

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008~2011

課題番号：2068802

研究課題名 (和文) 植物ウイルスに対する防御ネットワークに関わる宿主遺伝子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of host factors involved in the defense network against plant viruses

研究代表者

中原 健二 (NAKAHARA KENJI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90315606

研究分野：ウイルスに対する植物自然免疫

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：PAMPs、RNAi、自然免疫、植物ウイルス

1. 研究計画の概要

植物は自然免疫を多層的に発達させ、互いに連携したネットワークとして病原微生物に対抗していることが明らかになりつつある。ウイルスに対してもこのような防御ネットワークが発達していることが想定されているが現在の知見ではうまく説明できない。本研究でタバコのカルモジュリン様タンパク rgs-CaM を介した未知の防御機構が RNA サイレンシングや他の防御機構と連携してウイルスに対する防御ネットワークを形成していることを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

多くのウイルスは RNA サイレンシング抑制遺伝子 RSS をコードしている。ウイルス RSS の多くは 2 本鎖 RNA もしくは短鎖 RNA (siRNA) に結合し、それらを RNA サイレンシング経路から奪うことで RNA サイレンシングを抑制してウイルスの感染・増殖を促進する。

(1) 本研究でタバコの rgs-CaM がこの 2 本鎖 RNA/siRNA 結合領域に親和性を持つことで普遍的に RSS タンパクに結合するのではないかと仮説を立て検証した。その結果、rgs-CaM はポテウイルスの HC-Pro だけでなくキュウリモザイクウイルスの RSS、2b タンパク質とも結合することを BIACORE による表面プラズモンレゾナンス解析により見出した。2b の正に帯電した siRNA 結合領域に rgs-CaM の負に帯電した領域が結合することが計算上、予測され、これを支持する結果が他のウイルス RSS タンパクと rgs-CaM の結合試験でも得られたことから、rgs-CaM は仮説通り普遍的にウイルス RSS に結合すると結論した。

(2) rgs-CaM が RSS タンパクの siRNA 結合領域に結合するとすれば、その RNA サイレンシ

ング抑制能を阻害している可能性がある。実際に検討してみたところ、内生の rgs-CaM の発現を抑制した場合に、RSS タンパク (HC-Pro と 2b) の RNA サイレンシング抑制活性が上昇した。つまり、rgs-CaM は結合した RSS タンパクの RNA サイレンシング抑制能をある程度抑制することが明らかになった。

(3) rgs-CaM 自身の発現がウイルス感染や RSS タンパクの発現下で誘導されることを明らかにした。一方、rgs-CaM を過剰発現する形質転換タバコでえそ斑状の細胞死が観察され、多くの病原関連タンパクや抗菌タンパクなどの発現誘導がノーザンおよびマイクロアレイによる解析で確認された。

以上の結果から、当初の仮説通り、rgs-CaM はウイルス RSS タンパクの 2 本鎖 RNA/siRNA 結合領域に親和性を持つことで普遍的に RSS に結合し、ウイルスの侵入を感知して自身の発現を誘導する。つまり、rgs-CaM は RSS をウイルスの病原関連基本パターン分子 (PAMPs) として認識する受容体で、まずそれ自身が、結合した RNA サイレンシング抑制能を阻害して結果として宿主の RNA サイレンシングによる抗ウイルス活性を高めるとともに、他の防御機構も活性化してウイルスに対抗していることが示唆された。

さらに意外なことに、解析の中で rgs-CaM がウイルスの外皮タンパクとも結合することを示唆する結果を得た。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由)

上記のように当初の仮説通り rgs-CaM を介した未知の防御機構が RNA サイレンシングや他の防御機構と連携してウイルスに対す

る防御ネットワークを形成していることを示唆する結果を得た。その上、rgs-CaM が意外にもウイルス外皮タンパクに結合する可能性を示す結果を得た。これは rgs-CaM がウイルスの侵入を感知する受容体とすれば、非常に重要な意味を持つ。なぜなら、全てのウイルスは外皮タンパクをコードしていると思われる、そして、外皮タンパクは RSS と違ってウイルス粒子の構成因子の1つであるからウイルス（粒子）が植物細胞内に侵入後すぐに感知することができる。つまり、より適した性質を持つ外皮タンパクがウイルス PAMPs である可能性を発見したからである。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 上記のように植物はウイルス RSS だけでなく外皮タンパクを rgs-CaM の結合を介して認識してウイルスの侵入を感知している可能性が新たにでてきた。計画を変更して rgs-CaM と外皮タンパクの結合について検証・解析を進める。

(2) RSS に結合した rgs-CaM がそのまま RSS の RNA サイレンシング抑制能を阻害することについて確証を得るために、どのような分子メカニズムで阻害しているのか解明を目指す。これまでに、rgs-CaM は単に RSS が 2 本鎖 RNA/siRNA に結合するのを邪魔しているのではなく、結合した RSS タンパクを不安定化していることを示唆するデータを得ており、このことについてさらに解析を進める。

(3) rgs-CaM による他の防御機構を誘導・活性化についても上記と同様に確証を得るために、その分子メカニズムの解明を目指す。

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 5 件)

① Kenji S. Nakahara, Kouji Yoshida, Tsutae Ito, Kouichi Suzuki and Nobuyuki Yoshikawa, Sensitive PCR-based detection of Apple chlorotic leaf spot virus heterogenous in apple trees, Japan Agricultural Research Quarterly, 査読有, 2011, in press

② Kenji S. Nakahara, Ryoko Shimada, Sun-Hee Choi, Haruko Yamamoto, Jun Shao, and Ichiro Uyeda, Involvement of the P1 Cistron in Overcoming eIF4E-Mediated Recessive Resistance Against Clover yellow vein virus in Pea, Molecular Plant Microbe Interactions, 査読有, 23, 2010, 1460-1469

③ Young Sik Lee, Sigal Pressman, Arlise P. Andress, Kevin Kim, Jamie L. White, Justin J. Cassidy, Xin Lil, Kim Lubell, Do Hwan Lim, Ik Sang Cho, Kenji Nakahara, Jonathan B. Preall,

Priya Bellare^{1,5}, Erik J. Sontheimer¹ & Richard W. Carthew, Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking, Nature Cell Biology, 査読有, 11, 2009, 1150 - 1156

④ Marcelo Andrade, Yosuke Abe, Kenji S. Nakahara and Ichiro Uyeda, The cyv-2 resistance to Clover yellow vein virus in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E, Journal of General Plant Pathology, 査読有, 75, 2009, 241-249

⑤ Go Atsumi, Uiko Kagaya, Hiroaki Kitazawa, Kenji S. Nakahara, and Ichiro Uyeda, Activation of the Salicylic Acid Signaling Pathway Enhances Clover yellow vein virus Virulence in Susceptible Pea Cultivars, Molecular Plant Microbe Interactions, 査読有, 22, 2009, 166-175

[学会発表] (計 11 件)

① 中原 健二, タバコのウイルスに対する基礎免疫におけるカルモジュリン様タンパク rgs-CaM の役割¹, 平成23年度日本植物病理学会大会, 2011年3月29日, 東京農工大学 (府中市)

② Kenji Nakahara, Counterdefense against Viral RNAi Suppressors in Tobacco, Keystone SYMPOSIA Mechanism and Biology of Silencing (招待講演), 2011年3月20日~3月25日, Monterey, California, USA

③ Syota Yamada, Effect of rgs-CaM overexpression on PVY accumulation in transgenic tobacco plants, Keystone symposia RNA silencing mechanisms in plants, 2010年 2月 21-26日, Santa Fe, New Mexico, USA

④ Kenji Nakahara, eukaryotic initiation factor 4E involved in a recessive resistance to Clover yellow vein virus in pea carrying cyv2, International Congress of Virology, The International Union of Microbiological Societies, 10-15 August, 2008, Istanbul, ISTANBUL CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE