

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006-2010

課題番号：18108001

研究課題名（和文）ウイルスにコードされるジーンサイレンシング抑制遺伝子による植物遺伝子発現修飾機構

研究課題名（英文） Modification of plant gene expression by viral gene silencing suppressors

研究代表者

上田 一郎（Uyeda Ichiro）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10113523

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病原体相互作用、病原性因子、病害

1. 研究計画の概要

植物のジーンサイレンシング (PTGS) はウイルスに対する普遍的な防御機構であり、多くのウイルスはサイレンシング抑制遺伝子を持ち対抗している。(1)本研究では、ウイルスによる病害がサイレンシングを介した植物-ウイルスの相互作用でどこまで説明できるのか検証する。(2)複数の宿主・PTGS 抑制遺伝子やその変異遺伝子を用いて、PTGS 抑制遺伝子が作用する植物のターゲット因子を特定して、その影響を解析する。これらの成果により植物の遺伝子発現制御と耐病性機能の強化につなげていく。

2. 研究の進捗状況

以前の研究でクローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) の HC-Pro 遺伝子とキュウリモザイクウイルス (CMV) の 2b 遺伝子が PTGS 抑制遺伝子であること、HC-Pro と相互作用するタバコの rgs-CaM 遺伝子がショウジョウバエにおいても PTGS を抑制することを明らかにしてきた。

(1)HC-Pro の PTGS 抑制能が CIYVV による病徴発現に必要であることを、活性の低下した変異 HC-Pro を持つ CIYVV に他のウイルスの PTGS 抑制遺伝子を付加することでウイルス毒性の低下が相補できることを示すなどして証明した。一方、マメ科植物、エンドウのえそ病徴発現には半優性の対立遺伝子とサリチル酸経路の活性化が必要であることを明らかにし、この活性化に HC-Pro の PTGS 抑制能が関与していることも示した。

また、感染エンドウ葉に蓄積するタンパク

質を 2 次元電気泳動で網羅的に解析 (プロテオーム解析) することにより、えそ病徴発現と相関する 5 つのタンパク質を単離、同定した。

(2) ショウジョウバエ系では CIYVV の HC-Pro は PTGS を抑制しないものの、導入した外来 (ルシフェラーゼ) 遺伝子の発現を促進することが新たに明らかになった。一方、当初タバコの内在性 PTGS 抑制遺伝子として報告されていた rgs-CaM についても予想外の機能を持つ可能性が見出された。すなわち、rgs-CaM は HC-Pro だけでなく多くの PTGS 抑制遺伝子と親和性を有し、それら結合タンパク質を不安定化することで、宿主の PTGS 活性を高めてウイルスに対する防御を強化する機能を有する。本研究の重点の一つはウイルスの PTGS 抑制遺伝子が作用する宿主側のターゲット因子を見つけることであり、予想外の成果から、既にその答えの一つが rgs-CaM であることが判明した。そして rgs-CaM は本研究の最終目標の一つ、植物の耐病性強化にも利用できる可能性が考えられる。学際的にも、ウイルスの PTGS 抑制遺伝子に対して宿主側も対抗手段を備えていたことを新たに見出したことになり、重要な発見である。

(3) ウイルスの PTGS 抑制の活性を測定・比較するためにプロトプラストを使用したアッセイ系を構築した。プロトプラストに CMV の 2b 遺伝子とサテライト RNA (satRNA) を同時導入し、2b の PTGS 抑制活性を測定したところ、弱毒 CMV の 2b の PTGS 抑制能力に対して、サテライト RNA のプラス鎖、マイナス鎖ともに阻害的に作用

することを観察した。また、2b と結合する宿主因子を酵母の two-hybrid 法によってスクリーニングした結果、カタラーゼが 2b タンパク質と結合することが判明した。プロトプラストに 2b とカタラーゼを同時に発現させたところ 2b の PTGS 抑制活性が低下し、カタラーゼも 2b に阻害的に作用することがわかった。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。本研究の目的は、ウイルスにより引き起こされる病害に、PTGS がどのように関与するか明らかにすることである。研究期間中に、HC-Pro が宿主の Cyn1 遺伝子を介したえそ誘導を制御していること、また CMV のサテライト RNA が弱毒ウイルスに対するサイレンシングを強化していること等、世界的にこの分野をリードする知見を蓄積しつつあり、順調に研究が進展している。

もう一つの重点はウイルスの PTGS 抑制遺伝子が作用する宿主側のターゲット因子を見つけることであり、予想外の成果から、既にその答えの一つが rgs-CaM であることが判明した。そして rgs-CaM は本研究の最終目標の一つ、植物の耐病性強化にも利用できる可能性が考えられる。学際的にも、ウイルスの PTGS 抑制遺伝子に対して宿主側も対抗手段を備えていたことを新たに見出したことになる重要な成果である。

4. 今後の研究の推進方策

(1)HC-Pro の PTGS 抑制能と CIYVV の病原性の関係については、えそ病徴発現に関わる遺伝子の解析を進めて、その分子機構の解明を進める。具体的には半優性の対立遺伝子の同定を試みるとともに、プロテオーム解析で同定した遺伝子の発現を感染組織中で抑制するなどして、えそ病徴発現への関わりを調査する。

(2)HC-Pro と rgs-CaM の PTGS 抑制能の分子機構に関しては、計画を変更して新たに判明した rgs-CaM の PTGS 抑制遺伝子に対抗する防御タンパク質としての機能に焦点を絞って解析を進め、分子機構の解明を目指す。

(3) CMV の病徴を軽減する satRNA はその起源について未だ不明のままであり、いかなる進化を遂げた分子であるのか大きな謎となっている。我々は、satRNA を宿主遺伝子から派生して宿主の PTGS を強化するようになった、CMV に対する抵抗性因子であると考えている。今後 satRNA が宿主 PTGS に及ぼす影響や、2b との相互作用について分子レベルでの詳細な解析を実行する予定である。

5. 代表的な研究成果

(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19件)

Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances Clover yellow vein virus virulence in susceptible pea cultivars. Atsumi, G., Kagaya, U., Kitazawa, H., Nakahara, K. S., Uyeda, I. Molecular Plant Microbe Interactions 22, 166-175. (2009) 査読有り

Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. Yambao, M.L.M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Takahashi, Y., Nakahara, K. S., Uyeda, I. Arch. Virol. 153, 105-115. (2008) 査読有り

Degree of RNA silencing and ability of a viral suppressor vary depending on the cell species in a protoplast system. Shimura, H., Kogure, Y., Goto, K. and Masuta, C. Journal of General Plant Pathology. 74, 326-330. (2008) 査読有り

A strategy for screening an inhibitor of viral silencing suppressors, which attenuates symptom development of plant viruses. Shimura, H., Fukagawa, T., Meguro, A., Yamada, H., Oh-hira, M., Sano, S. and Masuta, C. FEBS Letters, 4047-4052. (2008) 査読有り

[学会発表](計40件)

志村華子、キュウリモザイクウイルスサテライト RNA が植物の RNA サイレンシングへ及ぼす影響の解析、日本植物病理学会、2009年3月27日、山形大学

[図書](計1件)

Shimura, H. and Masuta, C. (2009). Functional analysis of CMV satellite RNAs in RNA silencing. In Antiviral Resistance in Plants (Methods in Molecular Biology) Edited by M.B. Wang and J. Watson, Humana Press, Totowa, NJ, USA, in press.

[産業財産権]

出願状況(計3件)

金澤章・増田税・中原健二「外来遺伝子を持たない形質転換植物及びその生産方法」特願 2006-254801 2006.9.20 (国内)

取得状況(計1件)

[その他]

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/gs/education/res.html#22>