

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：10101
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2017～2019
課題番号：16KK0167
研究課題名（和文）全身獲得抵抗性誘導で植物が病原体感染を促進から阻害する状態へ相変化する分子機構（国際共同研究強化）
研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying a plant phase-change from facilitative to resistant responses against pathogens(Fostering Joint International Research)
研究代表者
中原 健二（Nakahara, Kenji）
北海道大学・農学研究院・講師
研究者番号：90315606
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,600,000円
渡航期間： 9ヶ月

研究成果の概要（和文）：ウイルスのRNAサイレンシング抑制タンパク質(RSS)との相互作用を介したウイルス防御遺伝子に関わるカルモジュリン様タンパク質(CML)を同定するために、キュウリモザイクウイルスのRSSである2bと親和性のあるCML探索し、CML43を含む6つのCMLが2bに結合した。CMLによるウイルス防御の分子メカニズムの解明のため、CML43と結合する内生因子のスクリーニングを行いシロイヌナズナcDNAライブラリーから2つの遺伝子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は以前の研究でウイルスRSSをオートファジーによる分解に導く宿主CMLを介したウイルス防御機構と、それが全身獲得抵抗性にも関わることを報告した。本研究で、ウイルスRSSと複数のCMLが直接結合して相互作用していることを明らかにし、それらのCMLの下流で働く内生宿主因子を同定することができた。これらの成果は、CMLを介したウイルス防御機構や全身獲得抵抗性の分子メカニズムの解明のためにキーとなる知見で、実際、その後の研究で興味深い成果を上げつつある。そして、その成果は農産物生産のための病害防除に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to identify calmodulin-like proteins (CML) that are involved in an antiviral defense via interaction with virus RNA silencing suppressors (RSS), we sought CMLs that have an affinity to RSS of cucumber mosaic virus, 2b. As a result, 6 CMLs including CML43 were found to bind to 2b. Then, we screened endogenous proteins that bind to CML43 and identified two proteins, which may be factors that mediate the CML associated antiviral defense.

研究分野：植物分子ウイルス学

キーワード：カルモジュリン様タンパク質 ウイルスRNAサイレンシング抑制タンパク質 植物ウイルス ウイルス防御機構

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本では病原体として約 300 種類の植物ウイルスが報告されている。これまでの研究から、この大部分が RNA サイレンシング抑制タンパク質(RSS)をコードしていると考えられている。それは、植物の RNA サイレンシングが内生の遺伝子やトランスポゾンの発現制御だけでなく、病原ウイルスに対する主要な防御機構だからである。植物はさらに、ウイルス RSS に対抗する防御機構を備えていることを我々が世界に先駆けて明らかにした。すなわち、タバコのカルモジュリン様タンパク質(CML)の一つ rgs-CaM がキュウリモザイクウイルス(CMV)がコードする 2b やポティウイルス属メンバーの HC-Pro などの RSS にカルシウムイオンとともに結合するとサリチル酸関連防御誘導し、自身とともに RSS をオートファジーによる分解に導くことで、結果としてウイルスに対する RNA サイレンシング防御を強化する対抗防御機構である。

(2) CML は植物で比較的大きな遺伝子ファミリー（シロイヌナズナで 50 遺伝子）を形成している。アミノ酸配列による系統解析で、同じクレードの 5 つの CML37-41 がタバコ rgs-CaM に同程度に同一性があった。これらの中でどの CML がウイルス RSS と相互作用してウイルス防御に働くのか調べるために、CML37-39 の 3 つの CML のノックアウト変異体に CMV を接種した結果、何れの変異体でも、CMV ゲノムの蓄積量が増加したことから、複数の CML がウイルス RSS との相互作用を介したウイルス防御機構を担っている可能性が示された。

(3) CML はカルモジュリンと同様 2-6 個の EF ハンドモチーフを持ち、カルシウムイオンと結合するが、それ以外の明らかな機能ドメインや酵素活性は見つかっていないことから、CML がウイルス RSS 結合してどのようにサリチル酸関連防御を誘導するのか、どのようにオートファジーによる分解に導かれるのか分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

(1) タバコ rgs-CaM に同一性の高い 5 つの CML を含めシロイヌナズナのどの CML がウイルス防御機構に関わり、ウイルス RSS とどのような相互作用をするのか明らかにするとともに、背景の分子メカニズムの解明を目指すのが本研究の目的であった。

(2) 共同研究者であるカナダのクイーンズ大学の Snedden 教授の研究室に長期滞在して、解析手法について学びながら目的の解析を遂行するとともに、結果や今後の研究の進め方について緻密に考察・話し合いを行いより大きな成果を得られるように共同研究の質を高め共同研究者との信頼関係を構築することも目的であった。

3. 研究の方法

(1) 酵母ツーハイブリッド (Matchmaker™ Gold 酵母ツーハイブリッドシステム) および split luciferase 相補解析法により、ウイルス RSS と CML の親和性を調べ、ウイルス防御に関わる CML を選抜した。split luciferase 相補解析法では、luciferase 遺伝子を二つに分け、N 末端側と C 末端側の Luciferase 断片をそれぞれ、結合を検証したいタンパク質との融合タンパク質として、アグロインフィルトレーションによる一過発現系で共発現する。Luciferase 断片に融合したタンパク質同士が結合する場合、Luciferase 断片が近接し、活性が復活するために、Luciferase 活性を調べることで結合するかどうか調べることが出来る。

(2) CML を介したウイルス防御メカニズムの解明の手がかりを得るために、選抜された CML の下流で働く内生因子を同定するために、CML に結合する内生タンパク質を市販のシロイヌナズナの cDNA ライブラリーから酵母ツーハイブリッド法により選抜した。

4. 研究成果

(1) 酵母ツーハイブリッド法では検証に用いるタンパク質は、GAL4 タンパク質断片との融合タンパク質として発現する影響で、本来結合する組み合わせでも、結合しなかったり、結合していない状態でも、検証しているタンパク質に DNA 結合性があるとマーカー遺伝子の発現を誘導してしまう場合（自己活性化）があり、発現に用いるベクターを変更するなど検証するために条件検討が必要である。検討の結果、シロイヌナズナ CML37 と CML38 はベイトベクターから発現すると強く自己活性化するがプレイベクターから発現することで自己活性化を回避できることが分かった。また、プレイベクターから発現したウイルス RSS の CMV 2b は結合の検証には機能しなかったが、ベイトベクターから発現することで検証することができた。

(2) タバコ rgs-CaM と rgs-CaM に同一性の高い 5 つの CML が CMV の RSS である 2b とポティウイルスの RSS である HC-Pro に結合するのか酵母ツーハイブリッド法で調べたところ、HC-Pro と CML の組み合わせでは、形質転換酵母は 4 アミノ酸欠損(-LTHA)培地で生育せず、強く結合する CML は見つからなかった。一方、2b との検証では、rgs-

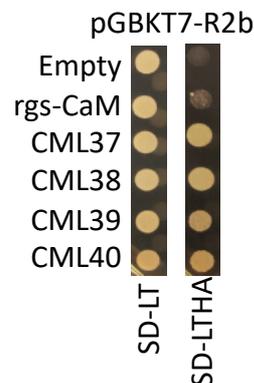


図 1. CMV 2b と CML の親和性を酵母ツーハイブリッド法で検証した結果(一部)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Junya, Wang Yongzhi, Yamada Tetsuya, Sato Masako, Ono Takuya, Atsumi Go, Abe Jun, Hajimorad M. R., Nakahara Kenji Suto	4. 巻 32
2. 論文標題 Recessive resistance governed by a major quantitative trait locus restricts clover yellow vein virus in mechanically but not graft-inoculated cultivated soybeans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-12-18-0331-R	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 該当する
1. 著者名 Jeon Eun Jin, Tadamura Kazuki, Murakami Taiki, Inaba Jun-ichi, Kim Bo Min, Sato Masako, Atsumi Go, Kuchitsu Kazuyuki, Masuta Chikara, Nakahara Kenji S.	4. 巻 91
2. 論文標題 rgs-CaM Detects and Counteracts Viral RNA Silencing Suppressors in Plant Immune Priming	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e00761-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00761-17	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 中原 健二	4. 巻 89
2. 論文標題 トレードオフを利用した植物のウイルス防御戦略	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 436-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890436	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 Zhila Osmani, Shinnosuke Jin, Masafumi Mikami, Masaki Endo, Hiroki Atarashi, Kaien Fujino, Tetsuya Yamada, Kenji S. Nakahara	4. 巻 in press
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated editing of genes encoding rgs-CaM-like proteins in transgenic potato plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 in press
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神 慎之介、佐藤雅子、須藤深雪、中原健二
2. 発表標題 キュウリモザイクウイルス感染シロイヌナズナにおけるカルモジュリン様タンパク質37, 38, 39欠損の影響
3. 学会等名 日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野卓哉、山田哲也、中原健二
2. 発表標題 ダイズとツルマメ間の組換え自殖系統におけるクローバ葉脈黄化ウイルスに対する抵抗性 の再評価
3. 学会等名 日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原健二・山田哲也
2. 発表標題 ダイズ栽培化で選抜されたかもしれないクローバ葉脈黄化ウイルス抵抗性について
3. 学会等名 第13回 植物ウイルス病研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウイルス抵抗性植物及びその作成方法	発明者 新子泰規、中原健二、山田哲也、増田 税	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2017-117	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	スネデン ウェイン (Snedden Wayne)	クイーンズ大学・生物学科・教授	