

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850243

研究課題名(和文) ウイルスの普遍的分子パターンを認識する植物の新規免疫反応の解明

研究課題名(英文) Analysis on a novel plant immune system triggered by a virus-encoded molecular pattern.

研究代表者

橋本 将典 (Hashimoto, Masayoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20615273

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)：本研究では、ウイルスが持つ普遍的な分子パターンにより誘導される、新規免疫機構の解明を目指した。その結果、コモウイルスにコードされるヘリカーゼ(Hel)タンパク質のアミノ末端領域に、新たな免疫誘導領域を見出した。当該領域には、ウイルスの複製に関わる両親媒性ヘリックスが予測され、両親媒性ヘリックスが免疫誘導に重要であることが示唆された。また、当該領域による免疫誘導活性は、ウイルス複製において両親媒性ヘリックスが担う宿主細胞膜の変性活性と相関することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal a novel plant immune system induced by a virus-encoded molecular pattern. As a result, we found an elicitor of immune responses in the N-terminal region of helicase proteins encoded by a comovirus. In this region, there is a predicted amphipathic helix involved in virus replication. We showed that the amphipathic helix is required for the induction of immune responses. In addition, we revealed that the elicitor activity is tightly correlated with the membrane modification activity, which is essential for the role of the amphipathic helix in virus replication.

研究分野：植物病理学

キーワード：普遍的分子パターン 植物ウイルス 細胞死 両親媒性ヘリックス

1. 研究開始当初の背景

植物は、病原体に対して多層的な免疫機構を備えている。細菌や菌類等の植物病原体に対しては、過敏反応(hypersensitive response; HR: Effector-triggered immunity (ETI)とも呼ばれる)に加えて、病原体由来の普遍的分子パターン(Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)により引き起こされる免疫反応 PAMPs-triggered immunity (PTI)が知られている。他方で、植物ウイルスに対しては、HR および RNA サイレncing の 2 つの免疫機構のみが知られ、PTI が存在するかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、植物ウイルスに対する新規免疫機構の解明を目的として、植物ウイルスにコードされる PAMPs の同定および免疫誘導における植物の反応を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、タバコ属植物に細胞死症状を引き起こす 2 種類の植物ウイルス(ポテックスウイルス、コモウイルス)を材料に用いた。

(1) ポテックスウイルスの細胞死誘導因子の探索には、コードされる各ウイルスタンパク質を 35S プロモーターの下流に接続し、アグロバクテリウムを用いた一過的発現系を用いて植物細胞内で発現させた。HR のシグナル伝達に関わる宿主因子 SGT1 の機能抑制には、ウイルス誘導性ジーンサイレンシング法(virus-induced gene silencing; VIGS)を用いた。(2) コモウイルスの感染性 cDNA クローンの構築には、コモウイルスの 2 分節のゲノム RNA を逆転写することで作製した cDNA を、それぞれバイナリーベクターに導入した。感染性 cDNA クローンの接種にはアグロバクテリウムを用いた。

コモウイルスの細胞死誘導因子の探索においては、コードされる各ウイルスタンパク質を potato virus X ベクターに導入し、一過的に発現させた。また、防御関連遺伝子の発現解析には、リアルタイム PCR を用いた。

nHel 発現時の植物細胞の反応に関する解析には、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。また、小胞体膜の様子を調べるため、小胞体膜に局在するシグナルを付加した緑色蛍光タンパク質(green fluorescence protein; GFP)を用いた。

4. 研究成果

本研究課題では、植物ウイルスがコードする PAMPs の存在を想定し、植物ウイルスの PAMPs により誘起される免疫反応の解明を目指し、主に以下の 2 項目について解析を行った。

(1) ポテックスウイルスの細胞死誘導因子の同定と機能解析(2013 年度)

タバコ属植物に細胞死を引き起こすポテックスウイルスについて、細胞死誘導の原因となるウイルスタンパク質(細胞死誘導因子)

の探索を行った。その結果、複製酵素に含まれるヘリカーゼ(Helicase; Hel)タンパク質が細胞死誘導活性を有することを明らかにした。また、Hel タンパク質による細胞死に伴って、ウイルス感染時の細胞死と同様に、植物細胞では活性酸素生成が引き起こされることが分かった。

