

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20688002

研究課題名（和文） 植物ウイルスに対する防御ネットワークに関わる宿主遺伝子の解析

研究課題名（英文） Functional analysis of host factors involved in antiviral defense networks in plants

研究代表者

中原 健二（KENJI NAKAHARA）

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90315606

研究成果の概要（和文）：

本研究で RNA サイレンシングと連携したタバコのカルモジュリン様タンパク rgs-CaM による未知のウイルス防御機構の存在を明らかにした。rgs-CaM は多様なウイルスの RNA サイレンシング抑制タンパクに普遍的に結合し、結合した RSS をオートファジーによる分解に導くことで宿主の RNA サイレンシングによるウイルス防御能を高めていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study uncovered a novel mechanism of antiviral defense cooperatively acting with RNA silencing. In the defense, a calmodulin-like protein, rgs-CaM, binds to diverse viral RNA silencing suppressors and directs degradation of them by autophagy. Thus, the rgs-CaM-mediated defense seemed a host countermeasure against viral RNA silencing suppressors to reinforce antiviral RNA silencing in tobacco.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：植物のウイルス抵抗性・耐病性

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：PAMPs、RNAi、自然免疫、植物ウイルス

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの多くは RNA をゲノムとして持ち、分子内や複製の過程で 2 本鎖 RNA を形成することから、それらを分解する RNA サイレンシングが多くのウイルスに対する基礎的な防御機構であることが知られている。その証拠に多くのウイルスは RNA サイレンシングを抑制するタンパク (RNA silencing suppressor, RSS) をコードしている。植物の防御機構は、一般に、このような宿主防御(この場合 RNA サイレンシング)とそれ

を抑える病原体の因子（この場合ウイルス RSS）が宿主植物-病原体の共進化過程で多層的に発達し、ジグザグモデルとして提唱されている。そして、多層構造の防御が互いに連携したネットワークとして病原微生物に対抗していることが明らかになりつつある。ジグザグモデルに従えばウイルス RSS に対して、宿主側が何らかの防御機構を発達させていることが想定されるが、実際に見つかってはいなかった。

2. 研究の目的

上記のこれまで分かっていないウイルス RSS に対する宿主側の防御機構の主要な因子がタバコのカルモジュリン様タンパク rgs-CaMであることを示し、rgs-CaM を介した防御機構の分子メカニズムを解析するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)rgs-CaM-ウイルス RSS タンパクの結合について。in vitro での結合試験は BIACORE を用いた表面プラズモンレゾナンス解析により行った。rgs-CaM と種々のウイルス RSS タンパクを大腸菌で発現して、可溶性タンパクとして精製した。rgs-CaM は常法では可溶性タンパクとして発現することは難しく、タカラ社製 pCold 発現ベクターを用いて低温培養、groES-groEL-tig シャペロン存在下で発現することにより可溶性タンパクとして精製した。ウイルス RSS も常法では難しい場合があり、MBP-融合タンパクとして発現することにより可溶性タンパクとして精製した。精製した rgs-CaM タンパクもしくは siRNA をセンサーチップに固定して、RSS タンパクとの結合を BIACORE で検証した。

in vivo での rgs-CaM とキュウリモザイクウイルス(CMV)の RSS、2b との結合を免疫沈降法に検証した。Flag ペプチドを付加した rgs-CaM をジャガイモ X ウイルス(PVX)ベクターに組み込み、CMV とともに *Nicotiana benthamiana* に共感染させ、感染組織で発現している Flag-rgs-CaM およびそれに結合しているタンパクを抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降法により分画してウェスタン解析により 2b が含まれているのか検証した。さらに in situ での rgs-CaM と CMV 2b もしくはクローバ葉脈黄化ウイルス(CIYVV)の RSS、HC-Pro との結合は Olink Bioscience 社の近接接合解析(PLA)法により検出した。Flag 付加 rgs-CaM や 2b、HC-Pro を 35S プロモータ下で発現する植物用発現ベクターに組み込み、それらをタバコ BY2 培養細胞から調整したプロトプラストに導入して、Flag-rgs-CaM と CMV 2b の結合もしくは内生の rgs-CaM と CIYVV HC-Pro の結合を PLA 法により検出した。

(2)ウイルス RSS に対する rgs-CaM 結合の影響。ウイルス RSS の RNA サイレncing 抑制能に対する影響を *N. benthamiana* からプロトプラストを調整してデュアルルシフェラーゼ解析により調べた。*N. benthamiana* プロトプラストにウイルス RSS およびホタルルシフェラーゼ(Fluc)、ウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)遺伝子を組込んだ植物用発現ベクターと Fluc および rgs-CaM に対する 2 本鎖 RNA をポリエチレングリコールを用いてトランスフェクションして、内生の rgs-CaM を RNA サイレncing で発現抑制した場合、発現抑制しない場合のウイルス RSS の RNA サイレncing 抑制能を比較した。次に

rgs-CaM 過剰発現/発現抑制形質転換タバコでウイルス RSS をアグロインフィルトレーションにより一過発現した場合のウイルス RSS mRNA および RSS タンパクの蓄積量を比較した。

(3)rgs-CaM によるウイルス RSS の不活化メカニズムについて。CMV 2b および CIYVV HC-Pro を恒常的に発現する形質転換タバコを用いて、2b と HC-Pro、rgs-CaM が宿主のタンパク分解系による分解の程度を調べた。形質転換タバコ葉に種々の宿主タンパク分解系阻害剤処理を行い、ウイルス RSS と rgs-CaM タンパクの蓄積量の変化をウェスタン解析により調べた。rgs-CaM に対する抗体は大腸菌で発現・精製した rgs-CaM タンパクをウサギに免役して作製した。次に、CMV 2b を発現する形質転換 BY2 培養細胞に阻害剤処理を行い、免疫組織染色により CMV 2b や rgs-CaM の蓄積や局在の変化を調べた。さらに、rgs-CaM 過剰発現/発現抑制形質転換タバコにウイルスを接種して、ウイルス病原性、増殖量を野生型タバコと比較した。

4. 研究成果

本研究で明らかになった rgs-CaM の機能は次のようにまとめられる。

(1)rgs-CaM と多様なウイルス RSS の結合。rgs-CaM は 2000 年に米国ノースカロライナ大学のヴァンス教授らの研究グループがポティウイルス属の tobacco etch virus の RSS、HC-Pro に結合して、rgs-CaM 自身も RNA サイレncing を抑制する内生の RSS として報告された。本研究で rgs-CaM の植物での RSS 活性は再現できなかったが、同じポティウイルスに属するカブモザイクウイルスの HC-Pro と in vitro における直接の結合が BIACORE を用いて検出され、さらに、別のウイルス、CMV や tomato aspermy virus (TAV) の RSS である 2b との結合も検出された。CMV 2b との結合については、感染植物中での in vivo での rgs-CaM との結合を免疫沈降法で確認できた。さらに、タバコ培養細胞 BY2 細胞で一過発現させた CMV 2b および CIYVV HC-Pro と rgs-CaM の in situ での結合を PLA 法で確認することができた。では、rgs-CaM はどうして大きさもアミノ酸配列も異なる 2 つのウイルス RSS、HC-Pro と 2b に結合できるのであろうか？両 RSS を含む多くのウイルス RSS は 2 本鎖の RNA や 20 塩基あまりの長さの siRNA に結合して、RNA サイレncing の経路で使われないよう隔離して、RNA サイレncing を抑制していることが示唆されている。そこで、“rgs-CaM は多くのウイルス RSS に共通の 2 本鎖 RNA 結合領域に親和性を持つことで、HC-Pro や 2b だけでなく多くの RSS に結合する”のではない

かと仮説を立てた。この仮説を検証するため、植物由来でないが2本鎖 siRNA に結合することが知られるヒト免疫不全ウイルスがコードする Tat タンパクおよび、Tat の siRNA 結合領域部分のペプチド Trf24 と rgs-CaM の結合を BIACORE で検証した。その結果、Tat も Trf24 も rgs-CaM に結合し、rgs-CaM が siRNA 結合領域に親和性を持つことを支持する証拠を得た。一方、rgs-CaM が、非特異的に上記ウイルス RSS に結合しているわけではないことを次に証明した。まず、rgs-CaM が siRNA に結合しないことを BIACORE で確かめることにより、rgs-CaM が siRNA を介して RSS と結合している可能性を否定した。また、トマトブッシュスタントウイルスの RSS である P19 と rgs-CaM の結合を検証した。P19 は他の RSS に比べて独特の結合様式で siRNA に結合することが知られ、siRNA の両末端部分を掴む様にして結合する。これに対して、2b など他の RSS がプラスの電荷を帯びた部位がマイナスに電荷を帯びた siRNA と結合することが示唆されている。この siRNA との結合様式の違いが rgs-CaM との親和性の差として現れるのではないかと考えた。検証の結果、P19 は siRNA とは結合するが rgs-CaM とは結合しないことを BIACORE で確かめた。シミュレーション解析により、rgs-CaM のマイナスに荷電した部分が 2b のプラスに荷電した部分と結合することが予測され、電荷依存的にウイルス RSS の dsRNA/siRNA 結合領域に親和性を持つことで、rgs-CaM は多様なウイルス RSS に結合するのではないかという仮説が正しいと結論した。

(2)ウイルス RSS に rgs-CaM が結合する影響。rgs-CaM がウイルス RSS の2本鎖 RNA/siRNA 結合領域に結合するのであれば、ウイルス RSS と siRNA の結合を阻害する可能性が考えられる。実際に TAV 2b と siRNA の結合に影響するのか BIACORE を用いて検証した。BIACORE で siRNA との結合試験に供試する前に、TAV 2b を rgs-CaM と混ぜ、結合させると siRNA との結合シグナルが予想通り低下した。ウイルス RSS の siRNA 結合能がウイルス RSS の RNA サイレncing抑制に重要であることが報告されており、上記の結果から rgs-CaM はウイルス RSS に結合することにより、ウイルス RSS の RNA サイレncing抑制能を低下させている可能性が考えられた。そこで、rgs-CaM がウイルス RSS のサイレンシング抑制能を阻害するのか検討した。*N. benthamiana* プロトプラストでデュアルルシフェラーゼ解析によりウイルス RSS の RNA サイレncing抑制能を調べる際、内生の rgs-CaM の発現を RNA サイレncingで抑制したところ、供試した3種類のウイルス RSS、CMV 2b、TAV 2b、カブモザイクウイルス HC-Pro、全てでより高い RNA サイレncing

