

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580069

研究課題名(和文)キュウリモザイクウイルス感染による宿主植物の抗ウイルスPTGS抑制機序の解明

研究課題名(英文)Study of suppression mechanisms of anti-viral PTGS of host plant in Cucumber mosaic virus infection

研究代表者

大木 理(OHKI, Satoshi T.)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：00128761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリモザイクウイルス(CMV)感染が植物転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)に及ぼす影響を明らかにするために、導入遺伝子が誘導するPTGS、CMVによるVIGS、および、内在性遺伝子制御PTGSの3つの機構について、CMV感染の影響をした。その結果、タバコへのGFP部分配列の逆位反復配列導入では3方向への二次PTGSは誘導しないこと、CMVによるVIGSでは、二次PTGSは5方向に誘導されるが、3方向には誘導されないことが分かった。さらに、内在性遺伝子制御PTGSでは、CMVは一次および二次PTGSの両方を阻害している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Effects of Cucumber mosaic virus (CMV) pepo strain infection on post-transcriptional gene silencing (PTGS) in host plants were investigated. To distinguish the primary and the secondary PTGS, we prepared transgenic tobacco carrying GFP mRNA and GF (5' two-third region of GFP gene) inverted-repeat constructs; siRNA from P region (3' one-third region of GFP gene) that was indicator of secondary PTGS was not detected, suggesting that the secondary PTGS was not induced toward 3' region of the GFP mRNA. We also constructed mutated CMV that had the 30 nt GFP sequence. Inoculation of the mutated CMV to the GFP expressing transgenic tobacco showed virus-induced gene silencing (VIGS) of GFP. Secondary VIGS in the 5' region of GFP was observed but not in the 3' region. Finally, we examined the effect of CMV pepo infection on endogenous PTGS, such as miRNA and ta-siRNA, of Arabidopsis. CMV pepo infection increased the expression of mRNAs that were targets of miRNA or ta-siRNA.

研究分野：農学

キーワード：キュウリモザイクウイルス ウイルスサプレッサー PTGS VIGS

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)

は植物の内在遺伝子発現制御機構であり、植物ウイルス感染に対する免疫機構である。植物ウイルスが感染すると植物は PTGS によりウイルス RNA を分解し、その感染を阻害する。それに対して、多くのウイルスはサブレッサータンパク質により PTGS を抑制することで感染を成立させる。ウイルスのサブレッサーがどのような機序で PTGS を抑制しているのかを解明することは、ウイルスがどのように植物に感染し毒性を発揮するのか、それに対して植物がどのように免疫機構を働かせているのかを理解するために重要である。

(2) これまでに知られている PTGS の機構を概略すると、以下の 3 つのステップになる。

DCL と呼ばれる二本鎖 RNA 分解酵素が長い二本鎖 RNA (dsRNA) を切断して 21-24 塩基の低分子 RNA (small interfering RNA: siRNA) を作る。

siRNA は RNA 切断活性を持つ複合体を形成して、相補 RNA を切断する。(1 と 2 のステップを一次 PTGS と呼ぶ)

siRNA は RNA 依存 RNA 複製酵素(RDR) に対してプライマーとして働き、さらなる dsRNA を作り出して DCL による分解を増幅し PTGS を維持する。(3 のステップを二次 PTGS と呼ぶ)

現在、各種植物ウイルスのサブレッサーの PTGS 抑制機構が明らかにされつつあり、上記 3 つのステップのいずれかを阻害していることが分かってきている。

(3) 申請者は、宿主植物への CMV 感染時における PTGS 抑制機構を調べるために、GFP センス鎖過剰発現が誘導する S-PTGS タバコ(sense transgene-induced PTGS)、ある

いは GFP 二本鎖 RNA (dsRNA) 発現が誘導する IR-PTGS タバコ (inverted repeat transgene-induced PTGS) に野生型 CMV ペポ系統を接種し、PTGS 抑制能を比較した。その結果、CMV ペポ系統に感染した S-PTGS タバコでは GFP 蛍光の回復が観察されたが、IR-PTGS タバコでは GFP 蛍光は全く観察されず、GFP mRNA の蓄積もほとんど認められなかった。このことから、CMV ペポは S-PTGS は抑制できるが、IR-PTGS は抑制できないことが示された。

## 2. 研究の目的

S-PTGS と IR-PTGS の大きな違いは、PTGS の誘導・維持に RDR が必要か否かである。IR-PTGS は dsRNA を形成するように GFP 遺伝子が導入されているため、PTGS の誘導・維持に RDR を必要としない。CMV ペポ感染は IR-PTGS を抑制しないことから、CMV ペポは RDR を必要とする二次 PTGS を特異的に抑制していると推察された(上記ステップ 3)。本研究では、CMV ペポ感染が植物の PTGS のどのステップを抑制しているのかを解明することを目的とした。そのために、以下の 3 点について検討した。導入遺伝子誘導型 PTGS では CMV ペポ感染は二次 PTGS を特異的に抑制しているのか？、CMV ペポ感染誘導 VIGS では二次 VIGS は誘導されているのか？、植物内在遺伝子発現制御 PTGS では、CMV 感染はどの経路を抑制するのか？

## 3. 研究の方法

本研究では、一次 PTGS と二次 PTGS を分けて検出できる実験系の構築を試みた。すなわち、約 800 塩基の GFP 遺伝子のうち 5'端 2/3 配列 (GF 配列と呼ぶ) を一次 PTGS のトリガーとし、3'端 1/3 領域 (P 配列と呼ぶ) を二次 PTGS の標的とした。GFP 蛍光の消失と GF 配列由来 siRNA (GF-siRNA) の蓄積を一次 PTGS の指標とし、P 配列由来 siRNA

( P-siRNA ) の蓄積を二次 PTGS の指標とした。

( 1 ) バイナリーベクターの 35S プロモーター下流に GF 配列の逆位反復配列をクローニングして、アグロバクテリウムを用いた常法により野生型タバコに導入し、GF-IR タバコを得た。その後、GF-IR タバコと GFP 恒常発現タバコを交配して GF-IR/GFP タバコ種子を得て、GFP 蛍光が消失したラインを選抜した。CMV ペポが感染した GF-IR/GFP タバコにおける GF-siRNA および P-siRNA の蓄積量をノーザン法により解析して、それぞれ一次、二次 PTGS の指標とした ( 図 1 )。

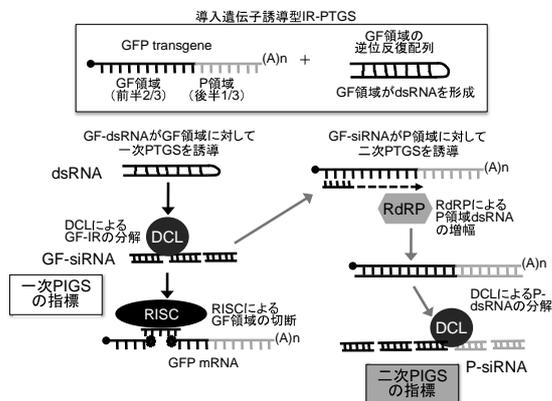


図 1. 導入遺伝子誘導型 IR-PTGS を用いた実験系模式図

( 2 ) CMV 感染が誘導する VIGS 実験においても同様の戦略を用いた。すなわち、一次 VIGS のトリガーとなる GF 配列を導入した CMV を作出して、GFP が恒常発現する組換えタバコに接種し、GFP 蛍光の消失と GF-siRNA および P-siRNA の蓄積をそれぞれ一次、二次 VIGS の指標とした ( 図 2 )。また、一次 VIGS のトリガーとなる GF 配列の長さを 500, 150, 60, そして 30 塩基まで検討した。

