

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580067

研究課題名(和文)植物ウイルス間の病原性相乗効果の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of synergism between plant viruses

研究代表者

竹下 稔 (Takeshita, Minoru)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00304767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物ウイルス間の相互作用に関する分子機構を探るため、CMV-TuMV間の感染初期に生じる局部干渉について、*Nicotiana benthamiana* (Nb)と内在性サリチル酸(SA)が分解されるNahG Nbを用いて解析した。DsRed2を発現するCMV (A1Ds)とEGFPを発現するTuMV (TuEG)、あるいはDsRed2を発現する2b欠損CMV (H1Ds)とTuEGを混合感染させると、NahG NbにおけるH1DsとTuEGとの混合感染で局部干渉が緩和された。この結果から、CMV-TuMV間の局部干渉に関して宿主のSA関連抵抗性とCMVの2b遺伝子の関連性が示された。

研究成果の概要(英文)：Spatial interactions between Cucumber mosaic virus (CMV) and Turnip mosaic virus (TuMV) were analyzed in *Nicotiana benthamiana* for better understand of the molecular mechanisms associated with local interference which can be observed before establishment of plant viral synergism. CMV and TuMV vectors expressing fluorescent protein DsRed2 (Ds) and E-GFP (EG) were used for inoculation onto *N. benthamiana*, respectively. A1 vector (A1) has a functional 2b while H1 vector (H1) is 2b-deficient. Curiously, a combination of H1Ds and TuEG compromised local interference in *N. benthamiana* nahG transgenic line. The results suggested that the SA-mediated host resistance and the 2b protein of CMV are involved in local interference.

研究分野：植物病理学

キーワード：CMV TuMV synergism サリチル酸 2bタンパク質

1. 研究開始当初の背景

Cucumovirus 属に含まれる *Cucumber mosaic virus* (CMV) は 1,000 種を超える宿主域を持つ最重要植物病原ウイルスである。一方、*Potyvirus* 属に属する *Turnip mosaic virus* (TuMV) はアブラナ科を中心とした植物に感染する重要病原ウイルスである。これらの異種ウイルスは例えばダイコンに同時混合感染すると単独感染より激しい病徴を引き起こす。この現象は病原性相乗効果 (シナジズム) によるもので、自然界では他のウイルス同士の組合せでも観察され、農作物において甚大な被害をもたらす場合が多い。例えば、CMV はダイコンに TuMV と混合感染することで植物内での全身感染能獲得とそれに応じた蓄積量の増大を示す (Sano and Kojima 1989; Takeshita and Takanami 2000)。しかしながら、CMV-TuMV 間のシナジズムでは両ウイルスの感染初期に局所的干渉効果 (local interference) を生じ、その後シナジズムによって局所的干渉効果が中和されていることが報告されている (Takeshita et al., 2012)。

2. 研究の目的

前述の内容から、異種植物ウイルス間のシナジズムは単純な分子機構のもとに成立しているのではなく、両ウイルスが引き起こす複雑な宿主反応を経た結果であることが示唆されている。そこで本研究では、両ウイルス cDNA クローンと宿主植物変異体を用いて、異種植物ウイルス間のシナジズムに至る分子メカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、CMV 感染、あるいは TuMV 感染によって誘導される宿主基礎抵抗性は類似しているのか、あるいは異なっているのか、そしてそれらは確かにお互いの感染を抑制するのかを明らかにする。

次に、これまで明確に提唱されていない 2b

の組織特異的な機能発現や未同定機能が存在するのかを明らかにする。

さらに、シナジズムに至るまでの宿主抵抗性に関与すると考えられる基礎抵抗性の誘導とウイルス感染増殖との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

CMV 感染および TuMV 感染によって、比較的感染初期に誘導される局所的宿主基礎抵抗性の解明を試みた。ここでは両ウイルスが局所的干渉効果を示さない *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の遺伝子破壊システムをスクリーニングすることに加え、植物内在性サリチル酸の蓄積を阻害する形質転換 *Nicotiana benthamiana* (ベンタミアナ) を用いた。既に構築済みの蛍光タンパク質発現 CMV ベクターならびに、蛍光顕微鏡を用いた観察系を本試験に活用した。基礎抵抗性遺伝子破壊システムにはサリチル酸 (SA) 系、エチレン系、ジャスモン酸 (JA) 系等に関連する様々な当研究室保有変異体等を用いた。まず、シロイヌナズナの基礎抵抗性遺伝子破壊系統群と内在性サリチル酸の蓄積を阻害する形質転換ベンタミアナ (NahG Nb) に蛍光タンパク質を発現する組換え CMV と組換え TuMV を混合接種し、蛍光顕微鏡観察を実施した。局所的干渉作用に及ぼす影響は蛍光顕微鏡による両ウイルスの移行動態により観察し、どのようなウイルス抵抗性シグナル伝達系が局所的干渉作用を決定しているのかを解析した。蛍光顕微鏡を用いた局所的干渉作用の観察結果から、SA 関連シグナル伝達経路が両ウイルス間の局所的干渉作用に深く関与することが示唆された。

