

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007 -2008  
 課題番号：19780034  
 研究課題名（和文） ユビキチン経路を介した新規なウイルス抵抗性経路の解明  
 研究課題名（英文） Discovery of a novel virus-resistance pathway mediated by the ubiquitin pathway

## 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・助教  
 研究者番号 40345187

## 研究成果の概要：

RNA ウイルスの感染に対して、植物のユビキチン関連因子である TARF がどのような機能を果たすかについて解析するために、モデルウイルスである TMV を用いて解析を行い、TARF は TMV の感染に対して阻害的に働く因子であることを示唆した。また、TARF は TMV の感染に伴い発現誘導を受けることを明らかにし、TARF の発現上昇により TMV の増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果は TARF が TMV の感染に対して阻害的に働く因子であることを示しており、本研究を通じて TARF がウイルス抵抗性に関わる新たな因子であることを示した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

## 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：病害抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスによる被害は全作物生産量の約 10 パーセントにも上るといわれているが、局所的にはより深刻な被害を与えていると考えられる。ウイルスは農薬などによる化学的防除が著しく困難であるため、植物ウイルスの防除は主に抵抗性品種の育種や媒介昆虫の駆除、弱毒ウイルスの利用などに頼らざるを得ない状況であり、その効果も極めて限定的である。一方、植物はウイルスを認識し、様々な防御反応を示すことが明らかにさ

れている。そこで、植物自身が本来もつウイルスに対する防御反応を利用することにより、ウイルス抵抗性を付与する試みが有効であると考えられる。

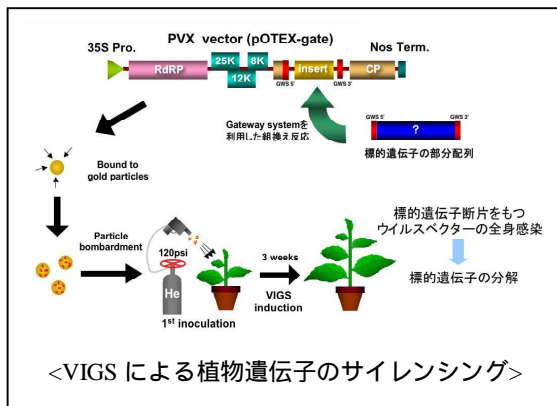
## 2. 研究の目的

植物はウイルスを認識し、様々な防御反応を示すことが明らかにされている。そこで、植物自身が本来もつウイルスに対する防御反応を利用することにより、ウイルス抵抗性を付与する試みが有効であると考えられる。

植物が病原体に対して示す防御応答にユビキチン経路が関わるということが最近明らかにされてきている。本研究は植物のユビキチン関連因子である TARF の機能解析を通じて、ウイルス感染へのユビキチン経路の関与を明らかにし、ウイルス耐性戦略に向けた基盤的知見の構築を目的とする。

### 3. 研究の方法

2007 年度は、TMV 感染に対して植物のユビキチン関連因子である TARF がどのような機能を果たすかを明らかにするために、*Nicotiana benthamiana* において TARF 遺伝子を一過的に発現抑制させ、TMV 感染に対する影響を調べる。具体的には、まず Virus-induced gene silencing (VIGS) を利用して一過的に TARF 遺伝子の発現をノックダウンする。ウイルスベクターに TARF 遺伝子の部分配列を導入し、*N. benthamiana* に感染させて TARF 遺伝子の一過的サイレンシングを誘導する。TARF 遺伝子のノックダウンによる植物の形態変化を詳細に観察するとともに、リアルタイム PCR により TARF 遺伝子のノックダウンを確認する。TARF 遺伝子ノックダウン組織に TMV を接種し、ノーザン解析もしくはリアルタイム PCR により、TMV RNA 蓄積量を調べる。GFP を発現するレポーターウイルス (TMV-GFP) の接種も行い、その感染動態を観察する。



2008 年度は agroinfiltration により、*Nicotiana benthamiana* において一過的に TARF 遺伝子を発現上昇させ、TMV 感染に対する影響を調べる。バイナリーベクターに TARF 遺伝子を導入し、agrobacterium に形質転換した後に、*N. benthamiana* に infiltration して TARF 遺伝子を一過的に発現上昇させる。リアルタイム PCR により TARF 遺伝子の発現上昇を確認する。TARF 遺伝子が発現上昇した組織に TMV を接種し、ノーザン解析もしくはリアルタイム PCR により、TMV RNA 蓄積量を調べる。

次いで、タバコに TMV を接種し、TARF

遺伝子の発現量をノーザンおよびリアルタイム PCR により経時的に調べることににより、TMV 感染により TARF 遺伝子が誘導を受けるかどうかについて調べる。

### 4. 研究成果

2007 年度は RNA ウイルスの感染に対して、TARF がどのような機能を果たすかについて解析するために、モデルウイルスである TMV を用いて解析を行い、TARF は TMV の感染に対して阻害的に働く因子であることを示唆した。

まず、TARF の機能を明らかにすることを目的とし、ウイルスベクターを用いて特定の mRNA を特異的に発現抑制 (サイレンシング) する VIGS (virus-induced gene silencing) を試みた。Potato virus X (PVX) ベクターを用いた VIGS により *Nicotiana benthamiana* において TARF 遺伝子のサイレンシングを行い、リアルタイム PCR により TARF 遺伝子のノックダウンを確認した。その結果、顕著な植物体への影響は観察されなかった。

次いで、VIGS 法により TARF 遺伝子をサイレンシングした葉に TMV を接種し、その蓄積量をノーザンプロットにより調べた。その結果、TARF サイレncing 区では対照区に比べ TMV RNA 蓄積量が増加した。さらにウイルス感染を可視化する目的で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するレポーターウイルス、TMV-GFP を接種に用いたところ、TMV-GFP による蛍光斑の個数が対照区と比較して TARF サイレncing 区において増加した。従って、TARF 遺伝子のサイレンシングにより TMV の蓄積が促進されることが示された。

2008 年度は agroinfiltration 法による一過的発現系を用いて 2007 年度の結果の検証を行うと共に、ウイルス感染時における TARF 遺伝子の発現誘導を解析した。

まず、agroinfiltration により、*Nicotiana benthamiana* において一過的に TARF 遺伝子を発現上昇させた。バイナリーベクターに TARF 遺伝子を導入し、agrobacterium に形質転換した後に、*N. benthamiana* に infiltration して TARF 遺伝子を一過的に発現上昇させ、ノーザン解析により TARF 遺伝子の発現上昇を確認した。TARF 遺伝子の発現上昇が検出された組織に TMV を接種した。ノーザン解析により、TMV RNA 蓄積量を調べたところ、TARF の発現上昇に伴い TMV RNA の蓄積量が減少することが明らかになった。

次いで、タバコに TMV を接種し、TARF 遺伝子の発現量をノーザン解析およびリアルタイム PCR により経時的に調べた。その結果、TARF は TMV 接種後短時間 (4 時間程度) で発現が上昇することが明らかになった。

以上を要するに、TARF は TMV の感染に伴い発現誘導を受けることを明らかにし、TARF の発現上昇により TMV の増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果は TARF が TMV の感染に対して阻害的に働く因子であることを示しており、本研究を通じて TARF がウイルス抵抗性に関わる新たな因子であることを示した。

#### 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7件)

- (1) Komatsu K, Hashimoto M, Maejima K, Ozeki J, Kagiwada S, Takahashi S, Yamaji Y, Namba S. (2007) Genome sequence of a Japanese isolate of Radish mosaic virus: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus. Arch Virol. 152:1501-1506. (査読有り)
- (2) Hashimoto M, Ozeki J, Komatsu K, Senshu H, Kagiwada S, Mori T, Yamaji Y, Namba S. (2008) Complete nucleotide sequence of asparagus virus 3. Arch Virol. 153:219-221. (査読有り)
- (3) Komatsu K, Yamaji Y, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Takahashi S, Namba S. (2008) Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. Arch Virol. 153:193-198. (査読有り)
- (4) Maejima K, Himeno M, Komatsu K, Kakizawa S, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S. (2008) Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, Magnaporthe oryzae. Arch Virol. 153:389-391. (査読有り)
- (5) Yoshii A, Shimizu T, Yoshida A, Hamada K, Sakurai K, Yamaji Y, Suzuki M, Namba S, Hibi T. (2008) NTH201, a Novel Class II KNOTTED1-Like Protein, Facilitates the Cell-to-Cell Movement of Tobacco mosaic virus in Tobacco. Mol Plant Microbe Interact. 21:586-596. (査読有り)
- (6) Komatsu K, Hatada K, Hashimoto M, Ozeki J, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. (2008) Complete nucleotide sequence of a California isolate of Radish mosaic virus. Arch Virol. 153:2167-2168. (査読有り)
- (7) Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S. (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. J Gen Virol. 90:1014-1024. (査

読有り)

[学会発表](計9件)

- (1) 山次康幸・橋本将典・前島健作・千秋博子・小松健・難波成任、Potexvirus 属の種の分類基準に関する再検討、平成 19 年度日本植物病理学会大会、2007 年 3 月 28-30 日、宇都宮
- (2) 尾関丈二・橋本将典・前島健作・千秋博子・小松健・山次康幸・難波成任、Plantago asiatica mosaic virus の細胞間移行に関する外被タンパク質のアミノ末端領域、平成 19 年度日本植物病理学会大会、2007 年 3 月 28-30 日、宇都宮
- (3) 前島健作・姫野未紗子・山次康幸・濱本宏・難波成任、イネいもち病菌より分離された Magnaporthe oryzae virus の系統解析、平成 19 年度日本植物病理学会大会、2007 年 3 月 28-30 日、宇都宮
- (4) 姫野未紗子・前島健作・山次康幸・濱本宏・難波成任、イネいもち病菌より分離されたウイルス (Magnaporthe oryzae virus ; 新称) の全塩基配列、平成 19 年度日本植物病理学会大会、2007 年 3 月 28-30 日、宇都宮
- (5) Ozeki J, Senshu H, Himeno M, Maejima K, Komatsu K, Yamaji Y, Namba S, Analysis of the amino terminal region of plantago asiatica mosaic virus coat protein responsible for viral cell-to-cell movement.、9th International Conference on Plant Pathology、2008.8.24-8.29、トリノ(イタリア)
- (6) Komatsu K, hashimoto M, Ozeki J, Aoyama M, Yamaji Y, Namba S, Analysis of the systemic necrosis on Nicotiana benthamiana induced by plantago asiatica mosaic virus infection.、International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology、2008.8.5-8.9、イスタンブール(トルコ)
- (7) 小松 健・尾関丈二・千秋博子・姫野未紗子・山次康幸・難波成任、オオバコモザイクウイルス(PIAMV)の遺伝学的多様性、平成 20 年度日本植物病理学会、2008.4.26-4.28、松江
- (8) 千秋博子・尾関丈二・橋本将典・小松健・青山倫子・山次康幸・難波成任、Potexvirus 属ウイルスによる RNA サイレncing抑制能の比較解析、平成 20 年度日本植物病理学会、2008.4.26-4.28、松江
- (9) 姫野未紗子・前島健作・小松 健・山次康幸・濱本 宏・難波成任、糸状菌に感染する Totivirus 科ウイルスの分類について、平成 20 年度日本植物病理学会、2008.4.26-4.28、松江

#### 6. 研究組織

(1)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・助教  
研究者番号：40345187

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし