

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06059

研究課題名(和文)植物ウイルス感染による退緑症状発病機構の解明と耐病性植物作出の試み

研究課題名(英文)The mechanism behind the development of chlorosis caused by plant virus infections and attempts to generate disease-resistant plants.

研究代表者

望月 知史(Mochizuki, Tomofumi)

大阪公立大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30469837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物ウイルス感染による代表的な症状である退緑の発症機構を解明するために、キュウリモザイクウイルス(CMV)の外被タンパク質(CP)の役割を検討した。CMV CPは葉緑体フェレドキシンI(FdI)と相互作用することが知られていた。そこで、葉緑体局在シグナルを付加したCPやFdIと相互作用しないCPを発現する変異株などを用いた接種実験により、葉緑体でCPとFdIが相互作用することにより激しい退緑が発症する可能性が示唆された。一方で、CP単独発現では激しい退緑症状が再現されず、CMV感染による激しい退緑症状にはCP以外のウイルス因子も必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ウイルスが感染した農作物では様々な病気が引き起こされて減収に至る。ウイルス感染による発病機構の解明は防除研究に重要な基礎的知見となる。本研究では、葉緑体でCPとFdIが相互作用することによりCMV感染による激しい退緑が発症する可能性が示唆された。この可能性をさらに検討し、CPと相互作用しないFdIを設計することにより、CMV感染しても激しい退緑を引き起こさない耐病性作物を作出できるかも知れない。CMV CPの129番目のアミノ酸変異で症状が大きく変化することは1990年代初頭には知られていた。本研究成果は、なぜアミノ酸変異で激しい退緑になるのかという疑問の解明に向けた大きな一歩である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of cucumber mosaic virus (CMV) coat protein (CP) in chlorosis, a typical symptom of plant virus infections. CMV CP is known to interact with chloroplast ferredoxin I (FdI), so we further examined this interaction. Inoculation experiments using mutants expressing CP with a chloroplast localization signal and mutants expressing CP that does not interact with FdI suggested that the interaction between CP and FdI in chloroplasts may cause severe chlorosis. On the other hand, expression of CP alone did not induce severe chlorosis, indicating that viral factors other than CP are also required for the severe chlorosis caused by CMV infection.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 発病機構 葉緑体 外被タンパク質 キュウリモザイクウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物ウイルスが感染した植物では様々な病気が引き起こされ、農作物生産では減収に至る。ウイルス感染による植物の発病機構の解明は耐病性植物の創出などの応用研究にとって重要な基礎的知見となるが、ウイルス感染により植物の遺伝子発現や代謝がどのように変化して症状となって現れるのかや遺伝子発現や代謝がなぜ変化するのかなど、その分子機構は明らかではない。植物ウイルス感染による症状は様々であるが、モザイク病の退緑組織に見られるクロロシスは植物ウイルスによる代表的な症状の一つである。そこで本研究では、退緑症状の発病機構の解明を目指した。

(2) 私達は、タバコに退緑症状を引き起こすキュウリモザイクウイルス (CMV) pepo 系統と毒性 (退緑の程度) が異なる外被タンパク質 (CP) 変異株を用いたこれまでの研究により、退緑組織では、①葉緑体中のチラコイド膜構造が特異的に減少している (Mochizuki and Ohki 2011)、②核ゲノムにコードされる光合成関連遺伝子の mRNA 蓄積量が減少している (Mochizuki et al 2014)、③光合成関連遺伝子 mRNA の蓄積量減少程度と CMV 変異株間の毒性の違いに相関がある (Mochizuki et al 2014)、ことを明らかにしてきた (図 1)。このことから、CMV 感染による光合成関連遺伝子の発現抑制がチラコイド膜減少を引き起こし、退緑症状となって表れると考えられた。

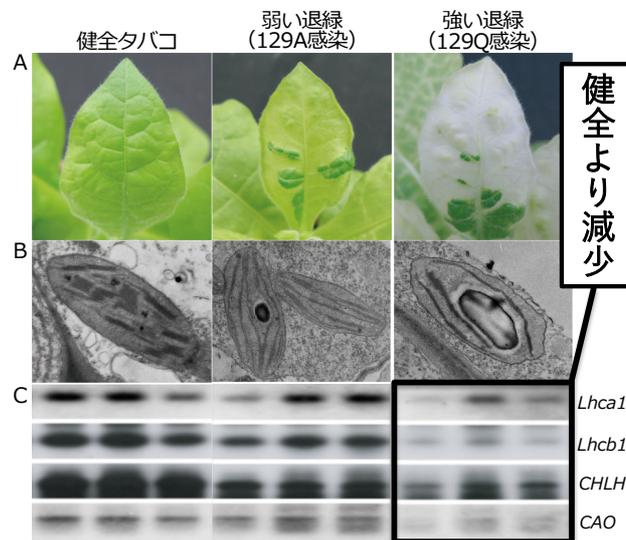


図 1. 毒性の異なる CMV 変異株による退緑症状 (A)、葉緑体微細構造 (B)、および、光合成関連遺伝子 mRNA の蓄積量

(3) しかしながら、①ウイルス感染による光合成関連遺伝子の発現量低下は退緑の直接的な原因なのか？、②CMV 感染によって光合成関連遺伝子の発現量が低下するメカニズムは？という二つの疑問が残されている。さらに、激しい白化症状を引き起こす CMV M 系統について、近年、M 系統 CP はタバコの葉緑体フェレドキシン I (ntFdI) と相互作用すること、激しい白化症状は CP による ntFdI の葉緑体局在阻害によるものであることが報告されが (Qiu et al. 2018)、この報告では、CP による ntFdI の葉緑体局在阻害が M 系統以外の CMV 系統に共通する発病機構であるのかについては明らかにはされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルス感染により植物が退緑を発症する分子機構を明らかにするために、以下の二点について明らかにすることである。

- ① 退緑発症、光合成関連遺伝子発現量低下、葉緑体形態異常との因果関係を解明するために、CMV CP を誘導発現して退緑を示す遺伝子組換えシロイヌナズナ実験系を作出し、葉緑体遺伝子の発現量低下と葉緑体形態異常が「いつ」起こるのかを明らかにする。加えて、遺伝子組換えシロイヌナズナに変異原処理して CP が発現しても退緑しない CP ナズナを得て、退緑を示さなくなった原因遺伝子を同定する。
- ② pepo 系統 CP とその変異 CP が ntFdI と相互作用するかどうか、そして、激しい白化症状を示す変異株感染が ntFdI の葉緑体局在を阻害するかどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### ① CMV CP を誘導発現して退緑を示す遺伝子組換えシロイヌナズナ実験系の作出

野生型 pepo 系統 CP (129P)、あるいは変異 CP (129Q) をエストラジオール誘導プロモーターから発現させる組換えシロイヌナズナをそれぞれ作出し、エストラジオールを含む寒天培地上で生育させた際に明瞭な退緑の表現型を示す系統を選抜して、以下の実験を行う。

(a) エストラジオール処理後に経時的にサンプリングした葉組織における光合成関連遺伝子 mRNA 蓄積量、および、葉緑体微細構造を解析し、光合成関連遺伝子蓄積量の減少や葉緑体形態異常が退緑に先立って起こるのかどうかを検討する。

(b) CP ナズナ種子を変異誘導剤 EMS で処理して突然変異を誘発し、エストラジオール含有植物育成培地に播種する。退緑せずに緑色を保つものを選抜し、原因遺伝子を同定するための自植後代を得て、MutMap 法により突然変異形質の原因遺伝子を同定する。

#### ③ pepo 系統 CP と ntFdI との相互作用の解析

野生型 CP (129P)、変異 CP (129A、129Q) と ntFdI との相互作用を Yeast two-hybrid (Y2H) 法および Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によって確かめる。

ntFdI に GFP を融合した組換えタンパク質を一過的に発現させる実験系により、野生型 pepo 系統や変異株 (129A と 129Q) が感染して退緑を発症した組織において、ntFdI の葉緑体局在阻害が見られるのかどうかを観察する。

pepo 系統の部分欠損 CP や ntFdI と相互作用しない Q 系統とのキメラ CP を用いて ntFdI と相互作用する CP 領域を特定する。さらに、ntFdI と相互作用しない Q 系統とのキメラ CP を発現する変異株を作出し、退緑発症における CP と ntFdI との相互作用の必要性を検討する。

### 4. 研究成果

#### ① CMV CP を誘導発現して退緑を示す遺伝子組換えシロイヌナズナ実験系の作出

野生型 CP (129P) とその変異 CP (129Q) がエストラジール処理により単独発現する遺伝子組換えシロイヌナズナを作出した。MS 寒天培地で生育させた組換えシロイヌナズナ T2 世代にエストラジール処理したところ、それぞれの CP の蓄積は確認できたが、CMV 感染時のような退緑症状は示さなかった。このことから、CMV 感染による退緑症状の発症には、CP 以外のウイルス因子が必要であることが示唆された。

#### ② pepo 系統 CP と ntFdI との相互作用の解析

(1) Y2H 法および BiFC 法により、野生型 pepo 系統 CP (12P) とその変異 CP (129A、129Q) 全てが ntFdI と相互作用することが分かった (図 2A、B)。

(2) 野生型や変異株 (129A、129Q) が感染したタバコ退緑組織細胞において、ntFdI-GFP を発現させて局在を観察したところ、全ての退緑組織において ntFdI-GFP 蛍光は葉緑体で観察され

(図 3)、CMV 感染による ntFdI の葉緑体局在は阻害は認められなかった。以上から、CMV-pepo 系統による退緑発現メカニズムは、M 系統で報告された ntFdI の葉緑体局在阻害とは異なることが示唆された。

(3) 数種の部分欠損 CP と Q 系統 CP とのキメラ CP の ntFdI との相互作用の有無を解析した結果、CP の C 末端が ntFdI との相互作用に重要であり、pepo 系統 CP の C 末端を Q 系統 CP に置換したキメラ CP (CQ) は ntFdI との相互作用が見られなくなった (図 4)。

(4) 激しい白化症状を引き起こす 129Q について、FdI との相互作用と退緑症状との関係性を確かめた。129Q の C 末端を Q 系統に置換した変異株 CQ-129Q を作出してタバコに接種したところ、激しい白化症状が緩和された (図 5)。続いて、pepo 系統 CP が葉緑体に局在して退緑を引き起こしているのかどうかを検討するため、野生型 CP (129P) の N 末端に葉緑体輸送ペプチドを付加した変異株 TP-CP をタバコに接種すると、激しい白化症状が引き起こされた (図 5)。TP-CP の C 末端を Q 系統に置換した変異株 TP-CQ をタバコに接種すると激しい白化症状が緩和された (図 5)。以上より、激しい白化症状の誘導には葉緑体における FdI と CP との相互作用が必要であることが示唆された。

#### <引用文献>

- Mochizuki and Ohki (2011) Single amino acid substitutions at residue 129 in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and thylakoid structure. Arch Virol. 156: 881-886.
- Mochizuki et al. (2014) Quantitative transcriptional changes associated with chlorosis severity in mosaic leaves of tobacco plants infected with the *Cucumber mosaic virus*. Mol Plant Pathol. 15: 242-254.
- Qiu et al. (2018) Cucumber mosaic virus coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. Sci Rep. 8: 1205.

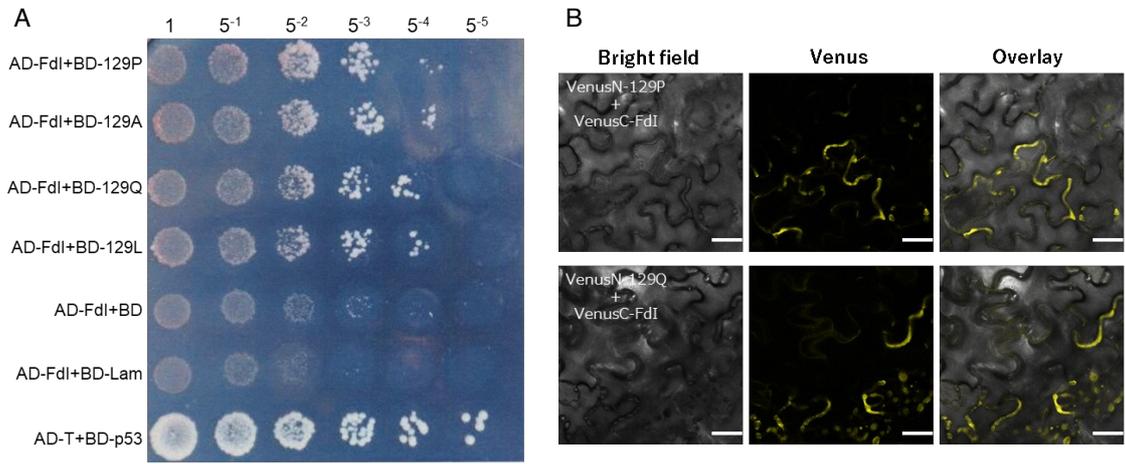


図 2. Y2H 法 (A) および BiFC 法 (B) による、pepo 系統野生型 CP (129P)、および、変異 CP (129A、129Q、129L) と ntFdi との相互作用の解析。

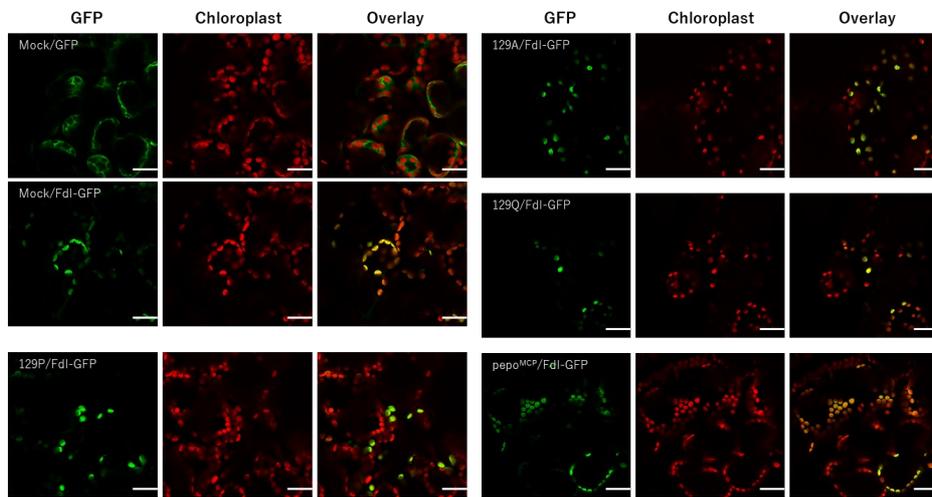


図 3. ntFdi-GFP の一過的発現系による、ntFdi の細胞内局在の解析。すべての CMV 感染退緑組織において、ntFdi-GFP 蛍光は葉緑体自家蛍光と一致した。

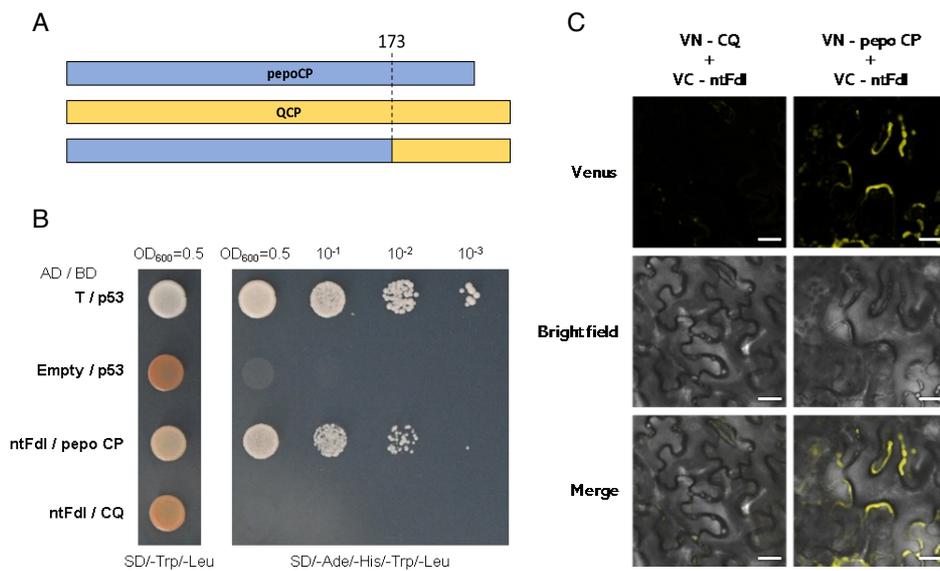


図 4. Y2H 法 (B) および BiFC 法 (C) による、ntFdi と相互作用する CP 領域の特定。C 末端を Q 系統に置換したキメラ CP (CQ) は ntFdi との相互作用が認められない。

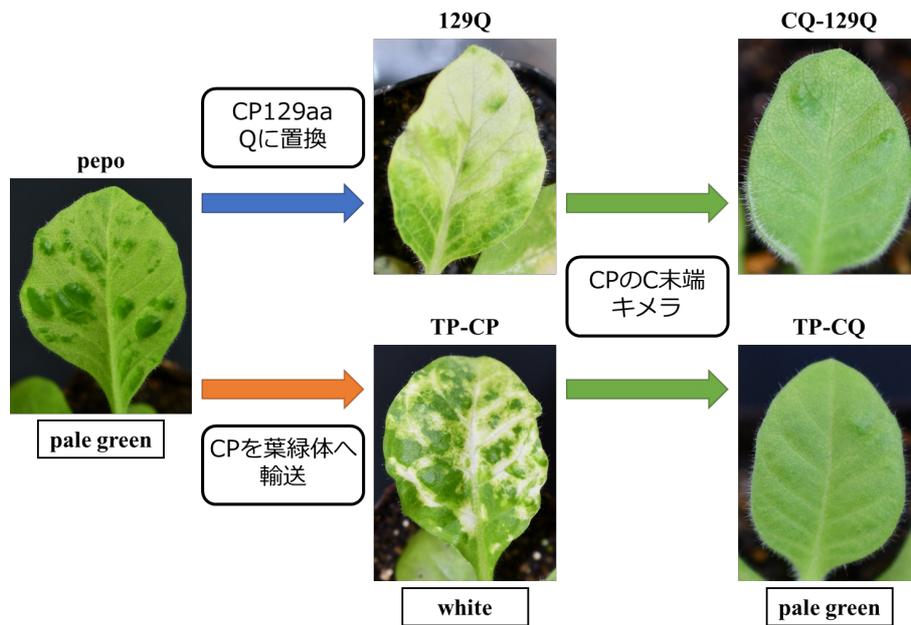


図 5. 129 番目のアミノ酸残基置換 (129Q)、葉緑体局在シグナルの付加 (TP-CP)、ntFdI との相互作用欠損 (CQ-129Q および TP-CQ) による退緑症状の激しさの変化。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murai Hiroto, Atsumaru Kenta, Mochizuki Tomofumi	4. 巻 167
2. 論文標題 Effect of mutations in the 2b protein of tomato aspermy virus on RNA silencing suppressor activity, virulence, and virus-induced gene silencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-021-05344-z	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 Murai Hiroto, Mochizuki Tomofumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Virus-Induced Gene Silencing in Chrysanthemum seticuspe Using the Tomato Aspermy Virus Vector	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 430 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11030430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fuji Shin-ichi, Mochizuki Tomofumi, Okuda Mitsuru, et al.	4. 巻 88
2. 論文標題 Plant viruses and viroids in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-022-01051-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanase Koji, Matsushita Yosuke, Mochizuki Tomofumi	4. 巻 88
2. 論文標題 Silencing of the chalcone synthase gene by a virus vector derived from the cucumber mosaic virus in petunia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 507 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.UTD-078	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 望月 知史	4. 巻 45
2. 論文標題 植物ウイルス感染による退緑症状の発病機構 -ウイルスによる葉緑体代謝の制御-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本農業学会誌	6. 最初と最後の頁 7~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W20-09	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井口宏紀、集 健太、望月知史
2. 発表標題 キュウリモザイクウイルスによる退緑発病機構における外被タンパク質と葉緑体の関与
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井口宏紀、集 健太、望月知史
2. 発表標題 キュウリモザイクウイルスペポ系統の外被タンパク質とフェレドキシンIの相互作用の調査
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小枝亮彦、望月知史
2. 発表標題 外被タンパク質遺伝子のヌクレオチド組成とジヌクレオチド組成を改変したキュウリモザイクウイルスの病原性と競合的適応度
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井裕知、望月知史
2. 発表標題 キクタニグクへのトマトアスパーマイウイルス感染性クローンの効率的な接種方法の確立
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村井裕知、久保田健嗣、望月知史
2. 発表標題 トマトアスパーマイウイルス2bタンパク質の変異が病原性およびサイレンシングサプレッサー活性に与える影響
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

MOCHIZUKI Lab. @OMU <a href="https://www.omu.ac.jp/agri/mochizukiviruslab/">https://www.omu.ac.jp/agri/mochizukiviruslab/</a>
--

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
研究協力者	井口 宏紀  (Iguchi Hiroki)	大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・大学院生	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	集 健太  (Atsumaru Kenta)	大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・大学院生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関