

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580046

研究課題名（和文） タバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子の転写調節と過敏感応答誘導機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of transcriptional regulation of Tobacco mosaic virus resistance gene and induction of hypersensitive response

研究代表者

丹生谷 博 (NYUNOYA HIROSHI)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・教授

研究者番号：60135936

研究成果の概要（和文）：*N* 遺伝子のプロモーター上流領域に結合する転写因子として、Dof ファミリーに属する BBF1, BBF2, 及び BBF3 を同定した。*N* 遺伝子の約 2.3 kb の上流配列（NP2.3）にレポーター遺伝子 GFP を接続してプロモーター解析を実施した結果、BBF1 の一過的発現は *N* 遺伝子の転写を増大させた。また、BBF1 の過剰発現時により、ROS 産生、及び HR 誘導と関連遺伝子の転写増強がもたらされた。

研究成果の概要（英文）：Dof transcription factors BBF1, BBF2 and BBF3 were binding factors to the region upstream of the *N* gene promoter. Transient expression of BBF1 led to enhancements of *N* gene transcription, ROS production and HR induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：タバコモザイクウイルス、抵抗性遺伝子、Dof 転写因子、過敏感応答

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは *N* 遺伝子上流域にレポーター遺伝子（GFP）を接続して、アグロバクテリウム浸潤法による一過性発現実験でこれを再現させる系を確立した。連続的な欠失体を用いた転写量測定の結果、転写開始点を含む上流域約 0.26 kb のゲノム断片があれば、p50 依存的に転写が 3～4 倍に上昇することがわかった。p50 に加えて、*N* タンパク質を同時に発現させることにより、さらに転写が増強された。そこで、タバコモザイクウイルス（TMV）遺伝子産物の一部である p50 がエリシターとして植物細胞内の転写因子を直接

に活性化するのか、または *N* タンパク質のような細胞質内のタンパク質との相互作用を介して活性化するのかを明らかにする必要があった。

## 2. 研究の目的

申請者らは、*N* タンパク質が、*N* 遺伝子すなわち自己遺伝子上流域の p50 標的配列を介した転写増強にも関与しているという新事実を発見し、最小標的配列となる 20 bp のエンハンサー配列の Dof 結合モチーフ（AAAG）が必須であることを明らかにしていた。本研究では、タバコに複数存在する Dof

転写因子の cDNA クローニングを行い、組換えタンパク質を得て、DNA 結合能やファウエスタン法を用いたタンパク質-タンパク質間相互作用の詳細な解析を進める。これらの結果から、N タンパク質、p50、Dof 因子がどのような相互作用により転写を調節して、HR 誘導が導かれるかを解明しようとした。

### 3. 研究の方法

(1) タバコに存在する Dof 転写因子うち、BBF1、BBF2 および BBF3 の完全長 cDNA をクローニングし、組換えタンパク質を発現して精製を行う。これらの組換えタンパク質と 20 bp のエンハンサー配列の結合について *in vitro* の実験を行い、3 種の転写因子の結合能の比較や標的配列の詳細な分析を行う。また、Dof タンパク質の植物細胞での発現系を構築し、N 遺伝子転写活性化のエフェクターとしての評価を行う。これらの方法により、Dof は単独でも転写活性化を起こすか、p50 や N タンパク質と相加的に作用または相乗的に働くかを調べ、3 つのエフェクターの関係について解析する。

(2) DOF タンパク質が *in vivo* で実際に転写活性化に関与することを確認するために、タバコ葉から調製した抽出物と混合してゲルシフトアッセイを行い、エンハンサー結合性転写因子を検出する。シフトバンドの特異性を確認するためには、非放射性プローブによる競合実験や変異型プローブを用いる。細胞内での Dof 因子と標的 DNA との結合については、質量分析機を用いて同定し、転写活性化に関与する新規因子を明らかにして、転写活性化機構を推定する。

### 4. 研究成果

(1) N 遺伝子の約 2.3 kb の上流配列 (NP2.3) にレポーター遺伝子 GFP を接続してプロモーター解析を実施した結果、p50 が関与する転写増強には Dof ファミリー転写因子が関与している可能性が示唆された。そこで BBF1 について、N 遺伝子の転写増強と N を介した防御応答における役割を調べたところ、N 遺伝子をもつタバコで p50 の非存在下で BBF1 を一過的に過剰発現させると、HR は誘導されないが、内在性 N 遺伝子の発現が増加した。

(2) p50 存在下で BBF1 を一過的に共発現させた結果、BBF1 を共発現しない場合と比べて HR が増強された。一方、HR 誘導時における内在性 BBF1 の発現量の変化を調べたところ、TMV 感染や p50 による HR 誘導時において、N 遺伝子の発現は増強されたが、BBF1 遺伝子の転写量に変化は見られなかった。

(3) 興味深いことに、N 遺伝子の有無に関わらず、BBF1 の過剰発現時では、p50 発現に非依存的に ROS の産生量が増大したが、ROS 産生に関わるとされる NADPH オキシダーゼ遺伝子 (NtrbohD) の発現は影響がなかった。また、N 遺伝子の非存在下で HR が誘導されない場合でも、BBF1 を過剰発現時させると、サリチル酸やジャスモン酸を介したシグナル伝達経路のマーカー遺伝子 (PR1a, PR1b) や HR マーカー遺伝子 (Hsr203j, Hin1) の発現が増加した。

これまで Dof ファミリー転写因子の機能については、数多くの報告があるが、病原抵抗性に関与する報告はほとんど存在しない。本研究の成果は、代表的なウイルス抵抗性遺伝子の作用機構について、重要な新規知見を得たものとなった。

### 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 5 件)

① Mayumi Takano, Md. Ashraful Haquea, Shota Odaira, Keiko Nakata, Nobumitsu Sasaki, and Hiroshi Nyunoya. Overexpression of a tobacco Dof transcription factor BBF1 stimulates the transcription of the tobacco mosaic virus resistance gene N and defense-related responses including ROS production. *Plant Biotechnology*. 査読有, 30(1), 2013, 37-46, DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.1207a

② Hiraguri A, Hibino H, Hayashi T, Netsu O, Shimizu T, Uehara-Ichiki T, Omura T, Sasaki N, Nyunoya H, Sasaya T. The movement protein encoded by gene 3 of rice transitory yellowing virus is associated with virus particles. *Journal of General Virology*. 査読有, 93(10), 2012, 2290-2298, DOI:10.1099/vir.0.044420-0

③ Nobumitsu Sasaki, Tatsuro Odawara, Shoko Nagai, Kazuma Yoshimura, Yasuhiko Matsushita, Hiroshi Nyunoya. Interference with initial and short-distance cell-to-cell movement of Tomato mosaic virus in transgenic tobacco plants with high expression of BcKELP, a virus movement protein interactor from *Brassica campestris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 査読有, 78, 2012, 38-44, DOI:10.1016/j.pmpp.2012.01.003

④ A. Hiraguri, O. Netsu, T. Shimizu, T. Uehara-Ichiki, T. Omura, N. Sasaki, H. Nyunoya, T. Sasaya. The nonstructural protein pC6 of rice grassy stunt virus trans-complements the cell-to-cell spread of a movement-defective tomato mosaic virus. The nonstructural protein pC6 of rice grassy stunt virus trans-complements the cell-to-cell spread of a movement-defective tomato mosaic virus. Archives of Virology, 査読有, 156(5)2011, 911-916, DOI: 10.1007/s00705-011-0939-6

⑤ J-S. Gao, Y. Meng, N. Sasaki, H. Kanegae, N. Hayashi, H. Nyunoya. Characterization and cloning of TMV resistance gene N homologues from Nicotiana tabacum. African Journal of Biotechnology, 査読有 9(47), 2010, 7998-8006, DOI:10.5897/AJB10.732

[学会発表] (計 18 件)

① Takano M., Odaira S.1, Haque M.A. Sasaki N. and Nyunoya H. OVEREXPRESSION OF THE DOF PROTEIN IN TOBACCO LEADS TO TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF THE RESISTANCE GENE N, SUGGESTING POTENTIAL ROLES IN THE REGULATION OF HYPERSENSITIVE RESPONSE TO TMV. The 24th International Conference on Arabidopsis Research. 2013. 6月 25 日 (発表決定), シドニー (オーストラリア)

② 高野 真由美、アシュラフル・ハーク、佐々木 信光、丹生谷 博、タバコ Dof タンパク質 BBF1 の一過的過剰発現時における防御関連遺伝子の発現解析, 平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013. 3 月 29 日, 岐阜市

③ 高岡万純, 佐々木信光, 丹生谷 博, 抵抗性因子 N のスプライシングバリエントの一過的過剰発現はエリシター誘導性の過敏感細胞死およびウイルス抵抗性を抑制する, 平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013. 3 月 29 日, 岐阜市

④ H. Nyunoya, M. Takano, S. Odaira, Md. A. Haque, N. Sasaki. Involvement of Dof proteins in the Transcriptional Activation of the Tobacco Resistance Gene N by Tobacco Mosaic Virus elicitor and Its Implication for the induction of Hypersensitive Response. BIT's 2nd Annual World Congress of Microbes-2012. 2012. 8 月 1 日, 広州市 (中国)

⑤ M Takano, MA Haque, N Sasaki, H Nyunoya. Overexpression of tobacco Dof transcription factor enhances transcriptional activation of the virus resistance gene N and ROS generation. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012. 7 月 30 日, 京都市

⑥ M Takaoka, M Takano, MA Haque, N Sasaki, H Nyunoya. The role of a splice variant product of the virus resistance gene N in the induction of hypersensitive response. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012. 7 月 30 日, 京都市

⑦ M. Takano, Md. A. Haque, N. Sasaki, H. Nyunoya. Transcriptional activation of the N gene and increase of ROS generation by transient overexpression of tobacco Dof protein BBF1. The 2nd Korea-Japan Joint symposium. 2012. 3 月 27 日, 福岡市

⑧小平将太, 松丸昌道, 仲田積実, 佐々木信光, 丹生谷 博, N 遺伝子による防御応答におけるタバコ Dof タンパク質 BBF2 の機能解析, 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012. 3 月 16 日, 京都市

⑨高岡万純, 高野真由美, ハーク アシュラフル, 佐々木信光, 丹生谷 博, TMV 抵抗性遺伝子 N のスプライスバリエント産物の HR 誘導における役割, 第 3 4 回日本分子生物学会年会, 2011. 12 月 15 日, 横浜市

⑩ 高野真由美, ハーク アシュラフル, 佐々木信光, 丹生谷 博, ウイルス抵抗性遺伝子 N を介した過敏感応答の誘導におけるタバコ Dof タンパク質 BBF1 の機能解析, 第 3 4 回日本分子生物学会年会, 2011. 12 月 15 日, 横浜市

⑪ M. Takano, S. Odaira, Md. A. Haque, N. Sasaki, H. Nyunoya. Overexpression of a Dof transcription factor accelerates hypersensitive response to the elicitor of Tobacco mosaic virus through the upregulation of the tobacco resistance gene N. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. 2011. 11 月 29 日, 神戸市

⑫ N. Sasaki, T. Odawara, H. Nyunoya. Virus resistance of transgenic tobacco plants expressing a movement protein-binding

protein. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. 2011.11月28日, 神戸市

⑬ N. Sasaki, T Odawara, H. Nyunoya. Interfered cell-to-cell movement of Tomato mosaic virus in transgenic tobacco plants over-expressing BcKELP, a binding factor for viral movement proteins. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011.9月11日, 札幌市

⑭ H. Nyunoya, N. Sasaki, Md. A. Haque, M. Takano, S. Odaira. Transcriptional Transactivation of the Tobacco Resistance Gene N for Tobacco mosaic virus through its Own Product N Protein. BIT's 1st Annual World Congress of Microbes-2011. 2011.8月1日, 北京市 (中国)

⑮ 小平将太, アシユラフルハーク, 佐々木信光, 丹生谷 博, ウイルス抵抗性遺伝子 N のエリシター応答配列におけるタバコ Dof タンパク質 BBF1 の認識配列の解析, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011.3月27日, 府中市

⑯ 高野真由美, アシユラフルハーク, 佐々木信光, 丹生谷 博, タバコ Dof タンパク質 BBF1 の一過的過剰発現はタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子 N のプロモーターの活性化をもたらす, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011.3月27日, 府中市

⑰ N. Sasaki, Md. A. Haque, M. Takano, S. Odaira, H. Nyunoya. Tobacco transcription factor Dof proteins mediate the promoter activation of the resistance gene N against Tobacco mosaic virus. Cold Spring Harbor Asia Conference - From Plant Biology to Crop Biotechnology. 2010.10月26日, 蘇州市 (中国)

⑱ N. Sasaki, M. A. Haque, M. Matsumaru, S. Odaira, H. Nyunoya. Involvement of tobacco transcription factor Dof proteins in the promoter activation of the resistance gene N against Tobacco mosaic virus. International Congress of Arabidopsis Research 2010. 2010.6月7日, 横浜市

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/3/0000255/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹生谷 博 (NYUNOYA HIROSHI)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・教授

研究者番号 : 60135936

### (2) 研究分担者

佐々木 信光 (SASAKI NOBUMITSU)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・助教

研究者番号 : 70431971

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :