

令和元年5月31日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07622

研究課題名(和文) ウイルス抵抗性を支配する新奇な劣性因子の機能解析

研究課題名(英文) A novel mechanism of recessive resistance to potyviruses in cucumber

研究代表者

井村 喜之 (IMURA, Yoshiyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50366621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリの自然発生変異体A192-18は、複数種のポティウイルスに対して強度の抵抗性を示す。本抵抗性は液胞輸送タンパク質(Vps)をコードする遺伝子の変異によって決定づけられる新奇な劣性抵抗機構を示す。ウイルス罹病性キュウリにA192-18由来の変異型Vpsをウイルスと共に発現させるとウイルス蓄積量が劇的に低減し、A192-18に罹病性キュウリ由来のVpsを発現させるとウイルスの感染が認められた。さらに、A192-18由来Vps遺伝子の2箇所の変異のうち、1塩基のみの変異により抵抗性が決定づけられ、この変異によりウイルスタンパク質との相互作用が解除されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キュウリの自然発生変異体が示すウイルスに対する強度抵抗性の新奇なメカニズムを明らかにした延長線上には、メロンやカボチャ等の様々なウリ科作物にウイルス抵抗性を賦与できる可能性を秘めている。さらに、本抵抗性は複数種のウイルスに対して効果を示すことから、本研究結果を基盤として作製した新品種はウイルスによる病害を著しく軽減させることができるとともに、ウイルス媒介虫を駆除するための農薬施用量の大幅な削減に貢献できる。学術面では、本抵抗性を支配する液胞輸送タンパク質がヒト免疫不全ウイルス、HIVのヒトへの感染に深く関与することが報告されており、動物、植物ウイルス間の感染メカニズムの共通性を考察できる。

研究成果の概要(英文)：A naturally occurring cucumber mutant, A192-18 shows a highly resistant against some potyviruses. The novel recessive resistance is determined by the mutation of a gene encoding a vacuolar protein sorting factor (Vps). The virus accumulation was drastically decreased in the susceptible cucumber leaves by coexpression of mutated Vps isolated from A192-18. Furthermore, A192-18 plants permitted the virus infection by coexpression of Vps isolated from the susceptible cucumber. A single-nucleotide change in two nucleotide mutations of the Vps gene from A192-18 conferred resistance to the viruses, and caused a cancellation of interaction with viral proteins.

研究分野：植物保護科学

キーワード：抵抗性 ウイルス 劣性因子 タンパク質間相互作用 複製

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界中のウリ科作物に甚大な被害をもたらすポティウイルス属のズッキーニ黄斑モザイクウイルス (以下, ZYMV) に対する抵抗性遺伝子は、メロンやカボチャ、ペポカボチャなどにおいて優性に遺伝する (Pitrat and Lecoq 1984, Paris et al. 1988, Paris and Cohen 2005) ことが報告されている一方、キュウリにおいては劣性に遺伝する (Wal et al. 1997) と記録されており、本ウイルスに対する抵抗性のメカニズムに統一的な見解がなされていない。加えて、抵抗性遺伝子から翻訳されるタンパク質の構造や機能、抵抗性発動機構に関しては、ブラックボックスの中にあつた。研究代表者らは自然発生したキュウリの突然変異体 A192-18 が ZYMV をはじめとする複数種のポティウイルスに対して高度の抵抗性を示すことを見出した。さらに、A192-18 とウイルス罹病性キュウリを交雑した F1 および F2 集団の表現型を調べた結果、本ウイルス抵抗性は単一の劣性因子によって支配されることが判明した。ゲノムマッピングにより抵抗性遺伝子が座乗する染色体上の位置を特定したところ、ポティウイルスに対する劣性抵抗性に関与すると報告されている翻訳開始因子とは異なる新奇な抵抗性機構を有することが明らかとなった (Amano et al. 2013)。抵抗性遺伝子が座乗する第 6 染色体上の 2.2 cM 領域内には少なくとも 6 つの ORF が含まれており、A192-18 とウイルス罹病性の複数品種間で塩基配列を比較・解析した結果、液胞へのタンパク質輸送に関わる vacuolar protein sorting-associated protein 4 (以下, Vps4) をコードする遺伝子にアミノ酸変異を伴う配列の相違が認められた。そこで本研究では、ポティウイルスに対する抵抗性と Vps4 の関係を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

キュウリの自然発生突然変異体 A192-18 が示すポティウイルスに対する高度抵抗性のメカニズムを明らかにすることを目指して、Vps4 遺伝子の変異と抵抗性の関係およびウイルス感染と Vps4 の関係を明らかにすることを目的とした。

(1) キュウリのウイルス抵抗性と Vps4 遺伝子の変異との関係性

自然発生突然変異キュウリ A192-18 の ZYMV に対する抵抗性と Vps4 遺伝子の変異の間に関係性があるかを明らかにするために、A192-18 と罹病性キュウリを交雑した F2 集団を用いて、ウイルスに対する表現型を観察し Vps4 遺伝子の変異の有無を PCR-RFLP 解析により調べる。

(2) 罹病性キュウリにおける変異型 Vps4 とウイルスの共発現による抵抗性の解析

ZYMV ゲノム RNA 由来完全長 cDNA ベクターである pZ5 内に A192-18 キュウリから単離した変異型 Vps4 の完全長 cDNA を組み込み、これをウイルス罹病性キュウリに接種する。本システムは Vps4 遺伝子をウイルスゲノム cDNA 内に組込んでいるため、ウイルスが侵入した細胞内でウイルスタンパク質とともに Vps4 タンパク質を高発現させることが可能である。ウイルスと変異型 Vps4 を共発現させた罹病性キュウリ組織におけるウイルス蓄積量の経時的な変動を定量 RT-PCR 法により解析する。

(3) A192-18 における罹病性キュウリ由来 Vps4 とウイルスの共発現による罹病性の解析

ウイルス高度抵抗性キュウリ A192-18 は ZYMV の増殖を許容しない。そこで、ウイルス罹病性キュウリ由来の Vps4 cDNA を A192-18 の子葉にて発現誘導させた後、同組織に ZYMV を接種する。接種後にウイルスが増殖可能となるか否かを ZYMV 外被タンパク質遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR により経時的に解析する。

(4) Vps4 遺伝子のウイルスに対する抵抗性を決定づける変異箇所の特定制

A192-18 由来の Vps4 cDNA は罹病性を示す複数品種由来の配列と比較して、アミノ酸置換を伴う 2 箇所の変異が生じている。そこで、この変異のうち、どの箇所の変異がウイルスに対する抵抗性を決定づけるのかを特定することを目的とした。

(5) Vps4 と相互作用するウイルスタンパク質の特定ならびに変異導入による相互作用の変化

罹病性キュウリ由来 Vps4 タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質を酵母ツーハイブリッド解析により明らかにする。さらに、(3)でのウイルス抵抗性を決定づける Vps4 遺伝子の変異が、タンパク質間相互作用に影響するかを調べる。

3. 研究の方法

(1) キュウリのウイルス抵抗性と Vps4 遺伝子の変異との関係性

A192-18 由来の Vps4 cDNA にはアミノ酸置換を伴う 2 箇所の変異が生じており、変異が生じることにより制限酵素 *Dra* I の認識配列となる。そこで、A192-18 と罹病性キュウリを交雑した F2 からゲノム DNA を抽出した後、PCR で増幅した Vps4 cDNA 断片を *Dra* I で処理することにより Vps4 遺伝子に変異が生じていない優性ホモ型およびヘテロ型、変異がホモになっている劣性ホモ型を分類することができる。この Vps4 遺伝子型とウイルス接種

による病徴発現の関係を調べることとした。

(2) 罹病性キュウリにおける変異型 Vps4 とウイルスの共発現による抵抗化の解析

ポティウイルスである ZYMV は、ゲノム上にコードされた 10 種のタンパク質を融合させたポリプロテインを翻訳させた後、自身の持つタンパク質分解酵素によってそれぞれの機能タンパク質に切断される。この特性を利用して ZYMV ゲノム RNA 由来完全長 cDNA, pZ5 に外来タンパク質である Vps4 をコードする cDNA を組み込み、ウイルスタンパク質とともに Vps4 を翻訳させることができる。本システムにより、ウイルスが感染した細胞内で Vps4 を発現させ、ウイルス蓄積量の変動を調べることでウイルス感染における機能・役割を推察することができる。そこで、抵抗性キュウリ A192-18 由来の変異型 Vps4 cDNA を pZ5 に組み込んだ後、罹病性キュウリ子葉にパーティクル・ボンバードメント法により接種する。接種後のウイルス感染による病徴発現を観察するとともに、ウイルス蓄積量の変動を外被タンパク質遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR 法により経時的に解析する。

(3) A192-18 における罹病性キュウリ由来 Vps4 とウイルスの共発現による罹病化の解析

ZYMV は A192-18 に感染することができず、細胞内でタンパク質を翻訳させることもできないため、上述の(1)の共発現システムにより Vps4 の機能を調べることができない。そこで、Ri プラスミド由来の変異型複製起点を持ち、植物において外来遺伝子を高発現に誘導できる pRI201-AN ベクター (TaKaRa) に罹病性由来 Vps4 cDNA を組み込み、アグロバクテリウムを介して植物細胞内で発現誘導させる。一定期間経過した後、pZ5 を接種し、ウイルスの増殖が可能となったか否かを上記(2)と同様の定量 RT-PCR によりウイルス蓄積量を調べる。

(4) Vps4 遺伝子のウイルスに対する抵抗化を決定づける変異箇所の特定

A192-18 由来 Vps4 遺伝子に見られる 2 箇所の変異のうち、抵抗性獲得には 2 つの塩基の変異が必要であるのか、あるいはいずれか 1 箇所の変異が決定づけるのかを明らかにする目的で、KOD mutagenesis kit (TOYOBO) を用いて、人為的に Vps4 cDNA に変異を導入する。次に、上記(1)にて記載した実験手法により、変異導入した Vps4 cDNA を pZ5 に組み込み、罹病性キュウリにおけるウイルス蓄積量の変動を定量 RT-PCR により解析する。

(5) Vps4 と相互作用するウイルスタンパク質の特定ならびに変異導入による相互作用の変化

酵母ツーハイブリッド法により、罹病性キュウリ由来の Vps4 タンパク質と相互作用する ZYMV タンパク質を特定することとした。次に、この相互作用が Vps4 の変異により変化する、または解除されるかを同様の手法にて解析する。

4. 研究成果

(1) キュウリのウイルス抵抗性と Vps4 遺伝子の変異との関係性

A192-18 と罹病性キュウリを交雑した F2 種子から 100 株を用いて、Vps4 をターゲットとした PCR-RFLP 解析を行った。増幅した Vps4 cDNA 断片は 338 bp であり *Dra*I で消化されると 315 bp の断片が検出される (図 1)。RFLP 解析の結果、優性ホモ型：ヘテロ型：劣性ホモ型の分離比は 1:2:1 と予想された通りとなった。さらに、Vps4 遺伝子の変異の有無とウイルス接種後の病徴発現の関係性を調査した結果、優性ホモ型およびヘテロ型ではすべてウイルスによる病徴が現れたのに対して、劣性ホモ型ではまったく病徴が現れず、ウイルスもほとんど蓄積していないことが判明した (図 1)。この結果は、A192-18 のウイルス抵抗性は Vps4 遺伝子の変異によって決定付けられる新奇な劣性抵抗性機構であることが判明した。

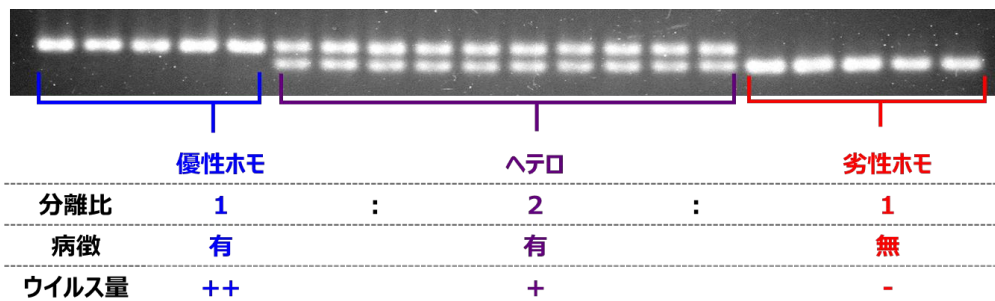


図 1. PCR-RFLP による Vps4 遺伝子の変異とウイルスに対する表現型

(2) 罹病性キュウリにおける変異型 Vps4 とウイルスの共発現による抵抗化の解析

A192-18 由来の変異型 Vps4 (以下、A-Vps4) をウイルスと共発現させた組織におけるウイルス蓄積量の経時的な変動を ZYMV 外被タンパク質遺伝子をターゲットとした定量

RT-PCRにより解析した。その結果、ZYMVの蓄積(pZ)は接種後5日目から急激に増加し、9日目にピークに達したのに対して変異型Vps4を共発現させる(A)とZYMV蓄積量は劇的に低減し、コントロールと比較してわずか3%程度となった(図2)。この結果は、ウイルスの増殖とともにA-Vps4が産生され発現量が増加した結果、宿主由来のVps4に対して優勢となったことによるドミナント・ネガティブ作用に起因するものと考えられた。すなわち、ウイルスはVps4を自身の複製または増殖に利用するが、変異型Vps4は利用できず、優勢となった変異型Vps4の拮抗作用によりウイルスがほとんど増殖できなかったものと考えられた。

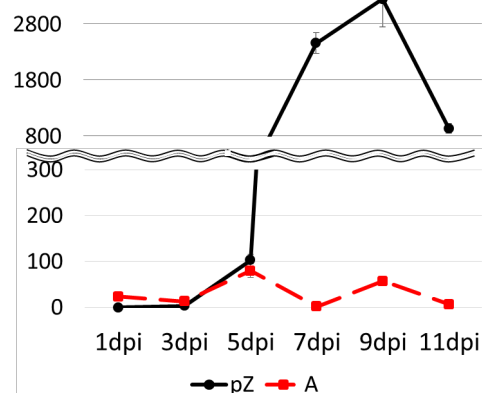


図2. 変異型Vps4発現によるウイルス蓄積量の経時的変動

(3) A192-18における罹病性キュウリ由来Vps4とウイルスの共発現による罹病化の解析

罹病性キュウリ由来のVps4(以下、S-Vps4)タンパク質をアグロインフィルトレーション法により、A192-18子葉にて発現誘導させた後、5日目にpZ5を同子葉に接種した。接種後9日目のZYMVの蓄積量を定量RT-PCRにより解析した結果、ウイルスの蓄積が確認された(図3)。このことは、Vps4がウイルスの複製および増殖に機能することを強く示唆しているとともに、Vps4はウイルス増殖に必須の因子であることを意味している。

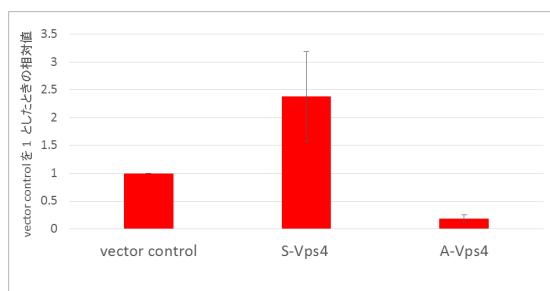


図3. A192-18におけるVps4発現によるウイルス蓄積量

(4) Vps4遺伝子のウイルスに対する抵抗性を決定づける変異箇所の特定

変異型Vps4をZYMVと共発現させるとウイルス蓄積量が劇的に低減することが明らかになった。そこで、2箇所の変異の1番目と2番目の変異のそれぞれを罹病性キュウリ由来のVps4遺伝子の配列に置換し、共発現した場合のウイルス蓄積量を定量RT-PCRにより調べた。その結果、1番目の塩基を置換したA-m1は、変異型Vps4であるA-Vps4と同様にウイルスの蓄積量が劇的に低減したのに対して、2番目の塩基を置換したA-m2はウイルス蓄積量の低減を引き起こさなかった(図4)。この結果から、A-Vps4発現によるウイルス感染の障害は、2番目の塩基変異によって決定づけられることが強く示唆された。

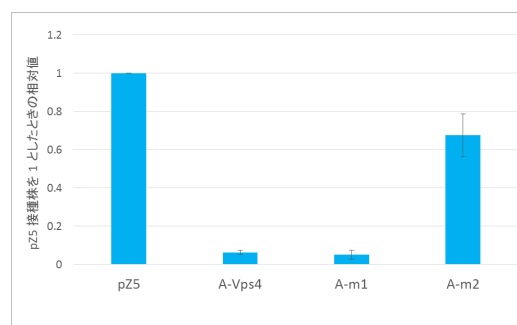


図4. A192-18 Vps4の塩基置換によるウイルス蓄積量

(5) Vps4と相互作用するウイルスタンパク質の特定ならびに変異導入による相互作用の変化

罹病性キュウリ由来のVps4タンパク質と相互作用するZYMVタンパク質を酵母ツーハイブリッド法により解析した。その結果、ウイルスゲノムRNAの5'末端に結合するタンパク質であるVPgとRNAサイレンシングサプレッサーとして機能するとされるHC-proがVps4と相互作用することが判明した。変異型Vps4をbaitとして用いた場合にはこれらのウイルスタンパク質との相互作用が認められなかったことから、本実験で明らかとなった特異的なタンパク質間の相互作用がウイルス複製または増殖に重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 8件)

中川寛之・謝欣・前田孟徳・小林政輝・天野政史・北宜裕・井村喜之 ポティウイルスに対するキュウリ劣性抵抗性因子とウイルスおよび宿主タンパク質の結合部位の解析

平成 31 年度日本植物病理学会大会 2019 年
前田孟徳・奥畑徹之・中川寛之・天野政史・北宜裕・井村喜之 キュウリのウイルスに対する劣性抵抗性は Vps4 遺伝子の 1 塩基変異により決定づけられる
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
中川寛之・謝欣樺・前田孟徳・木村海飛・中込達義・天野政史・北宜裕・井村喜之 キュウリの劣性抵抗性因子と相互作用するウイルスおよび宿主タンパク質
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
中川寛之・謝欣樺・木村海飛・中込達義・天野政史・北宜裕・井村喜之 ポティウイルスに対する劣性抵抗性因子と相互作用するタンパク質群の解析
平成 30 年度日本植物病理学会関東部会 2018 年
奥畑徹之・前田孟徳・中川寛之・矢口裕之・嶋田拓実・大谷晃範・天野政史・北宜裕・井村喜之 ブッキーニ黄斑モザイクウイルスに対するキュウリの劣性抵抗性は Vps4 遺伝子の 1 塩基変異により決定づけられる
平成 30 年度日本植物病理学会大会 2018 年
前田孟徳・奥畑徹之・中川寛之・矢口裕之・嶋田拓実・大谷晃範・天野政史・北宜裕・井村喜之 PCR-RFLP によるキュウリのブッキーニ黄斑モザイクウイルス抵抗性の判別
平成 29 年度日本植物病理学会関東部会 2017 年
奥畑徹之・前田孟徳・森住周・矢口裕之・嶋田拓実・大谷晃範・天野政史・藤田佳克・井村喜之 ポティウイルスに対するキュウリ劣性抵抗性における Vps4 の関与
平成 29 年度日本植物病理学会大会 2017 年
井村喜之 ウイルスを攻撃しない抵抗性のメカニズム
園芸学会平成 29 年度春季大会 - 革新的ウイルス対策技術分野叡智共有化プラットフォーム「園芸学とウイルス学の異分野融合研究会」 - 2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~agb/laboratory/syokubutu/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Peter D. Nagy

ローマ字氏名：(NAGY, Peter D.)

研究協力者氏名：天野 政史

ローマ字氏名：(AMANO, Masashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。