

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780039

研究課題名(和文) 転写仲介因子を介した植物ウイルスの細胞間移行制御機構の研究

研究課題名(英文) Study on a transcriptional coactivator-mediated regulation for plant virus intercellular movement

研究代表者

佐々木 信光 (Sasaki, Nobumitsu)

東京農工大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：70431971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トマトモザイクウイルス(ToMV)の移行タンパク質(MP)と結合することが分かっているタバコの転写仲介因子MBF1aタンパク質の機能を調べた。NtMBF1aの一過的過剰発現によって第一次細胞間移行およびその後の局所的感染の拡大には影響しないことが示唆されたが、MBF1aはMPと細胞内で共局在し、MPの原形質連絡への局在に影響を与える可能性が示唆された。一方、MBF1aの遺伝子発現を抑制した形質転換植物を用いたウイルス接種実験からは、条件によってウイルス感染が減退する可能性が示唆された。以上の結果、ウイルス感染におけるMBF1aの役割について新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of a tobacco transcriptional coactivator MBF1a (NtMBF1a), which can bind to the movement protein (MP) of Tomato mosaic virus (ToMV) in vitro, in virus cell-to-cell movement was investigated. Our results suggest that the transient over-expression of NtMBF1a has little effects on the initial and subsequent local spread of the virus, whereas the over-expressed NtMBF1a co-localizes with MP and may influence the localization of MP to plasmodesmata. Virus inoculation experiments using NtMBF1a-silenced transgenic plants suggest the possibility that virus infections may be reduced in those transgenic plants depending on the experimental conditions. These results provide novel findings of possible roles of NtMBF1a in virus infections.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物ウイルス 細胞間移行 転写仲介因子 原形質連絡 ウイルス抵抗性

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスが感染細胞から隣接する非感染細胞へと移行する「細胞間移行」と呼ばれる過程は、ウイルスの宿主範囲を決定する重要な感染過程のひとつであり、ウイルスは細胞間移行の成立に必須である「移行タンパク質 (MP)」をコードしている。一方、植物には、MP の機能を補助する感受性因子や、逆に機能を阻害する因子が存在し、細胞間移行の成否は、MP と植物因子群との相互作用により決定されると考えられている。何が感受性因子や機能阻害性因子であり、MP との相互作用がどのように細胞間移行に影響しているのか理解できれば、ウイルス抵抗性を高めた遺伝子組換え植物の開発を効率的に進めることができる。近年、細胞間移行に関わる植物因子の同定および機能解析は国際的に盛んに行われており、ウイルス抵抗性の増強に寄与しうる有用な植物遺伝子の研究は重要になっている。我々は、トマトモザイクウイルス (ToMV) の MP と *in vitro* で直接相互作用する植物因子の機能解析を精力的に進めてきた。我々が報告した植物因子の一つである NtMBF1a はタバコ由来のタンパク質であり、古細菌から真核生物まで広く保存されている転写仲介因子として知られている。一方で、ToMV に対する抵抗性因子である N タンパク質と結合する植物因子を同定する別の実験 (Konagaya et al., J Gen Plant Pathol, 2004) から、NtMBF1a が N タンパク質のロイシンリッチリピート領域 (N-LRR) とも結合することが示唆されていた (未発表)。植物の MBF1 群の生理学的・病理学的な機能には不明な点が多く、シロイヌナズナの MBF1c 過剰発現体では、糸状菌感染に対して抵抗性が高くなるという報告がなされてはいる (Kim et al., Biochem Biophys Res Commun, 2007) が、植物ウイルス感染における役割に関する報告はない。我々の予備実験から、NtMBF1a を一過的に過剰発現させた植物細胞でウイルスの細胞間移行が抑制されるかどうか調べたところ、抑制効果は認められなかった。一方で、*NtMBF1a* 遺伝子の発現を抑制するサイレンシング誘導タバコ (品種 Samsun NN) を作出し、NtMBF1a の発現量が低下している T1 世代のタバコに ToMV を接種したところ、壊死斑サイズが縮小する傾向があるという結果を得ていた。そこで、本研究では、NtMBF1a はウイルスの細胞間移行およびウイルス抵抗における役割を詳しく調べ、これを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、NtMBF1a は、ウイルスの細胞間移行に対して抑制的に作用するのではなく、むしろ細胞間移行を促進する植物因子である可能性を検証し、NtMBF1a と MP の相互作用に基づくウイルス細胞間移行 (あるいはウイルス抵抗性) の制御メカニズムが存在するかどうかを調べ、NtMBF1a の発現制御により