次に、2b 欠損 CMV と TuMV を野生型 Nb および NahG Nb に同時接種し、両ウイルス間の局所干渉への影響を調べた。その結果、サリチル酸関連抵抗性と CMV の 2b 遺伝子の双方が相加的に関与することが明らかとなった。さらに、SA 誘導抵抗性のもとでは 2b 欠

損 CMV 由来の蛍光は頂芽付近で認められないことも明らかとなった。

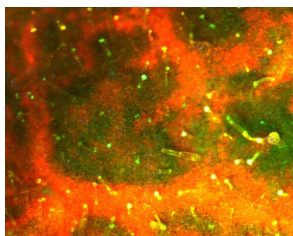


図1 . NahG Nb における CMV-TuMV 間の局部干渉の緩和

次に、局部干渉とウイルス RNA の蓄積量との関連性を調べた。まず、蛍光タンパク質発現 CMV ならびに TuMV ウイルスベクターを野生型ベンタミアナおよび NahG Nb に同時接種し、両ウイルス RNA 蓄積量を測定した。その結果、混合感染個体におけるウイルス RNA 蓄積量は、単独感染個体のそれと比べて CMV では増加し、TuMV では減少した。次に、NahG Nb において明瞭に局部干渉が緩和される組み合わせ、*2b* 欠損 CMV と TuMV を Nb および NahG Nb に同時接種し、両ウイルス RNA 蓄積量を測定した。その結果、混合感染個体におけるウイルス RNA 蓄積量は、単独感染個体のそれと比べて *2b* 欠損 CMV では増加し、TuMV では同程度に回復した。以上の結果から、CMV-TuMV 間の局部干渉における *2b* 遺伝子と、TuMV の RNA 蓄積量の減少との間に関連性が示唆された。

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 2 件)

A single amino acid at N-terminal region of the 2b protein of cucumber mosaic virus strain ml has a pivotal role in virus attenuation.

Maneechoat, P., Takeshita, M., Uenoyama, M., Nakatsukasa, M., Kuroda, A., Furuya, N., Tsuchiya, K.

Virus Research 197: 67-74. (2015)

Induction of antiviral responses by acibenzolar-S-methyl against *Cucurbit chlorotic yellows virus* in melon.

Takeshita, M., Okuda, M., Okuda, S., Hyodo, A., Hamano, K., Furuya, N., Tsuchiya, K.
Phytopathology Vol. 103: 960-965. (2013)

〔学会発表〕(計 9 件)

小田裕太, 竹下 稔, 吉岡博文, 古屋 成人, 土屋健一, 混合感染における植物ウイルス間の局部干渉に関する解析, 日本植物病理学会百周年記念大会 (平成 27 年度大会) 2015.03.31

Maneechoat P., Minoru Takeshita, Kuroda A, Uenoyama M, Nakatsukasa M, Furuya Naruto, Kenichi Tsuchiya, Involvement of the 2b gene of the mild strain of Cucumber mosaic virus (CMV-ml) in the attenuated virulence, The Phytopathological Society of Japan, 2014.06.04.

兵頭紋佳, 竹下 稔, 古屋 成人, 土屋 健一, アシルベンゾラル S メチル(ASM)による宿主抵抗性誘導下でのキュウリモザイクウイルス(CMV)の感染動態の解析 .日本植物病理学, 2014.06.03

小田裕太, 竹下 稔, 高橋英樹, 古屋 成人, 土屋 健一, 混合感染における植物ウイルス間の相互作用に関する分子機構の解析, 日本植物病理学会, 2014.06.03.

Phoowanarth Maneechoat, Atsuko Kuroda, Misa Uenoyama, Maki Nakatsukasa, Minoru Takeshita, Naruto Furuya, Tsuchiya Kenichi, Biological and molecular characterization of a mild strain of Cucumber mosaic virus, AFELiSA 2013 (The 10th International Joint Symposium among Japan, Korea and China) 2013.11.07

兵頭紋佳, 竹下 稔, 泊 賢吾, 奥田 充, 増田 税, 古屋 成人, 土屋 健一, アシベンゾラル S メチル (ASM) によるキュウリモザイクウイルス (CMV) の感染低減に関する解析 . 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 岐阜大学 2013.03.28

高橋英樹, 鈴木 匡, 竹下 稔, 増田 税, 安藤杉尋, キュウリモザイクウイルス抵抗性遺伝子 RCY1 に対応するウイルス非病原性因子の解析 . 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 岐阜大学 2013.03.28

竹下 稔, 河野亜希子, 松浦 明, 泊 賢吾, 奥田 充, 古屋 成人, 土屋 健一 . Cucurbit chlorotic yellows virus の感染低減を目的としたハウス栽培メロンへの ASM 処理について . 九州病害虫研究会第 85 回研究発表会, 2013.02.05

Minoru Takeshita, Emiko Koizumi, Makiko Noguchi, Naruto Furuya, and Kenichi Tsuchiya.
Infection dynamics and interference under the synergism between Cucumber mosaic virus and Turnip mosaic virus. IS-MPMI 2012 XV International Congress, Kyoto International Conference Center 2012.7.30

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹下 稔 (九州大学)

研究者番号 : 00304767

(2)研究分担者

古屋成人 (九州大学)

研究者番号 : 10211533

(3) 研究分担者

土屋健一 (九州大学)

研究者番号 : 40150510