

ウイルス感染防御応答による全身壊死誘導の分子機構に関する研究

小松 健 (東京農工大学農学研究院)

akomatsu@cc.tuat.ac.jp

はじめに

植物ウイルス病は世界の作物生産に年間 5 兆円を超える被害を及ぼす。植物ウイルスは感受性の植物に全身感染し、葉のモザイクや黄化、植物体の萎縮などさまざまな病徴を引き起こす。これらの病徴のうち最も激しく影響が甚大なものの一つが、植物体の枯死に至る全身壊死である。これと類似した壊死を示す反応として、抵抗性の植物がウイルスへ示す防御反応の一つである過敏感反応 (hypersensitive response; HR) がよく知られ研究が進んでいる。HR は局部壊死斑の形成により病原体を初期感染細胞に封じ込める植物の防御応答である。一方、感受性の植物におけるウイルスによる病徴としての全身壊死の発現機構は未解明であった。全身壊死の HR との相違点を明らかにしその誘導機構を解明することは、ウイルス病の新たな防除戦略の構築へとつながりうる。そこで本研究では、重要な花き植物であるユリに全身壊死を引き起こすポテックスウイルスのオオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) を用い、本ウイルスがタバコ属のモデル植物である *Nicotiana benthamiana* に引き起こす全身壊死病徴の発現機構に関する一連の解析を行った。

全身壊死病徴を引き起こす植物 RNA ウイルスゲノムの多様性に関する研究

まず、我が国で発生する植物に全身壊死を引き起こすウイルス群に着目し、そのゲノム解析を行った。アブラナ科植物に壊死病徴を示す radish mosaic virus (RaMV) を含む種々の RNA ウイルスのゲノム配列について、いずれも我が国で初めて全ゲノム配列を解読し^[1,45]、それらの病原性決定因子について機能解析を行った^[238,10]。特にこの中で注目したのは、青森県でユリに発生した PIAMV である。本ウイルスは *Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属の 1 本鎖 RNA ウイルスで、ユリに感染しモザイクや全身壊死症状を引き起こすことにより、その商品価値を低下させる。本ウイルスの種々の分離株のゲノム解析により、PIAMV が他の同属ウイルスに比べ、種内分離株間のゲノム配列相同性が低いという病原性も多様であり、ゲノム配列の多様性が同ウイルスの病原性の多様性に関係している可能性が示された^[6]。

実際、PIAMV の分離株である Li1 と Li6 はモザイク病徴を示す単一のユリ個体から分離されたが、タバコ属植物 *N. benthamiana* における病徴は全く異なる。

すなわち、両分離株とも *N. benthamiana* に全身感染するが、Li1 は全身壊死病徴を引き起こすのに対し Li6 は無病徴である。そこで、キメラウイルスを用いた解析を行った結果、両分離株の病徴型が複製酵素 (RNA-dependent RNA

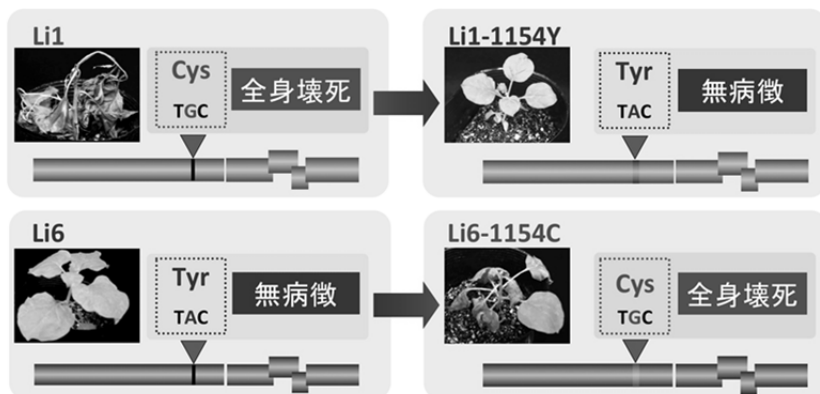


図 1. PIAMV の Li1 と Li6 分離株の病徴を決定するウイルス因子。複製酵素 (一番左の四角) の 1154 番目の 1 アミノ酸が Cys の場合は全身壊死, Tyr の場合は無病徴となる。

polymerase; RdRp) の 1154 番目の 1 アミノ酸 (aa 1154; Li1: C1154, Li6: Y1154) の相違により決定されることを明らかにした (図 1)^{6]}.

全身壊死病徴の発現に関わる宿主因子の研究

PIAMV の Li1, および Li6 分離株の 1 アミノ酸変異株である Li6-1154C は, *N. benthamiana* に全身壊死を引き起こす一方でウイルスが全身感染する. この壊死組織を調べたところ, H₂O₂ 生成やイオン漏出, プログラム細胞死など, 過敏反応 (HR) に特徴的な反応が確認された. こうした反応は, 無病徴の Li6 分離株, および Li1-1154Y には認められなかった (図 2). このことは, PIAMV による全身壊死病徴が, ウイルスの過剰な蓄積による非特異的な反応ではなく, 植物の典型的な防御応答である HR と類似した反応であることを示唆している. 次に, 植物ウイルスベクターを用いた virus-induced gene silencing (VIGS) 法による遺伝子ノックダウンの系を利用し, 既に良く研究されている抵抗性反応である HR に必要な宿主遺伝子の発現を抑制し, それら因子の全身壊死病徴への関与を調べた. その結果, PIAMV による全身壊死には, HR による抵抗性機構に特徴的な宿主因子 SGT1, RAR1, MAPKKK α , および MEK2 が関わっていることが明らかとなった (図 3). さらに, これらのノックダウン植物におけるウイルスの蓄積量を解析したところ, 壊死に伴い, 壊死を引き起こす Li1 分離株の蓄積が抑制されていることがわかった. 以上の結果より, これまでウイルスの過剰な蓄積による非特異的な反応と考えられていた全身壊死症状が, 植物の典型的な防御応答である HR の一種であることが明らかになった^{7]}.

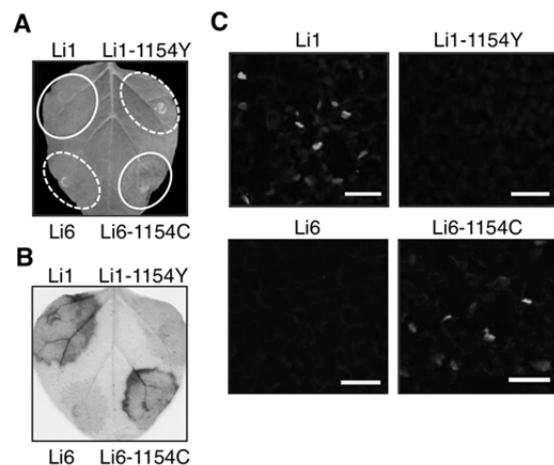


図 2. PIAMV による *N. benthamiana* の全身壊死に伴い認められる, HR による抵抗性反応と同様の特徴.

A. Li1 および Li6-1154C (実線) は感染部位で壊死を示すが, Li6 および Li1-1154Y (点線) は示さない.

B. A と同じ葉の DAB(3,3'-diaminobenzidine)染色. 壊死が認められる領域で活性酸素が発生している.

C. TUNEL (transferase-mediated dUTP nick-end labeling) 法による核 DNA の断片化の解析. 壊死を起こすウイルスで核 DNA の断片化 (白色の蛍光) が認められる.

植物ウイルスにコードされる壊死病徴の誘導因子の同定

以上のように, 全身壊死が HR の一種であることが明らかとなったため, 次にこの反応を引き起こすエリクターとして機能するウイルス因子の同定を試みた. 壊死を引き起こす PIAMV-Li1 分離株にコードされる 5 種類のタンパク質をアグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* において一過的に発現させた結果, RdRp の単独発現により植物組織に壊死症状が誘導された. さらに, エストラジオール誘導発現システムを用いて RdRp の蓄積量と壊死の程度を調べ

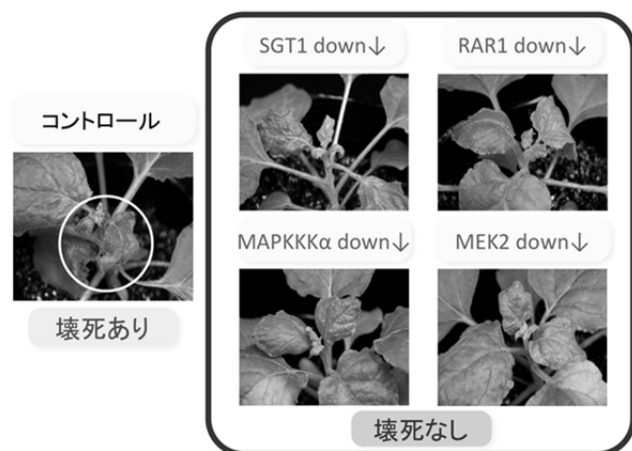


図 3. ウイルスベクターを用いた宿主遺伝子のノックダウンによる壊死への影響. コントロールの植物で認められた Li1 分離株による壊死 (左) は, SGT1, RAR1 などの因子のノックダウンにより消失する (右).

たところ、壊死は RdRp の蓄積量依存的に誘導されることが示された。そこで、RdRp を 3 つのドメイン (メチルトランスフェラーゼ (MET)、ヘリカーゼドメイン (HEL)、ポリメラーゼドメイン (POL)) に分割して発現させることで壊死誘導因子を絞り込んだ結果、ヘリカーゼドメインが壊死誘導因子であることが明らかになった (図 4)。意外なことに、植物に感染しても全く病徴を生じない Li6 分離株についても RdRp のヘリカーゼドメインは Li1 と同様の壊死を誘導した、一方で、植物における RdRp の蓄積量は Li1 分離株が Li6 分離株より顕著に多かった。さらに、Li1, Li6 分離株の病徴を決定するポリメラーゼドメインの 1 アミノ酸 (aa1154) は、ウイルスの複製量を左右しており、aa1154 が Cys (Li1 および Li6-1154C : 全身壊死) のウイルスは Tyr (Li6 および Li1-1154Y : 無病徴) のウイルスより複製量が大きくなることが分かった。これらのことから、Li1, Li6 両分離株の壊死誘導の可否は、両分離株の病徴決定因子である aa1154 の変異によりウイルスの複製量が制御され、その結果として壊死誘導能を持つ RdRp、特にそのヘリカーゼドメインの蓄積量が増加することにより決定されていることが示唆された⁹⁾。

おわりに

本研究では、植物ウイルスによる全身壊死病徴が HR と共通の機構により誘導されていることが明らかになった。無病徴型のウイルス分離株にも壊死のエリシターがコードされ、その蓄積量依存的に壊死が誘導されるという知見は、これまでメカニズムが不明とされてきた他の全身壊死研究の進展にも大きく寄与すると考えられる。全身壊死病徴は、多くのウイルスと宿主の組み合わせにおいて観察され、その被害は甚大であるにも関わらず、その発現機構の研究はまだ緒に就いたばかりである。今後、全身壊死病徴の発現機構の普遍性および HR による抵抗性と全身壊死病徴を分かち機構を明らかにし、植物ウイルス抵抗性品種の育種に寄与しうるような研究を展開していきたい。

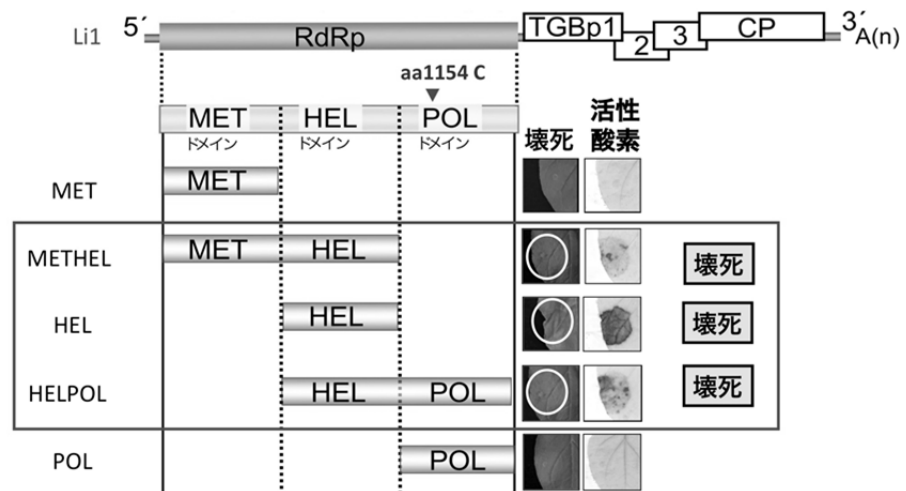


図 4. PIAMV による壊死誘導因子の同定. 複製酵素 (RdRp) の中央部の HEL ドメインを含む領域の一過的発現により、壊死が誘導され活性酸素の生成が起こる。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科、生産・環境生物学専攻、植物病理学研究室において実施したものです。本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科の難波成任教授には終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、励ましとご支援をいただきましたことを心より感謝申し上げます。また、同大学院農学生命科学研究科、生産・環境生物学専攻、植物病理学研究室におきまして様々な場面でご協力・ご助言を頂いた山次康幸先生、および研究にご協力いただいた同僚・学生諸氏に深く御礼申し上げます。最後に、学会の場で多くの励ましとアドバイスをいただくとともに、本賞にご推薦下さいました日本植物病理学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Komatsu K., Kagiwada S., Takahashi S., Mori T., Yamaji Y., Hirata H., Ozeki J., Yoshida A., Suzuki M., Ugaki M. Namba S. (2005) Phylogenetic characteristics, genomic heterogeneity and symptomatic variation of five closely related Japanese strains of *Potato virus X*. *Virus Genes*, 31:99-105.
2. Kagiwada S., Yamaji Y., Komatsu K., Takahashi S., Mori T., Hirata H., Suzuki M., Ugaki M. Namba S. (2005) A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the *Potato virus X* genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Research*, 110: 177-182.
3. Ozeki J., Takahashi S., Komatsu K., Kagiwada S., Yamashita K., Mori T., Hirata H., Yamaji Y., Ugaki M. Namba S. (2006). A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. *Archives of Virology*, 151:2067-2075.
4. Komatsu K., Hashimoto M., Maejima K., Ozeki J., Kagiwada S., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. (2007) Genome sequence of a Japanese isolate of Radish mosaic virus: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus. *Archives of Virology*, 152:1501-1506.
5. Komatsu K., Hatada K., Hashimoto M., Ozeki J., Maejima K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. (2008) Complete nucleotide sequence of a California isolate of *Radish mosaic virus*. *Archives of Virology*, 153:2167-2168.
6. Komatsu K., Yamaji Y., Ozeki J., Hashimoto M., Kagiwada S., Takahashi S., Namba S. (2008) Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. *Archives of Virology*, 153:193-198.
7. Komatsu K., Hashimoto M., Ozeki J., Yamaji Y., Maejima K., Senshu H., Himeno M., Okano Y., Kagiwada S., Namba S. (2008) Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:283-293.
8. Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Maejima K., Himeno M., Senshu H., Kawanishi T., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. (2009) The N-terminal region of the *Plantago asiatica mosaic virus* coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 677-685.
9. Komatsu K., Hashimoto M., Maejima K., Shiraishi T., Neriya Y., Miura C., Minato N., Okano Y., Sugawara K., Yamaji Y., Namba S. (2011) A necrosis-inducing elicitor domain encoded by both symptomatic and asymptomatic *Plantago asiatica mosaic virus* isolates, whose expression is modulated by virus replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24:408-420.
10. Komatsu K., Hirata H., Fukagawa T., Yamaji Y., Okano Y., Ishikawa K., Adachi T., Maejima K., Hashimoto M., Namba S. (2012) Infection of capilloviruses requires subgenomic RNAs whose transcription is controlled by promoter-like sequences conserved among flexiviruses. *Virus Research*, 167: 8-15.
11. Hashimoto M., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Shiraishi T., Ishikawa K., Takinami Y., Yamaji Y., Namba S. (2012) Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, 12: 103.
12. 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.

Studies on molecular mechanisms underlying virus-induced systemic necrosis associated with host defense responses

Ken Komatsu (Tokyo University of Agriculture and Technology)

akomatsu@cc.tuat.ac.jp