

平成 30 年 8 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292026

研究課題名(和文)植物ウイルス病における退緑・黄化の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of chlorosis in plant virus diseases

研究代表者

小林 括平(KOBAYASHI, Kappei)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：40244587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物ウイルス病の多くで葉の緑色が薄くなったり、黄色くなったりする症状(退緑・黄化)が認められる。これがどのような遺伝子やタンパク質の働きによって起こるのかを明らかにする目的で、それ自体は植物に影響を及ぼさない薬品で処理した時にウイルス遺伝子等が働き、退緑・黄化症状を引き起こす遺伝子組換え植物を5種類作製した。それらを用いて研究を進めたところ、ウイルス等の病原体から植物の身を守る仕組みが、退緑・黄化の発症にも関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The loss of green pigment (chlorosis) or yellowing in the leaves are the common symptoms of plant virus diseases. To elucidate which genes or proteins are involved in the development of such chlorosis or yellowing symptoms, we generated five genetically modified plants, in which chlorosis or yellowing symptoms are induced by the treatment with a chemical that does not affect plants by itself. Studies using these plants have suggested that plants' functions responsible for the defense against pathogens including viruses are also involved in the development of chlorosis or yellowing symptoms.

研究分野：植物ウイルス病の発症機構の解析と耐病性分子育種

キーワード：植物ウイルス病 遺伝子組換え植物 遺伝子発現解析 病害応答 葉緑体

1. 研究開始当初の背景

植物病害で多く見られる葉の退緑・黄化は光合成を行う葉緑体の障害によって生じるため、植物の生産性低下に直結しており、これを軽減することは作物保護の一戦略となり得る。従来の退緑・黄化病徴発現機構に関する研究の多くは、葉緑体が崩壊あるいは機能障害を受けた状態の植物を分子レベルで記述するにとどまっていたが、近年、ウイルスの RNA サイレンシング抑制因子による miRNA 依存性遺伝子発現制御の攪乱や、ウイルス RNA に対するサイレンシングによる相同配列を持つ葉緑体タンパク質 (ChII および Hsp90C) の発現抑制などのメカニズムが報告された。しかし、それらのメカニズムで退緑・黄化のすべてを説明できるわけではなく、種々の報告に基づいて病害シグナルを葉緑体に伝達し、障害に導くメカニズムがむしろ主要な経路ではないかと考えるに至った。

本研究代表者らは、カリフラワーモザイクウイルスの Tav タンパク質を薬剤誘導的に発現する遺伝子組換えタバコ (iTav タバコ) を作出し、これを用いた退緑・黄化の発症機構に関する研究に着手していたが、上述の葉緑体タンパク質の発現抑制による発症機構との比較解析を行う必要を感じていた。また、上述の iTav タバコでは、発症機構に関わる遺伝子を遺伝学的に解析するのが困難であるため、同様に Tav タンパク質を発現する遺伝子組換えシロイヌナズナ (iTav ナズナ) の作出も計画していた。さらに、ウイルス抵抗性タンパク質から葉緑体に病害応答シグナルを伝達する分子の候補として葉緑体タンパク質である THF1 を同定していた。

2. 研究の目的

本研究では iTav タバコと薬剤誘導的に葉緑体タンパク質を発現抑制する植物の比較解析、iTav ナズナの解析、および THF1 を介した葉緑体へのシグナル伝達機構の解析を通して、植物ウイルス病における退緑・黄化の発症機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 薬剤誘導的に葉緑体タンパク質を発現抑制する植物として、ChII mRNA 特異的な人工マイクロ RNA (amiRNA)、Hsp90C 特異的な領域のヘアピン RNA (hpRNA)、または THF1 mRNA 特異的な amiRNA を iTav タバコと同様にデキサメサゾン (Dex) 誘導性プロモーターの制御下に発現する遺伝子組換えタバコ (それぞれ i-amiChII, i-hpHsp90C, および i-amiTHF1 タバコ) を常法により作出した。また、iTav ナズナは iTav タバコと同じ遺伝子をシロイヌナズナに常法により導入した。

2) Tav タンパク質の検出はウェスタンブロットング法によって、ChII, Hsp90C, THF1 およびその他の植物 mRNA は、RT-PCR 法によって検出、または定量した。

3) iTav ナズナの核をヨウ化プロピジウムで染色し、BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) で核相解析した。

4) iTav ナズナ, i-amiChII タバコ, および i-hpHsp90C タバコの網羅的遺伝子発現解析は、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点事業の共同研究として RNA-seq 法によって行った。

4. 研究成果

1) iTav タバコにおける退緑・黄化誘導の分子機構 (発表論文 4, 6 および 7)

iTav タバコは Dex 処理 2 日後には明確な光合成関連遺伝子の発現抑制と統計的に有意なクロロフィル量の減少を示し、7 日後には肉眼でも視認できる程度の退緑、成長抑制、およびチラコイド膜微細構造の崩壊を伴う葉緑体障害を示した。また、Dex 処理 1 日後には PR1a などの病態関連遺伝子の発現誘導を示した。iTav タンパク質が PR1a の発現誘導に関わるサリチル酸 (SA) 経路を抑制することが報告されていたことから、野生型タバコにおける一過性発現実験および iTav タバコにおける SA 処理後の PR1a の発現誘導を検討したところ、一過性発現系では PR1a の発現誘導の抑制が認められたが、iTav タバコでは抑制は認められなかった。また、サリチル酸分解酵素を一過性発現させたところ、アグロバクテリウムによって誘導される SA 依存的な PR1a の発現誘導は抑制されたが、Dex 処理した iTav タバコにおける PR1a の発現誘導は抑制されなかった。Tav の欠失変異遺伝子を用いた解析から、Tav タンパク質による PR1a の発現と退緑の誘導に関与するドメインが、サイレンシング抑制活性とトマトブッシュスタントウイルスの p19 によって誘導される細胞死を抑制する活性に関与するドメインと同一であることが示された。これらの結果から、iTav タバコにおける退緑は、Tav タンパク質の病原因子としての機能に対して植物が応答した結果であり、そのシグナル伝達に SA は関与しないことが示唆された。

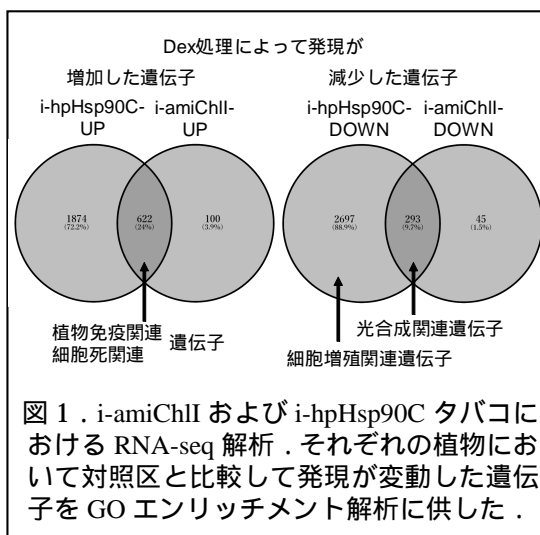
iTav タバコの退緑発症に植物免疫関連遺伝子群が関与する可能性を検討する目的で、リング小球形潜在ウイルスベクターを用いた RNA サイレンシングによる遺伝子発現抑制系を構築し、ウイルスベクターの簡易定量法を開発した。しかし、RNA サイレンシングの誘導に長い期間を要したこと、および 6 週齢以上の iTav タバコでは Dex 処理による Tav タンパク質の誘導効率が低かったことから、解析を実施することができなかった。

2) 葉緑体タンパク質の発現抑制による退緑・黄化と病害応答 (発表論文 1~3)

i-amiChII タバコ, および i-hpHsp90C タバコにおいても、Dex 処理 2 日後に明確な光合成関連遺伝子の発現抑制と統計的に有意なクロロフィル量の減少を示し、7 日後には肉眼でも視認できる程度の退緑と成長抑制を

示すことが分かった。i-amiChII タバコでは Hsp90C の発現抑制は認められなかったが、i-hpHsp90C タバコにおいては ChII の発現抑制が認められた。これらの結果から、これらの遺伝子の発現制御に違いがあることが示唆された。また、これらの植物は病原体由来の遺伝子を全く保有していないが、Dex 処理 2 日後までに PR1a の発現誘導が認められた。特筆すべきことは、これらの植物における PR1a の発現誘導が iTav タバコに比べて極めて顕著であり、葉緑体における活性酸素種の生成などが、PR1a の発現誘導に寄与することが示唆された。

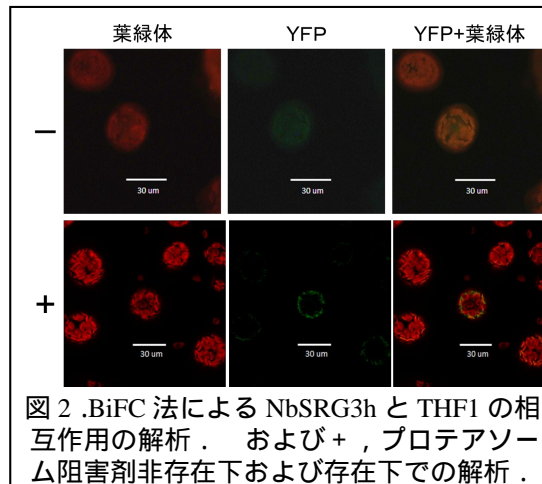
i-amiChII タバコ、および i-hpHsp90C タバコにおける RNA-seq 解析の結果 (図 1)、いずれにおいても病害抵抗性応答や細胞死に関与する遺伝子の発現が高まっていることが示された。しかし、i-hpHsp90C タバコにおいて細胞死の検出を試みたが、細胞死の兆候は認められなかった。一方、i-hpHsp90C タバコでは、細胞増殖関連遺伝子の発現抑制が認められたが、i-amiChII タバコでは認められなかった。これらの結果は、これら 2 種類の植物における成長抑制のメカニズムが異なることを示唆する。



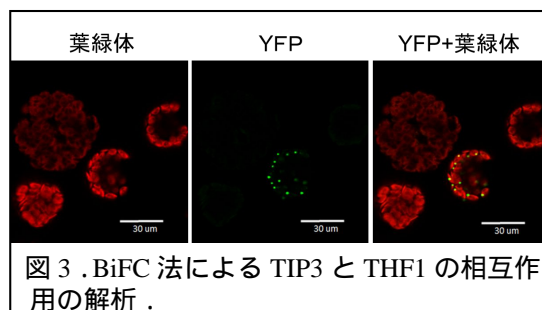
3) THF1 による葉緑体へのシグナル伝達機構
トウガラシ属植物およびタバコのトバモウイルス抵抗性タンパク質, L および N' の N 末端領域と相互作用する因子として単離された葉緑体タンパク質 THF1 は、抵抗性タンパク質から葉緑体へのシグナル伝達に関与すること、その伝達様式として THF1 が細胞質で抵抗性タンパク質と相互作用し、分解されることが示唆された (発表論文 5)。

THF1 が他の病害等ストレス関連シグナルの伝達に関わる可能性を考え、THF1 と相互作用するタンパク質を酵母ツーハイブリッドスクリーニング法で探索し、タバコにおいて 2 種類の細胞質タンパク質、および 3 種類の葉緑体タンパク質が THF1 と相互作用することを明らかにした。

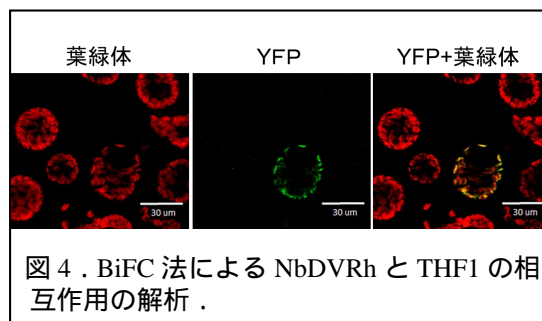
細胞質タンパク質である NbSRG3h は上述のウイルス抵抗性タンパク質と同様に、細胞質で THF1 と相互作用し、分解に導くことが示唆された (図 2)。シロイヌナズナの SRG3 が老化に関連して発現が高まること示されていることから、NbSRG3h は老化のシグナルを葉緑体に伝達するものと考えられた。



もう一つの細胞質タンパク質 TIP3 は、葉緑体包膜上で THF1 と相互作用することが示唆され、THF1 の葉緑体への輸送を調節していることが示唆された (図 3)。TIP3 は低温ストレスによって発現誘導されることが示され、低温ストレスシグナルの葉緑体への伝達に関与するものと考えられた。

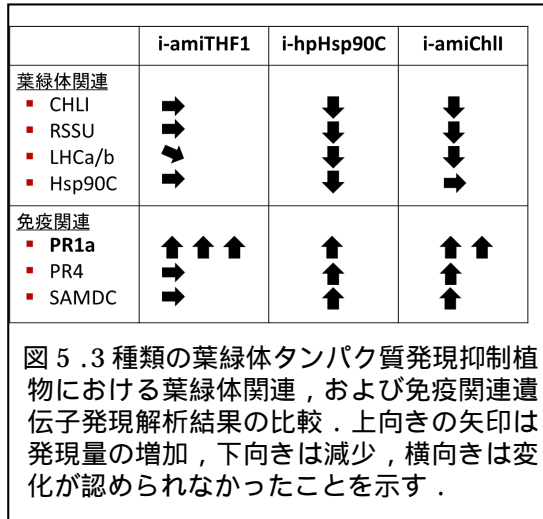


3 種類の葉緑体タンパク質についても上述と同様の方法で相互作用が確認された (一例を図 4 に示す)。THF1 がこれら葉緑体タンパク質の機能を制御している可能性が考え

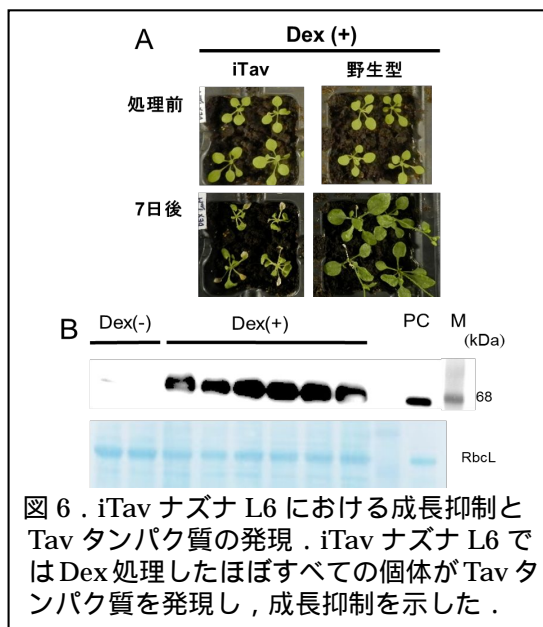


られたため、THF1 の発現を Dex 処理誘導的に抑制する植物、i-amiTHF1 タバコを作出し

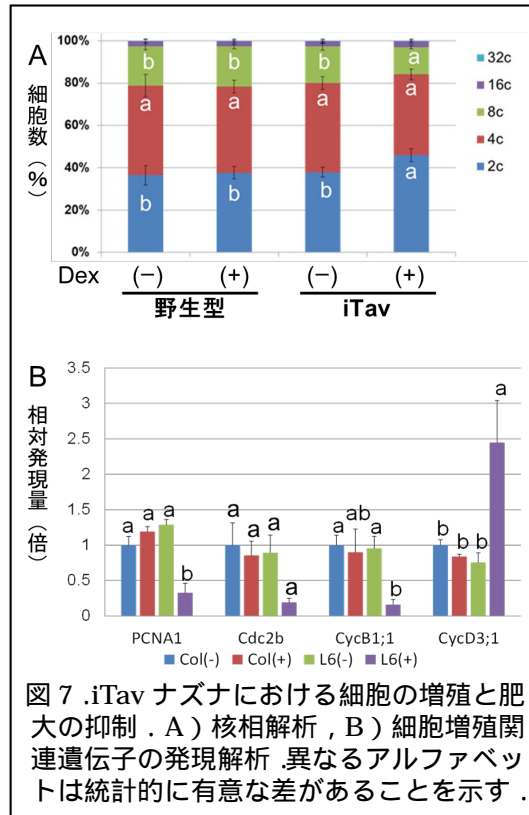
た．この植物も i-amiChII タバコ，および i-hpHsp90C タバコとは異なり，強光条件(200 $\mu\text{mole}/\text{m}^2 \text{ s}$) 下では Dex 処理 7 日後に退緑を示したが，80 $\mu\text{mole}/\text{m}^2 \text{ s}$ の弱光条件下では退緑は明確でなかった．また，光合成関連遺伝子の発現に対する抑制効果も低かったが，PR1a の発現誘導は i-amiChII および i-hpHsp90C タバコよりも顕著であった(図 5)．



4) iTav ナズナにおける成長抑制機構の解析
iTav タバコは退緑・黄化の発症機構を解析するために有用なモデル系であるが，タバコは異質四倍体で突然変異体を得るのが困難であり，遺伝学的な解析には不向きである．そこで，同じ Tav タンパク質発現系をシロイヌナズナに導入した iTav ナズナを作出した．Dex を含む培地で遺伝子導入系統のスクリーニングを行ったところ，複数の系統で成長抑制が認められた．そのうち系統 6(以下，L6)が顕著な Tav タンパク質の発現と成長抑制を示した(図 6) ことから，これを主な解析対象とした．



L6 の成長抑制が細胞の増殖および肥大成長の抑制によって起こることが想定されたため，フローサイトメトリーによる核相解析を行った．その結果，Dex 処理した L6 において 2c の割合が高く，8c の割合が低かった(図 7A) ことから，細胞増殖と核内倍加による細胞肥大の両方が抑制されていることが示された．これと一致して細胞増殖関連遺伝子の発現変動が認められた(図 7B)．



Tav タンパク質の発現から細胞増殖と肥大の抑制に至るシグナル伝達経路を明らかにする目的で，遺伝子発現の網羅的解析を行った．その結果，細胞増殖関連遺伝子の発現変動が確認され，また，低温や浸透圧，脱水などのストレス応答遺伝子，およびアブシジン酸およびエチレンに対する応答遺伝子の発現量が増加し，オーキシンシグナル伝達系，細胞分裂関連，微小管関連，アミノ酸輸送関連，およびステロール代謝関連遺伝子等の発現量が減少していた．これらの結果から，Tav タンパク質の発現によって植物のストレス応答系が活性化し，その結果として細胞の増殖と肥大が抑制されることが示唆された．

上述のように Tav タンパク質によって誘導される成長抑制に際しては，多様なストレス応答系が活性化されていたが，そのうちのどの経路が Tav タンパク質によって直接活性化されるのか，あるいは他のストレス応答経路の活性化によって二次的に活性化されるのかは明らかでない．そこで，この点について明らかにする目的で L6 種子を変異原処理し，突然変異体集団を作製した．Dex を含む培地

上での成長抑制の回避を指標としてスクリーニングを行い、これまでに100系統以上の突然変異体が得られた。今後、これらの詳細の解析によってウイルス病における植物の成長抑制に関する分子機構が明らかになると期待される。また、L6を長日条件下で育成した場合には、Dex処理後の退緑は明確でなかったが、短日条件下で栄養成長を促した後でDex処理した場合には、明確な退緑を示すことも見出した。今後の研究によって退緑発症の分子機構についても解明が可能になると期待される。

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 7 件)

1. Bhor S. A., Tateda C., Mochizuki T., Sekine K.-T., Yaeno T., Yamaoka N., Nishiguchi M. and Kobayashi K. (2017) Inducible transgenic tobacco system to study the mechanisms underlying chlorosis mediated by the silencing of chloroplast heat shock protein 90. *VirusDisease* 28: 81-92.
2. Bhor S. A., Tateda C., Mochizuki T., Sekine K.-T., Yaeno T., Yamaoka N., Nishiguchi M. and Kobayashi K. (2017) Inducible expression of magnesium protoporphyrin chelatase subunit I (CHLI)-amiRNA provides insights into Cucumber mosaic virus Y satellite RNA-induced chlorosis symptoms. *VirusDisease* 28: 69-80.
3. Bhor S. A., Akhter M. S., and Kobayashi K. (2016) Artificial induction of chlorosis symptom through the silencing of chloroplast genes in transgenic tobacco. *Indian Phytopathology* 69 (4s): 175-177.
4. Bhor S. A., Akhter M. S., Yaeno T., Yamaoka N., Nishiguchi M., Kaido M. and Kobayashi K. (2016) Simple and Quantitative Detection of Apple latent spherical virus Vector by a Spot Hybridization. *International Journal of Modern Botany*, 6: 31-36.
5. Hamel L.-P., Sekine K.-T., Wallon T., Sugiwaka Y., Kobayashi K., and Moffett P. (2016) The chloroplastic protein THF1 interacts with the coiled-coil domain of the disease resistance protein N' and regulates light-dependent cell death. *Plant Physiology* 171: 658-674.
6. Waliullah S., Kosaka N., Yaeno T., Ali M. E., Sekine K.-T., Atsumi G., Yamaoka N., Nishiguchi M., Takahashi H. and Kobayashi K. (2015) *Cauliflower mosaic virus* Tav protein induces leaf chlorosis in transgenic tobacco through a host response to its virulence function. *Journal of General*

Plant Pathology, 81: 261 - 270.

7. Waliullah S., Mochizuki T., Sekine K.-T., Atsumi G., Ali M. E., Yaeno T., Yamaoka N., Nishiguchi M. and Kobayashi K. (2014) 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.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 寺田忍, Bhor Sachin Ashok, 望月知史, 館田知佳, 関根健太郎, 田中啓介, 坂本光, 田谷萌香, Islam Shaikhul, 中村瑞生, 三好沙季, 八丈野孝, 小林括平. トランスジェニックモデル植物を用いた植物ウイルス病発症機構の解析, 日本植物病理学会植物ウイルス病研究会, 2018.
2. 寺田忍, 田中啓介, 坂本光, 関根健太郎, 八丈野孝, 山岡直人, 小林括平. カリフラワーモザイクウイルス Tav 遺伝子発現シロイヌナズナにおける細胞自律的な成長抑制. 日本植物病理学会大会, 2018.
3. 寺田忍, 八丈野孝, 小林括平. シロイヌナズナにおけるカリフラワーモザイクウイルス Tav 遺伝子誘導性病徴様表現型発現機構の遺伝学的解析: 病徴様表現型を回避する突然変異体のスクリーニング法. 日本育種学会四国談話会, 2017.
4. 寺田忍, Bhor Sachin Ashok, 田中啓介, 坂本光, 関根健太郎, 八丈野孝, 山岡直人, 西口正通, 小林括平. 誘導型カリフラワーモザイクウイルス Tav 遺伝子発現シロイヌナズナが示す成長抑制における遺伝子発現の網羅的解析. 日本植物病理学会大会, 2017.
5. Bhor, S.A., Tateda, C., Mochizuki, T., Sekine, K.-T., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. and Kobayashi, K. Upregulation of pathogenesis-related protein genes after the induced silencing of chloroplast protein genes in transgenic tobacco. 年度日本植物病理学会大会, 2017.
6. Nishioka K., Sugiwaka Y., Kobayashi K. The chloroplast protein THF1 interacts with the cytosolic protein TIP3. 第14回 松山国際学術シンポジウム, 2016.
7. Bhor, S.A., Sekine, K.-T., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. and Kobayashi, K. Artificial induction of chlorosis symptom through the silencing of chloroplast genes in transgenic tobacco. 日本植物病理学会大会, 2016.
8. 寺田忍, Bhor Sachin Ashok, 関根健太郎, 八丈野孝, 山岡直人, 西口正通, 小林括平. 薬剤誘導型カリフラワーモザイクウイルス Tav 遺伝子導入シロイヌナズナは誘導薬剤依存的に葉の黄化および成長

抑制を示す。日本植物病理学会関西部会，2015。

9. 寺田忍, Bhor Sachin Ashok, 関根健太郎, 八丈野孝, 山岡直人, 西口正通, 小林括平。葉剤誘導型カリフラワーモザイクウイルス Tav 遺伝子導入シロイヌナズナは誘導薬剤依存的に葉の黄化および成長抑制を示す。日本植物病理学会植物感染生理談話会，2015。
10. Waliullah S., Kosaka N., Yaeno T., Ali M. E., Sekine K.-T., Atsumi G., Yamaoka N., Nishiguchi M., Takahashi H. and Kobayashi K. Cauliflower mosaic virus Tav protein induces leaf chlorosis in transgenic tobacco through an SA-independent host response to its virulence function. 日本植物病理学会大会，2015。
11. 杉若侑治, 田島薫, 菅沼裕介, 八丈野孝, 山岡直人, 西口正通, 小林括平。葉緑体タンパク質 THF1 の新規相互作用因子の探索。日本植物病理学会大会，2015。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 括平 (KOBAYASHI, Kappei)
愛媛大学大学院農学研究科・教授
研究者番号：40244587

(2)研究分担者

関根 健太郎 (SEKINE, Ken-taro)
琉球大学農学部・准教授
研究者番号：30574058
(平成 28 年度まで)

舘田 知佳 (TATEDA, Chika)
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：30774111
(平成 27 年度から)

(3)連携研究者

望月 知史 (MOCHIZUKI, Tomofumi)
大阪府立大学生命環境科学研究科・講師
研究者番号：30469837

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：30469837
(平成 26 年度まで)

(4)研究協力者

ワリウラ スマイヤ (WALIULLAH, Sumyya)
ボホール サチン アショク (BHOR, Sachin Ashok)
アクター エムディ シャミム (AKHTER, Md. Shamim)
小坂 奈央美 (KOSAKA, Naomi)
菅沼 裕介 (SUGANUMA, Yusuke)
杉若 侑治 (SUGIWAKA, Yuji)
高岡 光一 (TAKAOKA, Koichi)
寺田 忍 (TERADA, Shinobu)
西岡 佳司 (NISIOKA, Keiji)
田谷 萌香 (TADANI, Moeka)
中村 瑞生 (NAKAMURA, Mizuki)
イスラム シャイクル (ISLAM, Shaikhul)
坂本 光 (SAKAMOTO, Hikaru)
田中 啓介 (TANAKA, Keisuke)