

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23660

研究課題名（和文）植物の抗ウイルス免疫誘導時に働くウイルス増殖阻害実行因子に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of a factor that restricts viral propagation in plant antiviral immunity

研究代表者

吉田 哲也（Tetsuya, Yoshida）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：00809874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物ウイルスは宿主に極度に依存した感染環を有するため有効な化学農薬が存在しないことから、ウイルス抵抗性の利用が有効な防除法であり、その分子機構の解明は重要な課題である。本研究では植物ウイルスに対する抵抗性システムを対象とした解析を行い、未解明の点の多い植物ウイルス抵抗性遺伝子JAX1の機能に重要な領域およびアミノ酸残基を新たに同定することに成功した。また、植物体におけるウイルスの感染域を拡大する活性を有する配列を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JAX1による抵抗性の発現に重要な領域およびアミノ酸残基を同定できたことから、本研究は特異な因子をコードし未解明の部分の多い抵抗性遺伝子JAX1の分子機能の全容解明に向けた基盤的知見となると考えられる。また、植物ウイルスの感染域を拡大する活性を有する配列を見出したことから、本研究はウイルスの全身感染様式の詳細な理解に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Understanding the mechanism of plant antiviral immunity is important for disease-resistance breeding. I investigated whether various mutants of the noncanonical antiviral resistance factor JAX1 could inhibit viral replication, and identified some regions and amino acid residues that are crucial for the function of JAX1. I also revealed that a specific sequence enhances the spread of a plant virus in its host.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは宿主に極度に依存した感染環を有するため、他の病原体では有効な手段である化学農薬を利用した防除は困難である。植物ウイルスの有効な防除法の一つとして、植物の有するウイルス抵抗性システムの利用が挙げられる。抵抗性システムの一つとして、ウイルスに対する細胞内受容体である **nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR)** タンパク質をコードする優性抵抗性遺伝子による抵抗性が挙げられる。当該抵抗性においては、**NLR** タンパク質がウイルスの侵入を検知したのち、複雑なシグナル伝達経路を経て抵抗性が発揮されるが (de Ronde et al., 2014)、その最下流でウイルス増殖が阻害される分子機構には不明な部分が多く残されている。また、細胞内受容体以外をコードする優性抵抗性遺伝子による抵抗性の詳細な分子機構や、ウイルスに対する抵抗性システムとして働く **RNA** サイレンシングの時空間動態などについても全容解明には至っていない。

2. 研究の目的

抵抗性活性を有する培養細胞由来抽出液を用いた新規な無細胞解析系を利用することにより、**NLR** 型抵抗性遺伝子による抵抗性の最下流でウイルス増殖が阻害される分子機構の解明を試みる。また、**NLR** ではなくジャカリンレクチンタンパク質をコードし、ポテックスウイルス属ウイルスの複製を阻害する優性抵抗性遺伝子 **JAX1** (Yamaji et al., 2012; Yoshida et al., 2019) の機能領域を明らかにする。また、一般に植物の生長点が示す強固なウイルス抵抗性への関与が報告されている **RNA** サイレンシング (Qu et al., 2005; Schwach et al., 2005) の生長点付近における時空間動態の解明に向けた解析を行う。

3. 研究の方法

ウイルスに対する細胞内受容体およびそれにより認識されるウイルスタンパク質 (エリシター) を薬剤依存的に発現する培養細胞ラインを構築する。構築した培養細胞ラインに薬剤を処理し人為的に抵抗性反応を誘導したのち、細胞抽出液を作出する。細胞抽出液を各種クロマトグラフィーに順次供試し活性を有する画分を絞り込むことで、ウイルス増殖を阻害する因子を特定するとともに、その機能を明らかにする。

また、**JAX1** の各種変異体を作成し、培養細胞由来抽出液中でのウイルス複製阻害活性等を調べることにより、**JAX1** の機能に重要な領域およびアミノ酸残基を明らかにする。

さらに、野生型植物および **RNA** サイレンシング関連因子を一過的に発現抑制した植物における各種ウイルスバリエントの動態を詳細に観察する。

4. 研究成果

抵抗性活性を示す培養細胞由来抽出液を得る目的で、**NLR** 型抵抗性タンパク質およびエリシタータンパク質を発現する植物培養細胞ラインの確立を試みた。複数種類のプロモーターの下流に **NLR** タンパク質およびエリシタータンパク質のコード領域を連結したプラスミドを多数作出し、培養細胞への形質転換を行ったところ、一部のコンストラクトで形質転換に成功し、一過的なタンパク質の発現を確認した。しかし、**NLR** タンパク質およびエリシタータンパク質を安定して発現可能な培養細胞ラインの構築には至らなかった。これらと並行して、植物-ウイルス間相互作用解析のための新たなパソシステム確立に資することを目指し、園芸植物や野生植物などを対象に新規ウイルスの探索を行ったところ、国内未発生ウイルスやゲノム情報の不明なウイルス等を検出し、そのゲノムを解読することに成功した。

NLR タンパク質およびエリシタータンパク質を発現する培養細胞ラインの確立に至らなかったことから、これまでに植物培養細胞および培養細胞由来抽出液中での安定した解析の実績のある **JAX1** を用いた解析を行った。これまで不明であった **JAX1** の機能に重要な領域およびアミノ酸残基の特定を目指して、まず **JAX1** の各種領域を欠損したバリエントを複数作出した。各種バリエントを培養細胞抽出液中で発現させ、ポテックスウイルスの複製に与える影響を *in vitro* で調べたところ、複数のバリエントでウイルス複製阻害活性が低下または消失することを見出した。さらに、機能に重要であった領域を中心としてアミノ酸配列を変化させた **JAX1** バリエントを多数作出し同様の解析を行ったところ、複数のバリエントでウイルス複製阻害活性が低下または消失することを確認した。これらのことから、**JAX1** 遺伝子によるウイルス抵抗性発現に重要な領域およびアミノ酸残基を絞り込むことに成功した。この成果は、未解明の点の多い **NLR** 以外の因子をコードする抵抗性遺伝子 **JAX1** の分子機能の詳細な理解に貢献する成果であると考えられる。

また、一般に強固なウイルス抵抗性を示すことの知られる生長点における **RNA** サイレンシ

グの動態解明に向けた解析を行った。ウイルス誘導性ジーンサイレンシングにより RNA サイレncingの鍵因子を一過的に発現抑制した *Nicotiana benthamiana* に対し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するポテックスウイルス属ウイルスを接種し、GFP 蛍光パターンを観察したところ、野生型植物に接種した場合に比べ、植物体最上位部での蛍光が顕著に高まることを確認した。同ウイルスの様々なバリエーションを作成し同様の解析を行ったところ、植物体最上位部における蛍光がより高まるバリエーションを見出すことに成功した。植物体におけるウイルスの感染域を拡大する活性を有する配列を見出すことができたことから、今後同配列の機能解明を通じて、ウイルス全身感染の様式の理解が進むことが期待される。さらに、植物体内におけるウイルスの分布をより詳細に観察するため、ウイルス接種植物を透明化試薬により透明化し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、いくつかの条件において生長点近傍でウイルス由来と思われるシグナルを見出すことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katsu Kosuke, Nijo Takamichi, Yoshida Tetsuya, Okano Yukari, Nishikawa Masanobu, Miyazaki Akio, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Complete genome sequence of pleioblastus mosaic virus, a distinct member of the genus Potyvirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 645-649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-020-04916-9	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 Suzuki Takumi, Iwabuchi Nozomu, Tokuda Ryosuke, Matsumoto Oki, Yoshida Tetsuya, Nishikawa Masanobu, Maejima Kensaku, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete genome sequence of mirabilis crinkle mosaic virus isolated from pokeweed in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00283-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00283-21	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 Okano Yukari, Maejima Kensaku, Yoshida Tetsuya, Nishida Shuko, Tokuda Ryosuke, Nishikawa Masanobu, Namba Shigetou, Yamaji Yasuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Interfamily transfer of Arabidopsis lectin-mediated antiviral gene confers resistance to pepino mosaic virus in tomato	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 274-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-020-00917-3	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木拓海, 鈴木寛人, 岡野夕香里, 吉田哲也, 西川雅展, 藤本祐司, 岩淵望, 前島健作, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 JAX1遺伝子はトマトに広範なポテックスウイルスに対する抵抗性を付与する
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

1. 発表者名 岡野夕香里, 前島健作, 吉田哲也, 鈴木拓海, 松本旺樹, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 pepino mosaic virusに抵抗性を示すJAX1形質転換トマトの作出
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田哲也, 岡野夕香里, 西田萩子, 松本旺樹, 鈴木拓海, 前島健作, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 抵抗性遺伝子JAX1による広範なポテックスウイルスの増殖阻害
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaji Yasuyuki, Okano Yukari, Neriya Yutaro, Hashimoto Masayoshi, Yusa Akira, Yoshida Tetsuya, Hatanaka Tadashi, Narusaka Mari, Narusaka Yoshihiro, Maejima Kensaku, Namba Shigetou
2. 発表標題 Counter for the epidemics of potexviruses - Toward the eradication of pepino mosaic virus -
3. 学会等名 The 10th International Conference of Clinical Plant Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝浩介, 吉田哲也, 丸山紀子, 二條貴通, 西川雅展, 徳田遼佑, 前島健作, 難波成任, 山次康幸
2. 発表標題 東京都内のタケ亜科植物から検出されたポティウイルスの全ゲノム配列解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------