

## ウイルスにコードされるジーンサイレンシング抑制遺伝子 による植物遺伝子発現修飾機構

Modification of plant gene expression by viral gene  
silencing gene silencing suppressors

上田 一郎 (UEDA ICHIRO)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授



### 研究の概要

植物のジーンサイレンシングはウイルスに対する普遍的な防御機構であり、多くのウイルスはサイレンシング抑制遺伝子を持ち対抗している。(1)本研究では、ウイルスによる病害をサイレンシングを介した植物-ウイルスの相互作用でどこまで説明できるのか検証する。(2)複数の宿主・サイレンシング抑制遺伝子やその変異遺伝子を用いて、サイレンシング抑制遺伝子が作用する植物のターゲット因子を特定して、その影響を解析する。これらの成果により植物の遺伝子発現制御と耐病性機能の強化につなげていく。

研 究 分 野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キ ー ワ ー ド：病原体相互作用、病原性因子、病害

### 1. 研究開始当初の背景

植物のウイルス病に対する抵抗性機構のひとつとして転写後ジーンサイレンシング (PTGS) がある。転写後ジーンサイレンシングでは、RNA をゲノムに持つウイルスが感染すると、ウイルス RNA を分解し、抵抗性を発揮する。これが植物の主要な抵抗性機構である証拠に、既に 30 以上のウイルスから PTGS を阻害または抑制する遺伝子が見つかった。さらに、これらの遺伝子の多くは以前の研究で病徴発現に関与していることが報告されている。

### 2. 研究の目的

植物ウイルスがどのように感染・増殖して病気を引き起こすのか、それに対して植物がどのような抵抗性機構を備えているのかを、植物のウイルス病に対する抵抗性機構のひとつである PTGS に焦点をあてて、分子・遺伝子レベルで解明する。これらの成果により植物の遺伝子発現制御と耐病性機能の強化につなげていく。

### 3. 研究の方法

(主な購入設備等を含む)

病原性は、複数のウイルス遺伝子と宿主遺伝子の複雑な相互作用の結果であり、これを分子レベルで解析することは難しいと思われてきた。しかし PTGS が発見され、ま

たウイルスが PTGS 抑制遺伝子をコードすることが明らかになって、病原性が PTGS の分子機構で説明できる可能性が開けてきた。ここでは、PTGS でどこまで病原性が説明できるかを見極める。実験系はウイルスの PTGS 抑制遺伝子として最も早く同定され、また世界的に研究がよく進んでいるポテトウイルス属ウイルスの HC-Pro 遺伝子とキュウリモザイクウイルスの 2b 遺伝子を用いる。また植物の PTGS 調節遺伝子として単離された rgsCaM の機能解析を、ウイルスの PTGS 抑制遺伝子との関係において行う。ウイルス変異株の解析にはシーケンサーを用い、プロテオーム解析には 2 次元電気泳動装置を用いる。

### 4. これまでの成果

以前の研究でクローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) の HC-Pro 遺伝子とキュウリモザイクウイルス (CMV) の 2b 遺伝子が PTGS 抑制遺伝子であること、HC-Pro と相互作用するタバコの rgs-CaM 遺伝子がショウジョウバエにおいても PTGS を抑制することを明らかにしてきた。

(1)HC-Pro の PTGS 抑制能が CIYVV による病徴発現に必要なことを、①活性の低下した変異 HC-Pro を持つ CIYVV に他のウイルスの PTGS 抑制遺伝子を付加することでウイルス毒性の低下が相補できることを示すな

#### 〔4. これまでの成果 (続き)〕

として証明した。②一方、マメ科植物、エンドウのえそ病徴発現には半優性の対立遺伝子とサリチル酸経路の活性化が必要であることを明らかにし、この活性化に HC-Pro の PTGS 抑制能が関与していることも示した。③また、感染エンドウ葉に蓄積するタンパク質を 2 次元電気泳動で網羅的に解析(プロテオーム解析)することにより、えそ病徴発現と相関する 5 つのタンパク質を単離、同定した。

(2) ①ショウジョウバエ系では CIYVV の HC-Pro は PTGS を抑制しないものの導入した外来 (ルシフェラーゼ) 遺伝子の発現を促進することが新たに明らかになった。②一方、当初タバコの内在性 PTGS 抑制遺伝子として報告されていた rgs-CaM についても予想外の機能を持つ可能性が見出された。すなわち、rgs-CaM は HC-Pro だけでなく多くの PTGS 抑制遺伝子と親和性を有し、それら結合タンパク質を不安定化することで、宿主の PTGS 活性を高めてウイルスに対する防御を強化する機能である。本研究の重点の一つはウイルスの PTGS 抑制遺伝子が作用する宿主側のターゲット因子を見つけることであり、予想外の成果から、既にその答えの一つが rgs-CaM であることが判明した。そして rgs-CaM は本研究の最終目標の一つ、植物の耐病性強化にも利用できる可能性が考えられる。学際的にも、ウイルスの PTGS 抑制遺伝子に対して宿主側も対抗手段を備えていたことを新たに見出したことになり、重要な発見であり現在、雑誌 *nature* に論文を投稿中である。

(3) ウイルスの PTGS 抑制の活性を測定・比較するためにプロトプラストを使用したアッセイ系を構築した。プロトプラストに CMV の 2b 遺伝子とサテライト RNA (satRNA) を同時導入し、2b の PTGS 抑制活性を測定したところ、弱毒 CMV の 2b の PTGS 抑制能力に対して、サテライト RNA のプラス鎖、マイナス鎖ともに阻害的に作用することを観察した。また、2b と結合する宿主因子を酵母の two-hybrid 法によってスクリーニングした結果、カタラーゼが 2b タンパク質と結合することが判明した。プロトプラストに 2b とカタラーゼを同時に発現させたところ 2b の PTGS 抑制活性が低下し、カタラーゼも 2b に阻害的に作用することがわかった。

#### 5. 今後の計画

(1) HC-Pro の PTGS 抑制能と CIYVV の病原性の関係については、えそ病徴発現に関わる遺伝子の解析を進めて、その分子機構の解明を進める。具体的には半優性の対立遺伝子の同定を試みるとともに、プロテオ

ーム解析で同定した遺伝子の発現を感染組織中で抑制するなどして、えそ病徴発現への関わりを調査する。

(2) HC-Pro と rgs-CaM の PTGS 抑制能の分子機構に関しては、計画を変更して新たに判明した rgs-CaM の PTGS 抑制遺伝子に対抗する防御タンパク質としての機能に焦点を絞って解析を進め、分子機構の解明を目指す。

(3) CMV の病徴を軽減する satRNA はその起源について未だ不明のままであり、いかなる進化を遂げた分子であるのか大きな謎となっている。我々は、satRNA を宿主遺伝子から派生して宿主の PTGS を強化するようになった CMV に対する抵抗性因子であると考えている。今後 satRNA が宿主 PTGS に及ぼす影響や 2b との相互作用について分子レベルでの詳細な解析を実行する予定である。

#### 6. これまでの発表論文等

○ Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances Clover yellow vein virus virulence in susceptible pea cultivars. Atsumi, G., Kagaya, U., Kitazawa, H., Nakahara, K. S., Uyeda, I. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22, 166-175. (2009)

○ Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. Yambao, M.L.M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Tachibana, Y., Nakahara, K. S., Uyeda, I. *Arch. Virol.* 153, 105-115. (2008)

○ Degree of RNA silencing and ability of a viral suppressor vary depending on the cell species in a protoplast system. Shimura, H., Kogure, Y., Goto, K. and Masuta, C. *Journal of General Plant Pathology.* 74, 326-330. (2008).

○ A strategy for screening an inhibitor of viral silencing suppressors, which attenuates symptom development of plant viruses. Shimura, H., Fukagawa, T., Meguro, A., Yamada, H., Oh-hira, M., Sano, S. and Masuta C. *FEBS Letters*, 4047-4052. (2008).

○ Characterization of silencing suppressor 2b of Cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. and Masuta, C. *Plant Cell Physiology* 48, 1050-1060. (2007).

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/gs/education/res.html#22>