

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03770

研究課題名(和文) ウイルスに対する植物免疫応答の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of plant immune responses against plant viruses

研究代表者

山次 康幸 (YAMAJI, Yasuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：40345187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物免疫研究は食料増産に向けた重要研究領域であり、最初期過程である植物による病原体認識については重点的に解明されているが、植物免疫応答が最終的にどのように病原体に作用して感染を抑制するかについてはほとんど解明されていない。本研究ではウイルスに対する主要な植物免疫応答として代表者らが見出したレクチン抵抗性を対象とし、高度に制御されたin vitro実験系を採り入れ、ウイルス感染阻害の作用点を明らかにした。さらに得られた知見をもとにレクチン抵抗性が効果を発揮するウイルス効果範囲を解明し、実用作物においてもレクチン抵抗性がウイルス病防除に寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物免疫に関する基礎研究を実用的なウイルス耐性戦略に結びつけるためには、防御応答が具体的に病原体をどのように排除しているかの解明が最も重要であるが、技術的・材料的な制約からその作用点はほとんど解明されていない。本研究では植物ウイルスに対するレクチン抵抗性の作用点を解明し、さらにその知見を応用して実用作物において高度なウイルス抵抗性システムを作出した。これらの成果はこれまでブラックボックスであった植物免疫応答作用点の解明を通じて、新たな植物ウイルス耐性戦略確立に向けた知的・技術シーズを生み出すものであり、学術的・社会的意義が極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Plant immunity is an important area of research for increasing food production, and although the initial process of pathogen recognition by plants has been intensively studied, how plant immune responses ultimately act on pathogens to inhibit infection has remained largely unexplored. In this study, we focused on lectin-mediated resistance, which was found by our group to be a major plant immune response to viruses, and employed a highly controlled in vitro experimental system to clarify the point of action of lectin-mediated resistance in inhibiting virus infection. Based on these findings, we have elucidated the range of plant viruses in which lectin-mediated resistance is effective, and found that lectin-mediated resistance contributes to the control of viral diseases in practical crops.

研究分野：植物病理学

キーワード：レクチン抵抗性 劣性抵抗性

1. 研究開始当初の背景

世界の食料生産は植物病によりその1/3が毎年失われているため、植物病の防除を目的とする植物免疫研究は実用的に重要な研究領域である。植物免疫研究の中でも植物が病原体を認識するメカニズムはその詳細が明らかにされているが、病原体認識により誘導された防御応答が最終的に病原体にどのように作用して感染を抑制するかについてはほとんど解明されていない。さらに、植物免疫の基礎研究をもとに将来的な植物病防除を志向するには植物免疫機構を適用可能な病原体の適用範囲の解明、実用植物における応用など乗り越えるべきハードルがいくつも存在する。

ウイルスに対する植物免疫応答は優性抵抗性、劣性抵抗性、RNAサイレンシングに大別される。そのうち、抵抗性品種を作出するため、従来から交配育種により作物栽培種に野生種由来の抵抗性遺伝子が導入されてきたが、抵抗性遺伝子が優性である場合(当該遺伝子の付与により抵抗性になる場合)を優性抵抗性、抵抗性遺伝子が劣性である場合(当該遺伝子の破壊により抵抗性になる場合)を劣性抵抗性と呼ぶ。

優性抵抗性遺伝子のほとんどはNB-LRR(Nucleotide-Binding/Leucine-Rich Repeat)遺伝子であるが、NB-LRR 遺伝子は遺伝子発現制御が困難で、細胞死を誘導して発現植物の生育を阻害するため、最近是非NB-LRR 遺伝子の同定・研究が重視されている。申請者らはモデル植物シロイヌナズナのエコタイプを用いたスクリーニングにより新規な植物ウイルス優性抵抗性遺伝子JAX1を同定した。JAX1はレクチンをコードし、NB-LRR 遺伝子による抵抗性やRNAサイレンシングと異なる抵抗性メカニズム「レクチン抵抗性」を誘導することを見出した。レクチン抵抗性はNB-LRR 遺伝子と異なり細胞死を誘導せず、幅広い植物に導入できることから実用化に向けた汎用性が高いが、その作用点は未解明である。

2. 研究の目的

本研究ではウイルスに対する主要な植物免疫応答である、レクチン抵抗性を対象としてその作用メカニズムの解明、適用可能なウイルス種の解明、実用植物における応用を目的とする。ウイルスは宿主細胞内で複製する際に宿主細胞膜表面に膜で包まれた複製工場を形成することが、電子顕微鏡観察による細胞生物学的研究、*in vitro* 実験系による生化学的研究の両面から明らかにされている。そこで、本研究では*in vitro* 実験系を駆使してレクチン抵抗性のメカニズムを解明する。その上で、レクチン抵抗性が感染を阻害するウイルス種の範囲をそれぞれ特定し、さらに実際の作物においてウイルス病の防除に応用可能かどうかを検証する。これらの成果をもとに、将来的な植物ウイルス耐性戦略確立に向けた知的・技術シーズにしたいと考えている。

3. 研究の方法

JAX1によるレクチン抵抗性の作用機構解明にあたってはタバコプロトプラスト抽出液(BYL)を用いた*in vitro* 系を利用した。宿主膜画分を除去した抽出液中での翻訳反応を行うことにより(1)ウイルスタンパク質翻訳を行い、スクロース密度勾配遠心により(2)ウイルス複製酵素複合体前駆体を特異的に検出し、*in vitro* 翻訳系に再度膜画分を添加することにより(3)ウイルス複製工場形成を行った。これらを組み合わせることにより3つのウイルス感染ステップを識別した。この各過程にJAX1を添加して発現させることによりJAX1の作用点を解明した。さらにnative-PAGEによりウイルス複製酵素複合体前駆体を展開し、JAX1との挙動を検出した。また、JAX1とウイルス複製酵素との結合解析を行った。

JAX1のレクチン抵抗性の有効ウイルス範囲の解明と応用にあたっては、実験植物 *Nicotiana benthamiana* にJAX1を形質転換した高発現体を利用し、各種植物ウイルスを接種して抵抗性の有無を検証した。さらに、近年トマト生産において問題となっている pepino mosaic virus (PepMV) の防除への応用可能性を探るため、JAX1をトマトに形質転換して高発現体を作成し、PepMVを接種して抵抗性の有無を検証した。

4. 研究成果

4-1. JAX1によるレクチン抵抗性の作用点解明

JAX1がどのタイミングでウイルスゲノム複製を阻害しているのかをBYLを用いて解析したところ、JAX1がウイルス複製酵素の翻訳直後の極めて早いタイミングで作用し、ウイルスゲノムの複製を阻害することが明らかとなった。この際のJAX1の存在部位を調べたところ、1,000 kDa以上のサイズの巨大なタンパク質複合体であるウイルス複製酵素複合体前駆体からJAX1が検出された。また、JAX1がウイルス複製酵素と結合することも明らかにした。これらの結果から、JAX1はウイルスの極めて初期の感染過程で複製酵素と結合することによりウイルス複製工場内部に侵入し、ウイルスのゲノム複製を阻害することが明らかとなった。

4-2. JAX1によるレクチン抵抗性の有効ウイルス範囲の解明と応用

JAX1を高発現する *N. benthamiana* に7種のポテックスウイルス属ウイルス (potato virus X、

plantago asiatica mosaic virus、white clover mosaic virus、hydrangea ringspot virus、cymbidium mosaic virus、PepMV)とそれに近縁なロライルス属ウイルス(*lolium latent virus*)を接種したところ、ポテックスウイルス属ウイルスについては全てのウイルスに対して抵抗性を示したが、ロライルス属ウイルスには抵抗性を示さなかった。JAX1 が *N. benthamiana* で PepMV に対して抵抗性を示したことから、PepMV が実際に被害を及ぼすトマトにおいて抵抗性を発揮する可能性を検証した。まず、JAX1 をトマトに形質転換したところ、生育への影響は観察されなかった。次いで、JAX1 高発現トマトに 3 系統 12 分離株の PepMV を接種したところ、いずれに対しても高度に抵抗性であった。以上より、JAX1 は実用作物においてもウイルス防除に応用可能であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujimoto Y., Nijo T., Hosoe N., Watanabe K., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete genome sequence of lychnis mottle virus isolated in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00535-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00535-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida T., Kitazawa Y., Neriya Y., Hosoe N., Fujimoto Y., Hagiwara-Komoda Y., Maejima K., Yamaji Y., Namba S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete genome sequence of the first isolate of hibiscus latent Singapore virus detected in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00054-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00535-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida T., Shiraishi T., Hagiwara-Komoda Y., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Fujimoto Y., Yusa A., Yamaji Y., Namba S.	4. 巻 93
2. 論文標題 The Plant Noncanonical Antiviral Resistance Protein JAX1 Inhibits Potexviral Replication by Targeting the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01506-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01506-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa K., Hashimoto M., Yusa A., Koinuma H., Kitazawa Y., Netsu O., Yamaji Y., Namba S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Dual targeting of a virus movement protein to ER and plasma membrane subdomains is essential for plasmodesmata localization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1006463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1006463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoe Naoi, Keima Takuya, Fujimoto Yuji, Hagiwara-Komoda Yuka, Hashimoto Masayoshi, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 2028
2. 論文標題 Transfection of Protoplasts Prepared from Arabidopsis thaliana Leaves for Plant Virus Research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9635-3_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tokuda Ryosuke, Nishikawa Masanobu, Hosoe Naoi, Nijo Takamichi, Iwabuchi Nozomu, Yoshida Tetsuya, Watanabe Kiyoto, Maejima Kensaku, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Carrot Torradovirus 1 Isolate, Obtained from Angelica keiskei in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00110-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00110-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Masanobu, Tokuda Ryosuke, Yoshida Tetsuya, Nijo Takamichi, Maruyama Noriko, Katsu Kosuke, Maejima Kensaku, Yamaji Yasuyuki, Namba Shigetou	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Iris Severe Mosaic Virus Isolated in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00093-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00093-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤本 祐司, 橋本 将典, 山次 康幸	4. 巻 70
2. 論文標題 植物ウイルスに対する翻訳開始因子を介した劣性抵抗性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okano Yukari, Maejima Kensaku, Yoshida Tetsuya, Nishida Shuko, Tokuda Ryosuke, Nishikawa Masanobu, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Interfamily transfer of Arabidopsis lectin-mediated antiviral gene confers resistance to pepino mosaic virus in tomato	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 274 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-020-00917-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsu Kosuke, Nijo Takamichi, Yoshida Tetsuya, Okano Yukari, Nishikawa Masanobu, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Complete genome sequence of pleioblastus mosaic virus, a distinct member of the genus Potyvirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 645 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04916-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masanobu Nishikawa, Tetsuya Yoshida, Takamichi Nijo, Kensaku Maejima, Yasuyuki Yamaji and Shigetou Namba
2. 発表標題 Complete genome sequence of iris severe mosaic virus isolated in Japan
3. 学会等名 International Conference of Clinical Plant Science 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kosuke Katsu, Ryosuke Tokuda, Masanobu Nishikawa, Akio Miyazaki, Nozomu Iwabuchi, Kensaku Maejima, Yasuyuki Yamaji and Shigetou Namba
2. 発表標題 Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid detection of pepino mosaic virus
3. 学会等名 International Conference of Clinical Plant Science 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryosuke Tokuda, Masanobu Nishikawa, Kosuke Katsu, Naoi Hosoe, Nozomu Iwabuchi, Tetsuya Yoshida, Takamichi Nijo, Kensaku Maejima, Yasuyuki Yamaji, and Shigetou Namba
2. 発表標題 Complete genome sequence of carrot torradovirus 1 isolated from <i>Angelica keiskei</i> in Japan
3. 学会等名 International Conference of Clinical Plant Science 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳田遼佑・西川雅展・細江尚唯・二條貴通・岩淵望・吉田哲也・渡邊清斗・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 国内のアシタバから検出されたcarrot torradovirus 1の全ゲノム配列
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川雅展・徳田遼佑・吉田哲也・二條貴通・丸山紀子・勝浩介・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 国内で検出されたiris severe mosaic virusのゲノム配列の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝浩介・遊佐礼・吉田哲也・白石拓也・小松健・橋本将典・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 JAX1抵抗性の標的となるポテックスウイルス因子の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本祐司・吉田哲也・白石拓也・薦田優香・小松健・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 JAX1によるポテックスウイルス増殖阻害のin vitro再構成
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田哲也・薦田優香・藤本祐司・徳田遼佑・西川雅展・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 ポテックスウイルス複製複合体前駆体へのJAX1のターゲティング
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細江尚唯・橋本将典・石川一也・北沢優悟・鯉沼宏章・藤本祐司・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 イチジクモザイクウイルスの移行タンパク質が持つシグナルペプチドの機能解析
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本将典・細江尚唯・石川一也・北沢優悟・鯉沼宏章・藤本祐司・前島健作・山次康幸・難波成任
2. 発表標題 イチジクモザイクウイルスの移行タンパク質は異なる2つのオルガネラを介してプラズモデスマータに輸送される
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山次康幸
2. 発表標題 植物ウイルスに対する抵抗性機構とその利用
3. 学会等名 平成29年度植物感染生理談話会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamaji Y, Okano Y, Neriya Y, Hashimoto M, Yusa A, Hatanaka T, Narusaka Y, Yoshida T, Maejima K, Namba S
2. 発表標題 Counter for the Epidemics of Potexviruses - Toward the Eradication of Pepino Mosaic Virus -
3. 学会等名 The 10th International Conference of Clinical Plant Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山次康幸
2. 発表標題 ウイルスを標的とした植物免疫研究とその応用展開
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝浩介・吉田哲也・丸山紀子・二條貴通・西川雅展・徳田遼佑・前島健作・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 東京都内のタケ亜科植物から検出されたポティウイルスの全ゲノム配列解析
3. 学会等名 2019年日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本祐司・煉谷裕太郎・橋本将典・吉田哲也・桂馬拓也・徳丸海・前島健作・根津修・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 EXA1 を介した植物ウイルス抵抗性が作用するウイルス効果範囲に関する解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 煉谷裕太郎・遊佐礼・橋本将典・吉田哲也・藤本祐司・前島健作・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 植物で広く保存される劣性抵抗性遺伝子EXA1のポテックスウイルス感染に対する普遍性
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田哲也・岡野夕香里・西田萩子・松本旺樹・鈴木拓海・前島健作・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 抵抗性遺伝子JAX1 による広範なポテックスウイルスの増殖阻害
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野夕香里・前島健作・吉田哲也・鈴木拓海・松本旺樹・難波成任・山次康幸
2. 発表標題 pepino mosaic virus に抵抗性を示すJAX1 形質転換トマトの作出
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山次 康幸
2. 発表標題 抵抗性遺伝子から紐解く、植物とウイルスの共存戦略
3. 学会等名 第2回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山次 康幸
2. 発表標題 植物ウイルスの総合防除に向けた基礎研究
3. 学会等名 日本農学学会第46回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関