

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780041

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代謝遺伝子の発現制御と退緑病徴発現との対応

研究課題名(英文) Relationship between chlorotic symptom expression and regulation of host-gene expression by Cucumber mosaic virus infection

研究代表者

望月 知史 (MOCHIZUKI, Tomofumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：30469837

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)：毒性が異なる3種のキュウリモザイクウイルス(CMV)が感染した植物退緑組織における遺伝子発現を網羅的に解析した。CMV株間で発現が質的に異なる遺伝子はなく、宿主遺伝子発現の量的差違がCMV株間の毒性の違いに関係していると示された。発現量が減少していた遺伝子の多くは光合成関連遺伝子であり、これらの発現減少が退緑の原因と考えられた。一方で、光合成関連遺伝子の発現を制御するシロイヌナズナ転写因子atGLKが恒常発現する組換え体は、野性型植物同様に、CMV感染により退緑症状を示して光合成関連遺伝子の発現量も減少した。したがって、CMVによる退緑症状にはGLK経路は関与していないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We compared the transcriptomes of chlorotic tissues infected with three Cucumber mosaic virus (CMV) strains with diverse chlorosis severity. CMV inoculation appeared to have similar effects on the transcriptional expression profiles, and only the magnitude of expression differed among the different CMVs. Gene ontology analysis revealed chloroplast- and photosynthesis-related genes (CPRGs) were down-regulated in the chlorotic tissues. The level of CPRG down-regulation was correlated with the severity of chlorosis.

To elucidate the suggestion that the down-regulation of CPRGs caused chlorosis, transgenic tobacco that CPRGs expression was up-regulated by introduction of the Arabidopsis GLK transcriptional factor was generated. When GLK-tobacco were inoculated with CMVs, chlorotic symptoms appeared. Amounts of CPRGs mRNA in infected GLK-tobaccos were fewer than those of healthy tobacco, indicating that over-expression of atGLK hardly affected chlorosis expression.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：キュウリモザイクウイルス 退緑症状 光合成関連遺伝子 トランスクリプトーム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物ウイルスが感染した植物では様々な病徴が引き起こされ、農作物生産では減少に至る。発病機構の解明は耐病性植物の創出など応用研究にとって重要な基礎的知見となるが、ウイルス感染により植物の遺伝子発現や代謝がなぜ変化するのか、また、どのように変化して発病するのか、その分子機構は明らかではない。植物ウイルス感染による症状は様々であるが、モザイク病の退緑組織に見られるクロロシスは代表的な症状の一つである。キュウリモザイクウイルス (CMV) がタバコに感染すると明瞭なモザイク病を引き起こすが、モザイク葉の退緑部における発病メカニズムはほとんど明らかではない。

(2) タバコに薄緑色退緑症状を引き起こす CMV ペポ系統と毒性 (退緑の程度) が異なるペポ変異株を用いたこれまでの研究により退緑組織では、①葉緑体中のチラコイド膜が特異的に減少している、②核ゲノムにコードされる光合成関連遺伝子の mRNA の蓄積量が減少している、③光合成関連遺伝子 mRNA の蓄積量の減少程度と CMV 変異株間の毒性の違いに相関がある、ことが明らかになっていた。これらのことから、光合成関連遺伝子の発現抑制がチラコイド膜の減少およびクロロシスの原因であると考えられた。

(3) しかしながら、光合成以外の代謝に関わる遺伝子の mRNA 蓄積量は減少していないのかについては明らかではなく、さらに、光合成関連遺伝子の発現抑制がクロロシスの原因であるかどうかについて実験的な検証はなされていない。また、CMV 感染によりなぜ光合成関連遺伝子の発現抑制が起こるのか、その分子メカニズムは分かっていない。特に、ウイルス感染による退緑発現や光合成関連遺伝子の発現制御には活性酸素種が関わっているという報告があるが、CMV 感染タバコの退緑組織における活性酸素種の蓄積は解析されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、CMV 感染によるタバコの退緑症状について、植物遺伝子の発現変化から退緑症状の表現型に至る一連の発病分子メカニズムの解明を目指している。そのために、以下の3点を明らかにすることを目的に研究を行った。すなわち、①CMV 感染したタバコの退緑組織における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、その発現プロファイルを毒性の異なる CMV 株間で比較してクロロシスに関連の深い植物遺伝子を明らかにする、②光合成関連遺伝子の発現量が増加した組換えタバコを作成し、CMV 感染により発病するかどうかを明らかにする、③光合成関連遺伝子の発現制御に関わる活性酸素種の蓄積を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CMV 変異株が感染したタバコの退緑組織におけるトランスクリプトーム解析

毒性が異なる3種の CMV 株 (ペポ, 129A, および 129Q, 図1) が感染したタバコ葉の退緑組織、および CMV 非接種の健全タバコの葉組織のトランスクリプトーム解析をタバコマイクロアレイ (アジレント社, 約4万4千個の遺伝子の発現量を解析できる) を用いて行った。CMV 感染組織において発現量が健全組織よりも2倍以上増加あるいは減少している遺伝子を同定し、さらに、同定された発現変動遺伝子を遺伝子データベースと照合して遺伝子オントロジー解析を行い、生物学的機能および細胞内局在性と関連付けて分類した。

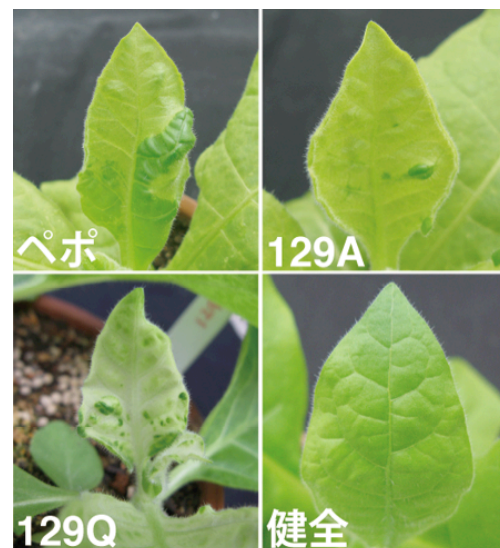


図1 3種のCMVが感染したタバコの病徴

#### (2) atGLK 遺伝子が過剰発現する組換えタバコにおける CMV 感染による退緑症状発病の解析

光合成関連遺伝子 (集光タンパク質やクロロフィル合成酵素等) の発現を誘導するシロイヌナズナの転写因子 golden-2 like transcription factor (*atGLK*) が過剰発現する組換えタバコ (GLK タバコ) を、植物形質転換用高発現ベクター (pRI 101 AN, タカラバイオ) を用いて作出した。各種光合成関連遺伝子の発現量が非組換え体より増加している GLK タバコを2ライン選抜して CMV 変異株を接種し、その後の病徴発現を観察した。さらに、CMV を接種した GLK タバコにおける各種光合成関連遺伝子の発現量をノーザン法により解析した。

#### (3) CMV 感染タバコにおける活性酸素種の蓄積の解析

CMV 感染による活性酸素種の蓄積が退緑症状に関係しているのかを明らかにするために、各 CMV 変異株が感染して退緑症状を引き起こしたタバコ組織における活性酸素種 (過酸化水素とスーパーオキシドアニオン)

の蓄積を検出した。それぞれの活性酸素種の蓄積は DAB および NBT 染色により行った。

#### 4. 研究成果

(1) 退緑の激しさがことなる 3 種の CMV 変異株 (薄緑色クロロシスを引き起こすペポと 129A, 白色クロロシスを引き起こす 129Q, 図 1) を用いて退緑組織におけるトランスクリプトーム解析を行った。健全タバコ組織と比較して発現量が 2 倍以上増減している遺伝子を CMV 株間で比較したところ、全ての CMV 株で共通して増加あるいは減少していた遺伝子はそれぞれ 1056 個と 316 個であった (図 2)。CMV 株間では発現が質的に異なる遺伝子 (つまり、ペポでは増加しているが 129A では減少している遺伝子) はなく、発現量増減の量的違いのみが認められた。このことは、毒性が異なる CMV 株間でもタバコの応答機構が類似していること、CMV 株間の毒性の違いは、退緑組織におけるタバコ遺伝子発現の量的差異が関係していることを示している。

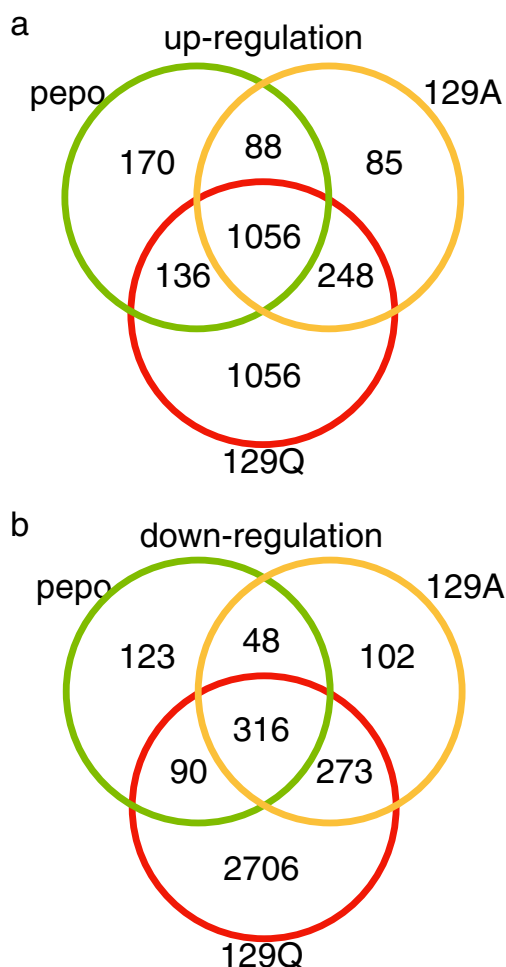


図 2 CMV 株特異的に、あるいは、全 CMV 株に共通して発現量が変化するタバコ遺伝子の数。a: 健全と比べて発現量が 2 倍以上増加していた遺伝子の数。b: 健全と比べて発現量が 2 分の 1 以下に減少していた遺伝子の数。

細胞内局在性により分類した遺伝子オン

トロジー解析の結果 (図 3)、発現量が増加している遺伝子では核局在性タンパク質をコードしている遺伝子が最も多く (約 30%) ついで、細胞質局在タンパク質、葉緑体局在タンパク質、細胞膜局在タンパク質をコードしている遺伝子 (約 18%-10%) であった。発現量が減少している遺伝子では葉緑体局在タンパク質をコードする遺伝子が最も多く (約 35%)、次いで核局在タンパク質遺伝子 (約 20%) であった。

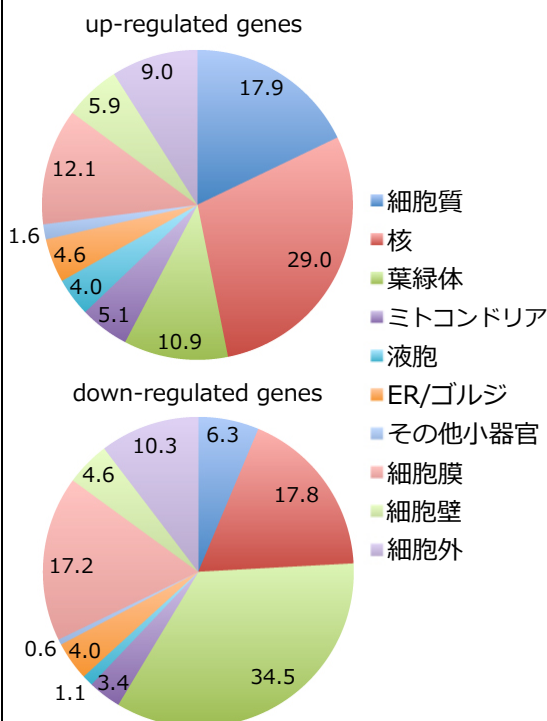


図 3 全ての CMV に共通して発現量が増加 (上) あるいは減少 (下) していた遺伝子のオントロジー解析による分類。各遺伝子はコードするタンパク質の細胞内局在性により分類した。

生物学的機能で分類した場合 (表 1)、発現量が増加していた遺伝子の多くは非生物学的ストレス (高温, 低温, カドミウム, 塩等) 応答に関与する遺伝子であった。これら遺伝子の発現量に CMV 株間で差は見られず、ウイルスの毒性に関係なく CMV 感染に共通するストレス応答であると考えられた。一方で、発現量が減少していた遺伝子には光合成の機能に関連する遺伝子が多く含まれていた。光合成関連遺伝子の発現量は全ての CMV 感染退緑組織で減少していたがその減少程度には CMV 株間で差が見られ、129Q が感染した白色クロロシス組織において最も減少していた。

植物のクロロシスと関連が深いと考えられている抗酸化遺伝子では、129Q が感染した白色クロロシス組織においてのみカタラーゼとスーパーオキシドジスムターゼの発現量が増加していた。これらの遺伝子の発現量増加は 129Q 感染による激しいクロロシスにより引き起こされたものと考えられた。ペ

ポや 129A が感染した薄緑色クロロシス組織では、抗酸化遺伝子の顕著な発現量増加は見られなかった。

表 1 全ての CMV に共通して発現量が増加あるいは減少していた遺伝子の生物学的機能による分類. (上位 11 の機能のみ提示)

| 生物学的機能            | 遺伝子の数 |
|-------------------|-------|
| 発現量が増加していた遺伝子     |       |
| カドミウムに対する応答       | 17    |
| 低温に対する応答          | 17    |
| 高温に対する応答          | 17    |
| 塩ストレスに対する応答       | 17    |
| タンパク質のリン酸化        | 15    |
| アブシジン酸刺激に対する応答    | 15    |
| DNA に依存した転写の制御    | 14    |
| 酸化還元反応            | 13    |
| 代謝反応              | 11    |
| タンパク質分解           | 11    |
| ユビキチン経路によるタンパク質分解 | 11    |
| 発現量が減少していた遺伝子     |       |
| タンパク質のリン酸化        | 10    |
| エチレン刺激に対する応答      | 9     |
| 光合成               | 5     |
| ペプチジルシステインのニトロシル化 | 4     |
| 細菌に対する防御応答        | 3     |
| 胚発生(種子の休眠を終わらせる)  | 3     |
| 脂質の輸送             | 3     |
| 光阻害               | 3     |
| 光化学系 II における電子伝達  | 3     |
| DNA に依存した転写の制御    | 3     |
| 種子の発達             | 3     |

(2) GLK タバコに上記 3 種の CMV を接種したところ、非組換えタバコ同様の退緑症状を引き起こし、モザイク病を示した。さらに、GLK タバコの退緑組織における各種光合成関連遺伝子の発現量は、非組換えタバコ同様に、退緑の激しさと相関した発現量減少が認められた。以上の結果から、*atGLK* の過剰発現は CMV 感染による光合成関連遺伝子の発現抑制には影響しないことが明らかになり、GLK が制御する経路は CMV 感染による退緑症状の発現に関与していないと考えられた。

(3) 3 種の CMV が感染したタバコの退緑組織における過酸化水素とスーパーオキシドアニオンの蓄積を観察したところ、いずれの CMV 感染退緑組織においても活性酸素種の蓄積は認められなかった。

トランスクリプトーム解析により、ペポと 129A が感染した薄緑色クロロシス組織では抗酸化遺伝子の発現量は増加していないことが示されていることから、薄緑色クロロシス組織では活性酸素種は生成されていない、あるいは、通常発現量の抗酸化遺伝子によりほとんどが消去されてる、の二つの可能性が考えられた。また、129Q が感染した白色クロロシス組織においては、過酸化水素を消去するカタラーゼとスーパーオキシドアニオンを消去するスーパーオキシドジムスター

ゼの発現量が増加していたことから、激しいクロロシスにより活性酸素種が生成されても、抗酸化遺伝子の発現量増加によりほぼ完全に消去されているものと考えられた。

## 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 1 件)

- ① MOCHIZUKI Tomofumi, OGATA Yoshiyuki, HIRATA Yuki, OHKI T. Satoshi. Quantitative transcriptional changes associated with chlorosis severity in mosaic leaves of tobacco plants infected with the *Cucumber mosaic virus*. *Molecular Plant Pathology*, 査読有, Vol. 15, 2014, pp. 242-254.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 望月知史. CMV によるモザイク病徴の発現メカニズム. 第 11 回植物ウイルス病研究会 (岐阜県) 2013 年 3 月 30 日

- ② 望月知史・尾形善之・平田裕樹・大木 理. 毒性が異なるキュウリモザイクウイルス変異株が感染したタバコモザイク葉退緑組織におけるトランスクリプトームの比較解析. 平成 25 年度日本植物病理学会大会 (岐阜県) 2013 年 3 月 28 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

望月知史 (MOCHIZUKI Tomofumi)  
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教  
研究者番号:30469837