

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660031

研究課題名(和文) 内在性ビタミンC蓄積を介した植物ウイルスに対する宿主抵抗性誘導機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on the resistance against plant viruses through the levels of endogenous ascorbic acid

研究代表者

増田 税 (MASUTA, Chikara)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60281854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンC(AsA)がカブモザイクウイルス(TuMV)に対して抵抗性を誘導することをハクサイやシロイヌナズナで観察した。この抵抗性は「あきまさり」などの抵抗性遺伝子Rnt-1をもった品種に限られている。TuMV-UK1を接種した場合には、接種後3日目でAsAが1.5倍ほど上昇した。遺伝子の発現解析を行ったところ、AsAはAPXとAO遺伝子の阻害とDHAR遺伝子の上昇が同時におきることによって上昇することが判明した。植物ホルモンJAを噴霧処理したところ、内在性AsAのレベルが上昇した。以上のことより、我々は、JAの関与する系によってハクサイのウイルス抵抗性が制御されていると結論した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that endogenous ascorbic acid (AsA) was closely associated with an antiviral response to Turnip mosaic virus (TuMV) in *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*. The AsA accumulation was induced by TuMV infection in *B. rapa* cvs. Aki-masari and Ku-kai 65, that have the resistant gene Rnt1-1. They accumulated about 1.5-fold higher levels of AsA 3 days after inoculation of the avirulent TuMV (strain UK1). Our gene expression analysis suggested that the observed AsA increase was due to the suppression of AsA oxidation by ascorbate peroxidase (APX) and ascorbate oxidase (AO), and the activation of AsA-recycling by dehydroascorbate reductase (DHAR). Endogenously supplied JA and JA derivatives actually increased the endogenous level of AsA. We therefore reasoned that the induction of the AsA accumulation in Aki-masari may be mediated by the JA-dependent signaling pathway as a defense reaction against viruses.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：ビタミンC RNAサイレンシング ウイルス Arabidopsis

1. 研究開始当初の背景

ビタミン C (AsA) は動植物で最も重要な抗酸化物質の 1 つであり、食品に酸化防止剤として広く使用されていることは周知のことである。またヒトの壊血病の原因が AsA 不足であることは有名な話である。ヒトは AsA を体内で合成できないため、この病気の予防のためにも、AsA を豊富に含む植物などから摂取しなければならない。植物細胞には AsA が数 mM 濃度で含まれ、特に葉緑体や液胞では数十 mM の高濃度に蓄積している。AsA の最大の機能は光などの abiotic stress によって発生する活性酸素を消去して酸素障害から植物細胞を守ることである。光合成で生じた superoxide (O_2^-) は superoxide dismutase (SOD) によってまず H_2O_2 に変換され、ascorbate peroxidase (APX) によって H_2O に分解・解毒される。この時、AsA は酸化されて、monohydroascorbate (MDHA) になる。MDHA は monodehydroascorbate reductase (MDHAR) によって AsA に還元されるか、あるいは、再度の酸化を受けて dehydroascorbate (DHA) に変換される。DHA は dehydroascorbate reductase (DHAR) によって AsA に還元される。すなわち、AsA と DHA とは酸化・還元のリサイクルによって細胞内の H_2O_2 の消去を行っているのである。

我々は、以前、植物ウイルスの RNA silencing suppressor (RSS) に結合する低分子化合物を 5000 種の中から in vitro でスクリーニングしたところ、分子構造が DHA と極めて類似した物質を同定している。これをきっかけに DHA や AsA にも RSS と結合する能力があることが判明し、AsA がウイルスの RSS に結合することによって植物ウイルスを抑制する可能性について検証を進めてきた。その結果、外から投与した AsA に十分ウイルス病の予防・防除効果があることを見出し、現在、農薬会社と共同で「夢

の抗植物ウイルス剤の農薬登録」を目指して、AsA 剤の開発研究を行っている。この研究を進めているうちにふと気づいたのは、植物はウイルスに感染したときに内在性 AsA の濃度を上げるのではないかとということである。例えば、デルモンテが開発した弱毒キュウリモザイクウイルス (CMV) を感染させたトマトでは AsA の含量が 1.5 倍ほどにまで上がる傾向にあり、商品の付加価値を高める結果となっている。ここで、「ひょっとすると植物はウイルス感染に対抗するために積極的にビタミン C 濃度を上げているのではないか」というアイデアに思い至った。もし、これが本当ならば、植物は、AsA の濃度を上げて、ウイルスの RSS を阻害し、RNA silencing を活性化してウイルスを弱毒化する戦略をとっていることになる。

2. 研究の目的

AsA は植物細胞に高濃度で存在し、主に生体内で発生する活性酸素の消去をしている。最近、申請者らは AsA に別の機能を見出した。AsA は多くのウイルスの RNA silencing suppressor に結合することができる。実際、AsA を散布した植物は予想通りに抗ウイルス性を示したことから、「植物はウイルスに対抗するために積極的に内在性 AsA の蓄積量を上げているのではないか」というアイデアが浮かんできた。本研究では、このアイデアの真偽を検証することが目的であり、AsA の合成・分解に関わる遺伝子群の発現とウイルス抵抗性との関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染とビタミン C 合成・分解関連遺伝子群の発現解析

TuMV に感染した植物(カブ、ハクサイ、シロイヌナズナ)で AsA 合成・分解に関与する遺伝子群の転写発現レベルを real-time

RT-PCRによって網羅的に解析する。次に、それをタンパク質レベルで確認するために、ウイルス感染によって誘導されることが判明した遺伝子について、そのコードするタンパク質の酵素活性を直接測定する。上記で特定した遺伝子について、シロイヌナズナの遺伝子ノックダウンミュータントをSALKなどの種子ストックセンターから入手し、それにTuMVを接種して、ウイルスの増殖・移行を観察する。TuMVの増殖はELISA法によって測定する。またウイルスの移行をモニターするため、蛍光タンパク質YFPを発現するTuMV-YFPを接種して、接種葉での蛍光を発する感染点の大きさと数を計測する。さらに、上葉へのウイルス移行のスピードをUV照射下で経時的に蛍光観察する。これらの実験によって、TuMV感染時に発現誘導がかかるアブラナ科植物のAsA関連遺伝子を特定する。

(2) ウイルス感染で誘導されるビタミンC蓄積に関わるシグナル伝達経路の解析

植物ウイルス感染を感知して、宿主植物が発動する抵抗性は、サリチル酸(SA)によって誘導されるものが主体である。また、菌根菌や根粒菌の共生に代表される病徴を誘導しない‘感染’時の宿主と病原体の相互作用は、主にジャスモン酸(JA)によって制御されていることが最近報告されている。本研究では、SAやJAを植物に投与し、上記1で特定した遺伝子の発現パターンをreal-time RT-PCRやNorthern blot解析によって明らかにする。さらに植物にTuMVを感染させ、接種葉や上葉でのSAやJAの蓄積をLC-MSによって測定する。申請者は、ビタミンCがウイルスを弱毒化することから、宿主と微生物の共生を制御するJAの関与を疑っている。

(3) ビタミンCによる抗ウイルス性発現に関わる遺伝子のVIGSによる解析

上述の実験によって特定したウイルス感

染時にAsAの蓄積を制御すると予想される遺伝子について、CMVベクターに一部の塩基配列(100~150塩基)を挿入し、この組換えCMVを植物に接種して、ターゲット遺伝子対してRNAサイレンシングを誘導する(VIGS)。接種2週間後にその遺伝子の発現レベルをreal-time RT-PCRによって解析する。VIGSによりこの遺伝子の発現量を特異的に低下させ、この遺伝子が直接にAsA(及びDHA)の蓄積量を制御していることを明らかにする。また、並行してCMVの増殖・移行をreal-time RT-PCRやELISAによって解析し、VIGSが正常に機能していることを確認する。

4. 研究成果

ハクサイやシロイヌナズナでは、葉に蓄積する内在性アスコルビン酸(AsA)の量がカブモザイクウイルス(TuMV)に対する耐性とリンクする。シロイヌナズナの野生種に対してAsA量が40%程度に低下したミュータントはTuMVに対する抵抗性が低下した。また、AsAの前駆体であるL-ガラクトースをハクサイに与えるとTuMVに対する耐性がおよそ2倍程度に向上した(接種葉での感染点を計数)。このTuMV抵抗性は、抵抗性遺伝子Rnt1-1遺伝子をもつ品種(あきまさりと空海)のみで観察された。これらの品種ではTuMV接種後、野生種の1.5倍程度にAsA量が上昇する(図1)。この内在性AsAの上昇は、APX遺伝子とAO遺伝子の両方の発現抑制とDHAR遺伝子の発現誘導が同時に起きることによって誘導されるようである。したがってAsAのリサイクル経路が活性化した結果、分解されるはずのAsAの量が減ったために全体量が上昇したものと考えられる。予備実験によって、ジャスモン酸(JA)処理によって、リサイクル経路の遺伝子の発現量が変動することがわかってい

たので、JA をハクサイに処理したところ、予想通りに内在性 AsA の蓄積量が上昇した。これらの結果から、あきまさりで観察されたウイルス抵抗性は AsA の蓄積量の増加に起因し、その AsA は JA を介して制御されるものと結論した。

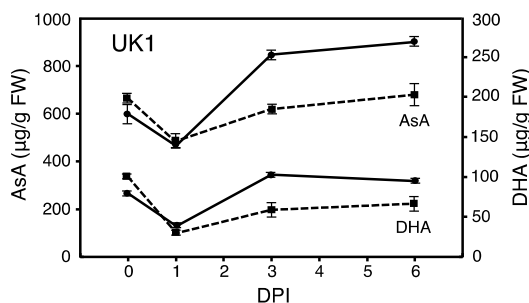


図1 . ハクサイ (あきまさり) での TuMV (UK1) 感染による AsA (DHA) 蓄積 .

次に、同じ現象が異なる植物とウイルスの組合せでも起きるのか調べるために、ナス科のトウガラシにキュウリモザイクウイルス (CMV) を接種して、感染葉における AsA の蓄積と CMV の増殖量について解析した。その結果、トウガラシにおいても CMV 感染によって AsA 蓄積が上昇することがわかった。この時、AsA の上昇は、ハクサイなどで観察された APX、AO 及び DHAR の関与するリサイクル経路によってではなく、マンノース・ガラクトース経路に依存していることが判明した。すなわち、この経路のキー酵素である GGP 遺伝子の発現が CMV 感染によって誘導されることが再現性よく確認できた(図2)。次に、CMV ベクターに GGP 遺伝子の一部の配列 (80 塩基) を挿入して、野生タバコである *N. benthamiana* に接種し、接種後 2 週間後に感染葉の GGP mRNA 蓄積量と内在性 AsA 量を測定したところ、両者とも非感染個体あるいはインサートを持たない CMV 感染個体と比較して有意に減少した(図3)。

以上の結果を総合すると、ウイルスに感染した植物では、内在性 AsA の蓄積量が上昇する傾向にあり、その結果、宿主にウイ

ルス抵抗性を付与すると考えられる。AsA を上昇させるメカニズムについては、ウイルスと宿主の組合せによって、異なるようであり、例えば、アブラナ科植物と TuMV の組合せではリサイクル経路 (DHAR や APX 遺伝子) が重要であり、ナス科と CMV の組合せではマンノース・ガラクトース経路 (GGP 遺伝子) が重要であった。また、前者は、植物ホルモンである JA によって制御されており、ハクサイでは抵抗性遺伝子を持っている品種のみで観察されることから、この抵抗性遺伝子の発現が内在性 JA 量に影響を与えるのかもしれない。