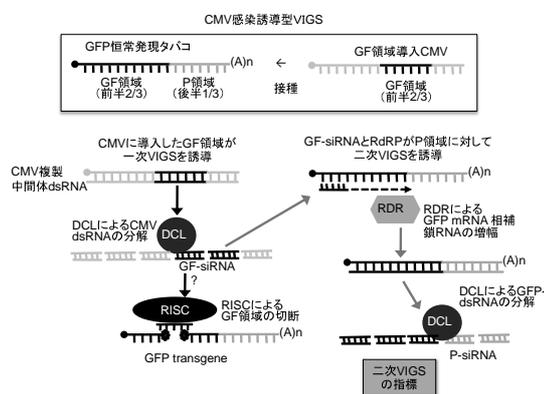


図 2. CMV 感染型 VIGS を用いた実験系模式図

( 3 ) 植物の内在遺伝子発現制御 PTGS において、trans-acting siRNA ( ta-siRNA ) の生成には RDR が必要であるが、micro RNA ( miRNA ) の生成には RDR は関与しないことが報告されている。したがって、CMV ペポ感染による影響が、ta-siRNA と miRNA 経路で異なる可能性がある。そこで、CMV ペポを接種したシロイヌナズナ ( Col-0 ) における、既知の miRNA と ta-siRNA が標的とする内在遺伝子 mRNA の蓄積量をノーザン法により解析した。

( 4 ) なお、供試ウイルスには野生型 CMV ペポとともに、CMV のサプレッサーである 2b タンパク質に一塩基置換を導入してサプレッサー活性を喪失させた弱毒株 ( R46C ) をネガティブコントロールとして用いた。

#### 4. 研究成果

( 1 ) GFP が恒常発現するタバコに GF 領域の逆位反復配列を導入して GFP 蛍光が完全に消失した GF-IR/GFP タバコを得たが、この GF-IR/GFP タバコでは P-siRNA が検出されず、タバコにおける GF-IR による PTGS では 3' 方向への二次 PTGS は誘導していないことが示唆された。このことから、GF-IR を用いた実験系では二次 PTGS を検出することが困難であると判断した。現在、5' 方向への二次 PTGS を検出するため、GFP 遺伝子の中間領域約

250 bp を一次 PTGS のトリガーとした組み換えタバコを作出中である。

(2) CMV RNA3 の CP 遺伝子の終始コドン直後に GFP 部分配列を導入した .500 塩基および 150 塩基の部分配列を導入した CMV は感染性そのものが喪失した。一方で, 60 塩基および 30 塩基の GFP 部分配列を付加した CMV ペポは GFP 恒常発現タバコに全身感染してモザイク病徴を引き起こし, さらに, GFP に対する VIGS を誘導した。そこで, 30 塩基の GFP 配列を付加し, 野生型 2b をもつ pepo-F30 と弱毒型 2b をもつ R46C-F30 を GFP 恒常発現タバコにそれぞれを接種して GF-siRNA と P-siRNA を検出したところ, 両ウイルス感染タバコとも GF-siRNA は検出され P-siRNA は検出されなかった。このことから, CMV による VIGS においても, 5'方向へは二次 VIGS が誘導されるが, 3'方向への二次 VIGS は誘導されないことが示唆された。5'方向への二次 VIGS は pepo-F30 と R46C-F30 で同程度起こっていたことから, CMV ペポ感染が二次 VIGS を阻害しているという仮説は確認できなかった。

(3) 野生型ペポと弱毒型 R46C が感染したシロイヌナズナにおいて, 一次 PTGS の標的である *ARF8* mRNA, および, 二次 PTGS の標的である *ARF4* mRNA と *PPR* mRNA の蓄積量を調査した。その結果, *ARF8*, *ARF4*, そして *PPR* のすべての mRNA 蓄積量がペポ感染シロイヌナズナで増加しており, 内在性遺伝子制御 PTGS では, CMV ペポ感染は一次および二次 PTGS の両方を阻害している可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

MOCHIZUKI Tomofumi, Yamazaki Ryota,

WADA Tomoya, OHKI Satoshi T. Coat protein mutations in an attenuated *Cucumber mosaic virus* encoding mutant 2b protein that lacks RNA silencing suppressor activity induces chlorosis with photosynthesis gene repression and chloroplast abnormalities in infected tobacco plants. *Virology*, 査読有, Vol. 456, 2014, pp. 292-299.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大木 理 (OHKI Satoshi T.)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号: 00128761

### (2)連携研究者

望月 知史 (MOCHIZUKI Tomofumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号: 30469837