

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850231

研究課題名(和文)植物RNAウイルスによるプログラム細胞死抑制機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of plant RNA virus-mediated inhibition of programmed cell death

研究代表者

小松 健 (Komatsu, Ken)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60451837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オオバコモザイクウイルス(PIAMV)は*Nicotiana benthamiana*にプログラム細胞死(PCD)を伴う全身壊死を引き起こす。本ウイルスの変異体の壊死誘導能を解析したところ、外被タンパク質(CP)遺伝子への変異、特に細胞間移行に必要なCPの3番目のアミノ酸ロイシンの変異体(L3A)の壊死誘導能が高いことが分かった。また酵母two-hybrid法によりCPとPCD誘導能を持つPIAMVの複製酵素のHELドメインとの相互作用が示唆されたが、L3A変異では相互作用の強さは変わらず、CPによるPCD抑制はHELとの相互作用によるものではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) is a plant RNA virus and induces systemic necrosis in its infected *Nicotiana benthamiana* plants, which is associated with programmed cell death (PCD). In this project, we constructed PIAMV mutants and analyzed its necrosis-inducing ability, and found that PIAMV with mutation in its coat protein (CP) gene induced more severe necrosis in plants. This enhancement of necrosis-inducing ability is also observed in a PIAMV mutant that possesses leucine (residue in the 3rd position of CP) to alanine (L3A) mutation, which is important for its cell-to-cell movement function. Moreover, although yeast two-hybrid analysis revealed interaction between CP and helicase domain (HEL) of a replicase, which is an elicitor of necrosis, L3A mutation of CP did not abolish this interaction. This implied that CP and HEL interaction is not responsible for the PCD (necrosis) inhibition by CP.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス

1. 研究開始当初の背景

植物はウイルスの感染に対し、さまざまな防御応答反応を誘導しその増殖を抑制する。そのなかでも最も代表的なものが、ウイルスの初期感染細胞で迅速に誘導され、ウイルスをその部位に封じ込めるプログラム細胞死 (programmed cell death:PCD)である。最近の研究は、PCD がウイルスの感染が成立しない場合だけではなく、植物ウイルスが宿主に全身感染し「全身壊死」の病徴を示す場合にも誘導されることを示しており、植物が多くウイルスに対し PCD を誘導しうることを明らかにしつつある。

一方で、植物病原菌類、細菌を中心とする近年の急速な研究の進展は、病原体がエフェクターと呼ばれる病原性因子により、植物の PCD を抑制して感染を成立させる過程を明らかにしてきた [PNAS 2006. 103:2851-56; Science 2006. 311:222-226]。このことは、PCD の抑制という戦略が、特に生細胞が増殖に必要なウイルスなどの病原微生物の感染の成立に大きく寄与していることを示唆している。しかしながら、植物ウイルスがこれに対抗する機構が存在するかどうかは未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、PCD を伴う全身壊死を植物に引き起こす RNA ウイルスを材料として、これまで未解明の、植物ウイルスによる宿主の PCD 抑制機構の存在を明らかにすることを目的とする。並行して、植物ウイルスの PCD 誘導機構の多様性を明らかにすることで、PCD を引き起こさないウイルスがどのように植物の防御応答を回避しているかについて重要な知見が得られると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は主に以下の手法で行った。

(1) タバコ属のモデル植物 *Nicotiana benthamiana* に感染し PCD を伴う全身壊死を引き起こすオオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) の各遺伝子の変異体を作成する。それぞれの変異体を *N. benthamiana* にアグロインフィルトレーション法により感染させ、PCD 誘導の程度を調べる。

(2) (1) で PCD 誘導能が上がっていた変異 PIAMV は、変異の入っているタンパク質が PCD 抑制能を持つと考えられる。そのタンパク質で重要な機能を持つアミノ酸に変異を導入し、PCD 誘導を直接に引き起こすタンパク質との相互作用を解析することで、ウイルス感染に重要な機能と PCD 抑制能の関係を明らかにする。

(3) 上記で用いている PIAMV とは系統的に離れた植物 RNA ウイルス、ダイコンモザイク

ウイルス (*Radish mosaic virus*; RaMV) のコードする各タンパク質を *N. benthamiana* においてアグロインフィルトレーション法により一過的発現させ、PCD 誘導能を持つタンパク質を同定する。そのタンパク質の局在を解析し、PCD 誘導機構を解析する。

4. 研究成果

(1) PIAMV の CP 変異体は壊死がより強く生じる

アルファフレクシウイルス科ポテックスウイルス属のオオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) の Li1 分離株は、*Nicotiana benthamiana* に PCD を伴う全身壊死を引き起こし、この壊死は複製酵素のヘリカーゼドメイン (HEL) により誘導されることが分かっている。そこで、Li1 の複製酵素以外の、トリプルジーンブロックタンパク質 1、2、3 (TGBp1,2,3) および外被タンパク質 (CP) をそれぞれ発現しなくなる変異体を作成し、アグロインフィルトレーションにより *N. benthamiana* に接種し病徴を観察した。

その結果、CP を発現しないウイルスは、細胞間移行が生じていないにも関わらず接種葉で激しい壊死が生じた。さらに、TGBp1,2,3 を発現しなくなる変異との組み合わせにより、接種葉でのウイルスの蓄積量に関わらず、CP 変異により Li1 感染時の壊死が強まる、すなわち CP が PCD を抑制している可能性が示唆された。

(2) CP の PCD 抑制メカニズムの解析

(1) における CP 変異体の壊死の激化は、Ozeki et al., 2009 で示されたウイルスの細胞間移行に必要な CP の 3 番目のロイシンのアラニン変異体 (L3A) でも再現され、この際ウイルスの蓄積量は変わらないことがノーザンブロット解析により示された。また、PIAMV と同属のウイルスである Bamboo mosaic virus において CP と HEL が相互作用するとの知見があるが (Lee et al., 2011 J. Virol) PIAMV においても、酵母 two-hybrid 法により CP と PCD 誘導能を持つ PIAMV の複製酵素のドメインである HEL との相互作用が示唆された。しかし、L3A 変異では相互作用の強さは変わらず、CP による PCD 抑制は壊死を誘導するエリシタータンパク質との相互作用によるものではないと考えられた。

(3) RaMV の PCD を伴う全身壊死のメカニズムの解析

植物ウイルスの PCD 誘導機構の多様性を明らかにする目的で、セコウイルス科コモウウイルス属のダイコンモザイクウイルス (*Radish mosaic virus*; RaMV) が *N. benthamiana* に引き起こす全身壊死のエリシターの同定を試みた。

RaMV 感染植物の接種葉および上位葉において、複数の防御関連遺伝子の発現上昇が認められた。さらに壊死が誘導される茎頂周辺組織において、核 DNA の断片化が確認され、PCD が誘導されていることが分かった。アグロインフィルトレーション法により RaMV の各ウイルスタンパク質を一過的に発現させたところ、ヘリカーゼタンパク質 (Hel) を発現させた場合に壊死が認められた。また、この PCD 誘導には、Hel の N 末端側に存在する両親媒性ヘリックスが小胞体膜に局在し、元来ネットワーク状の膜において小胞形成を引き起こすことが関与していることがわかった。

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 9 件)

全て査読あり

Fujita N, Komatsu K., Neriya Y., Kagiwada S., Hara S., Miyazaki A., Netsu O., Hashimoto M., Yamaji Y., Namba S. Complete genome sequence of a Japanese isolate of Daphne virus S. *Cytologia* 80: 327-330. 2015.

Komatsu K., Maejima K., Fujita N., Netsu O., Tomomitsu T., Arie T., Teraoka T., Namba S. A detection method based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for a genetically heterogeneous plantago asiatica mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology* 81: 297-303. 2015.

Miura C., Komatsu K., Maejima K., Nijo T., Kitazawa Y., Tomomitsu T., Yusa A., Himeno M., Oshima K., Namba S. Functional characterization of the principal sigma factor RpoD of phytoplasmas via an *in vitro* transcription assay. *Scientific Reports* 5: 11893. 2015.

Netsu O., Hiraguri A., Uehara-Ichiki T., Komatsu K., Sasaya T. Functional comparison of RNA silencing suppressor between the p5 protein of rice grassy stunt virus and the p3 protein of rice stripe virus. *Virus Research* 203: 10-19. 2015.

Hashimoto M., Komatsu K., Iwai R., Keima T., Maejima K., Shiraishi T., Ishikawa K., Yoshida T., Kitazawa Y., Okano Y., Yamaji Y., Namba S. Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 675-688. 2015.

Ishikawa K., Miura C., Maejima K., Komatsu K., Hashimoto M., Tomomitsu T., Fukuoka M., Yusa A., Yamaji Y., Namba S. Nucleocapsid protein from fig mosaic virus forms cytoplasmic agglomerates that are hauled by endoplasmic reticulum streaming. *Journal of Virology*, 89:480-491. 2015.

Minato N., Himeno M., Hoshi A., Maejima K., Komatsu K., Takebayashi Y., Kasahara H., Yusa A., Yamaji Y., Oshima K., Kamiya Y., Namba S. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports* 4: 7399. 2014.

Yoshida T., Kitazawa Y., Komatsu K., Neriya Y., Ishikawa K., Fujita N., Hashimoto M., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. Complete nucleotide sequence and genome structure of a Japanese isolate of hibiscus latent Fort Pierce virus, a unique tobamovirus that contains an internal poly(A) region in its 3' end. *Archives of Virology*, 159:3161-3165. 2014.

Minato N., Komatsu K., Okano Y., Maejima K., Ozeki J., Senshu H., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. Efficient foreign gene expression *in planta* using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Archives of Virology* 159: 885-896. 2014.

[学会発表](計 8 件)

全て査読あり

鈴木健央、有江力、寺岡徹、小松健
「*Nicotiana benthamiana* のプロトプラスト
を用いたオオバコモザイクウイルスの複製
量の解析」平成 28 年度日本植物病理学会本
大会、平成 28 年 3 月 22 日、岡山コンベン
ションセンター（岡山県岡山市）

松尾優希、鈴木健央、有江力、寺岡徹、小
松健「GFP 発現ウイルスベクターを用いたプ
ラントアクチベータ の植物 RNA ウイルス感
染抑制効果の評価系構築」平成 28 年度日本
植物病理学会本大会、平成 28 年 3 月 22 日、
岡山コンベンションセンター（岡山県岡山
市）

小松健、福原敏行、有江力、寺岡徹、児玉
基一朗、森山裕充「*Alternaria alternata* に
感染する 3 種類のマイコウイルスのゲノム構
造と系統解析」平成 28 年度日本植物病理学
会本大会、平成 28 年 3 月 22 日、岡山コンベ
ンションセンター（岡山県岡山市）

小松健、松尾優希、鈴木健央、寺岡徹、有
江力「プラントアクチベータのウイルス感
染抑制効果の検定系の確立」日本農薬学会第
41 回大会、平成 28 年 3 月 18 日、島根大学松
江キャンパス（島根県松江市）

橋本将典・遊佐礼・友光達哉・桂馬拓也・
岡野夕香里・小松健・山次康幸・難波成任「ダ
イコンモザイクウイルスの感染による茎頂
壊死の誘導因子」平成 27 年度日本植物病理
学会創立 100 周年記念大会、平成 27 年 3 月
31 日、明治大学（東京都千代田区）

小松健・藤田尚子・有江力・寺岡徹・森山
裕充「イネいもち病菌マイコウイルス MoCV1
の RT-LAMP を用いた検出系の確立」平成 27
年度日本植物病理学会創立 100 周年記念大会、
平成 27 年 3 月 31 日、明治大学（東京都千代
田区）

小松健・前島健作・藤田尚子・友光達哉・
松田健太郎・山次康幸・有江力・寺岡徹・
難波成任「種内ゲノム変異の大きなポテッ
クスウイルス種の RT-LAMP を用いた検出法
の確立」平成 26 年度日本植物病理学会関東
部会、平成 26 年 9 月 11 日、宇都宮大学（栃
木県宇都宮市）

小松健・湊菜未・北沢優悟・岡野夕香里・
前島健作・山次康幸・難波成任「オオバコモ
ザイクウイルス (*plantago asiatica* mosaic
virus; PIAMV) を用いた外来遺伝子発現ベク
ターの構築」平成 26 年度日本植物病理学会
本大会、平成 26 年 6 月 4 日、札幌コンベン
ションセンター（北海道札幌市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 健 (KOMATSU, Ken)
東京農工大学大学院・農学研究院・特任准
教授
研究者番号：60451837

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：