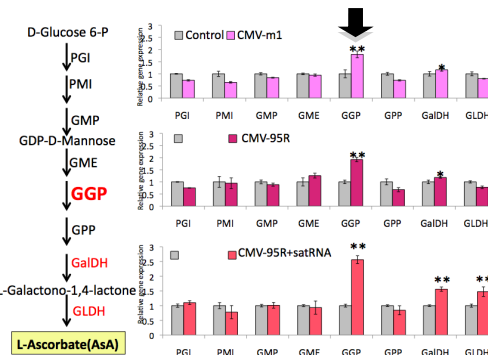


図2 . CMV 感染によって誘導されたマンノース・ガラクトース経路の遺伝子発現 . GGP 遺伝子 (矢印) が特異的に発現。

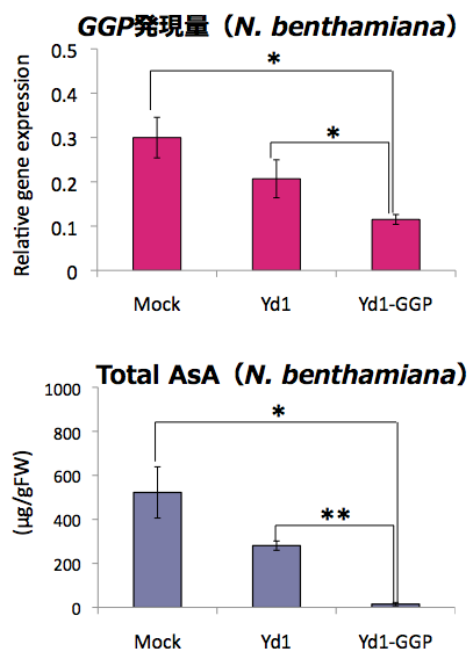


図3 . VIGS による GGP 遺伝子の発現抑制と AsA 減少 . Yd1: CMV ベクター、Yd1-GGP: GGP 遺伝子の一部を入れた CMV ベクター

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

以下すべて査読有り

Wagu G. S., Kobayashi, K., Yaeno T., Yamaoka, N., Masuta, C. and Nishiguchi, M. (2015). Rice necrosis mosaic virus, a fungal transmitted Bymovirus: complete nucleotide sequence of the genomic RNA 1 and subgrouping of bymoviruses. *J.Gen. Plant Pathol.* **82**, 38-42.

Yamagishi, M., Masuta, C., Suzuki, M. and Netsu, O. (2015). Peanut stunt virus-induced gene silencing in white lupin (*Lupinus albus*). *Plant Biotech.***32**, 181-191.

Shimura, H. and Masuta, C. (2015). Plant subviral RNAs as a long noncoding RNA (lncRNA): Analogy with animal lncRNAs in host-virus interactions. *Virus Res.* **212**, 25-29. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.016.

Uehara, T., Narabu, T., Itou, K. and Masuta, C. (2015). Detection of the potato cyst nematode resistance gene Hero A in Japanese tomato cultivars using PCR. *Nematological Res.* **45**, 115-120.

〔学会発表〕(計3件)

長谷部葉子他、ニンニクの茎頂培養に夜ウイルスフリー化、平成28年度日本植物病理学会大会、2016年3月21日～23日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

両国香他、北海道在来種ニンニクからのウイルスフリー化、平成27年度日本植物病理学会北海道部会、2015年10月15日～16日、北海道大学農学部(北海道札幌市)

十川聡子他、弱毒化したキュウリモザイクウイルスの感染によるトウガラシの葉におけるアスコルビン酸蓄積量の増加、平成27年度日本植物病理学会北海道部会、2015年10月15日～16日、北海道大学農学部(北海道札幌市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

増田税(MASUTA Chikara)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 60281854

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: