

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688005

研究課題名(和文)植物ウイルスに対するRNAサイレンシングと自然免疫応答のクロストーク

研究課題名(英文)Cross talk between RNA silencing and plant innate immune responses to viruses

研究代表者

山次 康幸(YAMAJI, YASUYUKI)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40345187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物はウイルスの感染に対して、RNAサイレンシングならびに自然免疫応答という2つの防御メカニズムを備えている。RNAサイレンシングを抑制するRNAサイレンシングサプレッサーTGBp1の機能解析を行い、二本鎖RNA合成に関与するシロイヌナズナタンパク質SGS3およびRDR6と相互作用し、細胞内で凝集・不活化させることを示した。また、植物ウイルスに対する自然免疫応答遺伝子JAX1の機能解析を行い、関与するウイルス側因子を解明した。以上を通じて、植物とウイルスの間で繰り広げられている多様な相互作用を包括的に解明した。

研究成果の概要(英文)：Plants combat with viruses using two defense mechanisms, RNA silencing and plant innate immunity. In this study, we analyzed the role of an RNA silencing suppressor, TGBp1. We found that TGBp1 interacted with Arabidopsis thaliana proteins SGS3 and RDR6, both of which are involved in double-stranded RNA synthesis, to aggregate and inactivate their activities in planta. We also analyzed the mechanism of JAX1-mediated resistance and revealed the a viral protein responsible for it. Based on these results, we elucidated various plant-virus molecular interactions.

研究分野：農学

キーワード：植物・病原体相互作用

1. 研究開始当初の背景

世界の作物生産額の15%は植物病害により失われている。植物病害のうち、細菌病と菌類病は化学農薬の普及によりその被害が低減してきているものの、ウイルス病には防除効果のある化学農薬が存在しないため、その損失額は増える一方である。植物ウイルスは化学農薬による防除が不可能なため、作物の近縁種や野生種との交配による抵抗性育種が主要な防除手段である。そのため、植物がウイルスに対して示す防御応答誘導メカニズムを解析することが重要である。

ウイルスに対する植物の防御応答反応は植物自然免疫応答とRNAサイレンシングに大別されてきた。植物自然免疫応答においては抵抗性遺伝子が主要な役割を担っている。抵抗性遺伝子のほとんどはNB-LRR (Nucleotide-Binding/Leucine-Rich Repeat) 遺伝子であり、NB-LRRタンパク質がウイルスの感染を察知すると植物は様々な防御反応とともに細胞死を誘導する。一方、申請者らは最近モデル植物シロイヌナズナを用いたスクリーニングにより新規な植物ウイルス抵抗性遺伝子JAX1を同定した。JAX1はレクチンをコードし、新規な抵抗性メカニズムを誘導することを見出したが、その作用メカニズムは不明である。

一方、RNAサイレンシングはウイルス特異的な抵抗性反応であると考えられている。RNAサイレンシングはRNAiとも呼ばれ、二本鎖RNA(dsRNA)などの異常なRNAを認識し、その遺伝情報をsiRNAと呼ばれる小分子RNAとして蓄積して記憶し、同じ配列をもつRNAを分解するメカニズムであり、真核生物がウイルスに対して示す直接的な抵抗性反応である。これに対して植物ウイルスはRNAサイレンシング抑制剤(RSS)と呼ばれるタンパク質を産生し、サイレンシングを抑制するが、その作用メカニズムの全容は不明である。

このようにウイルス病発病に至る舞台裏ではRNAサイレンシングや自然免疫応答の抑制を含めた複合的な植物・ウイルス間相互作用が繰り返されていると考えられている。

2. 研究の目的

植物はウイルスの感染に対して、RNAサイレンシングならびに自然免疫応答という2つの防御メカニズムを備えている。本研究ではこれらを対象として、それぞれの防御応答機構を詳細に解析し、植物の持つ防御応答メカニズムを解明し、植物とウイルスの間で繰り返されている未解明の多様な相互作用を包括的に解明する。

3. 研究の方法

本研究では植物ウイルスに対する防御応答機構である植物自然免疫応答とRNAサイレンシングについてそれらのメカニズムを解析した。JAX1はポテックスウイルス属ウイルスの感染を強く抑制する抵抗性遺伝子であるが、JAX1による抵抗性は自然免疫応答の1種であると考えられるため、JAX1を材料として用いた。JAX1抵抗性を打破する植物ウイルス耐性株の単離・塩基配列解読や、植物ウイルス変異体に対するJAX1抵抗性の影響を解析することにより、JAX1抵抗性に関わる植物ウイルス因子を明らかにした。また、JAX1抵抗性に関わる植物側因子を解析した。

