

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850030

研究課題名(和文) ウイルス感染による宿主植物の発生プログラムかく乱機構の解明

研究課題名(英文) Perturbation of host developmental pathways by virus infection in plant

研究代表者

厚見 剛 (Atsumi, Go)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究員

研究者番号：90547217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウの栽培では、リンドウこぶ症(茎や根で腫瘍状組織が形成される病気)が問題となっている。本研究では、リンドウこぶ症関連ウイルスがコードする、こぶ症様の症状を誘導するタンパク質GK32の作用機構の解明を目指した。遺伝子発現解析から、GK32タンパク質が木部分化の制御経路を活性化することを示唆する結果を得た。また、蛍光タンパク質融合GK32タンパク質が、核内で顆粒状の構造をとり、核小体に局在するNucleolinや、mRNAスプライシング関連因子群と共局在することを示した。酵母ツーハイブリッド法を用い、GK32タンパク質と結合するタンパク質の候補を複数(リボソームタンパク質など)単離した。

研究成果の概要(英文)：Kobu-sho is a syndrome that causes tumorous or hyperplastic disorders on stems, nodes and roots of gentians. Previously, I identified GK32 gene fragment inducing Kobu-sho-like symptom from Gentian Kobu-sho-associated virus genome. In this study, I aimed to elucidate the mechanism that GK32 protein induced Kobu-sho disease. Gene expression analysis suggested that expression of GK32 gene fragment activated the signaling pathway regulating xylem development. I showed that GK32 protein tagged with yellow fluorescent protein formed many speckles or plate-like structures in the nucleus. GK32 co-localized with Nucleolin (protein localized in nucleolus) and several mRNA splicing factors. I isolated GK32-interacting proteins including many ribosomal proteins using yeast two-hybrid screening.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物ウイルス 木部 木質細胞 形態形成 二次細胞壁 病徴

1. 研究開始当初の背景

リンドウは仏花を中心に利用されるが、その栽培においてリンドウこぶ症による被害が甚大となっている。こぶ症発症個体は茎皮層における木質細胞の異常分化や、節・根の腫瘍などのユニークな病徴を現す。約 30 年間原因となる病原体は不明であったが、私たちは独自の診断技術(図書[1])を利用して、こぶ症個体が新奇なウイルスに感染していることを発見し、リンドウこぶ症関連ウイルス(GKaV)と名付けた(発表論文[5]・[7])。

これまでに、こぶ症を引き起こす GKaV の因子を探索し、*Nicotiana benthamiana* において、こぶ症と類似した茎皮層における木質細胞の異常分化を誘導する遺伝子断片 GK32 を発見した。また、興味深いことに、GK32 タンパク質を発現させると、葉裏面の葉脈に沿った葉状組織の新生などの大規模な発生異常が見られた。

2. 研究の目的

本研究では、GK32 タンパク質が、こぶ症の症状、具体的には木質細胞の異常分化を誘導する機構の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) GK32 遺伝子断片発現時の表現型観察
リンドウで GK32 タンパク質がこぶ症様の病徴を誘導することを証明するため、GK32 タンパク質を発現する形質転換体を作成し、表現型を観察した。また、解析基盤を構築するため、薬剤(デキサメタゾン, DEX) 誘導性プロモーターで GK32 遺伝子断片の発現を制御した(DEX::GK32)、*N. benthamiana* およびシロイヌナズナの形質転換体を作成した。

(2) GK32 遺伝子断片発現時における宿主の遺伝子発現変化
シロイヌナズナの DEX::GK32 形質転換体を利用し、DEX 処理後の経時的なトランスクリプトーム解析を行った。顕著な発現変化が見られた特定の遺伝子群に関して、定量 PCR 解析で、その発現変化を再解析した。

(3) GK32 タンパク質の細胞内局在解析
蛍光タンパク質 YFP と融合させた GK32 タンパク質を、Agro-infiltration 法により、*N. benthamiana* の葉組織で一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、その細胞内局在を解析した。

(4) GK32 タンパク質が相互作用する宿主因子の探索
GK32 タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を、酵母ツーハイブリッド法で探索した。

(5) GK32 遺伝子断片発現による形態異常に関与する因子・経路の探索
シロイヌナズナの DEX::GK32 形質転換体は、DEX 処理依存的に顕著な形態異常を示す。こ

の形質転換体に EMS 処理により変異を導入し、形態異常が消失する復帰変異体を探索した。得られた変異体の M3 世代を利用し、全ゲノムシーケンスをもとにした MutMap+ 解析により、原因候補遺伝子を絞り込んだ。

4. 研究成果

(1) GK32 遺伝子断片発現時の表現型観察
リンドウにおいて、Nos プロモーターを用いて、植物体全体で GK32 遺伝子断片を発現する形質転換体を作成したところ、独立した 4 系統で、腫瘍状の組織が観察された。また、師部特異的プロモーターである rolC プロモーターで発現を制御した形質転換体を作成したところ、独立した 4 系統で、葉裏面の葉脈に沿って葉状組織の新生が見られた。

N. benthamiana およびシロイヌナズナの DEX::GK32 形質転換体を作成したところ、いずれも独立した 4 つ以上の系統で、DEX 処理依存的に、顕著な形態異常が観察された。

(2) GK32 遺伝子断片発現時における宿主の遺伝子発現変化
シロイヌナズナの DEX::GK32 形質転換体の発芽後 1 週間の実生に対して、DEX を処理し、4、8、12 時間、1、2、3、5、7 週後の個体からトータル RNA を抽出し、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析および定量 PCR 解析をした。その結果、DEX 処理後 4 時間から、オーキシンやブラシノステロイド経路が活性化し、サイトカニン経路が抑制されることを示す結果を得た。これは、維管束において、前形成層から木部の管状要素が分化する際の状態に類似している。さらに、木部などにおける二次細胞壁形成のマスタ制御因子のうち、VND5 および NST2 の発現が顕著に誘導されることを明らかにした。以上の結果は、シロイヌナズナにおいて、GK32 遺伝子断片の発現は、木部の分化を制御するシグナル伝達系を活性化することを示唆する。

(3) GK32 タンパク質の細胞内局在解析
N. benthamiana の葉組織において、Agro-infiltration 法で、YFP 融合 GK32 タンパク質を一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡でその細胞内局在を調べた。その結果、核内で顆粒状や板状の構造体を形成することが分かった。核内のどこに局在するかを調べるため、mCherry で標識した核小体(Nucleolin)、Cajal body(Coilin・SmB・SmD3)、Nuclear Speckle(SR タンパク質[SC35・SR34・RS2Z33])に局在するシロイヌナズナのタンパク質と、YFP 融合 GK32 タンパク質の局在を比較した。その結果、GK32 タンパク質は Nucleolin と共局在し、核小体に局在することがわかった。また SmB・SmD3 と共局在し、Coilin とは共局在しなかった。SmB・SmD3 はスプライソソームの構成因子であるが、GK32 はその他のスプライソソーム構成因子

U1-70K・U2B"とも共局在した。スプライソソームは、その成熟過程において、構成因子がCajal bodyに蓄積し、その後Nuclear speckleにリクルートされ、mRNAスプライシングに利用される。そこで、Cajal bodyには蓄積せず、Nuclear speckleに蓄積するSRタンパク質(SC35・SR34・RS2Z33)の局在と比較したところ、いずれとも共局在しなかった。今後は、共局在した因子との相互作用についても検証する。また、上記の局在パターンは、small RNAの生合成に關する複合体の局在と共通する部分もあるため、それら因子との局在も比較する。また、これらの結果を受け、核タンパク質に絞り、相互作用する因子の探索を生化学的に進めている。

(4) GK32 タンパク質が相互作用する宿主因子の探索

GK32 タンパク質と相互作用する宿主因子を、酵母ツーハイブリッド法で探索した。BaitとしてGK32タンパク質、Preyとして*Nicotiana benthamiana* cDNAライブラリーを用いた。栄養要求性レポーター(*ADE2*, *HIS3*)と青白選択(*α-galactosidase*)で選抜した結果、リボソームタンパク質(28種類)をはじめとした51種類の候補遺伝子を得た。現在、各遺伝子の完全長ORFを用いた、二次解析を行っており、完全長でも相互作用が検出される遺伝子を複数同定している。今後は、植物細胞内での相互作用や、GK32タンパク質が誘導する木質細胞の異常分化・形態異常に關するかを明らかにする。

(5) GK32 遺伝子断片発現による形態異常に關する因子・経路の探索

シロイヌナズナのDEX::GK32形質転換体にEMS処理で変異を導入し、形態異常が消失する復帰変異体を探索した。現在までに独立した5系統の復帰変異体を得た。ひとつの系統に關して、原因遺伝子がヘテロとなっているM2世代を得て、そのM3世代において、野生型および復帰変異型のDNAをそれぞれバルクにし、全ゲノムシーケンスをした。そのシーケンスデータをもとに、MutMap+解析により復帰変異体特異的に存在する一塩基置換(SNP)を検出し、統計的に有意な3つの候補遺伝子まで絞り込んだ。今後は、スクリーニングの継続、および得られた復帰変異体の原因遺伝子の同定に取り組む。

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8件)

[1] Waliullah S, Kosaka N, Yaeno T, Ali ME, Sekine KT, Atsumi G, Yamaoka N, Nishiguchi M, Takahashi H and Kobayashi K. Cauliflower mosaic virus Tav protein induces leaf chlorosis in transgenic tobacco through a host response to its

virulence function. *Journal of General Plant Pathology*, in press, 10.1007/s10327-015-0600-4 (査読あり)

[2] Atsumi G, Tomita R, Yamashita T, and Sekine KT. A novel virus transmitted through pollination causes ring-spot disease on gentian (*Gentiana triflora*) ovaries. *Journal of General Virology*, 96:431-439(2015) (査読あり)

[3] Waliullah S, Mochizuki T, Sekine KT, Atsumi G, Ali ME, Yaeno T, Yamaoka N, Nishiguchi M and Kobayashi K. Artificial induction of a plant virus protein in transgenic tobacco provides a synchronous system for analyzing the process of leaf chlorosis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 88:43-51(2014) (査読あり)

[4] Hisa Y, Suzuki H, Atsumi G, Choi SH, Nakahara KS and Uyeda I. P3N-PIPO of Clover yellow vein virus exacerbates symptoms in pea infected with White clover mosaic virus and is implicated in viral synergism. *Virology*, 449:200-206 (2014) (査読あり)

[5] Atsumi G, Tomita R, Kobayashi K and Sekine KT. Prevalence and genetic diversity of an unusual virus associated with Kobu-sho disease of gentian in Japan. *Journal of General Virology* 94:2360-2365 (2013) (査読あり)

[6] Atsumi G, Tomita R, Kobayashi K and Sekine KT. Establishment of an agroinoculation system for broad bean wilt virus 2. *Archives of Virology* 158:1549-1554 (2013) (査読あり)

[7] Kobayashi K, Atsumi G, Iwadata Y, Tomita R, Chiba K, Akasaka S, Nishihara M, Takahashi H, Yamaoka N, Nishiguchi M and Sekine KT. Gentian Kobu-sho-associated virus: a tentative, novel double-stranded RNA virus that is relevant to gentian Kobu-sho syndrome. *Journal of General Plant Pathology* 79:56-63 (2013) (査読あり)

[8] Choi SH, Hagiwara-Komoda Y, Nakahara KS, Atsumi G, Shimada R, Hisa Y, Naito S and Uyeda I. Quantitative and Qualitative Involvement of P3N-PIPO in Overcoming Recessive Resistance against Clover yellow vein virus in Pea Carrying *cyv1*. *Journal of Virology* 87:7326-7337 (2013) (査読あり)

[学会発表](計18件)

[1] 厚見剛、楢本悟史、富田麗子、白川明日佳、関根健太郎 リンドウこぶ症関連ウイルスのGK32遺伝子断片の発現は、シロイヌナズナにおいて木部の分化を制御するシグナル伝達系を活性化する 平成27年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代

田区、東京都 (2015 年 3 月)

[2] 白川明日佳、厚見剛、小林括平、富田麗子、関根健太郎 リンドウこぶ症関連ウイルスの形態形成異常誘導タンパク質 GK32 が相互作用する宿主因子の探索 平成 27 年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京都 (2015 年 3 月)

[3] 富田麗子、厚見剛、白川明日佳、○関根健太郎 網羅的 RNA ウイルス検出技術「DECS 法」の高効率化に向けた DRB4 タンパク質の機能解析 平成 27 年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京都 (2015 年 3 月)

[4] 薦田 (萩原) 優香、崔善熹、佐藤昌直、厚見剛、阿部純也、中原健二、上田一郎、内藤哲 クローバ葉脈黄化ウイルスがコードする P3N-PIPO および新規タンパク質の発現機構 平成 27 年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京都 (2015 年 3 月)

[5] 柳澤広宣、勝幸司、富田麗子、厚見剛、関根健太郎 ディープシーケンスによるブルーベリー及びブラックベリー苗からのウイルス検出 平成 27 年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京都 (2015 年 3 月)

[6] 鈴木春香、厚見剛、宮下湧理、比佐雄亮、中原健二 P3N-PIPO と相互作用するエンドウの二つの独立したウイルス防御メカニズムはクローバ葉脈黄化ウイルスの毒性を進化的に抑制すると思われる 平成 27 年度日本植物病理学会、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京都 (2015 年 3 月)

[7] 厚見剛、富田麗子、関根健太郎 リンドウ子房輪紋症ウイルス (仮称) の全塩基配列の決定。平成 26 年度日本植物病理学回東北部会、岩手県民情報交流センター、盛岡市、岩手県 (2014 年 9 月)

[8] 白川明日佳、厚見剛、富田麗子、関根健太郎 RNA ウイルスの網羅的診断技術「DECS 法」の適用範囲に関する検討。平成 26 年度日本植物病理学回東北部会、岩手県民情報交流センター、盛岡市、岩手県 (2014 年 9 月)

[9] 富田麗子、厚見剛、白川明日佳、関根健太郎 トバモウイルス抵抗性遺伝子 L3 の機能解析における *Nicotiana benthamiana* 形質転換体を用いたハイスループット実験系の確立。平成 26 年度日本植物病理学回東北部会、岩手県民情報交流センター、盛岡市、岩手県 (2014 年 9 月)

[10] Atsumi G, Tomita R and Sekine KT.

Subcellular localization of viral protein that induces developmental abnormalities in stem and leaf tissues. International Union of Microbiological Societies 2014 Congress, Palais des congrès de Montréal, Montreal, Canada (2014 年 7-8 月)

[11] Sekine KT, Tomita R, Atsumi G and Kadotani N. Glutamate fermentation co-product induces resistance to virus in Arabidopsis. 25th International Conference on Arabidopsis Research, University of British Columbia, Vancouver, Canada (2014 年 7-8 月)

[12] 厚見剛、富田麗子、関根健太郎 木質細胞の異常分化と葉の新生を誘導するウイルスタンパク質の細胞内局在解析。平成 26 年度日本植物病理学会、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道 (2014 年 6 月)

[13] 関根健太郎、富田麗子、厚見剛、小林括平 トバモウイルス粒子長悍化変異体の L 抵抗性タンパク質による認識の回避。平成 26 年度日本植物病理学会、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道 (2014 年 6 月)

[14] 鈴木春香、比佐雄亮、厚見剛、中原健二 クローバ葉脈黄化ウイルス 90-1 Br2 株の P3N-PIPO はエンドウ PI 226564 の致死性全身えそ病徴に關与する。平成 26 年度日本植物病理学会、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道 (2014 年 6 月)

[15] 藤晋一、澤田隆行、梅澤泰信、関根健太郎、厚見剛、川上清久、水谷朱美、戸田武、古屋廣光 ソラマメウィルトウイルス 2 (BBWV2) TN 分離株が *Nicotiana benthamiana* に壞疽を誘導するゲノムの特定。平成 26 年度日本植物病理学会、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道 (2014 年 6 月)

[16] 厚見剛、富田麗子、関根健太郎 木質細胞の異常分化と葉の新生を誘導するウイルスタンパク質の機能解析 第 55 回 日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、富山市、富山県 (2014 年 3 月)

[17] 関根健太郎、厚見剛、富田麗子 植物ウイルス遺伝子診断技術「DECS 法」を用いたリンドウ子房輪紋症 (仮称) 原因ウイルスの発見。平成 25 年度日本植物病理学会東北部会、秋田市、秋田県 (2013 年 10 月)

[18] 福田隼也、厚見剛、眞岡哲夫、増田税、上田一郎、中原健二 タバコのグリシンプロリンリッチタンパクのウイルス感染との関わり。平成 25 年度日本植物病理学会北海道部会、札幌市、北海道 (2013 年 10 月)

〔図書〕(計1件)

[1] Atsumi G, Sekine KT and Kobayashi K. New method to isolate total dsRNA. Methods in Molecular Biology 1236:27-37 (2015) (査読あり)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ppathol.ibrc.or.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

厚見剛 (ATSUMI Go)

公益財団法人岩手生物工学研究センター

園芸資源研究部・研究員

研究者番号：90547217