次に、Hel タンパク質による細胞死が植物の免疫反応の一つである過敏反応(HR)と類似した特徴を持つことに着目し、細胞死誘導に関わるシグナル伝達経路について検討を行った。その結果、HR に必須な SGT1 をサイレンシングした植物において、Hel タンパク質による細胞死が抑制された。

以上の解析により、ポテックスウイルスの複製酵素に含まれる Hel が細胞死誘導因子であることを明らかにするとともに、Hel による細胞死誘導のシグナル伝達経路を明らかにした。ポテックスウイルスの Hel タンパク質には、PAMPs の候補となりうる保存性の高いアミノ酸配列が見出されたものの、これらのアミノ酸配列と細胞死誘導活性との関係については未解明のままであり、今後の解析が必要である。

(2) コモウイルスの細胞死誘導因子の同定と機能解析(2013、2014 年度)

コモウイルスの効率的感染系の構築と評価

コモウイルスの効率的かつ再現性の高い感染系の構築を目的として、感染性 cDNA クローンの構築を行った。作製した cDNA クローンの接種によりコモウイルスの症状が再現された。また、コモウイルスにコードされるいくつかのウイルスタンパク質について抗体を作製し、感染植物におけるウイルスタンパク質の検出を行った。

コモウイルスの細胞死誘導因子の同定

タバコ属植物に細胞死を引き起こすコモウイルスについて細胞死誘導因子の探索を行った。その結果、コモウイルスにコードされるタンパク質のうち、Hel タンパク質が細胞死誘導活性を有し、さらに Hel アミノ末端領域の 74 アミノ酸からなる領域(nHel 領域)のみで細胞死が誘導されることを示した。また、nHel による細胞死の特徴を調べる目的で、HR との比較を行った。その結果、nHel による細胞死の誘導に伴い、活性酸素の生成や防御関連遺伝子の発現上昇、SGT1 発現抑制植物における細胞死の抑制等の、HR と類似した反応が観察された。

次に、nHel 領域内部において動植物ウイルスの「複製」(ウイルスが増殖する過程)で重要な機能を持つ両親媒性ヘリックスが予測されたことに着目し、欠損変異やアミノ酸変異を導入した変異 nHel を複数作製し、それぞれの細胞死誘導活性を調べた。その結果、nHel による細胞死には、両親媒性ヘリックスが重要な役割を果たすことが示唆された。また、両親媒性ヘリックスがコモウイルスに近

縁なウイルス属にも共通することに着目して、複数のコモウイルスと他ウイルス属のnHel領域を発現させたところ、いずれも細胞死が誘導された。この結果からも、nHelによる細胞死における両親媒性ヘリックスの重要性が示唆された。

nHel発現時における植物細胞の反応に関する解析

nHelを発現させた際に引き起こされる植物細胞の反応について解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて植物細胞内の動態を詳細に調べたところ、nHelは小胞体膜上に局在し、小胞体膜の激しい変性を引き起こすことが分かった。また、異なる細胞死誘導活性を有するnHel変異体による膜変性活性を調べたところ、nHelによる膜変性活性は細胞死誘導と相関することが示唆された。

膜合成阻害剤セルレニン、ウイルス複製に伴う宿主植物細胞膜の変性を抑制し、ウイルス複製を阻害することが知られている。nHelによる膜変性が、複製に伴う膜変性と共通した反応であると予想し、nHel発現時に植物細胞が示す反応について、セルレニン処理による影響を評価した。その結果、セルレニン処理によりnHelによる膜変性および細胞死誘導はいずれも有意に阻害された。また、セルレニン処理はHRの際に誘導される細胞死には影響しなかった。以上の結果より、nHelによる細胞死誘導は、ウイルス複製に必要な膜変性活性が引き金となる可能性が示唆された。

以上の解析により、コモウイルスの細胞死誘導因子nHelを同定した。また、nHelによる細胞死はHRと類似したいくつかの特徴を示したが、膜変性活性との相関性の点でHRと異なる特徴も見出された。さらに、nHel領域の細胞死誘導活性はいくつかのウイルスで共通するものの、当該領域のアミノ酸配列相同性は64%~16%であった。一般に、細菌などの病原体に見出されるPAMPsは、フラジェリンや翻訳伸長因子などの普遍的なタンパク質分子内でも、種や属を超えて相同性が高い数十アミノ酸からなる領域である。従って、コモウイルスに見出されたnHel領域は、既存のPAMPsに類似した特徴と異なる特徴を併せ持つことが分かる。今後は、nHel発現時の植物細胞の反応について、受容やシグナル伝達、遺伝子発現変動等の側面から、さらに詳細な解析を行う必要がある。

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9件)

1. Hashimoto, M., Komatsu, K., Iwai, R., Keima, T., Maejima, K., Shiraishi, T., Ishikawa, K., Yoshida, T., Kitazawa, Y., Okano, Y., Yamaji, Y., Namba, S. (2015) Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic

virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, in press. [査読あり]

2. Ishikawa K., Miura C., Maejima K., Komatsu K., Hashimoto M., Tomomitsu T., Fukuoka M., Yusa A., Yamaji Y., Namba S. (2015) Nucleocapsid protein from fig mosaic virus forms cytoplasmic agglomerates that are hauled by endoplasmic reticulum streaming. *Journal of Virology* 89: 480-491. [査読あり]
3. Yoshida T., Kitazawa Y., Komatsu K., Neriya Y., Ishikawa K., Fujita N., Hashimoto M., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. (2014) 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. *Archives of Virology* 159: 3161-3165. [査読あり]
4. Maejima K., Himeno M., Netsu O., Ishikawa K., Yoshida T., Fujita N., Hashimoto M., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. (2014) Development of an on-site plum pox virus detection kit based on immunochromatography. *Journal of General Plant Pathology* 80: 176-183. [査読あり]
5. Okano Y., Senshu H., Hashimoto M., Neriya Y., Netsu O., Minato N., Yoshida T., Maejima K., Oshima K., Komatsu K., Yamaji Y., Namba S. (2014) In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *The Plant Cell* 26: 2168-2183. [査読あり]
6. Shiraishi T., Maejima K., Komatsu K., Hashimoto M., Okano Y., Kitazawa Y., Yamaji Y., Namba S. (2013) First report of tomato chlorotic dwarf viroid isolated from symptomless petunia plants (*Petunia* spp.) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 79: 214-216. [査読あり]
7. Komatsu K., Hashimoto M., Okano Y., Keima T., Kitazawa Y., Nijo T., Takahashi S., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. (2013) Construction of an infectious cDNA clone of radish mosaic virus, a crucifer-infecting comovirus. *Archives of Virology* 158: 1579-1582. [査読あり]
8. Ishikawa K., Maejima K., Komatsu K., Netsu O., Keima T., Shiraishi T., Okano Y., Hashimoto M., Yamaji Y., Namba S. (2013) Fig mosaic emaravirus p4 protein is involved in cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 94: 682-686. [査読あり]
9. 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. (2013) 植物ウイルス病研究会レポート, 11: 11-21. [査読なし]

〔学会発表〕(計5件)

1. 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(日本植物病理学会創立100周年記念大会, 明治大学, 2015年3月28日-31日)
2. 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におけるMAPKKK群の相互作用(平成26年度日本植物病理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 2014年6月2日-4日)
3. 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, 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(日本植物病理学会創立100周年記念大会, 明治大学, 2015年3月28日-31日)
4. Hashimoto, M., Okano, Y., Yusa, A., Fukuoka, M., Tomomitsu, T., Fukuda, K., Hamamoto, H., Nakayama, M., Netsu, O., Kagiwada, S., Oshima, K., Namba, S. A questionnaire survey on how agricultural firms and farmers manage plant diseases in Japan. (The International Conference of Clinical Plant Science, NPUST, Pingtung, Taiwan, 2014年12月6日)
5. Netsu, O., Neriya, Y., Ishikawa, K., Tomomitsu, T., Fukuoka, M., Yusa, A., Fukuda, K., Nakayama, M., Hashimoto, M., Namba, S.: Establishment of operation systems by “Community Plant Doctor” and its future prospects. (The International Conference of Clinical Plant Science, NPUST, Pingtung, Taiwan, 2014年12月6日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 将典 (HASHIMOTO MASAYOSHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号: 20615273

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: