

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06420

研究課題名(和文)植物免疫機構の転用によるウイルス誘導性免疫不全

研究課題名(英文)Virus-mediated suppression of plant innate immunity

研究代表者

兵頭 究 (Hyodo, Kiwamu)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：80757881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、病原体の侵入を認識し、一連の防御反応を引き起こす免疫機構をもっている。活性酸素種産生酵素RBOHタンパク質は植物免疫における鍵因子の一つである。本研究では、植物ウイルスが自身の増殖のためにRBOHタンパク質をハイジャックすることを見出し、その分子機構の解析を行った。さらに、植物ウイルス感染が宿主免疫システムに干渉することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Plants have a multitier surveillance system that recognizes invading microbial pathogens using plasma membrane-localized and intracellular immune receptors. An RBOH (respiratory burst oxidase homolog) protein plays a key role in plant innate immunity. In this study, we found that a plant virus hijacks a host ROS generating enzyme RBOH for its multiplication. We also found that a plant virus infection can interfere with host immune responses.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 植物免疫 活性酸素種 カルシウム依存性タンパク質キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、病原体の侵入を認識し、活性酸素種 (ROS) 産生やMAPキナーゼ (MAPK) 活性化を介した一連の防御反応を誘導して効率的に病原体の増殖を抑える一方で、有用な微生物の感染を寛容する。植物の免疫応答において、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリン、糸状菌の細胞壁構成成分キチンなどの特定の微生物種に共通のエリシター (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) によって誘導される免疫 (PTI) は、植物と様々な微生物 (叢) との相互作用において中心的な役割を担う (Zipfel & Oldroyd, 2017; *Nature*) 。

植物ウイルスは、ウイルス因子を介して宿主因子の機能を改変し、感染に転用する (雑誌論文)。我々はプロテオミクス解析を用いて、モデル植物の1つであるベンサミアナタバコから red clover necrotic mosaic virus (以下、RCNMV) 複製酵素複合体の構成因子 p27・p88 に結合する宿主因子候補を同定した (Hyodo et al., 2015; *PLoS pathogens*)。同定した宿主因子候補には、植物が病原体や乾燥などの環境ストレスへの抵抗性獲得に必要な、活性酸素種 (ROS) 産生酵素 (NbRBOHB) やカルシウム依存性タンパク質キナーゼ (NbCDPKiso2) などの因子が含まれていた。興味深いことに、NbRBOHB 発現抑制植物や、RBOH 阻害剤を処理した植物では、ウイルス感染が著しく阻害された。加えて、p27 発現により RBOH 依存的細胞内 ROS バーストが観察され、同時に NbRBOHB は RCNMV 複製の場へと局在が変化した。以上の結果は、NbRBOHB 本来の機能から予測される結果 (抵抗性因子として、ウイルス感染を阻害する) とは逆に、ウイルスが RBOH タンパク質による ROS 産生機構を転用して、感染を

有利に進めている (ROS がないと感染できない) ことを示しており、「植物免疫機構の転用によるウイルス感染戦略」の存在が浮かび上がってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々の先行研究から見えてきた、植物ウイルスによる RBOH タンパク質の転用機構を明らかにすることを目指す。RBOH タンパク質は細胞表層の PAMPs 受容体近傍に局在し、免疫に貢献することが知られている。RCNMV は NbRBOHB の細胞内局在の変化を引き起こすことから、RCNMV は宿主の免疫システムに干渉する可能性が示唆される。ここでは特に PTI に着目し、本可能性の検証を試みた。

## 3. 研究の方法

先述した目的の達成のために、RCNMV とベンサミアナタバコをモデル系として研究を進めた。特に NbCDPKiso2 に着目し、RCNMV による NbRBOHB 転用機構の解析を行った。また、RCNMV 感染が PTI に及ぼす影響を調べるため、RCNMV 感染植物における PAMPs 誘導性 ROS バーストおよび MAPK 活性化を解析した。

## 4. 研究成果

p27 誘導性細胞内 ROS バーストにおいて、NbRBOHB に加えて、NbCDPKiso2 が必要であることを明らかとした。共免疫沈降法および bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によって、NbCDPKiso2 は p27、NbRBOHB の両者と相互作用し、三者複合体を形成することが明らかとなった。NbCDPKiso2 と NbRBOHB は p27 非存在時には細胞膜上で複合体を形成するのに対し、p27 存在

時にはその局在が変化し, p27 が形成する細胞内アグリゲート構造へと集積した。また *in vitro* キナーゼアッセイによって, NbCDPKiso2 は NbRBOHB をカルシウムイオン依存的にリン酸化することが示された。さらに, Virus induced gene silencing (VIGS)法によって NbCDPKiso2 をノックダウンした植物では, p27 誘導性 ROS バーストが起こらなくなり, RCNMV 増殖が著しく低下した。CDPK はリン酸化を介して RBOH タンパク質を活性化することが知られている(Boudsocq & Sheen, 2013; *Trends Plant Sci*)。以上より, RCNMV は NbCDPKiso2 を介して NbRBOHB を活性化しウイルス増殖に転用していると考えられる。また, 共免疫沈降法による相互作用に関わるドメイン解析から, NbRBOHB, NbCDPKiso2 それぞれについて, p27 との相互作用に必要な領域を絞り込んだ。以上の成果は原著論文として報告した(雑誌論文)。

RBOH タンパク質および CDPK は植物免疫シグナルの構成因子として知られている(Boudsocq & Sheen, 2013; *Trends Plant Sci*, Segonzac et al, 2011; *Plant Physiol*)。p27 は NbRBOHB, NbCDPKiso2 の局在を細胞膜(PAMPs 受容体近傍)から細胞内アグリゲート構造へと変化させることから, RCNMV 感染植物では PTI が弱体化する可能性が考えられた。そこで RCNMV 感染植物における flg22(細菌鞭毛タンパク質フェラジェリンエピトープ)誘導性 ROS バーストを解析した。その結果, RCNMV 感染植物ではコントロールに比べて flg22 誘導性 ROS バーストが著しく抑制された。さらに, 防御応答遺伝子の発現に必須の MAPK 活性化に及ぼす RCNMV 感染の影響を調べたところ, flg22 誘導性 MAPK 活性化も RCNMV 感染植物では抑制された。興味深いことに,

p27 は flg22 誘導性 ROS バーストを抑制する一方で, flg22 誘導性 MAPK 活性化には顕著な影響を及ぼさなかった。従って, RCNMV 感染時には, ウイルス由来の複数の因子が PTI 抑制に貢献すると考えられる。

#### <参考文献>

1. Zipfel C, Oldroyd GE. (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543:328-336.  
DOI: 10.1038/nature22009
2. Hyodo K, Taniguchi T, Manabe Y, Kaido M, Mise K, Sugawara T, Taniguchi H, Okuno T. (2015) Phosphatidic acid produced by phospholipase D promotes RNA replication of a plant RNA virus. *PLoS Pathog* 11:e1004909.  
DOI: 10.1371/journal.ppat.1004909
3. Boudsocq M, Sheen J. (2013) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*. 18:30-40.  
DOI: 10.1016/j.tplants.2012.08.008
4. Segonzac C, Feike D, Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Zipfel C, Rathjen JP. (2011) Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol*. 156:687-699.  
DOI: 10.1104/pp.110.171249

#### 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)

Hyodo K, Hashimoto K, Kuchitsu K, Suzuki N, Okuno T. (2017) Harnessing host ROS-generating machinery for the robust

genome replication of a plant RNA virus.  
Proc Natl Acad Sci U S A.  
114:E1282-E1290. (査読有り)  
DOI: 10.1073/pnas.1610212114

Hyodo K, Okuno T. (2016) Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. Curr Opin Virol. 17:11-18. (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.coviro.2015.11.004

[学会発表](計6件)

新屋友規、北條優子、兵頭究、晝間敬、西條雄介、Galís Ivan「イネの傷害誘導性ペプチド OsPep3 は植食性昆虫エリシター応答を増強する」第58回日本植物生理学会年会、鹿児島大学群元キャンパス、鹿児島県鹿児島市 (2017年3月16日～2017年3月18日)

Hyodo K. A role of reactive oxygen species during the replication of a plant RNA virus. International Mini-symposium Series II on Fungal and Plant Viruses. IPSR, Okayama University. (2017年3月8日)

兵頭究 「ウイルス感染による植物免疫への干渉作用」 菌類/植物ウイルス研究ミニシンポジウム 岡山大学資源植物科学研究所 (2016年9月21日)

Hyodo K. A role of host second messengers in dianthovirus replication. International Mini-Workshop on Plant Virus Research. IPSR, Okayama University. (2016年3月25日)

兵頭究, 鈴木信弘, 奥野哲郎 「活性酸素種は植物RNAウイルス増殖を正に制御する」 平成28年度日本植物病理学会

大会 日本植物病理学会 岡山コンベンションセンター (2016年3月21日～2016年3月23日)

兵頭究 「植物-ウイルス間相互作用における活性酸素種の役割」 第8回植物ストレス科学シンポジウム、倉敷市芸文館 (2016年3月7日～2016年3月8日)

[図書](計1件)

兵頭究 (2015) 毒薬変じて薬となる～植物を助けるウイルス～生物工学会誌 93巻10号 p630. (査読無し)

[その他]

ホームページ等

岡山大学資源植物科学研究所ホームページ：<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/index-j.html>

研究室ホームページ：<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/research/pmi-hp.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵頭 究 (Hyodo Kiwamu)

岡山大学資源植物科学研究所・助教

研究者番号：80757881