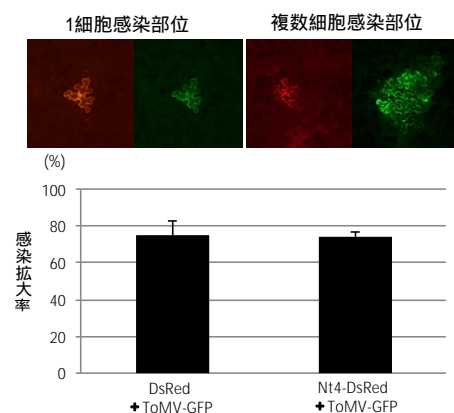
新規ウイルス抵抗性植物の作出の基盤となるデータを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 赤色蛍光タンパク質融合型 NtMBF1a (NtMBF1a-DsRed) を発現するためのプラスミドを作製する。パーティクルガン法を用いて NtMBF1a-DsRed と緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする ToMV 変異体 (ToMV-GFP) ゲノムをニコチアナベンサミアーナ葉に共導入し、NtMBF1a が過剰発現している細胞からの ToMV の細胞間移行への影響を調べる。
- (2) アグロバクテリウム浸潤法を用いて *NtMBF1a* と ToMV-GFP の cDNA をニコチアナベンサミアーナ葉に共導入し、NtMBF1a が一過的に過剰発現した組織における ToMV-GFP の細胞間移行について蛍光を指標として観察する。
- (3) パーティクルガン法を用いて NtMBF1a-DsRed と黄色蛍光タンパク質融合型 ToMV MP (MP-YFP) を一過的に共過剰発現させたニコチアナベンサミアーナ葉での両タンパク質の相互作用の有無および細胞内局在の変化を調べる。
- (4) *NtMBF1a* サイレncing誘導タバコ (T1 ヘテロ系統あるいは T2 ホモ系統) に ToMV あるいは近縁種の TMV を接種し、壊死斑サイズを測定し、ウイルスの細胞間移行への影響を調べる。
- (5) アグロバクテリウムを用いて TMV エリクターを一過的に過剰発現させた後の *NtMBF1a* 遺伝子の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて解析し、ウイルス抵抗性誘導時における NtMBF1a の発現変動を調べる。

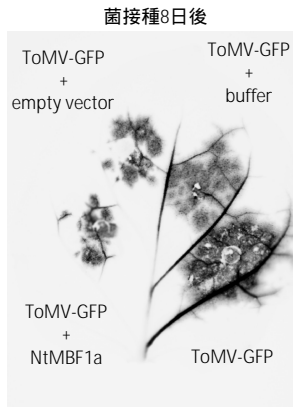
4. 研究成果

- (1) NtMBF1a-DsRed と ToMV-GFP ゲノムを共導入した場合、コントロール実験 (DsRed との共導入) と比較して、ToMV-GFP の隣接細胞への移行には違いが見られなかった (下図)。このことから、NtMBF1a には初期の細胞間移行を促進あるいは抑制する機能はないことが示唆された。

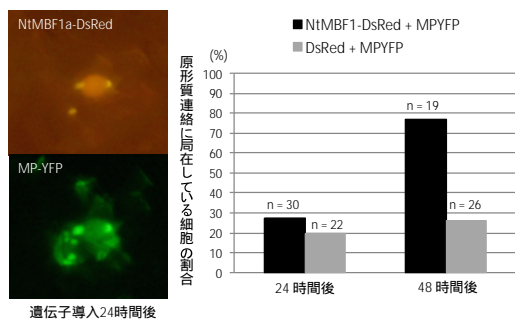


- (2) アグロバクテリウム接種後、経時的に GFP 蛍光を観察した結果、コントロール実験区 (empty vector をもつアグロバクテリウム

接種)と比較して、NtMBF1aの発現によるウイルス感染への影響は見られなかった(下図)。このことからNtMBF1には局所的な感染の拡大を促進あるいは抑制する機能はないことが示唆された。

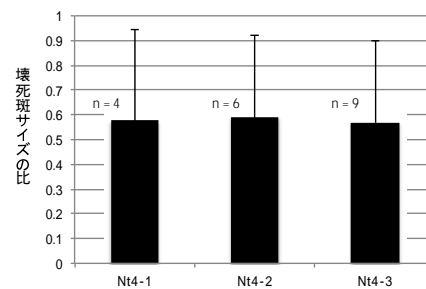


(3) NtMBF1a-DsRedとMP-YFPを共発現した細胞では、NtMBF1a単独発現では通常見られない顆粒状構造においてMP-YFPと共局在している様子が観察された(下図/左)。このことから、両タンパク質が細胞内でも相互作用している可能性が示唆された。NtMBF1a-DsRed発現細胞では、コントロール実験(DsRed共導入)よりも、遺伝子導入48時間後において、原形質連絡にMPが局在している細胞の割合が増加している傾向が見られた(下図/右)ため、NtMBF1aはMPの細胞内局在に影響を与える可能性が示唆された。



(4) *NtMBF1a*サイレンシング誘導タバコの3種類のT1系統(Nt4-1・Nt4-2・Nt4-3)を用いた野生型ToMVの接種実験を行ったところ、本研究当初の実験(3回の独立した実験)においては、いずれの系統においても壊死斑の平均サイズが2/3程度に縮小する傾向が認められた(下図)。しかし、以降の接種実験においては、非形質転換タバコとサイレンシングタバコ(上記の3種類のT1系統およびNt4-1のT2ホモ系統)において、形成される壊死斑のサイズにばらつきが大きくなり、統計的に有意な差は認められなかった。一方で、リアルタイムRT-PCRの結果、接種に用いたサイレンシング誘導タバコでは1/4から1/5程度に*NtMBF1*遺伝子の発現が抑制されている

ことが確認された。また、野生型のTMVを用いた接種実験も行ったが、同様に壊死斑サイズに有意な差が認められないという結果であった。以上の結果から、植物の生育などの環境条件によっては*NtMBF1*の発現抑制によりウイルス感染が抑制される可能性が示唆されたが、ToMVの細胞間移行の促進因子として機能していることを明確に支持するデータを得るためには植物の生育条件等の検討を加えた上で、更なる実験が必要であると考えられた。



(5) リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析の結果、非形質転換タバコにTMVのエリシターを一過的に過剰発現させた後、壊死斑が誘導される24時間および48時間の時点で*NtMBF1a*遺伝子の発現は変動しないことが分かった。また、マイクロアレイ解析も行い、今後の遺伝子発現の比較を行う基盤データを得ることができた。

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)

Nobumitsu Sasaki, Ryuki Shishikura, and Hiroshi Nyunoya. Formation and intracellular movement of cytoplasmic bodies of the tomato mosaic virus 126-kDa replication protein in association with its movement protein. *Journal of General Plant Pathology*. 査読有. in press.2014. DOI: 10.1007/s10327-014-0515-5.

Nobumitsu Sasaki, Masumi Takaoka, Shobu Sasaki, Katsuyuki Hirai, Tetsuo Meshi, Hiroshi Nyunoya. The splice variant Ntr encoded by the tobacco resistance gene N has a role for negative regulation of antiviral defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 査読有. 84. 2013. 92-98. DOI: 10.1016/j.pmp.2013.08.002.

Mayumi Takano, Md. Ashraf Haque, Shota Odaira, Keiko Nakata, Nobumitsu Sasaki, 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. 2013. 37-46. DOI:
10.5511/plantbiotechnology.12.1207a.

Akihiro Hiraguri, Shoko Ueki, Hideki Kondo, Koji Nomiyama, Takumi Shimizu, Tamaki Ichiki-Uehara, Toshihiro Omura, Nobumitsu Sasaki, Hiroshi Nyunoya, Takahide Sasaya. Identification of a movement protein of Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus. Journal of General Virology. 査読有. 94. 2013.1145-1150. DOI: 10.1099/vir.0.050005-0.

Akihiro Hiraguri, Hiroyuki Hibino, Takaharu Hayashi, Osamu Netsu, Takumi Shimizu, Tamaki Uehara-Ichiki, Toshihiro Omura, Nobumitsu Sasaki, Hiroshi Nyunoya and Takahide Sasaya. 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. 2012. 2290-2298. DOI: 10.1099/vir.0.044420-0.

〔学会発表〕(計9件)

佐々木信光・高岡万純・丹生谷博. タバコ抵抗性因子Nのプライスバリエントはウイルスエリシター誘導性の防御応答を負に制御する. 第55回日本植物生理学会年会. 2014年3月19日. 富山(富山).

山口昂哉・Haque A. Md.・仲田啓子・佐々木信光・丹生谷博. タバコ Dof 転写因子 BBF タンパク質間相互作用の in vitro 解析. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月5日. 兵庫(神戸).

中山逸平・仲田啓子・佐々木信光・丹生谷博. タバコ Dof 転写因子 BBF1, BBF2 および BBF3 のウイルスエリシター応答性過敏細胞死の誘導および防御関連遺伝子発現における機能の比較. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月5日. 兵庫(神戸).

宮本寛夫・小平将太・佐々木信光・丹生谷博. ウイルス抵抗性遺伝子Nの転写制御因子候補 BTF3 のクローニングと機能解析. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月5日. 兵庫(神戸).

高野真由美・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年3月29日. 岐阜(岐阜).

高岡万純・佐々木信光・丹生谷博. 抵抗性因子Nのプライミ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年3月29日. 岐阜(岐阜).

Hiroshi Nyunoya, Mayumi Takano, Shota Odaira, Md. Ashrafal Haque, Nobumitsu Sasaki. Involvement of Dof proteins in the transcriptional activation of the tobacco

resistance gene N by the tobacco mosaic virus elicitor and its implication for the induction of hypersensitive response. BIT's 2nd Annual World Congress of Microbe-2012. 2012年7月30日. Guangzhou, China.

Masumi Takaoka, Mayumi Takano, Md. Ashrafal Haque, Nobumitsu Sasaki, Hiroshi Nyunoya. The role of a splice variant product of the virus resistance gene N in the induction of hypersensitive response. IS-MPMI 2012 XV International Congress. 2012年7月29日. Kyoto, Japan.

Mayumi Takano, Md. Ashrafal Haque, Nobumitsu Sasaki, Hiroshi Nyunoya. Overexpression of tobacco Dof transcription factor enhances transcriptional activation of the virus resistance gene N and ROS generation. IS-MPMI 2012 XV International Congress. 2012年7月29日. Kyoto, Japan.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tuat.ac.jp/~idenshi/Japanese%20Files/Kenkyu_Folder/kenkyu2.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし