル材料である。申請者は、このTMV-N因子抵抗性誘導の分子機構を研究してきた。その研究の中で、TMV由来のエリシター(p50)とN因子をアグロバクテリウム浸潤法によってタバコの近縁種である*N. benthamiana*に一過的に発現したところ、明瞭な細胞死を起こさずにウイルス抵抗性だけが誘導されることを見出した。具体的には、ER局在型GFPをコードするトマトモザイクウイルス(ToMV-erGFP: ToMVはTMV近縁種でありN因子が抵抗性因子として働く)をNと共発現する葉ではウイルス複製を示すGFPの蛍光範囲が著しく減少しており、ToMV感染に対するNの抵抗性が誘導されていた。さらに、Nとp50を共発現した葉では、ほとんどの蛍光が1細胞に留まっており、複製できるが細胞間移行がほぼ完全に抑制されていた。よって、本実験系を用いてGFP蛍光を指標に移行抑制作用のみが誘導された組織を切り出し、細胞死に依存しない抵抗性に特異的な遺伝子発現の解析が可能となった。また、N因子に関する従来の研究では、ウイルスの細胞間移行に必須のウイルス因子である移行タンパク質(MP)の機能に着目した実験はほとんど行われていなかった。Nとp50の共発現により移行抑制作用を誘導した組織におけるMPの局在や動態を調べることはウイルス抵抗性の本質を明らかにする上で重要であると考えた。以上の経緯から本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

ウイルス抵抗性の代表例である過敏感反応

は、細胞死を伴うウイルスの局所的封じ込め反応であるとされるが、実際には細胞死とは別にウイルスの細胞間移行を抑止する抵抗反応が起こっている。しかしながら、これまでの研究では細胞死の誘導機構と区別することができず、その移行抑制作用の分子機構は不明である。本研究では、タバコの抵抗性因子Nとウイルスエリシターの共発現によってタバコ類縁種で細胞死を伴わないウイルス抵抗性を誘導する独自の実験系を用いて、細胞間移行に着目した遺伝子発現解析およびウイルス因子の機能解析を行い、効果的なウイルス抵抗性植物の開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *N. benthamiana*におけるN抵抗性誘導の最適化

N因子、p50およびToMVの遺伝子導入用アグロバクテリウムの混合比を変え、*N. benthamiana*に浸潤し、ウイルス抵抗性を誘導する最適な条件を調べた。ウイルス抵抗性の強度は、ToMV-erGFP感染細胞のサイズ(GFP蛍光を放つ細胞数)を指標として判断した。濁度調整用として、EVをもつアグロバクテリウムを浸潤した。

### (2) イオン流出度の測定

アグロバクテリウムを浸潤させた組織を1.0 mLの滅菌RO水で3時間振とうさせ、伝導率測定器を用いて電気伝導率を計測した。さらに、計測に用いた水を元のチューブに戻してオートクレーブを行い、試料内の全イオンを水中に流出させた。オートクレーブ後の電気伝導率に対する振とう直後の電気伝導率の割合を算出し、「イオン流出度」とした。

### (3) 活性酸素種(ROS)の測定

アグロバクテリウムを浸潤した一定時間後に、活性酸素種と反応する化学発光基質L-012を浸潤し、イメージアナライザーを用いて化学発光を検出した。ImageJを用いて化学発光量を計測した。陽性対照実験として、オオタバコモザイクウイルス(PIAMV)の複製酵素のヘリカーゼドメイン(HEL)を発現するアグロバクテリウムを用いた。

### (4) MPの局在解析

N因子、p50およびGFP融合型MPをコードするToMV(ToMV-MPGFP)の遺伝子導入用アグロバクテリウムを*N. benthamiana*に浸潤し、48時間後のGFPの蛍光を観察した。対照実験には、ToMV-MPGFPを導入させる代わりに、EVをもつアグロバクテリウムを浸潤した。また、アグロバクテリウム浸潤後72時間目の組織を切り取り、0.75 mMのソルビトール溶液に3時間浸して原形質分離を誘導し、プラズモデスマータへの局在を観察した。また、mCherry融合型プラズモデスマータ局在性タンパク質(PDLP-mCherry)を用いて、植物由来のタンパク質の細胞内局在に対するN抵抗性の影響を調べた。

### (5) N抵抗性を誘導した組織における抵抗性

### 関連遺伝子の発現解析

N と p50 の共発現によるウイルス抵抗性は、アグロバクテリウム浸潤後 24 時間から 36 時間までに誘導されていると考えられた。そこで、N 因子および p50 の遺伝子導入用アグロバクテリウムを *N. benthamiana* に浸潤してから、24、30、36 時間後の組織を回収して全 RNA を抽出し、エンドポイント RT-PCR 法を用いて、サリチル酸シグナル経路のマーカー遺伝子である *PR1a* と HR マーカー遺伝子である *Hin1* の発現量を調べた。

### (6) N 抵抗性を誘導した組織における網羅的遺伝子発現解析

実験(5)と同様に、N 因子および p50 の遺伝子導入用アグロバクテリウムを *N. benthamiana* に浸潤してから、24、30、36 時間後の組織を回収して全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法 (ペアエンド) を用いて内在性遺伝子の網羅的な発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *N. benthamiana* における N 抵抗性誘導の最適化

N 抵抗性誘導の最適条件の検討を行った結果、N と p50 の菌液の OD600 値が各 0.05 になるように混合することで、細胞死を誘導せずに ToMV-erGFP の細胞間移行を著しく抑制するようなウイルス抵抗性を十分に誘導できることを明らかにした (図 1)。また、N 単独の発現ではウイルス抵抗性はほとんど誘導できないが、p50 単独の発現の場合は、ある程度の抵抗性が誘導できることが分かった (データなし)。

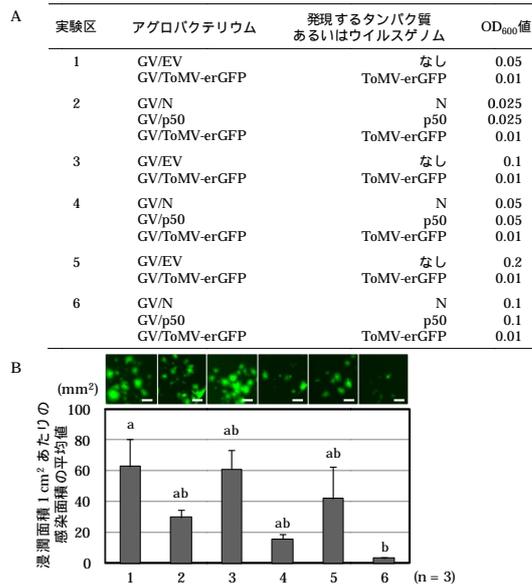


図 1 N 抵抗性誘導の最適化

### (2) イオン流出度の測定

N と p50 の OD600 値を各 0.05 にした上で、

OD600 値が 0.1~0.4 になるように EV の菌液を加えると、ウイルス抵抗性が増強されることを明らかにした (データなし)。また、EV の菌液量の増加にともなって、裏表皮の外観が変化し光沢化が見られた。そこで、アグロバクテリウム浸潤後 48 時間、72 時間目に電気伝導率の測定を行った。その結果、電気伝導率に有意な差はみられず (データなし)、裏表皮の光沢化とイオン流出との明確な相関は確認できなかった。ただし、電気伝導率計の精度が不十分であるため、さらに精度の高いイオン流出測定法を用いて検証する必要がある。

### (3) 活性酸素種 (ROS) の測定

アグロバクテリウム浸潤後 24 時間、36 時間、48 時間目に ROS 産生量を測定した結果、N 抵抗性が誘導されている組織 (N+p50) では、浸潤 36 時間目に ROS の急激な産生が誘導されることが示された (図 2)。EV の菌液のみを浸潤した組織 (EV) では ROS はほとんど発生せず、HEL を発現させた組織 (HEL+EV) では、浸潤 24 時間目に ROS の急激な産生が誘導された。このことから、N と p50 の共発現によるウイルス抵抗性の誘導には ROS の急激な発生を伴うことが示唆された。

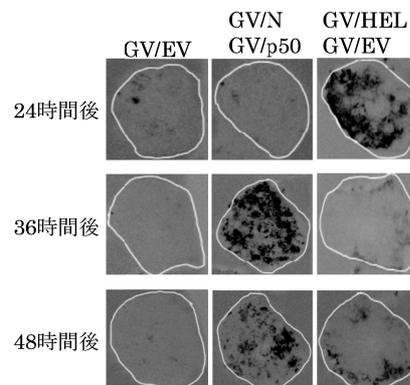


図 2 N 抵抗性誘導組織における ROS の検出

### (4) MP の局在解析

N 抵抗性を誘導した組織 (N+p50) において、ToMV-MPGFP の感染が一細胞に留まっている場合、MP が細胞質に大きな凝集を形成しており、プラズモデスマータに局在していない様子が観察された。さらに原形質分離を誘導した結果、MP の蛍光が細胞壁から遊離し、プラズモデスマータに局在していないことが確認された (図 3)。さらに、N 抵抗性を誘導した場合、PDLP の細胞内局在には明確な変化が見られなかった (データなし)。このことから、N 抵抗性はウイルス因子の細胞内局在を特異的に変化させている可能性が示唆された。ただし、他の細胞小器官マーカーを用いて検証を続ける必要がある。

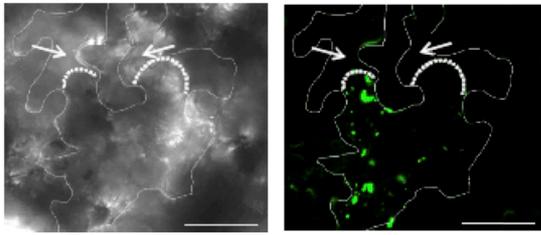


図3 N 抵抗性が誘導された細胞における GFP 融合型 MP の原形質分離後の細胞内局在 (矢印はアポプラストを示す)

(5) N 抵抗性を誘導した組織における抵抗性関連遺伝子の発現解析

エンドポイント RT-PCR 法を用いて、アグロバクテリウム浸潤 24 時間、30 時間、および 36 時間後の *PR1a* と *Hin1* の発現量を調べた。その結果、*PR1a* については、いずれの時間においても対照実験区との発現量の差異は認められなかった (図 4、上段泳動図)。*Hin1* については、36 時間後で発現量が上昇している可能性が示唆された (図 4、下段泳動図)。このことは、ウイルス抵抗性誘導時にサリチル酸経路が活性化していない可能性を示唆しており、予想外の結果となった。

実験区	アグロバクテリウム	発現するタンパク質 あるいはウイルスゲノム	OD <sub>600</sub> 値
1	GV/EV	なし	0.1
	GV/ToMV-erGFP	ToMV-erGFP	0.01
2	GV/N	N	0.05
	GV/p50	p50	0.05
	GV/ToMV-erGFP	ToMV-erGFP	0.01

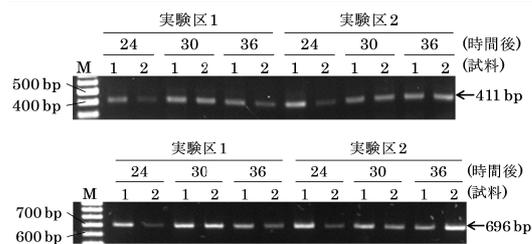


図4 N 抵抗性誘導した組織における 遺伝子発現変動の解析

(6) N 抵抗性を誘導した組織における網羅的 遺伝子発現解析

RNA-Seq 法による遺伝子発現解析の結果、6 つの解析サンプルについて、リード数が各 1,200 万~1,500 万リードで、総塩基数が各 3.5 ギガ~4.5 ギガのデータを得た。興味深いことに、発現量が増加する遺伝子としてテルペノイド合成系の遺伝子が目立っていた (図 5)。このことから、ウイルス抵抗性にテルペノイドが重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、さらにデータを詳細に解析し、ウイルス抵抗性に関連する遺伝子群の同定に繋げていく必要がある。

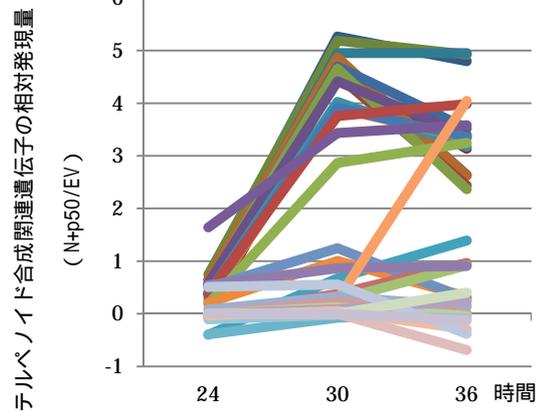


図5 N 抵抗性誘導時のテルペノイド合成 関連遺伝子の発現変動

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)

Sasaki Nobumitsu, Matsumaru Masamichi, Odaira Shota, Nakata Atsumi, Nakata Keiko, Nakayama Ippei, Yamaguchi Kota, Nyunoya Hiroshi, Transient expression of tobacco BBF1-related Dof proteins, BBF2 and BBF3, upregulates genes involved in virus resistance and pathogen defense, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 査読有、89号、2015、pp.70-77、<https://doi.org/10.1016/j.pmp.2014.12.005>

Akihiro Hiraguri, Osamu Netsu, Nobumitsu Sasaki, Hiroshi Nyunoya, Takahide Sasaya, Recent progress in research on cell-to-cell movement of rice viruses, *Frontiers in Microbiology*, section Virology, 査読有、on line publication、DOI: 10.3389/fmicb.2014.00210

[学会発表](計6件)

高島永太、佐々木信光、丹生谷博、トマトモザイクウイルス感染はタバコのレモリン膜タンパク質 NtREM の細胞内局在を変化させる、平成 28 年度日本植物病理学会関東部会、2016 年 9 月 29 日、横浜国立大学(神奈川)

村上智哉、高岡万純、佐々木信光、丹生谷博、抵抗性因子 N とタバコモザイクウイルスエリシターの共発現がトマトモザイクウイルス感染を抑制するメカニズムの解析、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 23 日、岡山コンベンションセンター(岡山)

村上智哉、高岡万純、佐々木信光、丹生谷博、タバコモザイクウイルスのヘリカ

ーゼ領域の一過的発現による近縁トバモウイルスに対する感染抑制効果の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫)

山家美歩、松沢健太、佐々木信光、丹生谷博、ウイルス抵抗性遺伝子 N のイントロン配列の遺伝子発現およびエリシターによる細胞死誘導における役割、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015 年 3 月 31 日、明治大学(東京)

Tomoya Murakami、Nobumitsu Sasaki、Hiroshi Nyunoya、Induction of virus resistance by the transient expression of the tobacco resistance factor N and a tobamovirus elicitor in *Nicotiana benthamiana*、The 3rd Korea-Japan Join Symposium、2014 年 10 月 23 日、釜山(韓国)

村上知哉、佐々木信光、丹生谷博、細胞死非依存型のウイルス抵抗性誘導系の確立、平成 26 年度植物感染生理談話会、作並温泉(宮城)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~bio/course/006/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 信光 (SASAKI, Nobumitsu)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・助教

研究者番号：70431971

### (2) 研究分担者

丹生谷 博 (NYUNOYA, Hiroshi)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・教授

研究者番号：60135936