抑制能が検出された。つまり、rgs-CaM は細胞内で部分的にウイルス RSS の RNA サイレncing抑制能を阻害していることが分かった。

(3)rgs-CaMによるウイルス RSS 不活化のメカニズム。rgs-CaMによるウイルス RSS 活性の阻害効果は、rgs-CaM がウイルス RSS と siRNA の結合を阻害することで説明可能ではあるが、実は、rgs-CaM はウイルス RSS の発現自体を阻害することが分かった。rgs-CaM を過剰発現および発現抑制する形質転換タバコを作製して、それらのタバコ葉でウイルス RSS と GFP を一過発現して発現タンパクの蓄積を比較したところ、GFP に比べて CIYVV HC-Pro の蓄積が過剰発現形質転換タバコで低下し、CMV 2b の蓄積が発現抑制形質転換タバコで増加した。同じ実験で、一過発現した遺伝子のタンパクだけでなく、mRNA の蓄積も調べたところ、rgs-CaM はタンパクレベルでウイルス RSS の発現を抑制していることが分かった。この場合、rgs-CaM がウイルス RSS の翻訳を阻害するか、RSS タンパクの分解を促進している可能性が考えられる。後者について検証した。宿主植物のタンパク分解系には主にユビキチン-26S プロテアソームとオートファジーの二つの系が知られている。この二つの分解系がウイルス RSS の分解に関わるのか調べることにした。実は、rgs-CaM タンパクもこれらのタンパク分解系で分解され易い不安定なタンパクなのではないかと考えていた。というのはタバコ葉の抽出物中の内生 rgs-CaM をウェスタン解析により検出を試みると非常に弱いバンドシグナルしか得られなかったからである。実際、ジャガイモ X ベクターに Flag ペプチドを付加した rgs-CaM 遺伝子を組込み、タバコに接種して感染葉中の rgs-CaM を抗 rgs-CaM 抗体と抗 Flag 抗体で検出してみると、26S プロテアソーム阻害剤を処理した区画で rgs-CaM タンパクの蓄積が著しく増加した。従って、少なくともウイルスベクターから発現した rgs-CaM タンパクはユビキチン化され 26S プロテアソームで分解される不安定なタンパクであることが分かった。内生の rgs-CaM やウイルス RSS も 26S プロテアソームの基質になっているのではないかと考え、野生タバコおよびウイルス RSS、CMV 2b と CIYVV HC-Pro を恒常的に発現する形質転換タバコで 26S プロテアソーム阻害剤を処理してそれらのタンパク蓄積量を比較したところ、あまり変化しなかった。しかしながら、オートファジー阻害剤 3-メチルアデニン (3MA)を処理すると、これらのタンパクの蓄積量が増加し、内生 rgs-CaM とウイルス RSS はむしろオートファジーの機構で分解されていることが示唆された。BY2 タバコ培養細胞を用いてさらに検証を進めた。タバコ葉と

同様BY2培養細胞に26Sプロテアソーム阻害剤や3MA処理して免疫組織化学染色すると、処理なしではほとんど検出できない rgs-CaM が細胞質にドット状に検出された。CMV 2b を発現する BY2 培養細胞株を確立してそれらの阻害剤を処理して抗 2b 抗体で免疫組織化学染色すると核に検出される 2b タンパクを示すシグナルが増強し、3MA 処理では、核ではなく、細胞質全体からシグナルが検出された。さらに、2b を発現する BY2 細胞で抗 rgs-CaM 抗体を用いて染色すると阻害剤未処理区でも rgs-CaM が検出され、阻害剤処理区でも、2b を発現しないBY2 と比べ、rgs-CaM のシグナル強度、局在が著しく変化したことから、rgs-CaM と 2b の相互作用が示唆された。興味深いことに、rgs-CaM は 2b と結合するにもかかわらず、2つのタンパクの共局在は 26S プロテアソーム阻害剤、3MA 処理では検出できなかった。しかしながら、オートファジーの後期のオートリソソーム中のタンパク分解を阻害する E64 処理では rgs-CaM と 2b は共に核周辺に形成されるオートリソソーム中に検出された。これらのことから、rgs-CaM と CMV 2b は結合後すぐにオートファジーにより分解されていることが示唆された。

(4)rgs-CaM のウイルス防御機構における役割。rgs-CaM の発現パターンを調べたところ、ウイルス感染もしくはウイルス RSS の発現下で rgs-CaM の発現が誘導されていた。上記のように rgs-CaM がウイルス RSS に結合し、結合した RSS の活性を阻害するとすれば、発現誘導される rgs-CaM はウイルス防御に貢献していることが考えられる。実際、rgs-CaM の過剰発現および発現抑制形質転換タバコに CMV やジャガイモ Y ウイルスを接種して、感染増殖を比較したところ、野生タバコに比べ、過剰発現形質転換タバコではウイルスに対する抵抗性が高まり、発現抑制タバコでは感受性が高まったことから、予想通り rgs-CaM はウイルス防御に貢献していることが分かった。ここで、一点、確かめておく必要があるのは、当初の報告では rgs-CaM は自身が RSS として働くこと報告されたことである。もしそうであれば、本研究の結果とは矛盾する。本研究で改めて rgs-CaM の RSS 活性の検出を試みたところ、常法であるアグロインフィルトレーションによる *N. benthamiana* 植物を用いた一過発現系、*N. benthamiana* プロトプラストを用いたデュアルフシフェラーゼ解析系および rgs-CaM の過剰発現および発現抑制タバコから調製したプロトプラストのいずれでも rgs-CaM の RSS 活性を検出することはできなかった。以上の結果から rgs-CaM は RSS ではなくウイルス RSS に対抗する迎撃機構を担う分子ではないかと思われる。本研究の結果をもとに図 1 のような新たなウイルスに対する自然免疫モデルを構

築できた。この中で rgs-CaM を介した迎撃機構は RNA サイレンシングと連携することで RSS を持つウイルスに対抗する防御ネットワークを形成していることが考えられた。動物では自然免疫と獲得免疫が連携して防御ネットワークを形成していることが知られているし、植物でもバクテリア・糸状菌に対してはジグザグモデルとして紹介したように複数の防御機構がネットワークを形成していることが知られていた。本研究はウイルスに対しても同様の防御ネットワークが発達していることを初めて示した例と思われる。rgs-CaM は多くのウイルスの RSS に結合し迎撃できると思われることから、本研究は、将来、複数のウイルスに対する作物の抵抗性を同時に強化する新たな分子育種法の開発に繋がる成果と考えられる。

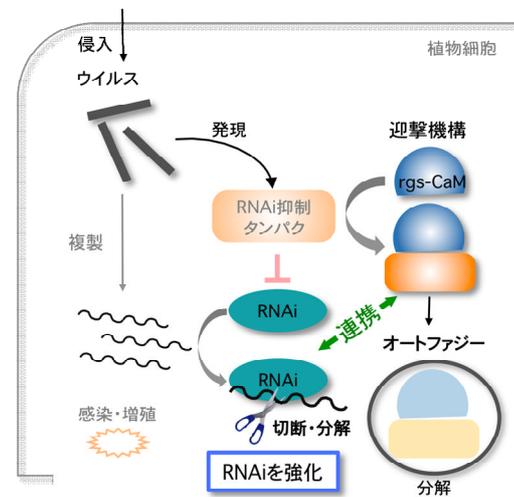


図1. 植物のウイルスに対する自然免疫モデル

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 11 件)

① Kenji S. Nakahara, Chikara Masuta, Syouta Yamada, Hanako Shimura, Yukiko Kashihiro, Tomoko S. Wada, Ayano Meguro, Kazunori Goto, Kazuki Tadamura, Kae Sueda, Toru Sekiguchi, Jun Shao, Noriko Itchoda, Takeshi Matsumura, Manabu Igarashi, Kimihito Ito, Richard W. Carthew, and Ichiro Uyeda, A tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 査読有, 印刷中, <http://www.pnas.org/>

② Sun Hee Choi, Kenji S. Nakahara, Marcelo Andrade, Ichiro Uyeda, Characterization of the recessive resistance gene *cyv1* against Clover yellow vein virus in *Pisum sativum*, *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 2012, DOI:

10.1007/s10327-012-0383-9

③ Go Atsumi¹, Kenji S. Nakahara, Tomoko Sugikawa Wada, Sun Hee Choi, Chikara Masuta, and Ichiro Uyeda, Heterologous expression of viral suppressors of RNA silencing complements virulence of the HC-Pro mutant of Clover yellow vein virus in pea, *Archives of Virology*, 査読有, 2012, DOI: 10.1007/s00705-012-1281-3

④ Yukari Ido, Kenji S. Nakahara, Ichiro Uyeda, *White clover mosaic virus*-induced gene silencing in pea, *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 78, 127-132, 2012, DOI: 10.1007/s10327-012-0360-3

⑤ Kenji S. Nakahara, Hiroaki Kitazawa, Go Atsumi, Sun Hee Choi, Yuji Suzuki, Ichiro Uyeda, Screening and analysis of genes expressed upon infection of broad bean with *Clover yellow vein virus* causing lethal necrosis, *Virology Journal*, 査読有, 8, 355, 2011, DOI: 10.1186/1743-422X-8-355

⑥ Dinari A. Harris, Kevin Kim, Kenji Nakahara, Constanza Vásquez-Doorman, and Richard W. Carthew, Cargo sorting to lysosome-related organelles regulates siRNA-mediated gene silencing, *Journal of Cell Biology*, 査読有, 194, 77-87, 2011, DOI: 10.1083/jcb.201102021

⑦ Kenji S. Nakahara, Kouji Yoshida, Tsutae Ito, Kouichi Suzuki and Nobuyuki Yoshikawa, Sensitive PCR-based detection of Apple chlorotic leaf spot virus heterogenous in apple trees, *Japan Agricultural Research Quarterly*, 査読有, 45, 411-421, 2011, DOI: 10.6090/jarq.45.411

⑧ Kenji S. Nakahara, Ryoko Shimada, Sun-Hee Choi, Haruko Yamamoto, Jun Shao, and Ichiro Uyeda, Involvement of the P1 Cistron in Overcoming eIF4E-Mediated Recessive Resistance Against Clover yellow vein virus in Pea, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 査読有, 23, 1460-1469, 2010, DOI: 10.1094/MPMI-11-09-0277

⑨ Young Sik Lee, Sigal Pressman, Arlise P. Andress, Kevin Kim, Jamie L. White, Justin J. Cassidy, Xin Lil, Kim Lubell, Do Hwan Lim, Ik Sang Cho, Kenji Nakahara, Jonathan B. Preall¹, Priya Bellare^{1,5}, Erik J. Sontheimer¹ & Richard W. Carthew, Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking, *Nature Cell Biology*, 査読有, 11, 1150 – 1156, 2009, DOI: 10.1038/ncb1930

⑩ Marcelo Andrade, Yosuke Abe, Kenji S. Nakahara and Ichiro Uyeda, The *cyv-2* resistance to *Clover yellow vein virus* in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E, *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 75, 241-249, 2009, DOI: 10.1007/s10327-009-0163-3

⑪ Go Atsumi, Uiko Kagaya, Hiroaki Kitazawa, Kenji S. Nakahara, and Ichiro Uyeda, Activation of the Salicylic Acid Signaling Pathway Enhances *Clover*

yellow vein virus Virulence in Susceptible Pea Cultivars, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 査読有, 22, 166-175, 2009, DOI: 10.1094/MPMI-22-2-0166

[学会発表] (計 15 件)

① 中原 健二, タバコのウイルスに対する基礎免疫におけるカルモジュリン様タンパク rgs-CaM の役割 2, 平成 24 年度日本植物病理学会大会, 2012 年 3 月 29 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

② 中原 健二, RNA サイレncing を強化するタバコのウイルス防御機構, 北海道植物学会大会 (招待講演), 2011 年 12 月 2 日, 北海道大学 (札幌市)

③ Kenji Nakahara, An rgs-CaM-mediated countermeasure for RNAi-based antiviral immunity in tobacco, IUMS, XV International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日, 札幌コンベンションセンター

④ 中原 健二, タバコのウイルスに対する基礎免疫におけるカルモジュリン様タンパク rgs-CaM の役割 1, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011 年 3 月 29 日, 東京農工大学 (府中市)

⑤ Kenji Nakahara, Counterdefense against Viral RNAi Suppressors in Tobacco, Keystone SYMPOSIA Mechanism and Biology of Silencing (招待講演), 2011 年 3 月 20 日~3 月 25 日, Monterey, California, USA

⑥ Syota Yamada, Effect of rgs-CaM overexpression on PVY accumulation in transgenic tobacco plants, Keystone symposia RNA silencing mechanisms in plants, 2010 年 2 月 21-26 日, Santa Fe, New Mexico, USA

⑦ Kenji Nakahara, eukaryotic initiation factor 4E involved in a recessive resistance to *Clover yellow vein virus* in pea carrying *cyv2*, International Congress of Virology, The International Union of Microbiological Societies, 10-15 August, 2008, Istanbul, ISTANBUL CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 健二 (KENJI NAKAHARA)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 90315606