RNAサイレンシングと植物ウイルスの相互作用を解析するため、RNAサイレンシング抑制剤(RSS)の機能解析を行った。ポテックスウイルス属ウイルスがコードするTGBp1はRNAサイレンシング抑制剤(RSS)であるが、PIAMVがコードするTGBp1は同属ウイルスの中で最も活性が強いことからこれを材料として用いた。TGBp1形質転換体を利用し、表現型解析、次世代シーケンスによる小分子RNAの網羅的解析、ライブイメージング解析などを駆使してTGBp1の機能解明を行った。

4. 研究成果

まず、ウイルスに対する植物の自然免疫応答とRNAサイレンシングの解析に最適なパソシステムを検討した。シロイヌナズナに感染する植物ウイルスを探索・比較し、ポテックスウイルス属のplantago asiatica mosaic virus (PIAMV)が最も効率よく全身感染することを明らかにした。

JAX1による抵抗性に関わるウイルス側因子を解析し、ウイルス複製酵素が関与することを明らかにした。ウイルス複製酵素、移行タンパク質、外被タンパク質遺伝子にそれぞれ変異を導入し、JAX1発現植物に接種試験を行うことにより、JAX1抵抗性にはウイルス複製酵素が必要十分であることを明らかにした。さらに、自然免疫応答に広く関わる植物遺伝子SGT1とMAPKKKとJAX1抵抗性との関連を調べるため、SGT1もしくはMAPKKKを発現抑制した葉におけるJAX1抵抗性を調べたところ、いずれにおいてもウイルス抵抗性は影響を受けなかったことから、JAX1抵抗性にSGT1、MAPキナーゼ経路が関与しないことが明らかになった。

ポテックスウイルスのRSSであるTGBp1の機能解析を行った。PIAMVのTGBp1を形質転換した植物の表現型解析を行った結果、tasiRNA経路の変異体と同様の表現型を示した。また、TGBp1形質転換体から小分子RNA画分を抽出し、次世代シーケンスにより小分子RNAの蓄積

量を解析したところ、tasiRNA の蓄積量が特異的に抑制されていたことから、TGBp1 が tasiRNA 合成に關与する経路を標的とする可能性が考えられた。次いで、TGBp1 が tasiRNA 合成のどのステップを阻害するかについて解析した。すなわち(1)DCL1 による pre-miRNA の切断、(2)切断後の RNA 断片を鋳型とした二本鎖 RNA 合成、(3)DCL4 による二本鎖 RNA の切断、のいずれのステップを阻害するかを解析し、TGBp1 が(2)の二本鎖 RNA 合成を阻害することを明らかにした。そこで、この反応に關与するシロイナズナタンパク質 SGS3 および RDR6 と TGBp1 の免疫沈降実験を行い、TGBp1 がこれらと相互作用することを明らかにした。さらに TGBp1、SGS3 の局在解析を行い、SGS3 を単独で発現させた場合は細胞質に散在しているが、TGBp1 と共発現させると核近辺に凝集することを明らかにした。TGBp1 は SGS3/RDR6 を凝集させることによりこれらの機能を阻害することが示唆された。また、サイレンシングサプレッサー欠損 cucumber mosaic virus はサイレンシング因子が欠損したシロイナズナミュータントで蓄積量が増加することが明らかにされている。これを TGBp1 形質転換植物に接種したところ、ウイルス蓄積量が劇的に増加した。この結果から、TGBp1 がサイレンシング経路を阻害する機能を持つことが確かめられた。

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 17 件)

- (1) Yusa, A., Iwabuchi, N., Koinuma, H., Keima, T., Neriya, Y., Hashimoto, M., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. Complete genome sequences of two hydrangea ringspot virus isolates from Japan. **Genome Announc** 4(2): e00022-e00016, March, 2016. (査読有)
- (2) Iwabuchi, N., Yoshida, T., Yusa, A., Nishida, S., Tanno, K., Keima, T., Nijo, T., Yamaji, Y., Namba, S. Complete genome sequence of Alternanthera mosaic virus, isolated from Achyranthes bidentata in Asia. **Genome Announc** 4(2): e00020-e00016, March, 2016. (査読有)
- (3) Ishikawa, K., Maejima, K., Netsu, O., Fukuoka, M., Nijo, T., Hashimoto, M., Takata, D., Yamaji, Y., Namba, S. Rapid detection of fig mosaic virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **J Gen Plant Pathol** 81(5): 382-389. September, 2015. (査読有)
- (4) Hashimoto, M., Komatsu, K., Iwai, R., Keima, T., Maejima, K., Shiraishi, T., Ishikawa, K., Yoshida, T., Kitazawa, Y., Okano, Y., Yamaji, Y., Namba, S. Cell death triggered by a putative

amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. **Mol Plant-Microbe Interact** 28(6): 675-688. June, 2015. (査読有)

- (5) Ishikawa, K., Miura, C., Maejima, K., Komatsu, K., Hashimoto, M., Tomomitsu, T., Fukuoka, M., Yusa, A., Yamaji, Y., Namba, S. Nucleocapsid protein from fig mosaic virus forms cytoplasmic agglomerates that are hauled by endoplasmic reticulum streaming. **J Virol** 89(1): 480-491. January, 2015. (査読有)

- (6) Yoshida, T., Kitazawa, Y., Komatsu, K., Neriya, Y., Ishikawa, K., Fujita, N., Hashimoto, M., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. Complete nucleotide sequence and genome structure of a Japanese isolate of hibiscus latent Fort Pierce virus, a unique tobamovirus that contains an internal poly(A) region in its 3' end. **Arch Virol** 159(11): 3161-3165. November, 2014. (査読有)

- (7) Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, K., Oshima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y., Namba, S. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. **Plant Cell** 26(5): 2168-2183. May, 2014. (査読有)

- (8) Minato, N., Komatsu, K., Okano, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Senshu, H., Takahashi, S., Yamaji, Y., Namba, S. Efficient foreign gene expression in planta using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. **Arch Virol** 159(5): 885-896. May, 2014. (査読有)

- (9) Maejima, K., Himeno, M., Netsu, O., Ishikawa, K., Yoshida, T., Fujita, N., Hashimoto, M., Komatsu, K., Yamaji, Y., Namba, S. Development of an on-site plum pox virus detection kit based on immunochromatography. **J Gen Plant Pathol** 80(2): 176-183. March, 2014. (査読有)

- (10) Sugawara, K., Shiraishi, T., Yoshida, T., Fujita, N., Netsu, O., Yamaji, Y., Namba, S. A replicase of potato virus X acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. **Mol Plant-Microbe Interact** 26(9):1106-1112. September, 2013. (査読有)

- (11) Komatsu, K., Hashimoto, M., Okano, Y., Keima, T., Kitazawa, Y., Nijo, T., Takahashi, S., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. Construction of an infectious cDNA clone of radish mosaic virus, a crucifer-infecting comovirus. **Arch Virol** 158(7): 1579-1582. July, 2013. (査読有)

- (12) Ishikawa, K., Maejima, K., Komatsu, K., Netsu, O., Keima, T., Shiraishi, T., Okano, Y., Hashimoto, M., Yamaji, Y., Namba, S. Fig mosaic emaravirus p4 protein is involved in cell-to-cell movement. **J Gen Virol** 94(3):

682-686. May, 2013. (査読有)

(13) 山次康幸・前島健作・尾関丈二・小松健・難波成任. レクチン抵抗性: 新規な植物ウイルス耐性システム. **植物ウイルス病研究会レポート**, 11: 63-69. 2013年3月(査読無)

(14) 小松健・橋本将典・山次康幸・難波成任. ポテックスウイルスによる全身壊死病徴の発現機構. **植物ウイルス病研究会レポート**, 11: 11-21. 2013年3月(査読無)

(15) Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Okano, Y., Shiraiishi, T., Ishikawa, K., Takinami, Y., Yamaji, Y., Namba, S. Identification of three MAPKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. **BMC Plant Biol** 12: 103. July, 2012. (査読有)

(16) Ishikawa, K., Maejima, K., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Hashimoto, M., Takata, D., Yamaji, Y., Namba, S. Identification and characterization of two novel genomic RNA segments of fig mosaic virus, RNA5 and RNA6. **J Gen Virol** 93(7): 1612-1619. July, 2012. (査読有)

(17) Komatsu, K., Hirata, H., Fukagawa, T., Yamaji, Y., Okano, Y., Ishikawa, K., Adachi, T., Maejima, K., Hashimoto, M., Namba, S. Infection of capilloviruses requires subgenomic RNAs whose transcription is controlled by promoter-like sequences conserved among flexiviruses. **Virus Res** 167(1): 8-15. July, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

(1) 西田萩子・吉田哲也・遊佐 礼・煉谷裕太郎・薦田(萩原)優香・岡野夕香里・橋本将典・山次康幸・難波成任、アグロインフィルトレーション法による pepino mosaic virus 接種系の確立、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016.3.21-3.23、岡山市

(2) 遊佐 礼・岩淵 望・鯉沼宏章・西田萩子・桂馬拓也・煉谷裕太郎・前島健作・山次康幸・難波成任、本邦産アジサイから検出された hydrangea ringspot virus の全ゲノム配列、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016.3.21-3.23、岡山市

(3) 西田萩子・吉田哲也・笹野百花・煉谷裕太郎・薦田(萩原)優香・岡野夕香里・橋本将典・山次康幸・難波成任、lolium latent virus のアグロイノキュレーション用コンストラクトの構築、平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015.9.10-9.11、宇都宮市

(4) 二條貴通・岡野夕香里・煉谷裕太郎・橋本将典・遊佐 礼・桂馬拓也・大島研郎・小松 健・山次康幸・難波成任、plantago asiatica mosaic virus の TGBp1 は植物内在性の小分子 RNA 「tasiRNA」の生成経路を抑制する、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.29-31、東京都

(5) 桂馬拓也・岡野夕香里・千秋博子・根津修・遊佐 礼・二條貴通・小松 健・山次康幸・難波成任、plantago asiatica mosaic virus

の TGBp1 は tasiRNA 生成経路の 2 本鎖 RNA 合成を阻害する、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.29-31、東京都

(6) 遊佐 礼・岡野夕香里・薦田(萩原)優香・桂馬拓也・二條貴通・小松健・山次康幸・難波成任、plantago asiatica mosaic virus の TGBp1 は RDR6 および SGS3 と結合してウイルス蓄積量を増加させる、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.29-31、東京都

(7) 岡野夕香里・遊佐 礼・薦田(萩原)優香・桂馬拓也・二條貴通・小松 健・山次康幸・難波成任、plantago asiatica mosaic virus の TGBp1 はホモオリゴマーを形成し SGS3/RDR6 body を凝集させる、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.29-31、東京都

(8) 橋本将典・遊佐 礼・友光達哉・桂馬拓也・岡野夕香里・小松 健・山次康幸・難波成任、ダイコンモザイクウイルスの感染による茎頂壊死の誘導因子、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.29-31、東京都

(9) 橋本将典・吉田哲也・小松 健・岡野夕香里・石川一也・山次康幸・難波成任、植物ウイルス感染による細胞死誘導のシグナル伝達経路における MAPKKK 群の相互関係、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014.6.2-4、札幌市

(10) 白石拓也・吉田哲也・北沢優悟・菅原杏子・根津 修・山次康幸・難波成任、接ぎ木接種法による JAX1 抵抗性打破 potato virus X 変異株の単離、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014.6.2-4、札幌市

(11) 吉田哲也・白石拓也・北沢優悟・菅原杏子・根津 修・山次康幸・難波成任、JAX1 抵抗性打破を引き起こす potato virus X の複製酵素 1 アミノ酸変異の解析、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014.6.2-4、札幌市

(12) 吉田哲也・白石拓也・小松健・山次康幸・難波成任、レクチン抵抗性は真正抵抗性や RNA サイレンシングとは異なるメカニズムにより誘導される、平成 25 年度日本植物病理学会関東部会、2013.9.12、東京都

(13) Shiraiishi, T., Sugawara, K., Yoshida, T., Yamaji, Y., JAX1-mediated resistance as the key to lectin-triggered immunity. EMBO Workshop "Green viruses, from gene to landscape" 2013.9.9、イェール(フランス)

(14) Komatsu, K., Yoshida, T., Yamaji, Y., Mechanisms underlying potexvirus-induced systemic necrosis in plants. EMBO Workshop "Green viruses, from gene to landscape" 2013.9.9、イェール(フランス)

(15) 山次康幸、ウイルスに対する植物免疫システム、日本農芸化学会関東支部 2012 年度 第 2 回支部例会、2013.2.9、茨城県稲敷郡

(16) 山次康幸、植物ウイルスに対する分子

耐性機構に関する研究、平成 24 年度日本農
学進歩賞受賞講演会、2012.11.26、東京都
(17) Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K,
Shiraishi T, Okano Y, Himeno M., Sugawara K,
Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M,
Namba S、Lectin-Mediated Resistance As a
Novel and Universal Innate Immunity Toward
Plant Viruses.、XV International Congress of
Molecular Plant-Microbe Interactions 、
2012.8.2、京都市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山次 康幸 (YAMAJI YASUYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授

研究者番号：4 0 3 4 5 1 8 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし