

植物・微生物間相互作用の進化

Evolution of Plant-Microbe Interactions

植物感染生理談話会論文集（第 56 号）

PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium Report Vol. 56

September 5 – 7, 2022

Sendai, Miyagi

日本植物病理学会

令和 4 年度植物感染生理談話会

Published annually by Plant-Microbe Interactions Symposium,
the Phytopathological Society of Japan (PSJ)

はじめに

植物感染生理談話会は、主に分子レベルでのアプローチから植物と病原微生物の相互作用に関わるテーマを研究する研究者が集い、合宿形式で最新の研究成果について発表・討議したり、最先端の研究トピックの情報を共有する場として、日本の植物病理学の進歩と、植物-病原微生物相互作用研究の発展に大きく貢献してきた。「夏の学校」と呼ばれてきた本談話会は、通常の学会では交流に十分な時間を確保することができない研究者仲間が、じっくりと膝を付き合わせて徹底的に議論をすることができる機会を提供している。また若手研究者に対しては、演者の講演に刺激を受けてモチベーションを高め、より一層自らの研究に打ち込むほどのインパクトを与えてきた。それは植物感染生理学の将来を担う若手研究者人材の育成へと繋がっている。その伝統は、コロナ禍におけるオンライン形式で開催された第55回談話会にも引き継がれてきたが、56回目の開催となる今回、再び対面形式で談話会を開催できることは大きな喜びである。ソーシャルディスタンスなどの感染対策をとっての開催ではあるが、ライブで議論し、交流を深めることの有り難さを実感する集会になるのではないだろうか。

今回の談話会のテーマは「植物・微生物間相互作用の進化」である。赤の女王仮説で説明されるように、植物と微生物は、時に戦いながらお互いを進化させて、時に共存関係を持ちながら共に進化をしてきたものと推察される。今回は、植物感染生理学に関わる最先端の研究を実践されている新進気鋭の若手研究者から、これまで植物感染生理学研究を先導し円熟期を迎えたベテラン研究者まで、12名の講師にご講演をいただく。さらに学生・若手研究者によるポスター発表の機会も設けた。加えて特別講演として、西村秀一先生（国立病院機構仙台医療センター）からはヒトのウイルス感染症について、白川仁先生（東北大学農学研究科）からは栄養学の視点からビタミンKの役割について、ご研究の一端をご紹介いただく。

みちのくの初秋に、歴史ある仙台の地で、久しぶりに対面での交流を楽しむとともに、サイエンスの熱い議論を戦わせる機会となれば幸いである。末筆ながら、お忙しい中、本談話会でのご講演ならびに要旨の執筆をご快諾くださった講師の先生方に心からお礼申し上げます。

令和4年7月
編者らしるす

目次

天然からの抵抗性誘導物質の探索と作用機構研究.....	1
瀬尾茂美 (国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構)	
植物の二次代謝産物と根圏マイクロバイオータの相互作用を介した 植物の鉄栄養吸収の促進.....	9
橋本将典*,†・井上晴彦** (*東京大学大学院農学生命科学研究科・ **国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・†現: 静岡大学農学部)	
植物病原糸状菌ウイルスのライフスタイル多様性.....	19
佐藤有希代*,†・近藤秀樹*・鈴木信弘* (*岡山大学資源植物科学研究所・†現: ケルン大学植物科学研究所)	
ビタミンKの新しい健康機能性 (特別講演).....	29
白川仁・大崎雄介 (東北大学大学院農学研究科)	
イネ科植物いもち病菌のヒストン修飾機構とゲノム進化.....	35
小林奈月・Thach An Dang・Pham Thi Minh Kieu・池田健一・中屋敷均 (神戸大学大学院農学研究科)	
植物-病原糸状菌相互作用における分泌タンパク質・ペプチドの解析.....	45
深田史美*・Guo Ting**・Wang Pingyu**・河野洋治* (*岡山大学資源植物科学研究所・**中国科学院上海植物逆境生物学研究中心)	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> が標的とする宿主因子の網羅的な同定にむけて.....	55
松井英譲*・黒江香那**・檜原沙知**・西村隆史** (*岡山大学学術研究院 環境生命科学研究学域 (農)・**岡山大学大学院 環境生命科学研究科 (農))	
複製酵素の膜結合ドメインの同定から探る植物ウイルス複製の分子機構.....	65
小松健*・佐々木信光*・Richard S. Nelson**・有江力* (*東京農工大学大学院農学研究院・** Oklahoma State University)	
ウイルス伝搬を考える ~ウイルス学でやり遺したことも (特別講演).....	75
西村秀一 (国立病院機構仙台医療センター)	

植物成長と防御応答の調節へのサリチル酸配糖化酵素遺伝子の関与.....	77
竹下稔・小林優大（宮崎大学農学部）	
果樹ウイルスの病原性に関する研究.....	87
八重樫元*,**・山岸紀子**・吉川信幸**・磯貝雅道*	
（*岩手大学農学部・**岩手大学次世代アグリイノベーションセンター）	
リンドウ畑発の基礎研究を目指して.....	97
藤崎恒喜*・舘田知佳*,†・ドミンゲズ ジョン*・関根健太郎**・西原昌宏*	
（*公益財団法人岩手生物工学研究センター・**琉球大学農学部	
・†現: 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科）	
植物ウイルスとゲノム編集.....	107
石橋和大（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）	

天然からの抵抗性誘導物質の探索と作用機構研究

瀬尾茂美

Seo, S.

Exploration of plant activators from natural resources and their mode of action.

Abstract

Since the 1970s, there has been increasing concern regarding pathogen resistance to agrochemicals such as fungicides in Japan. In addition, the recent phase out of methyl bromide, a fumigant used to kill a wide variety of plant pathogens and pests, has caused the re-emergence of these pathogens and pests. Therefore, it has become imperative to develop new, more environmentally friendly disease control strategies. Using the ability of plants to induce pathogen resistance for disease control is attractive because of its potential to reduce the environmental burden. One of the major techniques using such ability is plant activators, which are characterized by a capability to induce resistance to a broad range of diseases or herbivore pests without exhibiting direct antimicrobial or insecticidal activity. Most plant activators identified to date have been compounds that act on salicylic acid biosynthetic, metabolic, or signaling pathways that have a protective effect against a narrow range of disease spectrums (mostly rice blast disease). We have been trying to explore plant activators from natural resources. The diterpene sclareol was identified as an inducer of resistance against the soil-borne bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum*. Sclareol-induced resistance to *R. solanacearum* was ethylene-dependent. Sclareol also inhibited the penetration of root-knot nematodes (RKN) into plant roots. We also identified phytol as a sclareol- and RKN penetration-induced substance and found that phytol-induced RKN resistance was ethylene-dependent. The amino acid L-histidine was identified as an inducer of resistance against *R. solanacearum*. L-His-induced resistance to *R. solanacearum* was partially ethylene-dependent. We also identified loliolide, a monoterpene lactone, as an inducer of resistance against multiple harmful herbivores. Loliolide was found to induce resistance to herbivore pests through activation of jasmonic acid-independent pathways.

Key words: plant activator, terpene, ethylene, *Ralstonia solanacearum*, root-knot nematode, herbivore pests

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, JAPAN

はじめに

病原菌や害虫の攻撃に対して植物はサリチル酸やジャスモン酸等の防御物質を生産することにより対処している。蓄積したこれら物質は *PR* 遺伝子等の一連の防御遺伝子群の発現を誘導することから、植物の病虫害抵抗性におけるシグナルとして働いている (Pieterse *et al.*, 2009)。これら防御反応を誘導し、病原菌や害虫を直接殺さない物質 (抵抗性誘導物質) は、耐性菌や薬剤抵抗性害虫の出現リスクが低い環境低負荷型病虫害防除剤の素材として注目されている。しかし、膨大な数のリード化合物をスクリーニングして開発された殺菌剤や殺虫剤と比較すると、抵抗性誘導物質はこれまで見つかった物質の数が少ないこと等から実用化に至った例は少ない。実際、国内で農薬として上市されている抵抗性誘導剤は主にサリチル酸経路に作用し、その対象病害はイネいもち病等に限定される。サリチル酸やジャスモン酸が有効でない病虫害も多数あることから、新たな作用点を有する抵抗性誘導物質を見出すことは重要であるが、そのような物質の情報は限られていた。

このような背景の下、筆者らは新たな作用点を有する抵抗性誘導物質の探索と作用機構の解析を行ってきた。農薬等のシーズとなる化合物の探索にはケミカルライブラリーが使われることが多いが、筆者らは生理活性物質の宝庫である天然資源を材料として、生物検定を用いて天然物化学的手法により分画・精製を進めるやり方 (いわゆる、*bioassay-guided fractionation*) を取り入れてきた。本発表ではこれまで見つかった物質について紹介したい。

1. 青枯病抵抗性誘導活性を指標として見つけたジテルペン及びアミノ酸

青枯病は青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の感染によって引き起こされる病害である。青枯病の防除には抵抗性品種を用いた接ぎ木や土壤消毒などが用いられているが、土壤深層部に生存する青枯病菌を根絶するのが難しいこともあり、難防除病害と位置づけられている。筆者らは過敏感細胞死様の反応を起こす青枯病菌株 (8266) を接種したタバコ葉から青枯病に対して抵抗性を示す物質の探索を試みた。新たに構築した簡易青枯病抵抗性検定法を用いて病徴抑制活性を指標に探索したところ、酢酸エチル可溶中性画分に活性が検出された。種々のクロマトグラフィーによる精製を進めたところ、活性は HPLC 上で2つのピークに分離した。それぞれ単離し、構造を解析したところ、ジテルペンであるスクラレオールと *cis*-アビエノールであることが判明した (図 1; Seo *et al.*, 2012)。興味深いことに、スクラレオールと *cis*-アビエノールは、筆者らがタバコのストレス応答性 MAPK である WIPK を活性化する内生物質として同定した WAF-1 (図 1; Seo *et al.*, 2003) の構造とよく似ていた。WAF-1 も青枯病抵抗性を誘導する効果があった。

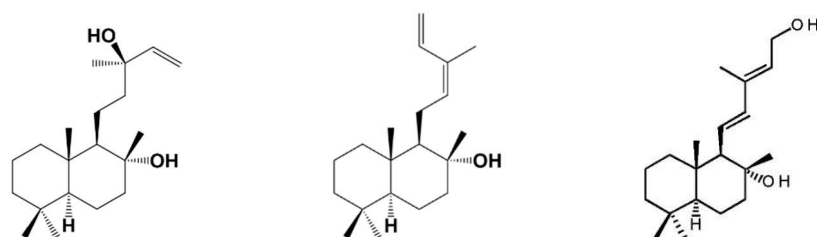


図 1. スクラレオール (左)、*cis*-アビエノール (中)、WAF-1 (右) の構造

シロイヌナズナの植物ホルモン等変異体を用いた解析から、スクラレオール等によって誘導される青枯病抵抗性にはエチレンシグナル伝達が関与することがわかった。

さらなる青枯病抵抗性誘導物質を探索していた過程において、筆者らは植物育成用液肥であるアグリボ EX にタバコ立枯病 (*R. solanacearum* によって起こる) を抑制する活性を見出した。そこで、その活性本体を明らかにするためにアグリボ EX を限外ろ過により分画し、得られた画分を、トマト芽生えを用いた簡易青枯病抵抗性検定に供した結果、分子量 3,000 未満の画分に病徴抑制活性を検出した。その後の分画によって活性は複数の画分に分離したが、高極性化合物を含む画分に焦点を絞り、精製を進めた。

最終的に HPLC 上で単一ピークになるまで精製し、精製物の構造を解析したところ、アミノ酸である L-ヒスチジンであった (図 2; Seo *et al.*, 2016)。L-ヒスチジンによって誘導される青枯病抵抗性はエチレンシグナル伝達が関与することがわかった。

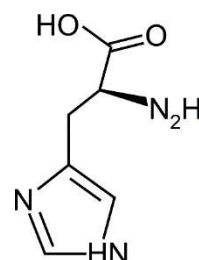


図 2. L-ヒスチジン

また、L-ヒスチジンはイネ苗立枯細菌病等の病害に対してもエチレン経路を活性化を通じてイネに抵抗性を誘導することが示された (Yariyama *et al.*, 2019)。

2. センチュウ抵抗性誘導活性を指標として見つけたジテルペン

植物の根や茎に寄生する植物寄生性線虫が農業に及ぼす被害額は世界全体で年間数千億から数兆円に及ぶと推算されている。中でも深刻な被害を与えているのがネコブセンチュウ (*Meloidogyne* 属) である。ネコブセンチュウ (以下、センチュウと略記) は広い寄主範囲 (700 種以上) を持ち、露地根菜類から施設果菜類におよぶ広範な作物に著しい減収や枯死を起こすこと、発生圃場では根絶が難しいことから、農業上の有害微生物の 1 つに数えられている。国内においては、土壌消毒用途のくん蒸剤の 1 種である臭化メチルの 2005 年の全廃以降、それまで防除できていたセンチュウ害が顕在化するとともに拡大している。センチュウに対する主な防除手段はホスホチアゼート剤や D-D 剤などの化学合成農薬を用いた化学的防除や還元土壌消毒などによる物理的防除だが、いずれの方法も防除効果や環境に与える影響などの面で解消すべき問題が多く残されている。そこで、センチュウに対する防御反応が誘起された植物からセンチュウ抵抗性誘導物質の探索を試みた。

図 3 に示す検定法 (Fujimoto *et al.*, 2016) を用いて、根へのセンチュウ侵入抑制を指標として探索したところ、中性画分に活性を検出した。最終的には本活性の本体としてスクラレオールを同定した (Fujimoto *et al.*, 2015)。スクラレオールを処理した植物ではセンチュウの侵入数が有意に低下した。センチュウに対する直接的な殺センチュウ活性は示さなかった。スクラレオールは、エチレン経路の

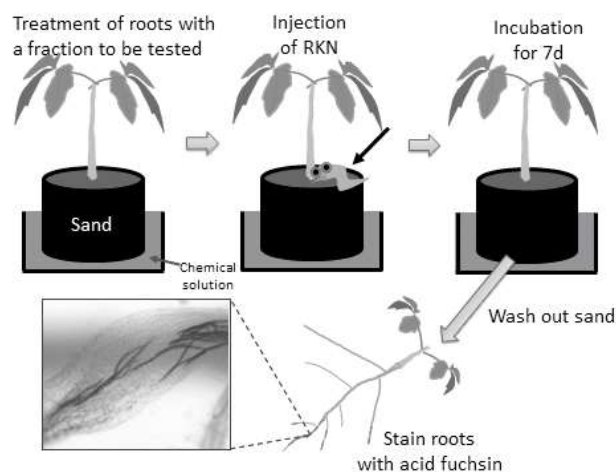


図 3. センチュウ抵抗性検定法

活性化を通じてリグニン蓄積等の防御反応を誘導することによりセンチュウ抵抗性に寄与することが示唆された。

植物寄生性線虫に寄生された植物では、様々な代謝産物が生成されたり分解されたりすることが知られている。そのような代謝物のなかには線虫の寄生を抑える物質があると考へ、センチュウに寄生されたシロイヌナズナ根の代謝物の変動をメタボローム分析により調べた。ノンターゲット分析によりセンチュウ寄生根ではフィトールが増加していることが判明した (Fujimoto *et al.*, 2021)。また、スクラレオール処理根においてもフィトールの蓄積が認められた。フィトールは葉緑体に含まれるクロロフィルの構成成分 (図 4) で、クロロフィルの機能維持のために必要である。ストレス等によりクロロフィルが分解されるとフィトール分子が遊離するが、遊離フィトールの生理学的役割についてはよくわかっていなかった。そこで、線虫寄生に対するフィトールの効果を調べることにした。シロイヌナズナの根にフィトールを与え、センチュウを放飼させると、対照区と比較して根への侵入数の低下が確認された。トマトを用いた場合でも同様の侵入抑制効果が認められた。フィトールを与えた植物では植物ホルモンであるエチレンの生成が高まることが確認された。フィトールはネコブセンチュウに対する直接的な殺線虫活性は持たなかった。ネコブセンチュウが根に侵入することにより葉緑体が崩壊し、クロロフィルが分解することで生じたフィトールがエチレン経路を介して抵抗性を誘導すると推察される (図 4)。

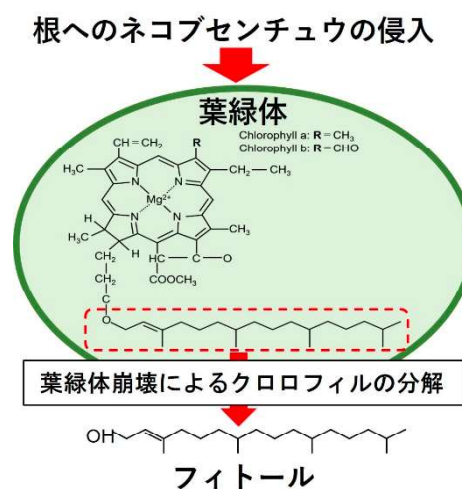


図 4. フィトールを介したセンチュウ抵抗性誘導の推定機構

3. 害虫抵抗性誘導活性を指標として見つけたモノテルペンアルコール

害虫に効く抵抗性誘導物質を見つけるべく、その探索源として過敏反応に着目した。過敏反応は非親和性の病原体の感染に伴って植物細胞で誘導される病害抵抗性反応であり、その過程では抗菌性物質などが生産される。過敏反応では害虫防御に関わる遺伝子群の発現も誘導されることから、「過敏反応が誘起された植物では害虫抵抗性誘導物質が生産されている」と仮説を立て、TMV 感染に伴い過敏反応が誘起されたタバコ葉から害虫に対する抵抗性誘導物質の探索を試みた。メタノール抽出画分をトマトに塗布するとハダニ雌成虫の生存率と産卵数を低下させる活性が検出できたことから、種々のクロマトにより精製して、最終的に活性を示すモノテルペンアルコールの 1 種であるロリオライドを単離・同定した (図 5; Murata *et al.*, 2019)。ロリオライドはアザミウマ孵化幼虫とハスモンヨトウ幼虫の生存率を低下させる活性も示した。

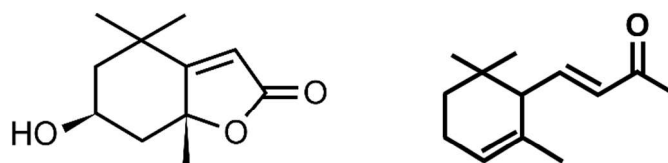


図 5. ロリオライド (左) と α -ヨノン (右) の構造

ロリオライドにはこれらの害虫に対する直接的な殺虫活性はなかったことから、生存率低下等の効果は植物で誘導された抵抗性反応によるものであると示唆された。ジャスモン酸の受容に関わる COI1 の変異株等を用いた解析によりロリオライドによる害虫抵抗性はジャスモン酸非依存的であることが判明した。

また、ロリオライドと同じアポカロテノイド（カロテノイド代謝物の総称）の1種である α -ヨノン（図 5）もアザミウマ類に対してシロイヌナズナにジャスモン酸非依存的に抵抗性を誘導することが示された（Murata *et al.*, 2020）。

おわりに

これまで見出されてきた抵抗性誘導物質の多くはサリチル酸に関連する経路に作用する（Yoshioka *et al.*, 2001; Nakashita *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2012; Noutoshi *et al.*, 2012）。本稿で述べた筆者らの見出した物質の多くは主にエチレン経路を活性化する（図 6）。このようなエチレン経路活性化タイプの抵抗性誘導物質はあまり知られておらず、新しいタイプの抵抗性誘導剤の開発に役立つと期待できる。抵抗性誘導剤の開発においては、植物の成長抑制や薬害等の副作用の有無、物質自体の基礎活性や残効性の高さ、実用レベルの防除効果を示す処理方法の最適化等を検討する必要があると考えられる。

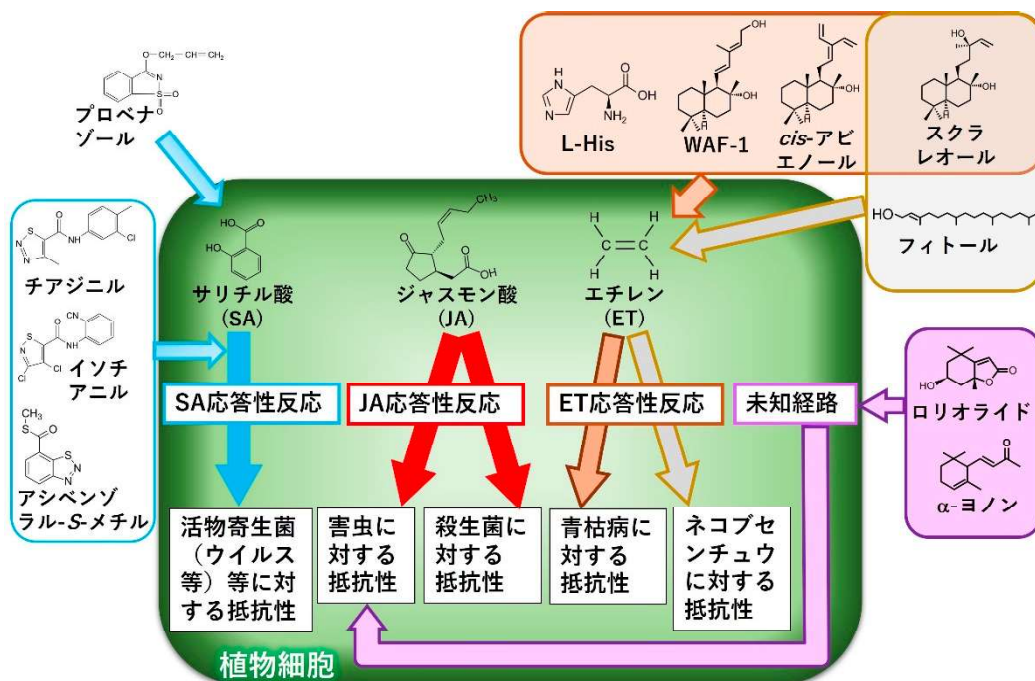


図 6. 抵抗性誘導物質の作用機構の推定模式図

謝辞

本研究は、青枯病関連は農研機構・中保一浩博士及び光原一朗博士及び東北大・高橋英樹先生、センチュウ関連は農研機構・藤本岳人博士、害虫関連は農研機構・村田未果博士をはじめ多くの方々のご指導・ご協力の下行われました。この場をお借りして感謝申し上げます。本研究の一部は、科研費 25292037、16H04888、19H02961、22H02352 及び受託研究費 [平成 26~30 年度 総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」(管理法人：農研機構生物系特定産業技術研究支援センター)] の助成を受けて実施した。

引用文献

- Chaturvedi, R., Venables, B., Petros, R.A., Nalam, V., Li, M., Wang, X., Takemot, L.J. and Shah, J. (2012) An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *Plant J.* 71: 161–172.
- Fujimoto, T., Mizukubo, T., Abe, H. and Seo, S. (2015) Sclareol induces plant resistance to root-knot nematode partially through ethylene-dependent enhancement of lignin accumulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28: 398–407.
- Fujimoto, T., Mizukubo, T., Abe, H. and Seo, S. (2016) Root-knot nematode penetration and sclareol nematicidal activity assays. *bio-protocol*. <http://www.bio-protocol.org/e1848>
- Fujimoto, T., Abe, H., Mizukubo, T., and Seo, S. (2021) Phytol, a constituent of chlorophyll, induces root-knot nematode resistance in *Arabidopsis* via the ethylene signaling pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 34: 279–285.
- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhara, I. and Ohashi, Y. (2007) Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in adult rice plants. *Plant Cell Physiol.* 48: 915–924.
- Murata, M., Nakai, Y., Kawazu, K., Ishizaka, M., Kajiwara, H., Abe, H., Takeuchi, K., Ichinose, Y., Mitsuhara, I., Mochizuki, A. and Seo, S. (2019) Loliolide, a carotenoid metabolite, as a potential endogenous inducer of herbivore resistance. *Plant Physiol.* 179: 1822–1833.
- Murata, M., Kobayashi, T. and Seo, S. (2020) α -Ionone, an apocarotenoid, induces plant resistance to western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, independently of jasmonic acid. *Molecules.* 25: 17.
- Nakashita, H., Yoshioka, K., Yasuda, M., Nitta, T., Arai, Y., Yamaguchi, I., (2002) Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61: 197–203.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., *et al.* (2012) Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 3795–3804.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wess, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308–316.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. and Ohashi, Y. (1995) Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270: 988–1992.
- Seo, S., Seto, H., Koshino, H., Yoshida, S. and Ohashi, Y. (2003) A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with Tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell* 15: 863–873.
- Seo, S., Gomi, K., Kaku, H., Abe, H., Seto, H., Nakatsu, S., Neya, M., Kobayashi, M., Nakaho, K., Ichinose, Y., Mitsuhara, I. and Ohashi, Y. (2012) Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in

tobacco, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 53:1432–1444.

Seo, S., Nakaho, K., Hong, S. W., Takahashi, H., Shigemori, H. and Mitsuhashi, I. (2016) L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 57:1932–1942.

Yariyama, S., Ando, S., Seo, S., Nakaho, K., Miyashita, S., Kanayama, Y. and Takahashi, H. (2019) Exogenous application of L - histidine suppresses bacterial diseases and enhances ethylene production in rice seedlings. *Plant Pathol.* 68: 1072–1078.

Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D.F. and Yamaguchi, I. (2001) Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J.* 25: 149–157.

植物の二次代謝産物と根圏マイクロバイオータの 相互作用を介した植物の鉄栄養吸収の促進

橋本将典^{*,†}・井上晴彦^{**}

Hashimoto, M., Inoue H.

Improvement of plant iron nutrition mediated by the interaction between
the plant secondary metabolites and the root microbiota.

Abstract

In nature, plant roots are colonized by a species-rich microbial community, which is mainly recruited from a subset of the surrounding soil microbiota. Whether and how the beneficial services to host plants are provided by the plant-associated microbiota is attracting many attentions for improving plant productivity and compromising environmental issues by food production. In the past few years, several studies reported that the interaction between *Arabidopsis thaliana* and the root microbiota under iron-limiting condition is mediated by the plant-derived coumarins, the plant secondary metabolites secreted from the plant root. These studies supported that biosynthesis of coumarins, especially scopoletin and fraxetin, is essential for the plant growth and the root microbiota assembly in iron-limiting soil. Furthermore, using the synthetic community assay reconstituting the iron-limiting nutrient condition, it is demonstrated that the root microbiota exhibits plant growth rescue activity, which is dependent on the reduction-based iron import mechanism and fraxetin secretion. Mono-association with each strain revealed that the beneficial activity is also exhibited by some of the root-associated bacteria across several phyla found in the root microbiota. Transcriptomic and ionomic analyses suggested that the plant growth promotion by root microbiota is associated with relieving the plant iron starvation responses. Although the mechanisms underlining the root microbiota-mediated plant iron nutrition are still elusive, the results suggested that the bacterial root microbiota, stimulated by the coumarins, contributes to plant adaptation to iron-limiting soils.

Key words: root microbiota, iron nutrition, plant secondary metabolites, coumarins

* 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657 JAPAN

** 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-1 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8517 JAPAN

† Present Address: 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529 JAPAN.

はじめに

自然条件で生息する植物の根圏には多種多様な微生物が生息している。これらの根圏に生息する微生物の群集は「根圏マイクロバイオータ」と呼ばれ、植物の耐病性や環境ストレス応答、栄養吸収等に関わると考えられている (Bulgarelli et al., 2013)。一方で、植物が根を伸ばす土壌には、1g あたりで 10 億個以上の微生物が生息しており、地球上で最も微生物の多様性が高い環境の一つであると言われている。根圏マイクロバイオータは、土壌微生物の一部が植物の根圏に達して形成され、その群集形成には土壌の性質に加えて、植物の根から分泌される光合成産物や二次代謝産物が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。実際に、植物は光合成産物のうちの 10%程度を根から分泌することを示した研究もあり、このことは植物が根圏マイクロバイオータとの相互作用に多くの資源を投資していることを示唆している。しかし、植物の根から分泌される二次代謝産物がどのように根圏マイクロバイオータの群集形成に関わり、さらに根圏マイクロバイオータの機能にどのように影響するのかは明らかになっていない。

鉄は植物の生育に不可欠なミネラルである (Kobayashi and Nishizawa, 2012)。鉄は様々な酵素の活性に重要な役割を担っており、特に植物では光合成に関与し地球上の生命活動の根幹をなす存在と言える。鉄は地球上で 4 番目に多いミネラルであり、土壌中に豊富に含まれるが、土壌が中性からアルカリ性になると容易に不溶化し植物に吸収されにくくなる。特にワイン生産などで珍重される石灰質土壌では、炭酸カルシウムの強い緩衝作用により土壌がアルカリ性に傾く。鉄が不溶化すると、植物は鉄を吸収できなくなり、葉の退緑症状や生育不全を起こしてしまう。このようなアルカリ性土壌は世界の耕地面積のおよそ 3 割を占めており、作物栽培に不向きな土壌においても作物の鉄栄養を補うことのできる技術の開発が求められている。

植物が備える鉄吸収機構は、大きく 2 つに大別される (Verbon et al., 2017)。イネ科の植物では、ムギネ酸に代表されるファイトシデロフォアが根から分泌され、土壌中で不溶態として存在する三価鉄イオン (Fe^{3+}) をキレートして可溶化することで鉄を吸収している。イネ科が持つファイトシデロフォアによる鉄吸収機構は **Strategy II** と呼ばれ、オオムギやイネで多くの知見が蓄積されている。他方で、イネ科以外の多くの植物が持つ鉄吸収機構は **Strategy I** と呼ばれる。**Strategy I** では、根の表皮細胞の原形質膜に存在する三価鉄還元酵素 **Ferric Reduction Oxidase 2 (FRO2)** が、不溶性の Fe^{3+} を可溶性の二価鉄 Fe^{2+} に還元している。また、同じく原形質膜に存在する H^+ -ATPase である **AHA2** によって、 H^+ イオンが根表皮細胞から放出され、根圏が酸性化されることで、 Fe^{3+} が可溶化しやすくなる。還元された Fe^{2+} は **Iron-Regulated Transporter 1 (IRT1)** により植物の根に吸収される。また **Strategy I** の植物では、鉄欠乏条件下で根からフェノール性化合物が分泌されることが古くから知られている。シロイヌナズナでは、鉄欠乏条件下でフェニルアラニンを基点として合成される二次代謝産物であるクマリン類が合成され、**ABC** トランスポーターである **PDR9** により分泌される (Ziegler et al., 2017)。クマリン類の一つであるスコポレチンの合成には **Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase 1 (F6'H1)** が関与し、*f6'h1* 変異体はアルカリ性条件で強い鉄欠乏症状を示す (Schmid et al., 2014)。また、*f6'h1* 変異体の根で蓄積量が減少するエスクレチンは、鉄をキレートする活性を持つことが示唆されている。また最近になって、スコポレチンから

scopoletin 8-hydroxylase (S8H)により合成されるフラキセチンが、Fe³⁺を還元する活性を持つことが示された (Rajniak et al., 2018; 図 1)。これまでの研究から、シロイヌナズナやイネ科以外のいくつかの植物では、クマリン類が鉄をキレートもしくは還元する活性を持ち、根からの鉄吸収に関与することが示唆されている。

オオムギ根圏から単離された *Pseudomonas simiae* WCS417 は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の根に接種すると induced systemic resistance (ISR)と呼ばれる抵抗性を植物体全身で誘導する (Pieterse et al., 2021)。 *P. simiae* による ISR の誘導には、根特異的転写因子である MYB72 が必須である。 *P. simiae* をシロイヌナズナ根に接種すると、MYB72 遺伝子のほか、鉄欠乏応答のマーカー遺伝子である *FIT* 遺伝子や *FRO2* 遺伝子などの発現量が上昇する (Zamioudis et al., 2015)。これらの知見は、植物の鉄欠乏応答が根圏マイクロバイオータとの相互作用に影響する可能性を示唆している。さらに *myb72* 変異体や *f6'h1* 変異体では、鉄欠乏時に根から分泌される蛍光性のフェノール性化合物の産生が失われること、クマリン類のうちスコポレチンが抗菌活性を持つファイトアレキシンであることから (Ahuja et al., 2012)、クマリン類が根圏マイクロバイオータとの相互作用に関わることが予想された。本稿では、シロイヌナズナの根から分泌されるクマリン類が、鉄のキレート活性や還元活性に加えて、根圏マイクロバイオータの群集形成に関与し、さらに鉄欠乏条件下で根圏マイクロバイオータによる植物の生育改善に関わることを示唆した研究を紹介したい。

1. クマリン類による根圏マイクロバイオータの群集形成

シロイヌナズナの根では、一連の合成経路で生成される3種類のクマリン類 (スコポレチン、フラキセチン、シデレチン) が存在し、それぞれの化合物の合成は F6'H1、S8H、CYP82C4 により触媒される (Rajniak et al., 2018; 図 1)。鉄欠乏条件下においてクマリンがどのように根圏マイクロバイオータとの相互作用や植物の生育に影響するかを調べる目的で、アルカリ性の石灰質土壌 (pH=7.4) でクマリン類の合成・分泌に関わる変異体を生育させた (Harbort et al., 2020a)。実験には、クマリンの合成経路に関わる酵素遺伝子を欠損した *f6'h1*、*s8h*、*cyp82c4* 変異体とクマリン類分泌トランスポーター遺伝子を欠損した *pdr9* 変異体を用いた。およそ4週間

生育させたところ、コントロールとして用いた中性土壌では野生型 Col-0 系統を含めていずれの変異体も健全に生育したが、石灰質土壌においてはクマリン合成経路欠損変異体のうち、*f6'h1* および *s8h* 変異体で葉の黄化などを含む典型的な鉄欠乏症状を見られ、著しい生育不良が生じた (図 1)。

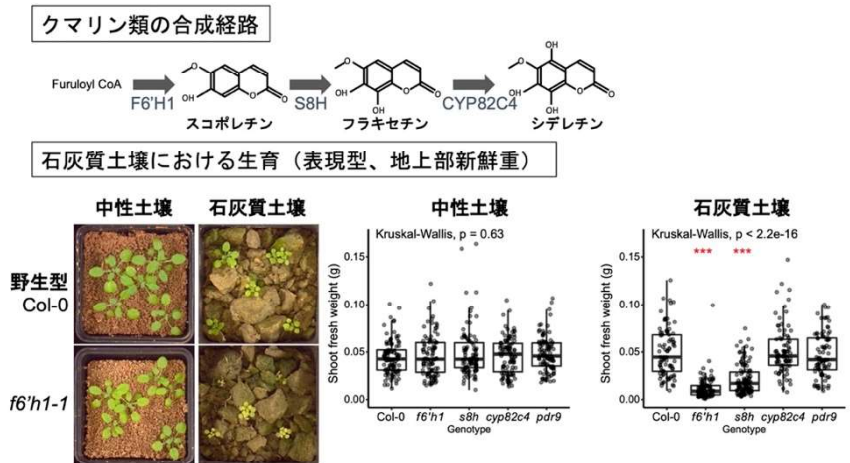


図 1 クマリン類の合成経路とクマリン類関連変異体の石灰質土壌における生育

続いて、それぞれの植物体の根から total DNA を抽出し、細菌の *16S rRNA* 遺伝子をターゲットとした菌叢解析を行なった。その結果、細菌の種数に対応する多様性指数であるアルファ多様性では、変異体間の違いはいずれの土壌においても見出されなかった。他方で、サンプル間の差異を表す多様性指数であるベータ多様性では、石灰質土壌において *f6'h1* および *s8h* 変異体での菌叢構造が野生型 Col-0 植物と有意な差異を示していた (図 2)。さらに、菌叢解析の結果を個々の微生物種のレベルで調べていくと、*f6'h1* 変異体では、他の変異体に比べて存在比が優位に変動する微生物の数が多いことが分かった。その内訳をさらに科レベルで見えていくと、Burkholderiaceae、Rhizobiaceae、Streptomycetaceae に分類されるものが多い傾向が見られた。以上の結果より、F6'H1 と S8H それぞれの酵素により合成されるスコポレチンおよびフラキセチンの合成が、石灰質土壌における植物の生育と根圏マイクロバイオータの群集構造形成に重要であることが示唆された。

16S rRNA遺伝子に基づく菌叢解析

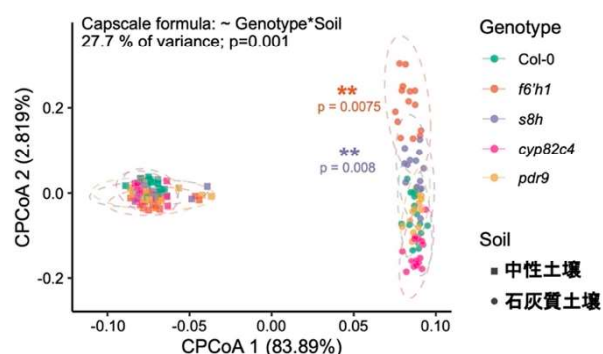


図 2 クマリン類関連変異体における根圏マイクロバイオータの菌叢解析

植物が産生するクマリン類はおよそ 1,300 種類が知られており、そのうちのいくつかは抗菌活性を持つことが示されている (de Souza et al., 2005.)。このことから、根圏マイクロバイオータの群集形成に影響するスコポレチンやフラキセチンが抗菌活性を持つかを調べた。

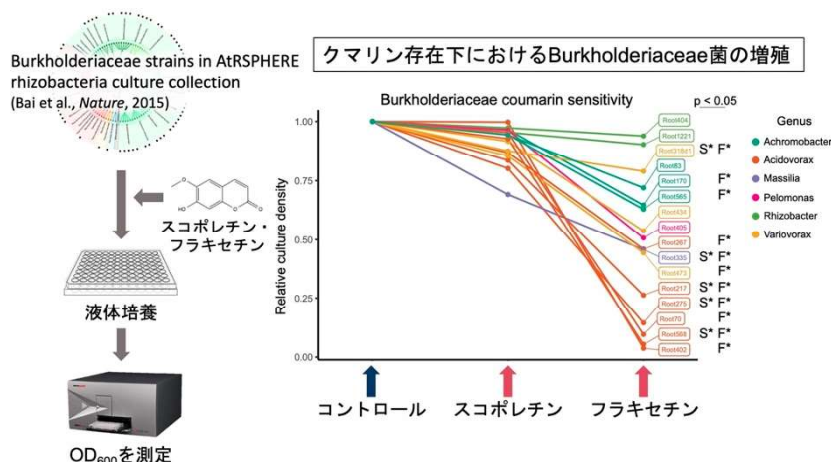


図 3 クマリン類の抗菌活性測定の手順とBurkholderiaceae菌に対する抗菌活性

根圏マイクロバイオータを構成する細菌の網羅的培養コレクション (Bai et al., 2015) から Burkholderiaceae に分類される菌株を選び、スコポレチンもしくはフラキセチンを添加した際の細菌の増殖程度を調べた。その結果、調べた 16 菌株のうち 11 菌株でフラキセチンによる抗菌活性が見られ、さらに 11 菌株のうち 5 菌株ではスコポレチンによる抗菌活性が検出された (図 3)。以上の結果からは、スコポレチンやフラキセチンが示す抗菌活性が、根圏マイクロバイオータの群集構造形成における活性を部分的に説明すると考えられた。

クマリン類による根圏マイクロバイオータの群集形成への関与は、異なる実験系を用いた他の研究によっても支持されている。最初の報告では、通常の栄養条件の培地で生育させた *f6'h1* 変異体を、石灰の混合により人工的にアルカリ性に矯正した土壌に植えかえて、*FRO2* や *IRT1* などの発現上昇が見られる 3 日後のタイミングで菌叢解析をおこなっている (Stringlis et al., 2018)。また、この研究の菌叢解析は *16S rRNA* 遺伝子をマーカーにした方

法ではなく、メタゲノム解析で行っている。また、2番目の研究では、根圏細菌の網羅的培養コレクションから選定した22菌株を、13日間水耕栽培したシロイヌナズナ植物体に接種して1週間後に菌叢解析を行っている (Voges et al., 2019)。いずれの研究も、クマリン類が根圏マイクロバイオータの群集形成に関与することを支持しているが、その活性の程度や差異の見られた菌の種類が実験条件ごとに異なっている。これらのことは、クマリン類を介した植物と根圏マイクロバイオータの相互作用が、根圏マイクロバイオータの種構成や植物の生育段階などによって複雑に変動することを示唆している。

2. クマリンと根圏マイクロバイオータが創発する鉄欠乏条件における植物の生育改善

石灰質土壌において、クマリン類合成を欠損する *f6'h1* 変異体が鉄欠乏症状を伴う生育不良とともに、根圏マイクロバイオータの群集構造の変化を示したことから、鉄欠乏条件において根圏マイクロバイオータがクマリン類に依存して植物の生育に影響する可能性が想定された。

先行研究において、根圏細菌を網羅的に単離した培養コレクションを用いて、根圏マイクロバイオータを人工的に再構成する合成コミュニティ法が開発された (Bai et al., 2015)。合成コミュニティ法では、人工的に再構成した根圏マイクロバイオータを無菌的に生育させた植物体に接種し、非接種コントロールと比較することにより根圏マイクロバイオータの働きを推定することが可能である。

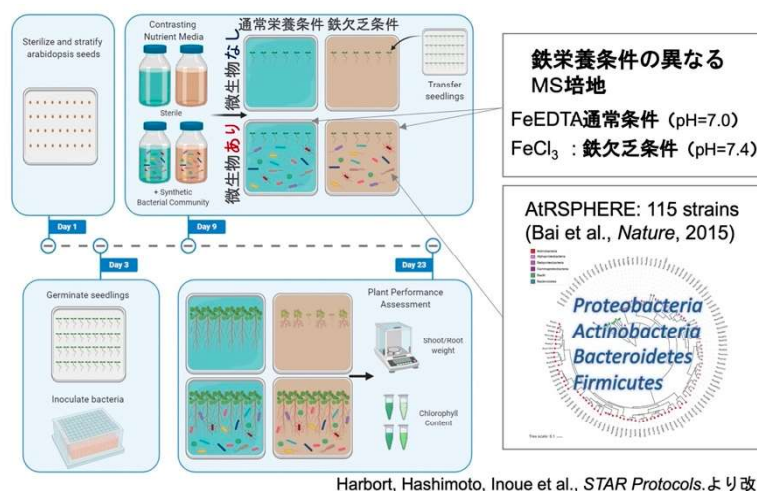


図4 鉄欠乏条件を再現した合成コミュニティ法

合成コミュニティ法を改変し、植物を生育させる培地の鉄栄養条件を変えることにより、鉄欠乏条件における根圏マイクロバイオータの接種による効果を評価することが可能であると考えた (Harbort et al., 2020b; 図4)。

通常の Murashige and Skoog (MS) 培地では鉄栄養として FeEDTA を用いる。他方でアルカリ性の土壌では、三価鉄は不溶化して Fe(OH)₃ が形成される。そこで MS 培地の pH をアルカリ性 (pH=7.4) に調整し、鉄栄養として FeEDTA の代わりに FeCl₃ を加えることで土壌における鉄欠乏条件の再現を試みた。FeCl₃ の形態で添加された三価鉄 Fe³⁺ は、アルカリ性条件で Fe(OH)₃ を形成し不溶化すると考えられる。FeCl₃ を添加した MS 培地と、通常の MS 培地に 115 菌株からなる根圏マイクロバイオータを再構成した合成コミュニティを接種し、野生型 Col-0 植物を2週間生育させた。FeCl₃ を添加した MS 培地では、期待した通り、微生物を接種しない場合に典型的な鉄欠乏症状が観察された。しかし、同じ鉄欠乏培地でも微生物を接種した場合、植物の生育が大きく改善することが分かった (Harbort et al., 2020a.; 図5)。他方で、通常の栄養条件では、微生物接種は植物地上部の生育に大きな影響を与えなかった。さらに、鉄欠乏条件における生育レスキュー活性は、根圏細菌を集団にした場合だけでなく、単一の菌の接種でも観察された。培養コレクションのうち、4つの門

にまたがる 52 菌株について調べたところ、30 菌株で生育レスキュー活性が見られた (図 6)。この結果は、前述の通り根から分泌されるクマリン類が抗菌活性を持つことを考えると意外な結果とも言えるが、根圏マイクロバイオータの接種が、鉄欠乏条件における植物の生育に有益な働きをすることを示唆している。また、個々の細菌菌株による生育レスキュー活性は、幅広い細菌分類群で見つかることから、そのメカニズムにはかなりの多様性があると想像される。

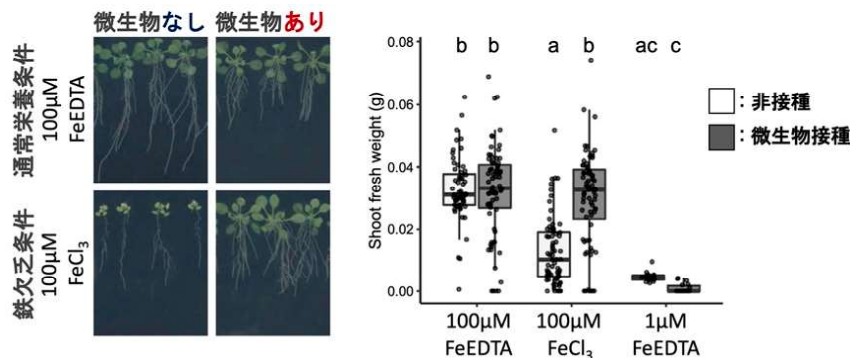


図5 鉄欠乏条件を再現した合成コミュニティ法における生育 (表現型・地上部新鮮重)

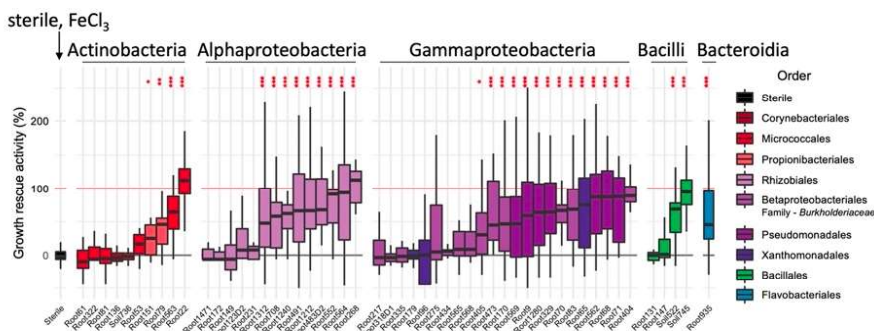


図6 各根圏細菌による鉄欠乏条件の生育レスキュー活性

根圏マイクロバイオータによる生育レスキュー活性が植物側のどのようなシステムに依存するか調べるため、合成コミュニティ法を用いて、植物の鉄吸収機構やクマリン類の合成・分泌のシロイヌナズナ変異体における生育レスキュー活性を調べることにした。まず、シロイヌナズナが持つ Strategy I の鉄吸収機構に関わる三価鉄還元酵素 FRO2、二価鉄トランスポーターIRT1、根圏の酸性化を担うプロトンポンプ AHA2 などの欠損変異体を用いた。その結果、*aha2* 変異体では野生型 Col-0 植物と同様の生育レスキュー活性が見られたのに対して、*fro2* 変異体および *irt1* 変異体では生育レスキュー活性が見られなかった (図 7)。このことから、根圏マイクロバイオータによる生育レスキュー活性には、植物が持つ三価鉄の還元による吸収機構が必要であることが示唆された。

続いて、クマリン類の合成・分泌の変異体における生育レスキュー活性を調べたところ、*f6'h1* 変異体と

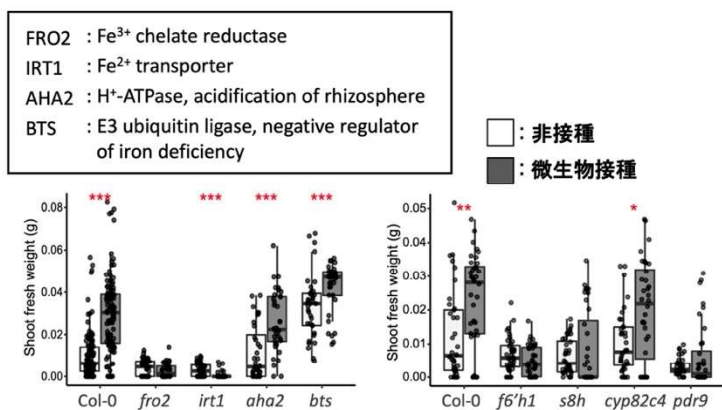


図7 各種変異植物体における鉄欠乏条件の生育レスキュー活性

s8h 変異体で生育レスキュー活性が失われた (図 7)。この結果は、前述の石灰質土壌における生育の結果と一致していた。また、地上部における鉄元素の蓄積量を ICP-MS により測定した。鉄欠乏条件における微生物の接種は野生型 Col-0 植物においては鉄蓄積量を増加させるのに対して、生育不良を起こす *f6'h1* 変異体において鉄蓄積量は低いままであったため、生育レスキュー活性は鉄栄養吸収が改善したためであることが確認された。

これらの結果から、クマリン類のうちスコポレチンとフラキセチンのいずれかが生育レスキュー活性に必要であると予想されたため、鉄欠乏条件で *f6'h1* 変異体に対してスコポレチンもしくはフラキセチンを添加する実験を行った。その結果、スコポレチンとフラキセチンのいずれも単独で処理した場合には植物の生育にほとんど変化が見られなかったが、フラキセチンを微生物接種と同時に添加した場合にのみ、*f6'h1* 変異体で生育レスキュー活性が観察された (図 8)。これらの結果は、クマリン類のうちフラキセチンが根圏マイクロバイオータによる生育レスキュー活性に必要であることを示している。

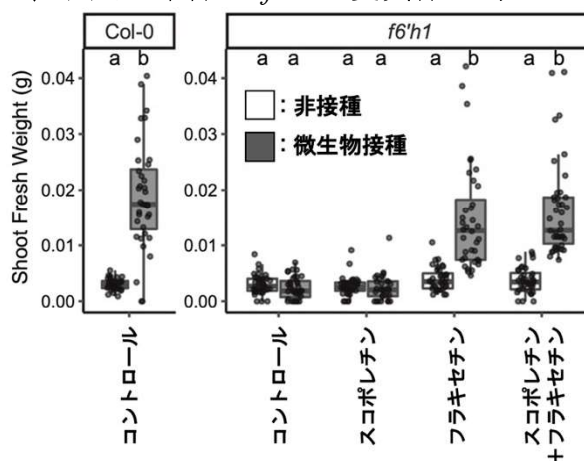


図 8 クマリン添加による生育レスキュー活性の再構成

根圏マイクロバイオータが鉄欠乏条件で植物に生育レスキュー活性を示すメカニズムとして、フラキセチンが根圏マイクロバイオータに作用した後に、根圏マイクロバイオータが植物の鉄欠乏応答を活性化しているか、もしくは根圏マイクロバイオータが不溶態鉄に作用し植物に吸収しやすくするか、いずれかの可能性が考えられた。これらの可能性を検証するため、鉄欠乏条件の合成コミュニティ法で生育させた植物体の応答を RNA-seq により調べることにした。はじめに主成分分析により各サンプル間の差異をプロットしたところ、鉄栄養の状態がサンプル間の差異を生じる最も大きな要因であり、微生物接種の有無が次に大きな要因であることが示唆された (図 9)。それぞれの試験区を比較すると、通常栄養条件では野生型 Col-0 植物と *f6'h1* 変異体がクラスタリングし、微生物を接種するとともにいずれの遺伝型でも異なるクラスターを形成した。鉄欠乏条件では、微生物を接種しない場合に通常栄養条件とは異なるクラスターを形成し、さらに遺伝型間の違いも顕著に見られた。さらに、微生物を接種すると遺伝型による違いはさらに顕著に現れた。すなわち、鉄欠乏条件で微生物を接種した場合、野生型 Col-0 植物は、通常栄養条件で微生物を接種した野生型 Col-0 植物および *f6'h1* 変異体とクラスタリングしたのに対して、*f6'h1* 変異体は他のいずれの試験区とも異なるクラスターを形成した。

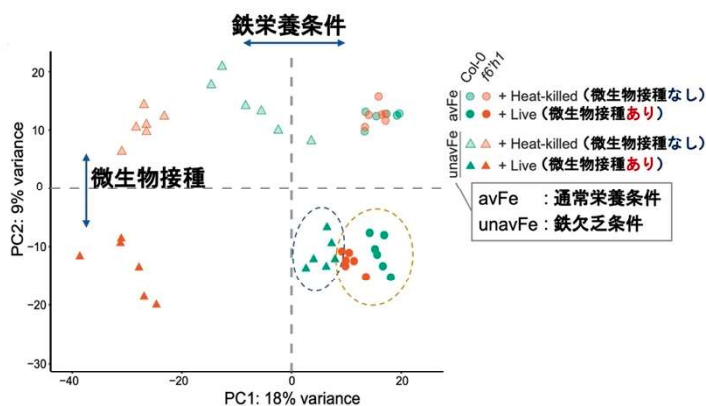


図 9 RNA-seqの主成分分析

続いて、植物の応答がどのような性質を持つかを調べるため、発現量に差異があった遺伝子群（differentially expressed genes: DEGs）を求め、k 平均法によりクラスタリングを行った。その結果、2,440 個の DEGs が発現量のパターンにより 10 個のクラスターに分類された。そのなかで、Cluster 4 には *FRO2*、*IRT1*、*MYB72* 遺伝子などの鉄欠乏応答に関わる遺伝子が有意に多く分類されることが分かった。Cluster 4 の遺伝子は、通常栄養条件では転写量はほぼ規定状態であるが、鉄欠乏条件においては生育不良を示す野生型 Col-0 植物で発現量が上昇し、発現量の上昇は微生物の接種により緩和された（図 10）。他方で、鉄欠乏条件における *f6'h1* 変異体では、微生物接種の有無によらず発現量は上昇する傾向が見られた。これらの結果から、野生型 Col-0 植物における根圏マイクロバイオータによる生育レスキュー活性は、微生物群集によって植物の鉄欠乏応答が活性化されるのではなく、むしろ微生物群集が不溶態鉄の可溶化に寄与することが原因であると推定された。

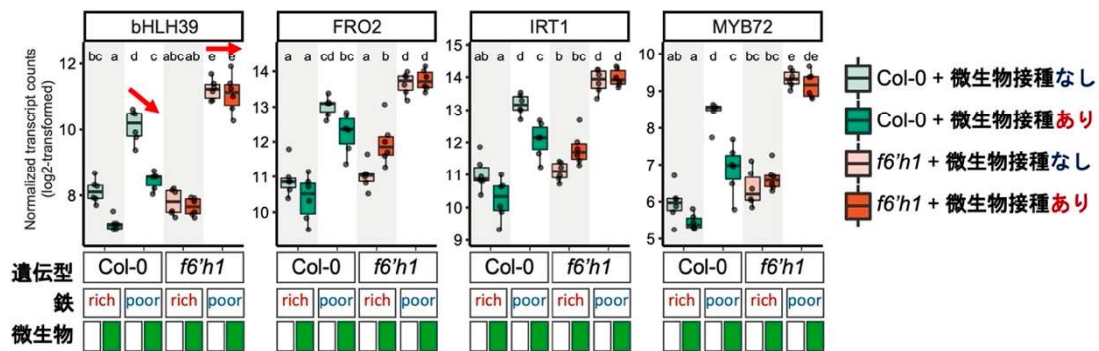


図10 cluster 4に分類される鉄欠乏応答遺伝子の発現量変動

おわりに

本研究により、植物二次代謝産物であるクマリン類を介した植物と根圏マイクロバイオータの相互作用とその機能の一端が明らかになった。クマリンが根圏マイクロバイオータにどのように作用し、その機能をどのように引き出しているのか詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。さらに植物が合成する二次代謝産物に視野を広げると、クマリン類だけでも 1,300 種類以上存在すると言われ、クマリンのように抗菌活性を持つものの数多く存在している。実際に、これまでにクマリン以外にもいくつかの二次代謝産物が根圏マイクロバイオータの群集形成に関与することが示されている（Koprivova and Kopriva, 2022）。しかしこれらの二次代謝産物の作用がどのように根圏マイクロバイオータの機能性に影響するのかはほとんどわかっていない。このような二次代謝産物と根圏マイクロバイオータの相互作用を深く理解することにより、根圏マイクロバイオータの機能を利用した農法や肥料などの開発が可能なのではないかと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究は、主にマックスプランク植物育種学研究所の Paul Schulze-Lefert 研究室で行われたものである。また、本研究の遂行にあたって独立行政法人日本学術振興会の支援をいただいた（科研費基盤研究 C: 15J04093、特別研究員 PD: 20K05955）。

引用文献

- Ahuja I., Kissen R., Bones AM. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Sciences*. 17, 73-90, 2012.
- Bai Y., Müller DB., Srinivas G., Garrido-Oter R., Potthoff E., Rott M., Dombrowski N., Münch PC., Spaepen S., Remus-Emsermann M., Hüttel B., McHardy AC., Vorholt JA., Schulze-Lefert P. Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature*. 528(7582), 364-369, 2015.
- Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review in Plant Biology*. 64, 807-38, 2013.
- de Souza SM., Monache FD., Smânia Jr A. Antibacterial activity of coumarins. *Zeitschrift für Naturforschung C, A Journal of Biosciences*. 60, 693-700, 2005.
- Harbort CJ.*, Hashimoto M.*, Inoue H., Niu Y., Guan R., Rombolà AD., Kopriva S., Voges MJEEE, Sattely ES., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P. Root-secreted coumarins and the microbiota interact to improve iron nutrition in *Arabidopsis*. *Cell Host & Microbe*. 28(6), 825-837, 2020a. *: equal contribution.
- Harbort CJ.*, Hashimoto M.*, Inoue H.*, Schulze-Lefert P. A gnotobiotic growth assay for *Arabidopsis* root microbiota reconstitution under iron limitation. *STAR protocols*. 1 (3), 100226, 2020b. *: equal contribution.
- Kobayashi T., Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review in Plant Biology*. 63, 131-152, 2012.
- Koprivova A., Kopriva S. Plant secondary metabolites altering root microbiome composition and function. *Current Opinion in Plant Biology*. 67, 102227, 2022.
- Pieterse CMJ., Berendsen RL, de Jonge R, Stringlis IA, Van Dijken AJH, Van Pelt JA, Van Wees SCM., Yu K., Zamioudis C., Bakker PAHM. *Pseudomonas simiae* WCS417: star track of a model beneficial rhizobacterium. *Plant and Soil*. 461, 245–263, 2021.
- Rajniak J., Giehl RFH., Chang E., Murgia I., von Wirén N., Sattely ES. Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nature Chemical Biology*. 14(5), 442-450, 2018.
- Schmid NB., Giehl RFH., Döll S., Mock HP., Strehmel N., Scheel D., Kong X., Hider RC., von Wirén N. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 164(1), 160-172, 2014.
- Stringlis IA., Yu K., Feussner K., de Jonge R., Bentum SV., Van Verk MC., Berendsen RL., Bakker PAHM., Feussner I., Pieterse CMJ. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115, E5213-E5222, 2018.
- Verbon EH., Trapet PL., Stringlis IA., Kruijs S., Bakker PAHM., Pieterse CMJ. Iron and Immunity. *Annual Review in Phytopathology*. 55, 355-375, 2017.
- Voges MJEEE., Bai Y., Schulze-Lefert P., Sattely ES. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116, 12558-12565, 2019.
- Zamioudis C., Korteland J., Van Pelt JA., van Hamersveld M., Dombrowski N., Bai Y., Hanson J., Van Verk MC, Ling HQ, Schulze-Lefert P., Pieterse CMJ. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-

deficiency responses. *The Plant Journal*. 84(2), 309-322, 2015.

Ziegler J., Schmidt S., Strehmel N., Scheel D., Abel S. Arabidopsis Transporter ABCG37/PDR9 contributes primarily highly oxygenated Coumarins to Root Exudation. *Scientific Reports*. 7(1), 3704, 2017.

植物病原糸状菌ウイルスのライフスタイル多様性

佐藤有希代^{*,†}・近藤秀樹^{*}・鈴木信弘^{*}

Sato, Y., Kondo, H., and Suzuki, N.

The diversity of virus lifestyles in phytopathogenic filamentous fungi.

Abstract

Studies of viruses in phytopathogenic fungi provide their agricultural significance as potential virocontrol agents and interesting insights into eukaryotic virus macroevolution. We have discovered various novel viruses from phytopathogenic filamentous fungi collected from different overseas areas in cooperation with international collaborators. Here, we introduce the diversity of these viruses in terms of the three aspects: 1) molecular properties, 2) virus-virus relationships, and 3) susceptibility to antiviral defense. In the first topic, we discuss the recently discovered capsidless multi-segmented RNA viruses, namely polmycoviruses, hadakaviruses, and splipalmiviruses, from the viewpoint of how peculiar lifestyles they show compared with known viruses. In the second topic, we describe the diverse symbiotic/parasitic relationships between yadokariviruses and partner double-stranded RNA viruses, which have potentially negative/positive impacts on host phytopathogenic fungi. The third topic is related to a newly recognized antiviral mechanism, termed “Argonaute-independent antiviral RNA interference (RNAi)” found in a model filamentous host fungus, *Cryphonectria parasitica*. Our recent study shows that Dicer alone without Argonaute can block some RNA viruses. Through these various topics, we will provide an overview of recent research progresses and future research questions in the mycovirology field that may supply insights into plant infection physiology.

Key words: virus diversity, mycoviruses (fungal viruses), phytopathogenic fungi, neo-virology, multi-segmented RNA virus, capsidless, virus-virus interaction, virus-host interaction, three-way interaction, antiviral RNA interference

* 岡山大学 資源植物科学研究所 Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki, Okayama, 710-0046, JAPAN

† Present Address: ケルン大学 植物科学研究所 Institute for Plant Science, University of Cologne, AG Thomma, Zùlpicher Str. 47b, 50674 Köln, GERMANY

はじめに

菌類ウイルス (マイコウイルス) の多様性や宿主との相互作用を紐解くことは、「病原糸状菌の生理・生態に影響を及ぼしうる要因」や「真核生物ウイルスの多様性・進化」を理解する上で重要である。我々の研究グループはそれらの理解への貢献を目指して、植物病原糸状菌に感染するウイルスを対象として研究を展開してきた。これまでに、世界各国の研究者と協力して、多種の菌株から新しい生態を持つ様々なウイルスを見出してきた。本稿では、菌類ウイルスの研究動向を概説した後、我々が見出してきた菌類ウイルスの新奇ライフスタイルについて、「ウイルス分子性状の多様性」、「ウイルス間の共生・寄生関係の多様性」、「宿主菌とウイルス間の攻防の多様性」という3題に分けてご紹介したい。

1. マイコウイルスの研究意義・動向

マイコウイルスは、植物や動物に病気を引き起こす真菌類の感染生理に多様な影響を及ぼすことが明らかにされている (Kotta-Loizou, 2021)。農学的には、植物病原性真菌や、植物害虫の天敵となる昆虫病原性真菌を制御する手段の一つとして有力視されている。実際に、菌類ウイルス [Cryphonectria parasitica hypovirus 1 (CHV1)] を利用してクリ胴枯病からクリ樹木を防除してきた海外の事例もある (Rigling and Prospero, 2018)。生物農薬として利用するためだけでなく、植物病害の発生生態に影響する要因を把握するためにも、植物圏に存在する菌類ウイルスの挙動を明らかにしていくことは重要と考えられる。

菌類ウイルスの探索は、主に RNA ウイルスをターゲットとして、宿主菌に蓄積するウイルス由来 2 本鎖 RNA (dsRNA、セルロースカラムにより精製できる) を指標に行われてきた。しかし本法では、dsRNA をあまり蓄積しない RNA ウイルスや、DNA ウイルスは見落とされてしまう。そこで次世代シーケンサーの普及以降は、宿主菌の RNA-seq 解析により感染ウイルスを探索する方法が主流になってきた。近年では、公共の菌類トランスクリプトームデータからのウイルス探索も盛んに行われており、例えば 1-2 割前後もの菌類由来のデータセットからウイルスが検出されたとの報告がある (Gilbert et al., 2019; Myers et al., 2020)。これらの方法を経て現在までに見つかった菌類ウイルスの大多数は RNA をゲノムとするウイルスである (Kondo et al., 2022)。

RNA ウイルスは、全て類縁の複製酵素 [RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) または reverse transcriptase] を有しており、単一の進化的起源を持っていると考えられている (Wolf et al., 2018)。菌類ウイルスは、動植物ウイルスに比べて研究の歴史は浅いものの (Ghabrial et al., 2015)、近年は真核生物 RNA ウイルスの進化学上のギャップを埋める存在としても注目されている。本稿では、我々が植物病原糸状菌から見出した、RNA ウイルスの新奇ライフスタイルや、真核生物抗ウイルス機構の新たな側面についてご紹介する。

2. ウイルス分子性状の多様性

～多分節型 RNA ゲノムを持つキャプシドレスウイルス～

環境中に潜む未知のウイルスを探索する上で、「ウイルスとは何か (ウイルスの実態)」を把握することは重要である。Wikipedia には『ウイルスは、他生物の細胞を利用して自己を複製させる、極微小な感染性の構造体で、タンパク質の殻とその内部に入っている核酸

からなる。』と記載されているが (ja.wikipedia.org/wiki/ウイルス、2022年6月参照)、本定義は現状正確ではない。すなわち、タンパク質の殻「キャプシド」を持たない (キャプシドレス) ウイルスが、特に菌類から、分子系統上独立に多数見つかってきている (図1)。キャプシドレスウイルスのうち、非分節型のゲノムRNAを持つもの (マイトウイルス、ナルナウイルス、ハイポウイルス、エンドルナウイルス) は古くから知られていたが、分節型のもの は比較的近年になってから発見されてきた。本章では、多分節型 RNA ゲノムを持つキャプシドレスウイルスについて取り上げる。

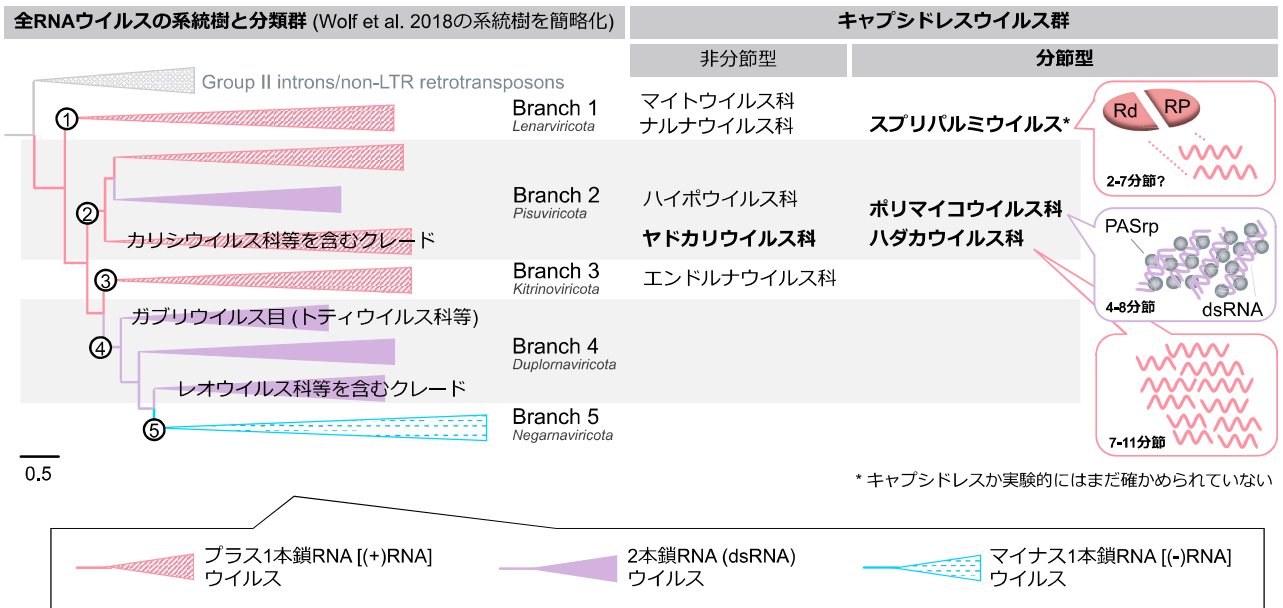


図1 全 RNA ウイルスの RdRP 分子系統樹から見たキャプシドレスウイルス群の位置付け

多分節型 RNA ゲノムを持つキャプシドレスウイルス発見の先駆けとなったのは、「ポリマイコウイルス」である (Kanhayuwa et al., 2015)。現在までに、4分節から8分節のウイルス種が様々な菌類宿主から見つかっており、宿主菌に多様な影響を及ぼすことが報告されている (Kotta-Loizou et al., 2022)。本ウイルス群は、球状粒子構造を持つ通常の dsRNA ウイルスとは異なり、Proline-Alanine-Serine rich protein (PASrp) と呼ばれるウイルスタンパク質をゲノム dsRNA にまとったコロイド状の不定形構造 (半キャプシドレス構造)、あるいはひも状の粒子構造とる奇妙なウイルスとして知られている (Jia et al., 2017; Kanhayuwa et al., 2015)。我々は、パキスタン産のペニシリウム属菌 (*Penicillium janthinellum*) から5分節の新規ポリマイコウイルス (*Penicillium janthinellum* polymycovirus 1) を見出し、本ウイルスの PASrp-dsRNA 複合体が、幅広い浮遊密度を示す不定形構造体であること、ならびに RNA 分解酵素に耐性を示すことを明らかにした (Sato et al., 2020b, 2020a)。

我々は、ポリマイコウイルスに近縁でありながら、さらに新しい特性を持つ「ハダカウイルス」を発見した (Sato et al., 2020b)。最初のハダカウイルス、hadaka virus 1 (HadV1) は、パキスタンのフザリウム萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*) から見出された。HadV1 が持つ11本のゲノム RNA 分節のうち、3本はポリマイコウイルスの保存ゲノム分節に相同であったが、PASrp やキャプシドタンパク質 (CP) をコードする分節は見出されなかった。そのため

HadV1 は、汎用的なウイルス精製法である超遠心分離法により沈降せず、菌糸磨砕液中で RNA 分解酵素に感受性であるという、既知の粒子性ウイルスやポリマイコウイルスと全く異なる性状を示した (Sato et al., 2020b)。HadV1 と同様の特性を持つ近縁ウイルスは、パキスタンの別種のフザリウム属菌 (*Fusarium nygamai*) や (Khan et al., 2021)、中国の果樹病原性コレトトリカム属菌 (*Colletotrichum fructicola*) からも見出されている (Fu et al., 2022)。これら近縁ウイルスのゲノム分節数はそれぞれ 10 本と 7 本であり、ポリマイコウイルスと同様のゲノム分節数の柔軟性が窺える。ハダカウイルスが、キャプシドや PASrp なしでどうやって複数のゲノム RNA 分節を保護・維持しているのかは、今後解明が待たれる。

ポリマイコウイルスやハダカウイルスとは異なる分子系統に属する、もう一つの多分節型キャプシドレスウイルス群として、「スプリパルミウイルス」が挙げられる (図 1)。スプリパルミウイルスは、RdRP を 2 本のゲノム分節に分割してコードするという、常識外れの性質を示す RNA ウイルスとして 2020 年に初めて報告された (Chiba et al., 2021a, 2021b; Sutela et al., 2020)。これまでに、2 分節から 7 分節のゲノム RNA が見出されているが (Jia et al., 2021; Sutela et al., 2020)、CP をコードする分節は同定されておらずキャプシドレスである可能性が示唆されている。我々は、ポルトガル産の *Cryphonectria* 属菌 (*Cryphonectria naterciae*) から 4 分節型のスプリパルミウイルス (*Cryphonectria naterciae splipalmivirus 1*, CnSpV1) を見出し、本ウイルスの 4 本全てのゲノム分節が常に一体として垂直・水平伝搬することを明らかにした。このことから、スプリパルミウイルスも多分節ゲノムを維持する何らかの機構を持っていると考えられ、今後の解明が待たれる。また、逆遺伝学系の確立による分割型 RdRP の再構成実験や、RdRP 分割意義の解明も待たれるところである。

多分節型 RNA ゲノムを持つキャプシドレスウイルスは、これまでに真菌分離株か、卵菌関連環境試料からしか見つかっていない。これまで、10 分節前後のゲノム RNA を持つウイルス [動物感染性のインフルエンザウイルス (8 分節) やレオウイルス (~12 分節) など] は、全てのゲノム分節を一つの粒子に包含すると考えられてきた (Varsani et al., 2018)。本戦略は、動植物ウイルスの場合など、ウイルスが生活環の中で細胞外に出て複数の宿主個体間で伝搬される感染ステージを持つ場合には合理的と思われる。一方で菌類ウイルスの場合には、宿主菌の孢子形成 (細胞分裂) による垂直伝搬や、宿主菌株間の細胞融合による水平伝搬により、宿主細胞内のみで感染サイクルを完結できることが知られている (Nuss, 2005)。こういった、ウイルスが細胞外ステージを持たずに済む宿主環境が、キャプシドなしで多分節ゲノムを維持する新規ライフスタイルの成立を支えてきたのかもしれない。

3. ウイルス間の共生・寄生関係の多様性

～ヤドカリウイルスと多様な dsRNA ウイルスのパートナーシップ～

菌類は、しばしば複数のウイルスに混合感染していることが知られている。そのため、ウイルスによる宿主菌への影響を理解する上で、ウイルス間の相互作用機構を理解することは不可欠である。現在までに、いくつかのマイコウイルスの組み合わせでその研究が進められてきたが (Hillman et al., 2018)、本稿では、我々が明らかにしてきた新奇のウイルス間相互作用、すなわちヤドカリウイルスと dsRNA ウイルス間の共生・寄生関係についてご紹介したい。本ウイルス間相互作用は、果樹病原性の日本産白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*)

から単離された yado-kari virus 1 (YkV1) と yado-nushi virus 1 (YnV1) において発見された (Zhang et al., 2016)。菌類には多様なキャプシドレスウイルスが存在することを既に述べたが、YkV1 もその一例である。YkV1 は非分節型ゲノムに、カリシウイルス科(+)-RNA ウィルス様の RdRP をコードする。一方で YnV1 は、自身の CP を持つ非分節型 dsRNA ウィルスであり、YkV1 とは全く異なる分子系統群 [ガブリウィルス目 (図 1) のヤドヌシウィルス科、未提案新科] に属している。YkV1 は、YnV1 なしでは複製できず、YnV1 のキャプシド内で自身の RdRP を使って複製することが示唆されている (Das et al., 2021; Zhang et al., 2016)。一般的に、(+)-鎖 RNA ウィルスは宿主生体膜上、dsRNA ウィルスはウィルス粒子内で複製することが知られている。それに対して YkV1 は、(+)-RNA ウィルスの系統にありながら、dsRNA ウィルスのキャプシドを乗っ取って、あたかも dsRNA ウィルスであるかのように振る舞う進化学的に奇妙なウィルスと捉えられている (Hisano et al., 2018)。

現在までに、YkV1 と近縁なキャプシドレスウィルス (ヤドカリウィルス科のメンバー) が、多様な子のう菌から十種以上見出されている。しかし、これらのウィルス (ヤドカリウィルス) が、YkV1 のようにキャプシドドナーとなるパートナー dsRNA ウィルスを必要とするのか否かは明らかではなかった。そこで、スペイン産白紋羽病菌から見出された新規ヤドカリウィルスである YkV3 と YkV4、ならびに、それらと共感染していた複数の dsRNA ウィルス (YnV1 とは異なるガブリウィルス目のウィルス科に属していた) に注目した (Arjona-Lopez et al., 2018)。日本産白紋羽病菌 W97 系統に YkV3 と YkV4 の感染性 cDNA をそれぞれ導入し、各パートナーウィルス候補を感染させた。その結果、YkV3 と YkV4 は、それぞれメガビルナウィルス科の *Rosellinia necatrix megabirnavirus 3* (RnMBV3)、またはメガトティウィルス科 (未提案新科) の *Rosellinia necatrix megatotivirus 1* (RnMTV1) と共存する場合にそれぞれ複製し、パートナー非存在下では複製しないことが明らかとなった。さらに、ヤドカリウィルス (YkV1・YkV3・YkV4) とパートナー dsRNA ウィルス (YnV1・RnMBV3・RnMTV1) のペアは、前記の組合せ以外では交換できないことが確認された。よって、ヤドカリウィルス科のウィルスは、ガブリウィルス目の多様な dsRNA ウィルスのうち 3 科に属する特定種をパートナーとすることが示唆された。各ウィルスの系統関係とパートナーシップの特異性には相関は認められなかった (図 2)。

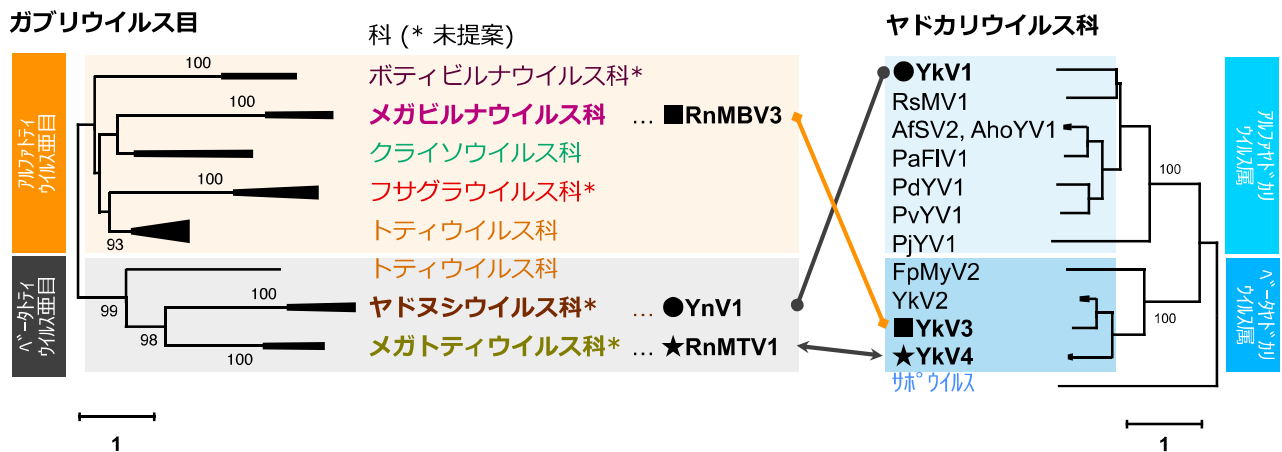


図 2 ヤドカリウィルスとパートナー dsRNA ウィルスの RdRP 分子系統樹 (最尤法) の対比較

次にヤドカリウイルスがパートナーdsRNA ウイルスの複製ならびに宿主糸状菌の生育に及ぼす影響を検討した。YnV1 は YkV1 にキャプシドを提供する一方で、YkV1 は YnV1 の複製量を増やすことから、YkV1 と YnV1 は相利共生的な関係を結んでいることが示唆されている (Zhang et al., 2016)。YkV1 の宿主白紋羽病菌に対する直接的な影響は明らかではないが、YnV1 との共存下で、宿主菌の培地上での生育に抑制的に働くことが示唆されている (Yaegashi et al., 2013)。我々は、新たに YkV3-RnMBV3 ペアと YkV4-RnMTV1 ペアについて検討した (図 3)。YkV3 は、パートナーウイルス RnMBV3 の蓄積量に影響を与えなかった。また RnMBV3 は、YkV3 の存在の有無にかかわらず、培地上での白紋羽病菌 W97 系統の生育に影響を与えなかった。対照的に YkV4 は、パートナーウイルス RnMTV1 の蓄積量を減らした。RnMTV1 は、単独感染下では W97 系統の生育を抑制したが、YkV4 との共感染下では同系統の生育に影響を与えなかった。すなわち YkV4 は、パートナーdsRNA ウィルスにとってはマイナス (寄生的) であるが、宿主菌にとっては dsRNA ウィルスの病徴を軽減する共生的な存在であることが見出された。以上のように、ヤドカリウイルスとパートナーdsRNA ウィルス・宿主菌の関係は三者三様であり、パートナーdsRNA ウィルス・宿主菌いずれの視点から捉えるかにより、共生性にも寄生性にも変わりうるが見出された。今後の研究課題として、ヤドカリウイルスとパートナーdsRNA ウィルス間のパートナーシップの特異性や、共生性・寄生性の決定機構に興味を持たれる。

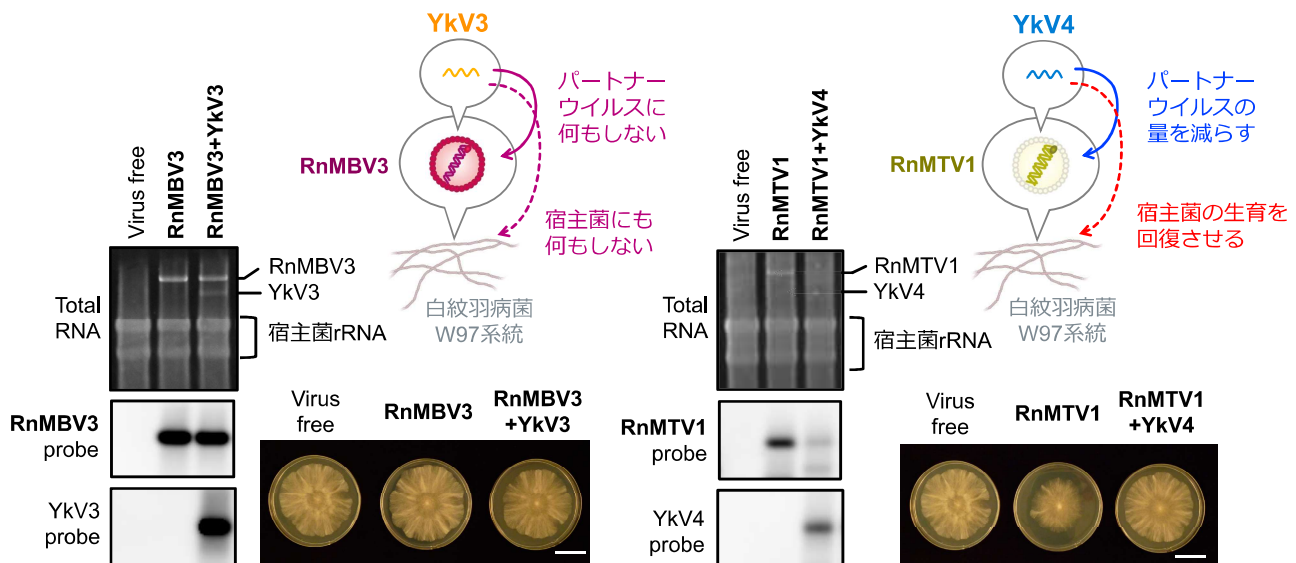


図 3 YkV3 と YkV4 がパートナーウイルスの蓄積量や宿主菌の生育に与える影響

4. 宿主菌とウイルス間の攻防の多様性

～抗ウイルス RNA 干渉機構における Argonaute の必要性の有無～

我々は、比較免疫学的な重要性から、糸状菌の抗ウイルス防御機構についても研究を進めてきた。抗ウイルス機構の中でも、広範な真核生物において保存される RNA 干渉 (RNAi、RNA サイレンシング) 機構に注目してきた (tenOever, 2016) (図 4A)。RNAi 機構の要を担う酵素として Dicer と Argonaute が挙げられる。Dicer は、dsRNA や、高次構造をとった 1 本

鎖 RNA を切断して、小分子 RNA 前駆体を生成する。Argonaute は、RNA-induced Silencing Complex 内において、1 本鎖小分子 RNA を取り込み、その相補配列を持つ標的 1 本鎖 RNA の分解または翻訳抑制を行う。ここで疑問とされてきたのが、もし Dicer が標的のウイルス dsRNA (ゲノム・複製中間体) を十分切断している場合、下流の Argonaute は必須かということである (Pumplin and Voinnet, 2013)。この疑問は、Argonaute 破壊変異体が致死となる動植物では解決されてこなかった。そこで我々は、クリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) では Argonaute が生存に必須ではないことに注目し (Sun et al., 2009)、本菌を用いて課題解決に取り組んできた。

クリ胴枯病菌のゲノムには、Dicer 様タンパク質 (Dicer-like protein, DCL) が 2 遺伝子座 (*dcl1*・*dcl2*)、Argonaute 様タンパク質 (Argonaute-like protein, AGL) が 4 遺伝子座 (*agl1*・*agl2*・*agl3*・*agl4*) にコードされる。このうち *dcl2* と *agl2* が、dsRNA 蓄積に応じて発現上昇を示し、モデルウイルス CHV1 [ハイポウイルス科の非分節型(+)RNA ウィルス] (図 5) に対する抵抗性に寄与していることが明らかにされている (Segers et al., 2007; Sun et al., 2009)。しかしながら、異種宿主菌由来のトテイウイルス科の非分節型 dsRNA ウィルス *Rosellinia necatrix victorivirus 1* (RnVV1) (図 5) は、*dcl2* を過剰発現するクリ胴枯病菌から、*agl2* 非依存的に排除されることが知られていた (Chiba and Suzuki, 2015)。そこで本研究では、RnVV1 に対する防御機構に、他の *agl* 遺伝子が寄与しているのか、それとも Dicer のみで成立する防御機構が働いているのか、遺伝学的に明らかにすることを目指した。

クリ胴枯病菌の DK80 系統 [*ku80* 遺伝子欠損株 (Lan et al., 2008)] を遺伝的背景として、*dcl2*・*agl1*・*agl2*・*agl3*・*agl4* の単独および多重破壊株を作製した。これら遺伝子破壊株は、培地上・ウィルス非接種下で、DK80 菌株と同等の健全な生育を示した。ウィルス接種下でのウィルス RNA 蓄積量を比較した結果、CHV1 接種株については、先行研究と同様に *dcl2* 欠損または *agl2* 欠損を持つ変異体においてウィルス RNA が増加した。対照的に、RnVV1 接種株については、*dcl2* 欠損株でウィルス RNA が顕著に増加する一方で、いずれの *agl* 欠損株 (4 遺伝子の単独破壊株および多重破壊株) も、DK80 系統と同等の極めて低いウィルス RNA 蓄積量しか示さなかった。さらに、他のウィルスでも調べたところ、レオウィルス科の 12 分節 dsRNA ウィルスである mycoreovirus 2 (MyRV2) (図 5) が、RnVV1 と同様の傾向を示すことが見出された。一方で MyRV2 と同属異種の関係にある mycoreovirus 1 (MyRV1) (図 5) は、MyRV2 とは異なり、DK80 系統に顕著に蓄積し、*dcl2*・*agl* 欠損株で顕著なウィルス蓄積上昇を示さなかった。以上のことから、クリ胴枯病菌は、Dicer のみの働きで、すなわち「Argonaute 不要の抗ウィルス RNAi 機構」(図 4B) によって、RnVV1 や

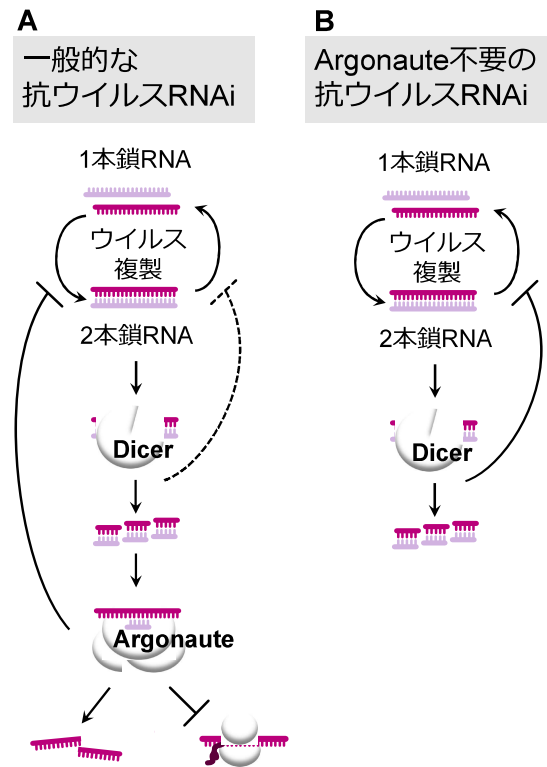


図 4 抗ウィルス RNAi の二面性

MyRV2 を抑制していることが示唆された。今後の研究課題として、Argonaute の寄与がウイルス間で異なるメカニズムに興味を持たれる。例えば、本菌の Dicer に対する感受性の高低により、Argonaute 関与の有無が分かれる可能性を考えている (図 5)。


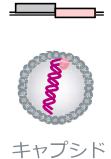
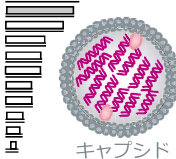


ゲノム	(+)RNA		dsRNA	
科	ハイポウイルス科	トティウイルス科	レオウイルス科	
ウイルス名	CHV1 (<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>)	RnVV1 (<i>Rosellinia necatrix victorivirus 1</i>)	MyRV1 (mycoreovirus 1)	MyRV2 (mycoreovirus 2)
ゲノム構成 と形態	 宿主脂質膜	 キャプシド	 キャプシド	 キャプシド
				
自然宿主	クリ桐枯病菌 EP713系統	白紋羽病菌 W1029系統	クリ桐枯病菌 9B21系統	クリ桐枯病菌 C18系統
DK80における Dicer感受性	高	低	高	低

図 5 抗ウイルス RNAi 研究に用いたウイルスの性状比較

おわりに

以上のように我々は、様々な植物病原糸状菌とウイルスを材料に、菌類ウイルスのライフスタイルを多角的に捉えることを目指してきた。今後の大局的な研究目標としては、菌類ウイルスが農業生態系や環境中で担う役割について、包括的・体系的に理解を進めることが挙げられる。まず、この数年であっても菌類からは未だ新規ウイルスが続々と見つかっていることから、第 2 節で示したような、菌類のヴァイロームを解明する研究が今後も必要と考えられる。さらに、個々のウイルス研究はもちろんのこと、第 3 節で示したような、ウイルス-ウイルス間相互作用の研究を幅広く展開していく必要もある。さらに、第 4 節において抗ウイルス RNAi 機構の研究例で示したように、宿主菌とウイルスの相互作用機構についても深く掘り下げていく必要がある。将来的には、上記研究の統合的理解に加え、ウイルス・宿主菌間の相互作用にとどまらず、ウイルス・宿主菌・植物間の多層性相互作用を捉える研究視点も必要となることだろう。

謝辞

本稿に記載した各研究は、Wajecha Shamsi 博士 [National University of Sciences & Technology (NUST)、パキスタン；現所属 Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research (Wald, Schnee und Landschaft, WSL)、スイス]、Haris A. Khan 氏 (NUST)、Atif Jamal 博士 (National Agricultural Research Centre、パキスタン)、Muhammad F. Bhatti 博士 (NUST)、Carolina Cornejo 博士 (WSL)、Daniel Rigling 博士 (WSL)、Sabitree Shahi 博士 [岡山大学資源植物科学研究所 (IPSR)]、Paul Telengech 博士 (IPSR)、久野昌氏 (IPSR)、Carlos López Herrera 博士 (Spanish National Research Council、スペイン) 各位と共同で行いました。また、千葉壮太郎博士 (名古屋大学)、松崎聖史博士 (愛知県農業総合試験場)、兼松聡子博士 [国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO)]、佐々木厚子博士 (NARO)、Donald L. Nuss 博士 (University of Maryland、アメリカ)、Bradley

I. Hillman 博士 (Rutgers, The State University of New Jersey、アメリカ)、本田信治博士 (福井大学)、山田晃嗣博士 (徳島大学) から、研究材料または研究技術情報をご提供いただきました。また本研究は、日本学術振興会特別研究員事業 (特別研究員 PD) および科学研究費助成事業 (特別研究員奨励費および新学術領域研究「ネオウイルス学：生命の源流から超個体、そしてエコ・スフィアへ」) による支援のもと遂行しました。国際学会における研究成果の発表にあたり、ウエスコ学術振興財団海外渡航費助成事業による支援もいただきました。この場を借りて、ご協力・ご支援いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Arjona-Lopez, J.M., Telengech, P., Jamal, A., Hisano, S., Kondo, H., Yelin, M.D., et al. (2018) Novel, diverse RNA viruses from Mediterranean isolates of the phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*: insights into evolutionary biology of fungal viruses. *Environ Microbiol.* 20: 1464–1483.
- Chiba, S., and Suzuki, N. (2015) Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus. *Proc Natl Acad Sci.* 112: E4911–E4918.
- Chiba, Y., Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S., and Hagiwara, D. (2021a) Discovery of divided RdRp sequences and a hitherto unknown genomic complexity in fungal viruses. *Virus Evol.* 7: veaa101.
- Chiba, Y., Oiki, S., Zhao, Y., Nagano, Y., Urayama, S., and Hagiwara, D. (2021b) Splitting of RNA-dependent RNA polymerase is common in *Narnaviridae*: Identification of a type II divided RdRp from deep-sea fungal isolates. *Virus Evol.* 7: veab095.
- Das, S., Alam, M.M., Zhang, R., Hisano, S., and Suzuki, N. (2021) Proof of concept of the yadokari nature: a Capsidless replicase-encoding but replication-dependent positive-sense single-stranded RNA virus hosted by an unrelated double-stranded RNA virus. *J Virol.* 95: e00467-21.
- Fu, M., Zhang, H., Yin, M., Han, Z., Bai, Q., Peng, Y., et al. (2022) A novel heptasegmented positive-sense single-stranded RNA virus from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum fructicola*. *J Virol.* 96: e00318-22.
- Ghabrial, S.A., Castón, J.R., Jiang, D., Nibert, M.L., and Suzuki, N. (2015) 50-plus years of fungal viruses. *Virology.* 479–480: 356–368.
- Gilbert, K.B., Holcomb, E.E., Allscheid, R.L., and Carrington, J.C. (2019) Hiding in plain sight: New virus genomes discovered via a systematic analysis of fungal public transcriptomes. *PLOS ONE.* 14: e0219207.
- Hillman, B.I., Annisa, A., and Suzuki, N. (2018) Chapter Five - Viruses of Plant-Interacting Fungi. In *Advances in Virus Research*. Edited by Kielian, M., Mettenleiter, T.C., and Roossinck, M.J. pp. 99–116 Academic Press.
- Hisano, S., Zhang, R., Faruk, M.I., Kondo, H., and Suzuki, N. (2018) A neo-virus lifestyle exhibited by a (+)ssRNA virus hosted in an unrelated dsRNA virus: Taxonomic and evolutionary considerations. *Virus Res.* 244: 75–83.
- Jia, H., Dong, K., Zhou, L., Wang, G., Hong, N., Jiang, D., et al. (2017) A dsRNA virus with filamentous viral particles. *Nat Commun.* 8: 168.
- Jia, J., Fu, Y., Jiang, D., Mu, F., Cheng, J., Lin, Y., et al. (2021) Interannual dynamics, diversity and evolution of the virome in *Sclerotinia sclerotiorum* from a single crop field. *Virus Evol.* 7: veab032.
- Kanhayuwa, L., Kotta-Loizou, I., Özkan, S., Gunning, A.P., and Coutts, R.H.A. (2015) A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. *Proc Natl Acad Sci.* 112: 9100–9105.
- Khan, H.A., Sato, Y., Kondo, H., Jamal, A., Bhatti, M.F., and Suzuki, N. (2021) A second capsidless hadakavirus strain

with 10 positive-sense single-stranded RNA genomic segments from *Fusarium nygamai*. *Arch Virol.* 166: 2711–2722.

Kondo, H., Botella, L., and Suzuki, N. (2022) Mycovirus diversity and evolution revealed/inferred from recent studies. *Annu Rev Phytopathol.* 60: online ahead of print. doi: 10.1146/annurev-phyto-021621-122122

Kotta-Loizou, I. (2021) Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 63: 10–18.

Kotta-Loizou, I., Coutts, R.H.A., and ICTV Report Consortium (2022) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Polymycoviridae* 2022. *J Gen Virol.* 103: 001747.

Lan, X., Yao, Z., Zhou, Y., Shang, J., Lin, H., Nuss, D.L., et al. (2008) Deletion of the *cpku80* gene in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, enhances gene disruption efficiency. *Curr Genet.* 53: 59–66.

Myers, J.M., Bonds, A.E., Clemons, R.A., Thapa, N.A., Simmons, D.R., Carter-House, D., et al. (2020) Survey of early-diverging lineages of fungi reveals abundant and diverse mycoviruses. *mBio.* 11: e02027-20.

Nuss, D.L. (2005) Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nat Rev Microbiol.* 3: 632–642.

Pumplin, N., and Voinnet, O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol.* 11: 745–760.

Rigling, D., and Prospero, S. (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol Plant Pathol.* 19: 7–20.

Sato, Y., Jamal, A., Kondo, H., and Suzuki, N. (2020a) Molecular characterization of a novel polymycovirus from *Penicillium janthinellum* with a focus on its genome-associated PASrp. *Front Microbiol.* 11: 592789.

Sato, Y., Shahi, S., Telengech, P., Hisano, S., Cornejo, C., Rigling, D., et al. (2022) A new tetra-segmented splipalmivirus with divided RdRP domains from *Cryphonectria naterciae*, a fungus found on chestnut and cork oak trees in Europe. *Virus Res.* 307: 198606.

Sato, Y., Shamsi, W., Jamal, A., Bhatti, M.F., Kondo, H., and Suzuki, N. (2020b) Hadaka virus 1: a capsidless eleven-segmented positive-sense single-stranded RNA virus from a phytopathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*. *mBio.* 11: e00450-20.

Segers, G.C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q., and Nuss, D.L. (2007) Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 12902–12906.

Sun, Q., Choi, G.H., and Nuss, D.L. (2009) A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 17927–17932.

Sutela, S., Forgia, M., Vainio, E.J., Chiapello, M., Daghino, S., Vallino, M., et al. (2020) The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. *Virus Evol.* 6: veaa076.

tenOever, B.R. (2016) The evolution of antiviral defense systems. *Cell Host Microbe.* 19: 142–149.

Varsani, A., Lefeuvre, P., Roumagnac, P., and Martin, D. (2018) Notes on recombination and reassortment in multipartite/segmented viruses. *Curr Opin Virol.* 33: 156–166.

Wolf, Y.I., Kazlauskas, D., Iranzo, J., Lucia-Sanz, A., Kuhn, J.H., Krupovic, M., et al. (2018) Origins and evolution of the global RNA virome. *mBio.* 9: e02329-18.

Yaegashi, H., Nakamura, H., Sawahata, T., Sasaki, A., Iwanami, Y., Ito, T., et al. (2013) Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. *FEMS Microbiol Ecol.* 83: 49–62.

Zhang, R., Hisano, S., Tani, A., Kondo, H., Kanematsu, S., and Suzuki, N. (2016) A capsidless ssRNA virus hosted by an unrelated dsRNA virus. *Nat Microbiol.* 1: 15001.

特別講演 ビタミンKの新しい健康機能性

白川 仁^{*,**}・大崎雄介^{*,**}

Shirakawa, H. and Ohsaki Y.

Novel functions of vitamin K for health promotion.

Abstract

Vitamin K is a cofactor of γ -glutamyl carboxylase, and is essential for the regulation of blood coagulation and calcification in bone and blood vessel. Quantification of the tissue distribution of vitamin K revealed significant amounts of vitamin K in the pancreas, brain, and testes. However, the physiological roles of vitamin K present in these tissues have not been fully clarified. Recently, the function of vitamin K in various cellular events, other than γ -glutamyl carboxylation, has been reported. Menaquinone-4, a form of vitamin K₂, directly bound to the pregnane X receptor (PXR) and modulated the gene expression involved in bile acid synthesis in liver of humanized PXR mice. And menaquinone-4 suppressed the activation of NF κ B and decreased pro-inflammatory cytokines expression in macrophage and microglia cells. Further, menquinone-4 enhanced testosterone production in testis and insulin secretion from pancreatic β -cells via the elevation of intracellular cAMP levels. These novel properties of menaquinone-4 could contribute to prevent life-style related diseases and prolong healthy life expectancy.

Key words: Vitamin K, PXR, anti-inflammation, steroidogenesis, insulin secretion

* 東北大学大学院農学研究科 食と農免疫国際教育研究センター International Education and Research Center for Food and Agricultural Immunology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 468-1, Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai, 980-8572, JAPAN

** 東北大学大学院農学研究科食品天然物化学講座栄養学分野 Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 468-1, Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai, 980-8572, JAPAN

はじめに

ビタミンKは、光合成の光化学系Iの反応に含まれる因子であるが、高等動物では必須の微量栄養素であり、抗出血因子として発見された。天然に存在するビタミンKは、ビタミンK1（フィロキノン）とビタミンK2（メナキノン）である。ともに、2-methyl-1,4-naphthoquinoneを基本骨格として、3位の側鎖構造が異なる。ビタミンK1はフィチル基を、ビタミンK2は種々の長さのイソプレノイド基（6~10ユニットのイソプレン単位を有するものが主要であるが、15ユニットまでのメナキノンが検出されている）を有している（図1）。我々は、緑色野菜や植物油に含まれる

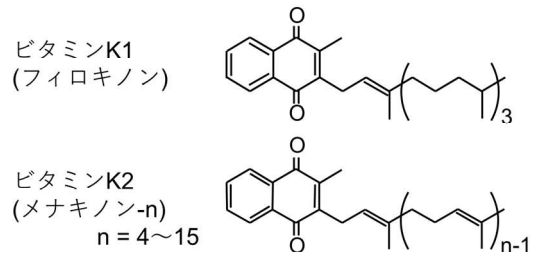


図1 ビタミンKの化学構造

ビタミンK1や納豆やチーズなどの発酵食品、肉類に含まれるビタミンK2を摂取している。先に述べたとおり、高等動物においてビタミンKは抗出血因子であるが、これはプロトロンビンなどの血液凝固因子の活性化にビタミンKがはたらくことによる（血液凝固因子の特定のグルタミン酸残基の γ -カルボキシ化）。同様の翻訳後修飾は骨タンパク質であるオステオカルシンでもみられ、ビタミンKはこれらのタンパク質の活性化を通じて、血液凝固系や骨代謝と密接に関連している。

マウスやラットにおいてビタミンKの生体内分布をみると、血液凝固因子の産生のある肝臓や骨組織のほかにも、脳、生殖腺、膵臓などでビタミンKは高い濃度で存在している（図2、白川ら, 2012）。脳や膵臓に含まれるビタミンKのほとんどが、イソプレン単位を4つもつビタミンK2（メナキノン-4）で占められている。通常の商品にはメナキノン-4は大量に含まれておらず、それらの臓器に存在するメナキノン-4は、摂取したビタミンKが吸収後に組織内で変換して生成することがわかっている。しかし、生成するメナキノン-4の生理的意義については必ずしも明確となっていない。本講演では、ビタミンK、特にメナキノン-4の新規作用について、我々の研究結果を含めて紹介する。

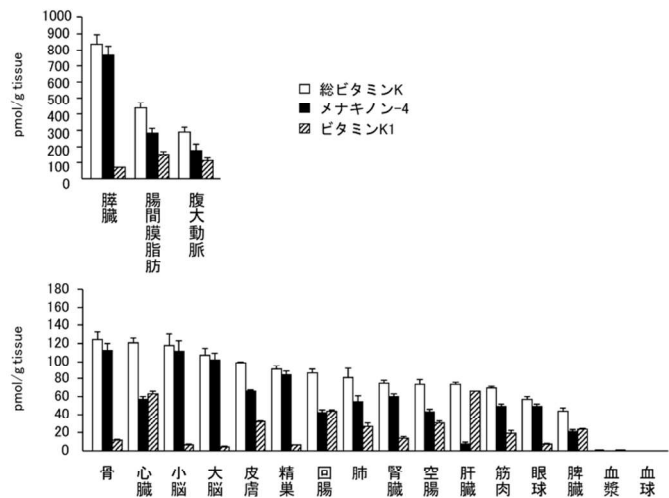


図2 ラット組織中のビタミンK量（白川ら, 2012より引用）

1. 核内受容体PXRのリガンド活性

核内受容体PXR (pregnane X receptor, NR1I2)は、薬物、毒物など生体異物をリガンドとして、薬物代謝関連遺伝子の発現を制御する転写調節因子である。しかし、近年になり、メナキノン-4を含む脂溶性ビタミンなどもリガンド活性を有することが明らかにされている。Tabbら(2003)は、骨芽細胞においてPXRが発現しており、PXRの標的遺伝子の発

現メナキノロン-4 処理によって変化することを示した。続いて、骨形成に関わる Tsukushi 遺伝子の mRNA 発現を上昇させ、コラーゲン量が増加することが示された (Ichikawa et al., 2006)。この発見以前にも、メナキノロン-4 はオステオカルシンの活性化のほかに、骨芽細胞の分化促進や破骨細胞の分化抑制にはたらくことが示されており、PXR を介した転写制御も加えて、骨代謝と密接に関係して、ロコモティブシンドロームのひとつである骨粗鬆症の予防や増悪抑制に関与していると考えられる。

PXR のリガンド結合領域 (LDB) は動物種間での相同性が他の領域に比べ低く、リガンドへの結合性や特異性が種間で異なる。例えば、抗結核薬として使用されているリファンピシンはヒト PXR に結合して遺伝子発現を変化させるが、ラットやマウスの PXR には働かない。一方、齧歯類 PXR の典型的なリガンド (pregnenolone 16 α carbonitrile) は、ヒトの PXR には作用せず、PXR 制御遺伝子の発現量を変化させない。このことから、ヒトリガンドを齧歯類で評価できるよう、マウス PXR の LBD をヒト PXR の LBD と置換したヒト型 PXR (hPXR) マウスが開発されている (Igarashi et al., 2012)。我々は、hPXR マウスにメナキノロン-4 を投与して、肝臓で変化する遺伝子を検索することで、新たなメナキノロン-4 の機能解析を試みた。その結果、PXR の標的遺伝子である薬物代謝関連遺伝子のほかに、糖代謝、脂質代謝に関連する遺伝子の発現にも影響を与えることがわかった。特に、胆汁酸合成に関わる *Cyp7a1*, *Cyp8b1* の mRNA 量がメナキノロン-4 投与によって低下していた (Sultana et al., 2018)。一方、野生型マウスではメナキノロン-4 による変化はみられなかった。また、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞においても、メナキノロン-4 は *CYP7A1* mRNA 量を有意に低下させた。以上の結果から、メナキノロン-4 はヒトにおいて PXR を介して胆汁酸代謝に関与することがはじめて示唆された。リガンドが結合した PXR によって *CYP7A1* の発現が抑制される機構については、本遺伝子の発現に必要な転写因子 HNF4 α と PXR が相互作用して、PXR がコリプレッサー的にはたらくことによって、*CYP7A1* の発現が低下するモデルなどが提唱されている。また、ヒト消化管由来 LS180 細胞において、メナキノロン-4 は PXR 標的遺伝子である薬物トランスポーター *MDR1* mRNA 量を上昇させた。さらに、リファンピシンとメナキノロン-4 を共処理した場合、*MDR1* mRNA 量が相乗的に増加した (Sultana et al., 2021)。このことは、食事由来のビタミン K が医薬品の薬効を変化させる可能性を示唆するものである。

2. 転写因子 NF κ B の活性化阻害

NF κ B (nuclear factor kappa B) は、炎症応答、細胞増殖、アポトーシスなど様々な細胞機能に関与している転写調節因子である。細胞内外からの多様なストレスにより活性化して、ストレス応答に関わる遺伝子の発現を制御する。肝癌由来細胞を比較的高濃度のメナキノロン-4 で処理すると細胞の増殖阻害が観察されるが、Ozaki ら (2007) はその機構解析を行い、NF κ B の活性化をメナキノロン-4 が抑制して、細胞周期の進行に重要なサイクリン D1 の発現低下によることを明らかにした。我々は、ヒトマクロファージ様 THP-1 細胞において、リポ多糖 (LPS) 処理による炎症性サイトカインの発現をメナキノロン-4 が抑制することを見出した (Ohsaki et al., 2010)。メナキノロン-4 の作用点について解析したところ、NF κ B の上流に位置するキナーゼである IKK α/β のリン酸化 (活性化) 阻害によると推定された。

また、マウスミクログリア由来 MG6 細胞においては、LPS に加えて、TNF α 誘導の NF κ B の活性化を抑制した (Saputra et al., 2019)。しかも、脳内のメナキノン-4 濃度に近い、1 μ M 以下の濃度で炎症性サイトカインの発現を有意に抑制した。アルツハイマー病をはじめとした脳疾患の発症と増悪には、脳内での炎症反応が密接に関与しているが、脳内で生成して大量に存在するメナキノン-4 は、炎症抑制に働き、脳疾患の発症抑制に寄与している可能性がある。

3. cAMP-A キナーゼ経路の活性化

細胞内の cAMP 濃度は、細胞外のシグナル分子によって刺激された G タンパク質共役受容体を通じて上昇し、下流因子である A キナーゼを活性化させる。Tsang ら (2002) は、PC12D 細胞を用いて、神経突起の伸張を促進する物質を検索したところ、ビタミン K1 やメナキノン-4 が伸張促進活性を示すことを発見した。この現象は A キナーゼ阻害剤で処理すると消失することから、ビタミン K 処理は A キナーゼを活性化させ、神経突起伸長を促進すると考えられた。また、メナキノン-4 による肝細胞癌の増殖や浸潤の阻害は、A キナーゼの活性化とその下流因子である Rho GTPase の阻害によることも示されている (Otsuka et al., 2004)。さらに骨芽細胞において、メナキノン-4 は A キナーゼを活性化させ、A キナーゼの標的遺伝子である *GDF15* や *STC2* の mRNA 量を上昇させる (Ichikawa et al., 2007)。我々は、ビタミン K 濃度を変化させた試験食を給餌したラットの解析から、ビタミン K 欠乏時には男性ホルモン (テストステロン) 産生が低下して、精巣中のメナキノン-4 量とテストステロン産生が関連していることを見出した (Shirakawa et al., 2006)。さらに、テストステロン産生細胞である精巣由来 I-10 細胞において、メナキノン-4 処理によって培地に分泌されるテストステロン量が増加した (Ito et al., 2011)。阻害剤などを用いた試験によって、メナキノン-4 はアデニル酸シクラーゼを活性化させ、細胞内の cAMP 量を増やして A キナーゼを活性化することによって、ステロイド産生を上昇させることが明らかとなった (図 3)。

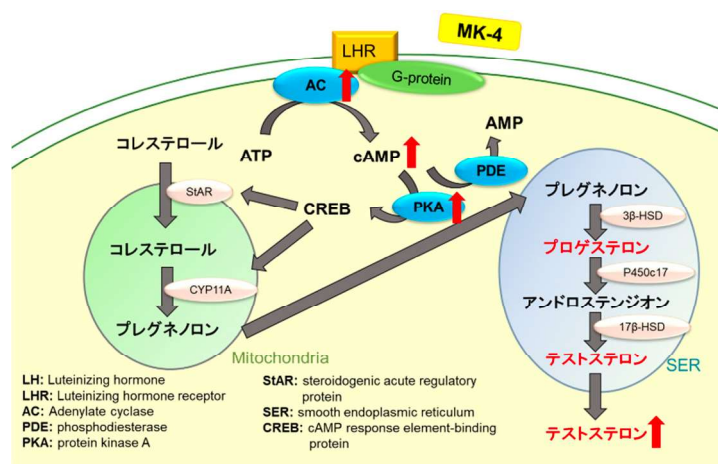


図 3 メナキノン-4 によるテストステロン産生上昇

同様のメナキノン-4 による cAMP 量の上昇は、ラット膵臓由来 INS-1 細胞においてもみられる。膵ランゲルハンス島の β 細胞は、グルコースに応答してインスリンを分泌するが、INS-1 は β 細胞様の細胞である。メナキノン-4 で INS-1 細胞を処理すると、グルコース応答性のインスリン分泌が上昇する (Ho et al., 2019)。細胞内の cAMP 量を測定すると、メナキノン-4 処理により上昇した。 β 細胞からのインスリン分泌は血中グルコース濃度の上昇により起こるが、GLP-1 や GIP といった消化管由来のペプチド (インクレチン) によって増強される。食後に上昇した血糖値を速やかに低下させるために、インクレチンは消化管から分泌され、 β 細胞に作用して、細胞内 cAMP 量を上昇させる。その後、A キナーゼや

Epac (Exchange protein directly activated by cAMP) が活性化され、インスリンの分泌が増強される。メナキノン-4 は cAMP-Epac 系を活性化して、グルコースに応答したインスリン分泌を増加させる。ヒトにおいても、ビタミン K の摂取量とインスリン分泌に関する試験が行われており、ビタミン K の摂取量が低いグループでは、グルコースに応答したインスリン分泌が低く、血糖値が高いことが示されている (Sakamoto et al., 1999)。膵臓に多量に存在するメナキノン-4 はインクレチン様作用を示して、食後血糖値の低下に寄与している可能性がある。

おわりに

日本人の平均寿命は、男性 81.41 才、女性 87.45 才である (2019 年)。一方、健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間である健康寿命は、男性 72.68 才、女性 75.38 才であり (2019 年)、日常生活に制限のある期間は、男性 8.73 年、女性 12.07 年である。この 20 年間、平均寿命、健康寿命ともに延伸しているが、制限のある期間はほぼ一定で推移している。国民医療費や家族、社会の負担を考えると、これまで以上に健康寿命を延伸させる必要がある。認知症やロコモティブシンドロームの予防は健康寿命のさらなる延伸のために重要な方策である。メナキノン-4 は骨粗鬆症の治療薬として処方されているが、骨への作用のほかに、転写因子やシグナル伝達分子の活性化によって、糖尿病や認知症を予防できることが示唆されるデータが蓄積してきている。超高齢社会において、健康寿命の延伸と高齢者の QOL を維持するために、ビタミン K の重要性が増すと考える。

引用文献

- Ho, H.-J., Shirakawa, H., Hirahara, K., Sone, H., Kamiyama, S. and Komai, M. (2019) Menaquinone-4 amplified glucose-stimulated insulin secretion in isolated mouse pancreatic islets and INS-1 rat insulinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 1995.
- Ichikawa, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B. and Inoue, S. (2007) Vitamin K₂ induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 39: 239-247.
- Ichikawa, T., Kuniko Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B. and Inoue, S. (2006) Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K₂-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, 281: 16927-16934.
- Igarashi, K., Kitajima, S., Aisaki, K., Tanemura, K., Taquahashi, Y., Moriyama, N., Eriko Ikeno, E., Matsuda, N., Saga, Y., Blumberg, B. and Kanno, J. (2012) Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. *J. Toxicol. Sci.*, 37: 373-380.
- Ito, A., Shirakawa, H., Takumi, N., Minegishi, Y., Ohashi, A., Howlader, Z.H., Ohsaki, Y., Sato, T., Goto, T. and Komai, M. (2011) Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. *Lipids Health Dis.*, 2011, 10: 158.
- Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Miura, A., Giriwono, P.E., Sato, S., Ohashi, A., Iribe, M., Goto, T. and Komai, M. (2010) Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured

- macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α / β phosphorylation. *J. Nutr. Biochem.*, 21: 1120-1126.
- Otsuka, M., Kato, N., Shao, R.-X., Hoshida, Y., Ijichi, H., Koike, Y., Taniguchi, H., Moriyama, M., Shiratori, Y., Kawabe, T. and Masao Omata. (2004) Vitamin K₂ inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology*, 40: 243-251.
- Ozaki, I., Zhang, H., Mizuta, T., Ide, Y., Eguchi, Y., Yasutake, T., Sakamaki, T., Richard G Pestell, R.G. and Yamamoto, K. (2007) Menatetrenone, a vitamin K₂ analogue, inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by suppressing cyclin D1 expression through inhibition of nuclear factor kappaB activation. *Clin. Cancer Res.*, 13: 2236-2245.
- Sakamoto, N., Nishiike, T., Iguchi, H. and Sakamoto, K. (1999) Relationship between acute insulin response and vitamin K intake in healthy young male volunteers. *Diabetes Nutr. Metab.*, 12: 37-41.
- Saputra, W.D., Aoyama, N., Komai, M. and Shirakawa, H. (2019) Menaquinone-4 Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in MG6 Mouse Microglial-Derived Cells by Inhibiting the NF- κ B Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 2317.
- Shirakawa, H., Ohsaki, Y., Minegishi, Y., Takumi, N., Ohinata, K., Furukawa, Y., Mizutani, T. and Komai, M. (2006) Vitamin K deficiency reduces testosterone production in the testis through down-regulation of the Cyp11a a cholesterol side chain cleavage enzyme in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760: 1482-1488.
- Sultana, H., Kato, A., Ohashi, A., Takashima, R., Katsurai, T., Sato, S., Monma, M., Ohsaki, Y., Goto, T., Komai, M. and Shirakawa, H. (2021) Effect of vitamin K-mediated PXR activation on drug-metabolizing gene expression in human intestinal carcinoma LS180 cell line. *Nutrients*, 13: 1709
- Sultana, H., Watanabe, K., Rana, M.M., Takashima, R., Ohashi, A., Komai, M. and Shirakawa, H. (2018) Effects of Vitamin K₂ on the Expression of Genes Involved in Bile Acid Synthesis and Glucose Homeostasis in Mice with Humanized PXR. *Nutrients*, 10: 982.
- Tabb, M.M., Sun, A., Zhou, C., Grün, F., Errandi, J., Romero, K., Pham, H., Inoue, S., Mallick, S., Lin, M., Barry M Forman, B.M. and Blumberg B. (2003) Vitamin K₂ regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J. Biol. Chem.*, 278: 43919-43927.
- Tsang, C.K. and Kamei, Y. (2002) Novel effect of vitamin K₁ (phylloquinone) and vitamin K₂ (menaquinone) on promoting nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells. *Neurosci. Lett.*, 323: 9-12.
- 白川仁、桂井朋子、駒井三千夫 (2012) ビタミン K. *Functional Food* 5: 340-345.

イネ科植物いもち病菌のヒストン修飾機構とゲノム進化

小林奈月* · Thach An Dang* · Pham Thi Minh Kieu* · 池田健一* · 中屋敷均*

Kobayashi, N., Dang, T.A., Pham, T.M.K., Ikeda, K., Nakayashiki, H.

Histone modification in *Pyricularia oryzae*: mechanisms and its possible involvement in genome evolution

Abstract

Histone modification is a covalent post-translational modification to histone proteins that includes methylation, acetylation, phosphorylation and so on. These modifications serve as epigenetic marks for regulating gene expression and/or altering chromatin structure. In this study, we determined a telomere-to-telomere genome sequence of the wheat-infecting *Pyricularia oryzae* strain Br48, and performed ChIP-seq analyses to gain a view of an epigenetic landscape of the genome. RNA-seq analysis of knock-out mutants of KMT1 and KMT6, which are enzymes responsible for the silent epigenetic marks H3K9me3 and H3K27me3, respectively, indicated loss of H3K27me3 directly led to a release of suppression of the marked genes whereas depletion of H3K9me3 did not show direct effects on expression of the marked genes except transposable elements. Comparative genomic analysis identified several megabase-scale “insertions” in the Br48 genome, some of which were possibly gained by horizontal gene transfer (HGT) from a related species such as *P. pennisetigena* or *P. grisea*. Notably, the mega-insertions often contained genes whose phylogeny did not follow species phylogeny, and some of the genes had a close homolog even in a very distantly-related organisms such as basidiomycetes or prokaryotes, implying the involvement of multiple HGTs. The mega-insertions and other possible insertions in the genome were generally associated with H3K9me3 and/or H3K27me3. H3K9me3 marks were mainly found at repetitive sequences whereas H3K27me3 were preferentially located at silent (or facultative) genes. Interestingly, a H3K27me3 level at a genomic fraction tended to be negatively correlated with phylogenetical concordance of genes in the fraction. This tendency was not limited to the insertions but also found in other parts of the Br48 genome. Taken together, we hypothesized that DNA sequences inserted in the genome are targeted for silent epigenetic modifications possibly as an initial process of gene domestication.

Key words: wheat blast fungus, *Pyricularia oryzae*, epigenetics, horizontal gene transfer, genome evolution

* 神戸大学大学院農学研究科 Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada-ku, Kobe, 657-8501, JAPAN

はじめに

ヒストン修飾は、染色体の最小単位であるヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質に付加される、メチル化、アセチル化、リン酸化などの化学修飾であり、染色体の状態を規定するエピジェネティックな標識として機能する (Strathl & Allis, 2000)。ヒストン修飾が起こるアミノ酸には多くの部位が知られており、またそれらが組み合わせられて起こるため、ヒストン修飾が“コードする”暗号の全容はまだ明らかではないが、遺伝子発現の活性化、抑制、また DNA 修復などに関与する一部のヒストン修飾については、多くの真核生物種で共通した機能を持つことが示唆されている。

当研究室ではイネ科植物いもち病菌を材料に、特にヒストンメチル化について研究を進めており、それらを担う lysine methyltransferase (KMT) 酵素群の機能解析を行ってきた (Pham *et al.*, 2015)。その中でこれらのヒストン修飾がいもち病菌の病原性発現に関与することを明らかとしてきたが、今回、特にゲノム進化との関係性を中心に、これらエピジェネティクス修飾がゲノム制御に果たす役割について話題を提供したい。

1. コムギいもち病菌 Br48 株の完全長ゲノム配列

いもち病菌の実験室系統である 70-15 株は、2005 年にドラフトゲノムが公開されており、植物病原糸状菌として最初にゲノム情報が利用可能となった (Dean *et al.*, 2005)。その後、PacBio などの長鎖型次世代シーケンサーの普及に伴い、いくつかのいもち病菌系で完全長のゲノム配列が決定されるに至っている (Gómez Luciano *et al.*; 2019; Peng *et al.*, 2019; Rahnama *et al.*, 2020)。当研究室で実験材料としているコムギいもち病菌 Br48 株は 1980 年代にブラジルでコムギいもち病菌が初めて発生した時期に採取された菌系であり (Urashima *et al.*, 1999)、今回イルミナの短鎖型と PacBio などの長鎖型の次世代シーケンサーを併用して、テロメアからテロメアまでの完全長ゲノム配列を決定した。Br48 のゲノムは他のいもち病菌と同様に 7 本の染色体からなっていたが、多くのいもち病菌系統で観察されるミニクロモソームは保有していなかった。ゲノムサイズは 42.5Mbp であり、約 1 万 2 千個のタンパク質をコードする遺伝子を保有すると推定された。

Br48 のゲノム配列を、すでにほぼ完全長のゲノムが決定されているイネ菌 (70-15)、シコクビエ菌 (MZ5-1-6) およびライグラス菌 (LpKY97) と比較した (図 1)。コムギ菌との系統的な類縁度は、ライグラス菌が最も高く、シコクビエ菌、イネ菌の順で

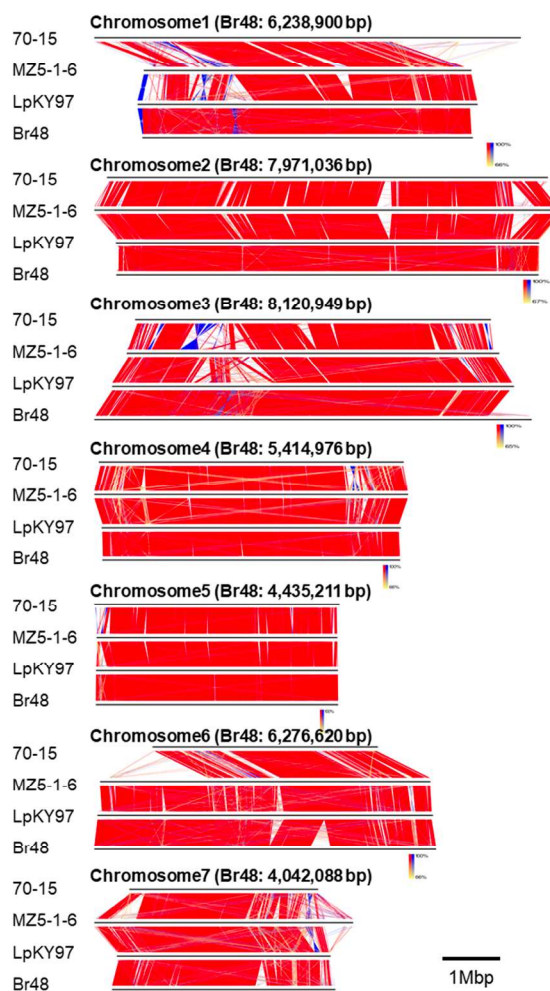


図 1 いもち病菌系統の染色体構造比較
順方向で相同な領域は赤色、逆方向で相同な領域は青色の線で表示した。70-15, イネ菌; MZ5-1-6, シコクビエ菌; LpKY97, ライグラス菌; Br48, コムギ菌

遠縁となっている。Br48 と 70-15 を比較すると、すでに報告されている 70-15 における 6 番染色体から 1 番染色体への約 2 百万塩基断片の転座に加え (Gómez Luciano *et al.*; Peng *et al.*, 2019)、1 番染色体および 3 番染色体の前半部に約百五十万塩基にわたる構造変異が見られた。この領域はライグラス菌とは共通していたが、シコクビエ菌では 70-15 とも異なった構造変異を持つことが示唆された。また、これらに加えて、6 番染色体および 7 番染色体には Br48 特有の数十万塩基の挿入があることが明らかとなった (図 1)。

2. いもち病菌間の大規模染色体構造変異には遺伝子の水平移行が関与している

Br48 と 70-15 のゲノム間で見られた 3 番染色体の構造変異の塩基配列を解析すると、Br48 ゲノムにおいて百万塩基以上の配列が挿入されている形となっており、相同性検索の結果、二か所で十~二十万塩基にわたってメヒシバ菌 (*P. grisea*) およびセンクルス菌 (*P. pennisetigena*) のゲノム配列とシンテニーを持つ配列が検出された (図 2 A)。また、センクルス菌と *P. oryzae* に属するシコクビエ菌のショートリードを Br48 の 3 番染色体にマップすると、全体のマップ率はそれぞれ 97.4%と 36.6%であったが、構造変異領域では、シコクビエ菌のリードマッピング量は大きく減少し、センクルス菌では逆に多くなるという逆転現象が起き (図 2 B)、この領域の配列がセンクルス菌等に由来するという仮説を支持する結果となった。コムギ菌である Br48 とセンクルス菌は別種であり、交配しないことを考え合わせると、Br48 で検出されたメガベーススケールの挿入配列の少なくとも一部は、センクルス菌等の *P. oryzae* とは異なる *Pyricularia* 属菌から水平移行によって得られたことが推定された。

さらに興味深いことには、3 番染色体の構造変異でメヒシバ菌とシンテニーが認められ領域を含む百万塩基ほどの配列は、1 番染色体にも存在しており、1 番染色体においても 70-15 と構造変異が見られる領域に相当した (図 3)。また、3 番染色体の構造変異でセンクルス菌とシンテニーが認められた領域の一部は、6 番染色体および 7 番染色体で検出さ

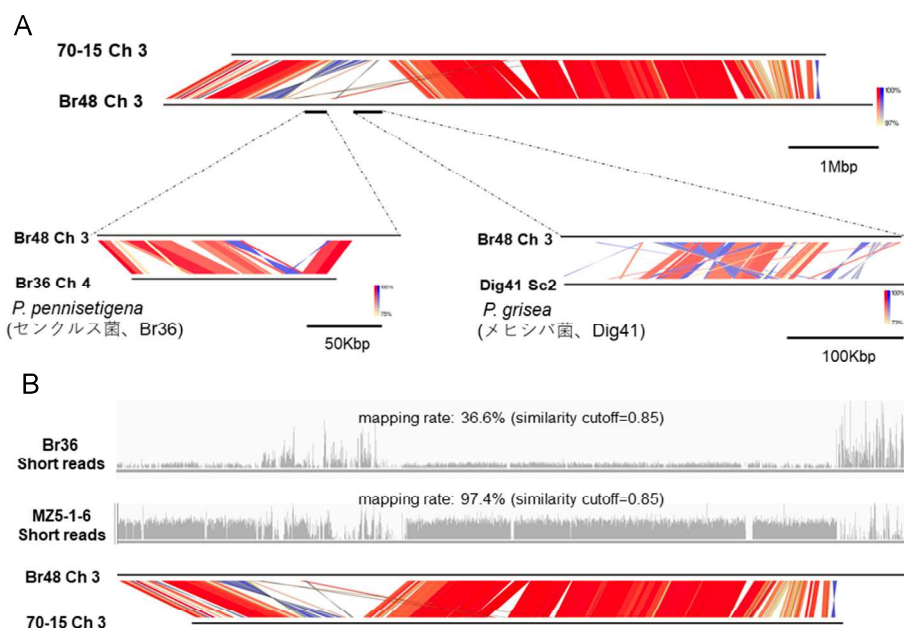


図 2 Br48 ゲノムには *P. oryzae* 以外の *Pyricularia* 属菌に由来する配列が挿入されている

A, Br48 の 3 番染色体の構造変異領域には *P. grisea* や *P. pennisetigene* ゲノムとシンテニーが見られる領域が存在する。

B, Br48 第 3 染色体への *P. oryzae* (MZ5-1-6) と *P. pennisetigene* のショートリードのマッピング。構造変異領域にマップされるリード数は *P. oryzae* では少なくなり、*P. pennisetigene* では増加する。

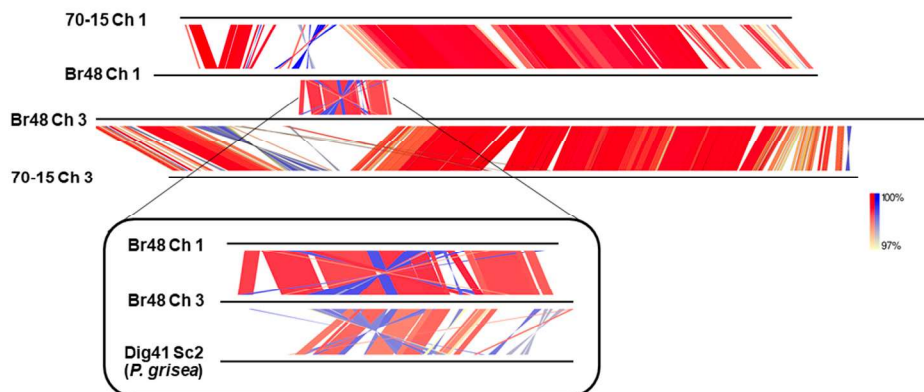


図3 *Pyricularia* 属菌に由来する配列は Br48 ゲノムに複数挿入されている

1 番染色体と 3 番染色体の構造変異領域には共通する配列が挿入されており、その一部は *P. oryzae* 以外の *Pyricularia* 属菌ゲノム由来であることが示唆された。

れた Br48 特有の挿入配列の中にも見出され (データ非掲載)、*P. oryzae* 外部に起源を持つ DNA 断片が Br48 ゲノムに複数箇所挿入されていることが示唆された。

このような水平移行によって獲得されたと推定される染色体断片にどのような遺伝子が含まれているか解析した所、遺伝子の系統関係が生物種の系統関係と一致しないという水平移行遺伝子特有の特徴を持つものが散見された。また、その中には原核生物や担子菌といった遠縁の生物種の持つ遺伝子と相同性の高いものが含まれていることも明らかとなった (データ非掲載)。これらの知見はメヒシバ菌やセンクルス菌などのゲノム配列が Br48 へと水平移行したという単純なモデルでは説明できず、複数回の移行イベントが関与している可能性が考えられた。

そこで水平移行で獲得した遺伝子を染色体全体で推定する為に Index of Phylogenetical Concordance (IPC) という指標を設定した。これはいもち病菌が属する子囊菌から代表的な 20 種を選び、それらの菌種が持つ、Br48 の各遺伝子に対するホモログの類縁度を BLAST スコアで順位付けし、種の類縁度の順位との相関係数を算出することで求めた。図 4 に 3 番染色体の例を示したが、染色体断片の挿入等により大規模な構造変異が生じた領域では、

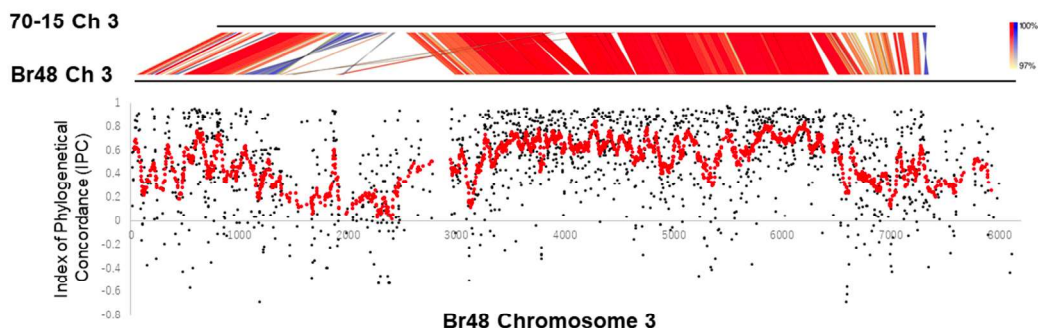


図4 Br48 染色体の構造変異領域では種の系統関係に従わない遺伝子の頻度が高い

Br48 の 3 番染色体上に存在する各遺伝子の Index of Phylogenetical Concordance (IPC) を産出し黒点で示した。また、15 遺伝子を単位とした IPC の移動平均値を赤点で表示した。

この IPC 値が大きく低下する傾向があり、水平移行遺伝子を検出するのに有効な指標となることが示された。また、興味深いことに 70-15 と Br48 間で相同配列は存在するものの、その相同性が比較的低い領域においても、IPC 値が低下する傾向が認められた。

以上の解析から得られた結果は、いずれも Br48 ゲノムにはメガスケールの染色体断片が水平移行によって挿入されたという仮説を支持している。

3. Br48 ゲノムにおけるヒストン修飾と遺伝子発現制御

Br48 ゲノムのエピジェネティック修飾を調査するために、H3K4me2、H3K4me3、H3K9me3 および H3K27me3 の抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。これまで報告されているように、H3K4me2 および H3K4me3 の修飾は全体として活発な遺伝子発現に関係しており、H3K9me3 および H3K27me3 は抑制された遺伝子と関連が認められた。この点をより詳細に検討する為に、ゲノムを 1000bp 単位のウィンドウに分割し、そこにおける各 ChIP-seq や RNA-seq の RPM 値を算出し、各ゲノム部位での動向やそれらの相関について調査した。RNA 発現は H3K9me3 や H3K27me3 の RPM 値が低い部位に偏っていたが、それらの修飾が多ければ多いほど、RNA の発現は少なくなるという単純な相関関係とはなっていなかった (図 5 A)。同様に H3K4me2 リッチな領域では高い RNA 発現も見られたが、H3K4me2 の修飾量に比例した増加ではなかった。図 5 B には 3 番染色体における H3K4me2 と RNA 発現量を示したが、巨視的に見た場合、RNA が発現している領域と H3K4me2 修飾が起きている領域は、ほぼ完全に一致しており、H3K4me2 は局所的な RNA 発現を促進するというより、遺伝子発現が起こり得るゲノム領域に対して付加される修飾と解釈できる結果

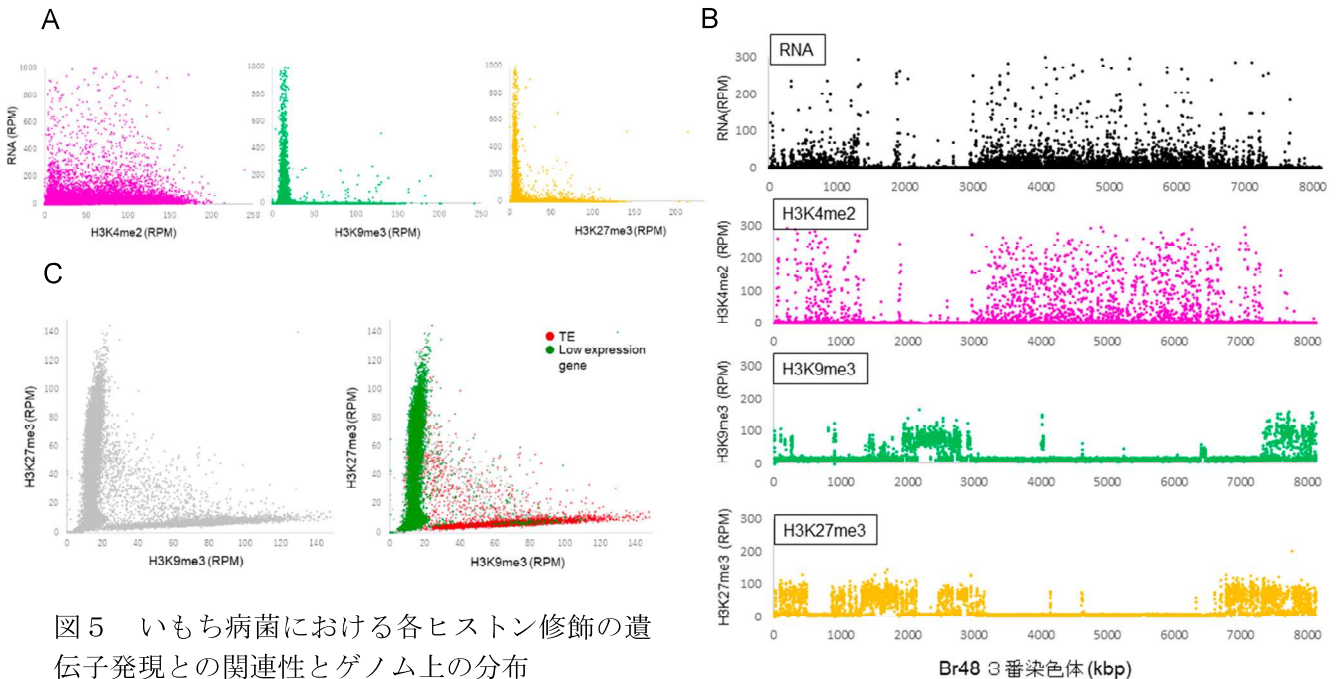


図5 いもち病菌における各ヒストン修飾の遺伝子発現との関連性とゲノム上の分布

A, 各ヒストン修飾と RNA 発現との相関図。Br48 ゲノムを 1kbp 単位で区切り、各ゲノム領域におけるヒストン修飾と RNA 発現量の RPM 値を散布図で示した。B, Br48 第 3 染色体における各ヒストン修飾と RNA 発現量の分布図。C, H3K9me3 と H3K27me3 の相関図。A と同様にゲノムを区画し、右図では低発現遺伝子 (RPM<5) を含む領域は緑で、転移因子を含む領域は赤で色付けした。

となった。この傾向は H3K4me3 でもまったく同様であった。

一方、遺伝子発現の抑制的修飾である H3K9me3 や H3K27me3 は、H3K4me2 や H3K4me3 の修飾が見られない領域に分布し、特に H3K9me3 と H3K4me2/3 は、ほぼ完全に排他的な関係にあった (図 5 B)。H3K9me3 および H3K27me3 の分布域は巨視的にみると近接している部分もあるが、1000bp 単位で解析すると、その大部分の領域でどちらか一方が明確に優占的に分布していることが示された (図 5 C)。ゲノム内で抑制的な修飾を受ける配列の代表として、低発現遺伝子および転移因子が挙げられるが、これらと H3K9me3 と H3K27me3 との関連を検討した所、転移因子の部位には主に H3K9me3 が修飾されており、低発現遺伝子は H3K27me3 によりその発現が抑制されていることが示唆された (図 5 C)。

次にこれら抑制的なヒストン修飾の作用機構に関する知見を得るために、H3K9me3 の修飾酵素である MoKmt1 および H3K27me3 の修飾酵素である MoKmt6 の欠失変異体を用いた RNA-seq 解析を行った。その結果、野生株において H3K27me3 の修飾が多く見られた遺伝子は、 Δ mokmt6 でその発現が上昇する傾向があり、少なくとも一部の遺伝子は H3K27me3 の消失により直接的に発現抑制が解除されたものと考えられた (図 6 A)。一方、野生株において H3K9me3 の修飾が多く見られた遺伝子に着目すると、MoKmt1 の欠失変異において発現が上昇する傾向は認められなかった (図 6 B)。ChIP-Seq やウエスタンブロッティング解析により Δ mokmt1 では H3K9me3 修飾が概ね消失していることは確認されており (データ非掲載)、H3K9me3 修飾が検出されるゲノム領域における遺伝子の発現抑制は、修飾それ自体ではなく HP1 の蓄積や DNA メチル化などによるヘテロクロマチン化といった、他の要因の影響を受けていることが推定された。

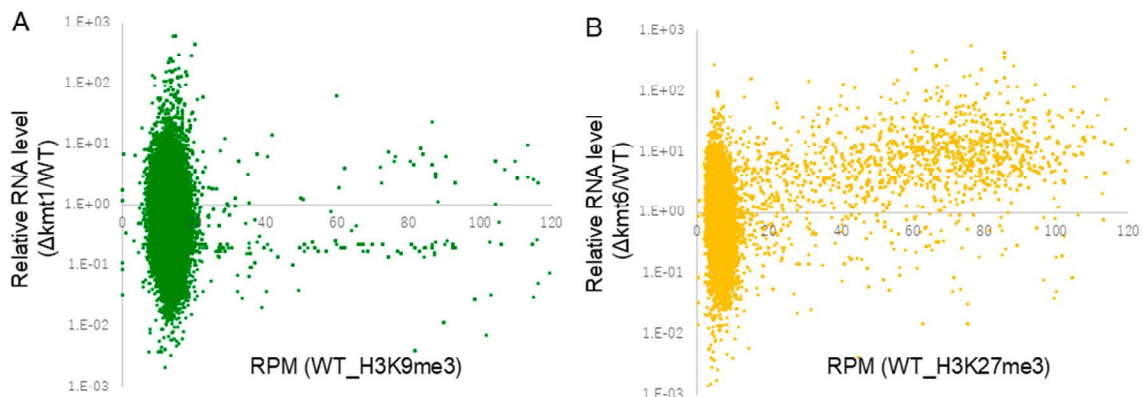


図 6 H3K9me3 および H3K27me3 の消失が遺伝子発現に与える影響

H3K9me3 を触媒する MoKmt1 および H3K27me3 の触媒酵素である MoKmt6 の欠失破壊株における RNA 発現値を野生株における発現値で除した比を Y 軸に、またその領域における野生株の各ヒストン修飾の RPM 値を X 軸として散布図を描いた。野生株において H3K27me3 修飾の多い領域では Δ mokmt6 において遺伝子発現が上昇する傾向が認められた。

4. いもち病菌系統間の染色体構造変異は抑制的なヒストン修飾と関連している

いもち病菌間の染色体構造変異と各ヒストン修飾の関係に着目して解析を行った所、構造変異領域では、抑制的なヒストン修飾である H3K9me3 と H3K27me3 が多く集積してい

る傾向にあることが明らかとなった。これは前述したメヒシバ菌等からの水平移行による大規模な構造変異領域だけではなく、Br48 とイネ菌との間で配列相同性が低い変異領域においても同様であった。特に後者では H3K27me3 の集積が顕著であった (図 7)。この傾向はこれまで図示してきた 3 番染色体だけではなく、すべての染色体で同様であり、一例として 7 番染色体を図 7 B に示した。

多くの真核生物において抑制的なヒストン修飾を誘導する要因として転移因子が知られている。この Br48 ゲノムの構造変異領域における抑制的なヒストン修飾への転移因子の関与を調べるために、その分布を図 7 A および 7 B に示した。特に図 7 B で明瞭だが、転移因子の分布部位では H3K9me3 の蓄積が顕著であり、H3K27me3 との関連性は認められなかった。これは図 5 C で示した結果とも一致しており、構造や配列の変異が生じた場所で見られる H3K27me3 の蓄積は転移因子によって誘導されたものではないと考えられた。

この構造変異と H3K27me3 の関係性を説明する仮説の一つとして、水平移行等で外部から獲得された DNA 断片に対する標識として H3K27me3 が修飾される機構の存在が考えられる。図 7 A および 7 B に IPC の移動平均線を示したが、H3K27me3 の修飾は IPC 値の低下とよく相関しており、この仮説を支持するものであった。哺乳動物では DNA double strand break(DSB)と H3K27me3 の関連性が複数の実験系で指摘されており (Chou *et al.*, 2010;

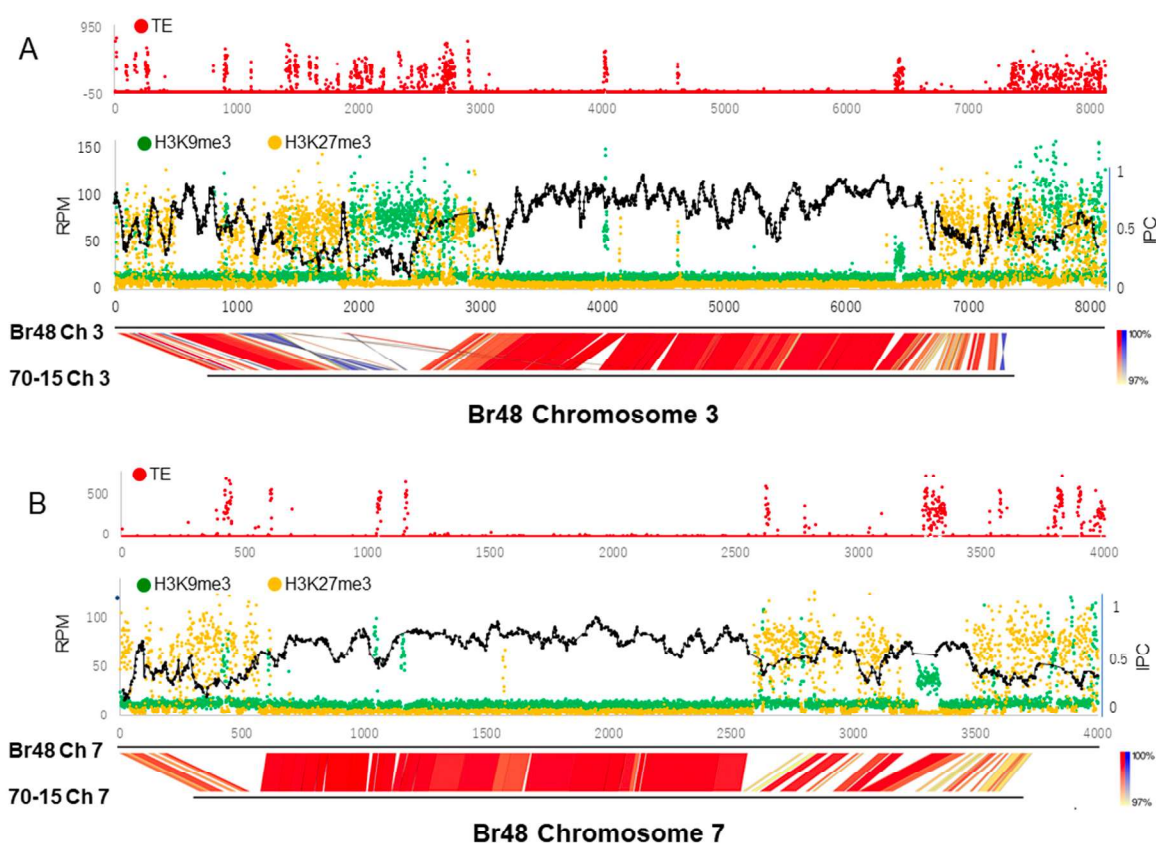


図 7 いもち病菌の染色体構造変異は抑制的なヒストン修飾と関連している

Br48 の 3 番染色体 (A) および 7 番染色体 (B) における H3K9me3、H3K27me3 および転移因子 (TE) の分布とイネ菌染色体との構造変異領域との関連性を図示している。TE と H3K9me3 は同所的に存在しており、大規模な構造変異部位には H3K27me3 が集積する傾向が認められた。

O'Hagan *et al.*, 2008; Lutze *et al.*, 2021)、本研究の結果も DSB を介して導入された染色体断片に H3K27me3 の修飾が起こると仮定すると説明ができる。一方、Br48 ゲノムにおいては大規模な染色体断片の挿入部位だけでなく、相同性が低下している領域にても H3K27me3 の修飾が検出された。これらの領域でも IPC 値の低下が認められるため、イネ菌とコムギ菌が分化する以前に外部から獲得した染色体断片と仮定することもできるが、何らかの理由でその領域の塩基配列の変異速度、すなわち進化速度が速くなっていると解釈することも可能である。これらの点は、今後の検討が必要である。

おわりに

エピジェネティックな修飾はなぜゲノムの特定の場所で起こるのか。これは現在のエピジェネティクス研究の中心的な興味の一つである。いくつかの修飾に関してはノンコーディング RNA をガイド分子とした機構や特定のタンパク質の結合配列などを介した機構が提唱されているが、H3K27me3 ではその機序が十分に解明されているとは言い難い。本研究では比較ゲノムと ChIP-seq 解析から、少なくとも一部の H3K27me3 修飾は DSB を伴った挿入配列を対象に起こる可能性が示唆された。

糸状菌においては多くの種間において遺伝子の水平移行が、進化の過程で起きてきたことが知られており、そういった遺伝子が条件的に発現することにより、特定のニッチへの適応が起こったことが示唆されている。しかし、水平移行してきた遺伝子をどのように制御可能な“自分の遺伝子としたか”、つまり遺伝子のドメスティケーションの過程は興味を持たれるが、十分には解明されていない。

本研究の結果は、水平移行により新たに獲得した遺伝子を、そのまま発現させるのではなく、一旦、H3K27me3 の修飾により発現抑制するようなゲノム防御反応が起こることを示唆している。外部から獲得した遺伝子は、それまでには“存在しなかった”ものであり、発現を一旦抑制することの不利益は考えられない。一方 H3K27me3 は、H3K9me3 のような恒常的ヘテロクロマチン化を伴った遺伝子発現抑制ではなく、条件的な解除が可能な修飾であり、その発現が生存に有利に働く場合には、抑制を解除する機構を付加していくことで、遺伝子のドメスティケーションが起こっていったことが想定される。また、外部からの配列が転移因子のような有害と考えられる配列であった場合は H3K9me3 を伴ったヘテロクロマチン化により恒常的な抑制へと進んだのではないかと考えられる。

以上のモデルは、いもち病菌のみならず、病原糸状菌全般にわたるエフェクターや二次代謝物産生遺伝子などの水平移行によるゲノム進化にも適応可能なシナリオであり、今後、この仮説を実証するための研究を進めて参りたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金 16H04883、20K21314、および 21H02195 の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Aoki, S. and Takebe, I. (1975) Replication of tobacco mosaic virus RNA in tobacco mesophyll protoplasts inoculated in vitro. *Virology* 65: 343-354.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., Elledge, S.J. (2010) A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:18475-18480.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., Birren, B.W. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature.* 434:980-986.
- Gómez Luciano, L.B., Tsai, I.J., Chuma, I., Tosa, Y., Chen, Y.H., Li, J.Y., Li, M.Y., Lu, M.J., Nakayashiki, H., Li, W.H. (2019) Blast fungal genomes show frequent chromosomal changes, gene gains and losses, and effector gene turnover. *Mol. Biol. Evol.* 36:1148-1161.
- Lutze, J., Wolfgeher, D., Kron, S.J. (2021) Global epigenetic analysis reveals H3K27 methylation as a mediator of double strand break repair. *bioRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2021.09.20.461136>.
- O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P., Baylin, S.B. (2008) Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.* 4:e1000155.
- Peng, Z., Oliveira-Garcia, E., Lin, G., Hu, Y., Dalby, M., Migeon, P., Tang, H., Farman, M.L., Cook, D., White, F.F., Valent, B., Liu, S. (2019) Effector gene reshuffling involves dispensable mini-chromosomes in the wheat blast fungus. *PLoS Genet.* 15: e1008272.
- Pham, K.T.M., Inoue, Y., Van Vu, B., Nguyen, H.H., Nakayashiki, T., Ikeda, K., Nakayashiki, H. (2015) MoSet1 (histone H3K4 methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. *PLoS Genet.* 11: e1005752.
- Rahnama, M., Novikova, O., Starnes, J.H., Zhang, S., Chen, L., Farman, M.L. (2020) Transposon-mediated telomere destabilization: a driver of genome evolution in the blast fungus. *Nucleic Acids Res.* 48: 7197-7217.
- Strathl, B.D., Allis C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Urashima, A.S., Hashimoto, Y., Don, L.D., Kusaba, M., Tosa, Y., Nakayashiki, H., and Mayama, S. (1999) Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of the retrotransposon MGR583. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65:429-436..

植物-病原糸状菌相互作用における 分泌タンパク質・ペプチドの解析

深田史美*・Guo Ting**・Wang Pingyu**・河野洋治*

Fukada, F., Guo, T., Wang, P., Kawano, Y.

Analysis of secreted proteins and peptides used for the interaction
between plant cell and plant pathogenic fungi

Abstract

In plant-pathogen interactions, pathogens secrete proteins and peptides, known as effectors for their successful infection. On the other hand, plants also employ secreted proteins and peptides to fine-tune plant immunity against pathogen infections. Plant endogenous peptides that are released upon pathogen recognition and regulate plant immunity are called phyto cytokines. In this article, we will describe two examples of secreted proteins and peptides produced by plant pathogenic fungi or plant cells. A first example is an effector protein secreted by the biotrophic basidiomycete fungus *Ustilago maydis*, the causal agent of maize smut disease. We identified a novel core effector *lep1* which was highly expressed during tumor formation and contributed to virulence. From the analysis of *lep1* mutants, localization of the protein, and interaction partner of Lep1, we concluded that Lep1 acts as a novel kind of cell adhesin for induction of the morphological changes associated with spore formation. A second example is a phyto cytokine used for rice (*Oryza sativa*) immunity against the rice blast fungus. Recently, our research group established a method to identify novel phyto cytokines through transcriptomics- and proteomics-based screening. From 236 small secreted proteins in rice, RAPID ALKALINIZATION FACTOR (RALF) peptide family was identified as one of the most highly expressed gene families. By conducting a functional comparison between the rice RALFa peptide and its Arabidopsis homolog peptides, we concluded that the rice RALFa peptide positively regulates rice immunity while AtRALF homologs negatively regulate Arabidopsis immunity. We will further discuss the diversified RALF functions by the identification of the RALF receptor protein in rice as well as the downstream targets by the RALF-receptor complex upon pathogen recognition.

Key words: effector, DAMPs, phyto cytokine, *Ustilago maydis*, rice, virulence, immunity

*岡山大学 資源植物科学研究所 Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki, Okayama, 710-0046, JAPAN

**中国科学院 上海植物逆境生物学研究中心 Shanghai Center for Plant Stress Biology, Center of Excellence for Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, 3888 Chenhua Road, Shanghai, 201602, CHINA

はじめに

植物病原菌が植物感染を成立させるためには、適切な時期に適切な病原因子を発動させる必要がある。特に植物との相互作用に重要な役割を果たす、病原菌の代表的な病原因子としてエフェクターが挙げられる。エフェクターは一般的に、病原菌から分泌されると植物のアポプラストもしくは細胞質に移行し、植物免疫の抑制や、植物の細胞プロセスの干渉により、自身の感染を優位にするような分泌タンパク質を指す (Lo Presti *et al.*, 2015)。一方で植物は、病原菌の侵入や細胞の傷害を受けるとダメージ関連分子パターン (Damage/Danger-associated molecular patterns: DAMPs) を分泌する。DAMPsには細胞壁の構成成分、ペプチド、タンパク質、核酸、アミノ酸等が該当し、細胞外に分泌されたDAMPsはその受容体に認識されると、パターン誘導性免疫 (Pattern-triggered immunity: PTI) と重複した反応を誘導あるいは抑制し、植物の免疫応答を調整する (Gust *et al.*, 2017, Hou *et al.*, 2019)。DAMPsの中でも、特に病原菌を認識後に分泌される免疫調節性ペプチドを植物サイトカインと呼び、免疫だけではなく植物の分化や生長を制御する細胞間コミュニケーションのシグナル因子であるとして近年注目を集めている (Tanaka & Heil, 2021)。本稿では、植物病原糸状菌が分泌するタンパク質の一例として、トウモロコシ黒穂病菌が分泌するエフェクターLep1を、植物が分泌するペプチドの一例として、イネが分泌する植物サイトカインRALFを題材として、未発表データも含めてご紹介したい。

1. トウモロコシ黒穂病菌が分泌するエフェクタータンパク質

トウモロコシ黒穂病菌はトウモロコシの主要病原糸状菌の一つである。本菌はトウモロコシの雌雄の穂や葉に感染し、植物組織中で菌糸を伸展させて巨大な腫瘍形成を誘導し、腫瘍中には多数の黒色胞子を形成する (図 1 A)。本菌の感染過程として、まずは接合型の異なる黒穂病菌同士が接合し、二核菌糸を形成する。この菌糸は植物表面を認識して付着器形成を誘導し、植物体内に菌糸を伸ばして侵入する (図 1 B)。本菌は活物寄生菌であるため、植物の細胞膜を破壊しないように菌糸を伸展させ、植物のアポプラスト領域にて増殖する。

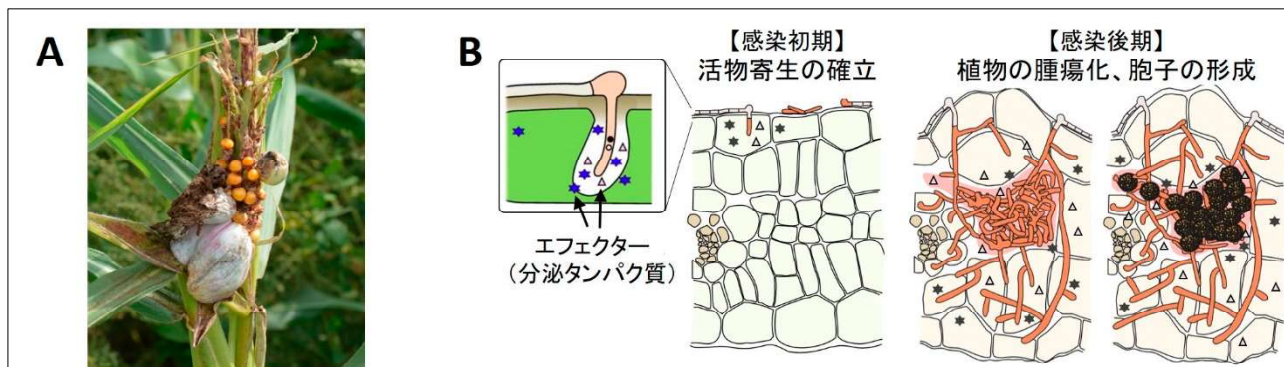


図 1 トウモロコシ黒穂病菌は植物組織に腫瘍を形成し、その中に大量の胞子を形成する。A. 黒穂病菌が感染したトウモロコシ果実。肥大して腫瘍化した組織中には、黒穂病菌が形成した黒色胞子が大量に存在し、空气中に飛散して感染を拡大させる。ドイツのトウモロコシ畑にて撮影。B. 黒穂病菌は感染中にエフェクターと呼ばれる分泌タンパク質を分泌する (Lanver *et al.*, 2018 より改変)

感染の後期になると、菌糸細胞において二核が融合し、それを引き金として、菌糸同士が接着し始め、3 mm²にも達するほど巨大な「菌糸塊」を形成する (図 1B)。菌糸塊の内部の細胞は、細胞周期が活性化する事によりバイオマスが劇的に増大し、その後黒色の胞子が大量に形成される (Lanver *et al.*, 2017)。

トウモロコシ黒穂病菌のゲノムには、476 個の推定分泌タンパク質をコードする遺伝子が存在し、それらの約半数は構造的もしくは機能的ドメインを持たない (Lanver *et al.*, 2018)。これらのエフェクター候補遺伝子の多くは、感染時特異的に発現が上昇し、本菌の病原性に重要な役割を果たすと考えられる (Kämper *et al.*, 2006)。時期特異的に発現する遺伝子群のプロファイリングを目的として、本菌の植物感染過程において経時的な RNAseq 解析が行われた (Lanver *et al.*, 2018)。その結果、分泌タンパク質をコードする遺伝子は主に2つのモジュールに大別された。第一のモジュールは感染初期の侵入時に発現が上昇する遺伝子群であり、植物感染を成立するために、主に植物の免疫応答を抑制する働きを担う (Djamei *et al.*, 2011, Hemetsberger *et al.*, 2015, Ludwig *et al.*, 2021, Ma *et al.*, 2018, Mueller *et al.*, 2013, Tanaka *et al.*, 2014, Tanaka *et al.*, 2020)。第二のモジュールは感染後期に遺伝子発現が上昇する遺伝子群であり、感染過程を考慮すると、植物の抵抗性に関与するというよりも、腫瘍の形成や胞子形成に機能を果たすのではないかと推測された。この感染後期モジュールには、本菌の分泌タンパク質をコードする遺伝子のうち、実に2割以上に相当する104遺伝子が当てはまる。しかし、感染後期過程にドラスチックな形態分化を遂げるその分子機構は未だに不明な点が多く、この時期に役割を果たすエフェクターの報告も皆無であった。そこで、黒穂病菌が感染の後期過程に分泌するエフェクターの機能解析を目的として研究を進めた。

1-1. 黒穂病菌の後期エフェクター—*lep1*の同定と破壊株の性状解析

黒穂病菌の感染過程における分泌タンパク質の発現パターンから、特に感染後期特異的に発現レベルが高いものを8個選択し、それらの遺伝子破壊株の解析から、後期エフェクターの植物の腫瘍化に関する役割、胞子形成への関与を明らかにすることを目的とした。これらの遺伝子破壊株をそれぞれトウモロコシに接種すると、7つの後期エフェクター破壊株は野生株と同様の腫瘍形成および胞子形成能を示したが、1つの破壊株は、腫瘍形成を誘導したものの、胞子形成能が顕著に減少した (図 2)。そこで、この遺伝子を *LEP1* (*LATE EFFECTOR PROTEIN 1*) と名付けた。*lep1* 破壊株の感染過程におけるバイオマスを

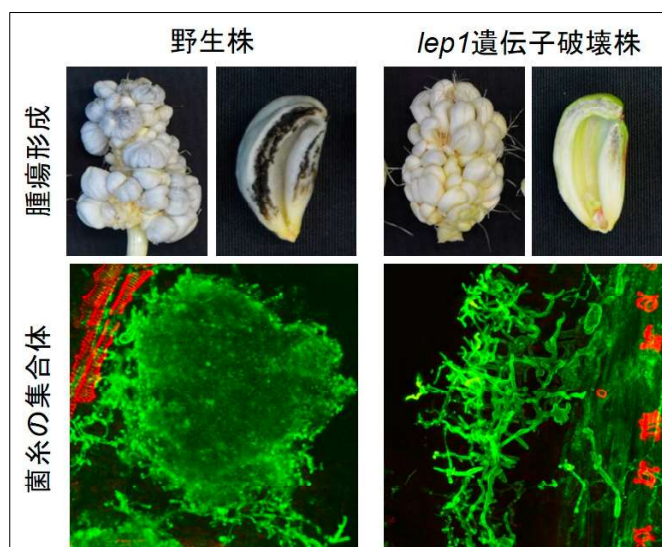


図 2 *lep1*破壊株は胞子形成と菌糸の集合体形成に欠損を生じる (一部 Fukada *et al.*, 2021 より改変)

解析したところ、特に菌糸の集合体を作る感染8日後から、野生株との差が顕著に現れた。そこで、黒穂病菌の菌糸を染色し、植物体中での感染過程を観察した。その結果、*lep1*破壊株での最も大きな欠損は菌糸の集合体形成能である事が明らかとなった(図2)。

1-2. Lep1タンパク質は菌糸表面の疎水性を高め、菌糸の集合体形成を促進する

*LEP1*遺伝子は菌糸の集合体形成が主な機能であると推測されたことから、それを確認するために*LEP1*の恒常発現株を培養し、その表現型を解析した。すると、*LEP1*恒常発現株のコロニー表面の疎水性が顕著に高まること、さらに液体培地中では、培養液の上部に菌糸同士が接着した菌糸塊を形成することが見出された。この結果は、黒穂病菌の菌糸から分泌されたLep1タンパク質が菌糸表面に結合し、アドヘシンのように細胞同士の接着を促すためである可能性を示唆している。そこで、まずは仮説のようにLep1タンパク質が菌糸表面に局在するかを検証するために、感染後期特異的にLep1-HAを過剰発現させる菌株を作製し、植物組織内で菌糸の集合体を形成させ、免疫染色を行った。期待した通り、Lep1-HAシグナルは黒穂病菌の細胞壁、特に菌糸の先端において観察されたことから、分泌後のLep1は黒穂病菌自身の細胞壁に局在すると考えられた。

1-3. Lep1は疎水性タンパク質Rep1と相互作用する新規アドヘシン様エフェクターである

分泌後のLep1が黒穂病菌の細胞壁に局在できる理由として、Lep1が黒穂病菌の細胞壁に存在するタンパク質と強く相互作用するためではないかと考えた。そこで、Lep1-HAを恒常発現する菌糸を培地上で生育させ、総タンパク質を用いて免疫共沈降、質量分析により、Lep1と相互作用するタンパク質の同定を試みた。その結果、菌糸の細胞壁にアミロイド線維を形成し、菌糸の疎水性を強化する分泌タンパク質であるRepellent Protein 1 (Rep1) (Teertstra *et al.*, 2009, Wösten *et al.*, 1996) が同定された。*LEP1*と*REP1*のそれぞれの恒常発現株の表現型解析を通じて、まずはRep1が分泌され、菌糸の表面においてアミロイド線維を形成し、その後細胞外に分泌されたLep1が、Rep1と相互作用することによって菌糸表面に局在し、Lep1自身は菌糸接着を促す新規のアドヘシンとして機能すると考えられた。

1-4. Lep1の植物への作用と菌糸塊形成の意義

一般にエフェクターは植物の抵抗性に作用するが、Lep1はどうか？*lep1*破壊株を感染させたトウモロコシの腫瘍組織を用いて、qRT-PCRにより既知の防御応答遺伝子の発現レベルを解析した。その結果、サリチル酸、フェニルプロパノイド合成経路に属する遺伝子の発現レベルに変化はない一方で、トウモロコシの抗菌性物質であるDIMBOA合成経路の遺伝子*bx3*および*bx4*は、*lep1*破壊株接種時に発現がやや上昇していた。そこで、*bx3*、*bx4*とLep1との関連性を調べるために、*bx3*および*bx4*欠損トウモロコシを用いて*lep1*破壊株の病原性を調べた。すると、*bx3*および*bx4*欠損体における*lep1*破壊株の病原性は、野生型トウモロコシにおける病原性と同程度であった。以上のことから、*lep1*破壊株の病原性低下の原因は少なくとも、植物の既知の防御応答が強く誘導されているからではないことが示唆された。さらに解析するためには、野生株と*lep1*破壊株を感染させた腫瘍組織を用いてRNAseqを行い、植物の遺伝子発現を比較検討する必要がある。

1-5. Lep1が形成促進する菌糸塊の意義

Lep1の主な働きは菌糸塊の形成であろうと考えられたが、その意義は何だろうか。植物腫瘍内で黒穂病菌の菌糸塊が形成される際には、黒穂病菌がコードする様々な細胞壁の加水分解酵素遺伝子が発現上昇し、細胞壁のリモデリングが積極的に行われる。それにより菌糸の断片化が促進され、断片化した細胞のそれぞれが形態形成過程を経て、黒色胞子が形成される。これはつまり、細胞壁のリモデリングが行われるこの時期は、外部環境からのダメージを比較的受けやすい時期であるとも言える。そこで黒穂病菌はLep1を分泌し、菌糸塊を形成することで菌糸をコーティングし、効率的に外部環境から自身を守っているのではないかと考えられる。興味深いことに、菌糸塊中の細胞は比較的細胞周期が同調化しており、菌糸塊の中央部から、適切なタイミングで黒色胞子が一気に形成される現象が見出された。このことから、菌糸塊を作ることによって、未知なる細胞周期の同調化シグナル因子が菌糸塊全体の細胞に行き渡るようになり、胞子形成を同調化して進めるような制御メカニズムがあるのではないかと期待された (Fukada *et al.*, 2021)。

2. 植物が分泌する免疫調整性ペプチド「植物サイトカイン」

植物が病原菌を認識すると、抵抗性反応の一つとして、自身の免疫を高めるため DAMPs を分泌する。DAMPs は「誘導性 DAMPs」および「構成要素 DAMPs」に大別され、前者には病原菌を認識後に分泌される植物サイトカインが、後者には細胞が傷害を受けた際に分泌される細胞外 ATP、細胞壁の構成成分、核酸などが当てはまる (Tanaka & Heil, 2021)。このうち特に植物サイトカインは、植物免疫を制御すると同時に、植物の分化や生長を制御する細胞間コミュニケーションのシグナル因子であるとして近年注目を集めている (Hou *et al.*, 2021)。代表的なものとしてはシステミン (Pearce *et al.*, 1991)、PEPs (Yamaguchi *et al.*, 2006, Huffaker *et al.*, 2006)、PSK (Matsubayashi & Sakagami, 1996, Yang *et al.*, 1999)、PIPs (Hou *et al.*, 2014)、SCOOP12 (Gully *et al.*, 2019)、RAPID ALKALINIZATION FACTOR (RALFs) (Pearce *et al.*, 2001) 等が挙げられる。これらの植物サイトカインは多くの場合、細胞質において翻訳後修飾やタンパク質切断を受け、成熟型サイトカインとなってアポプラスト領域に分泌される。これらは細胞膜に局在するサイトカイン特異的受容体によって認識され、下流のシグナル反応を引き起こす。多くの植物サイトカインは PAMPs/MAMPs と同様に、一般的な PTI 反応 (ROS 産生、防御応答遺伝子の発現上昇、MAPK の活性化、カルシウムの流入) を誘導もしくは抑制することで、免疫反応に対して助長的あるいは抑制的に働き、そのバランスを調整している (Hou *et al.*, 2019)。今回は、イネにおける新たな植物サイトカインとして RALFa ペプチドの機能解析を中心とした話をご紹介したい。

2-1. イネにおけるいもち病菌に対する植物サイトカイン候補の同定

筆者が所属する研究室では、いもち病菌に対する耐病性に関する植物サイトカインを同定することを目的として、トランスクリプトームとプロテオミクスを合体させたマルチオミクス解析が確立された。そのシステムを用いて、イネにいもち病菌を感染させた際や、培養細胞に糸状菌の細胞壁の構成因子であるキチンを処理した際に特異的に誘導されるサ

イトカインの単離を試みた。その結果、いもち病菌あるいはキチン処理時に特異的に誘導される236個もの内因性分泌型ペプチドが同定された (Wang *et al.*, 2020)。中でも、これまでに他の植物種で耐病性の機能が報告されているペプチドが多数単離されたことから、本方法が植物サイトカインを同定するための有効な手段であることを示している (表 1, Wang *et al.*, 2020)。

2-2. RALFファミリーペプチドの同定

上記のマルチオミックス解析の結果、筆者らは発現誘導が最も高い分泌ペプチドとして複数得られた RALF ファミリーペプチドに着目した。RALF は、シロイヌナズナにおいて

細胞伸長の抑制、細胞外のアルカリ化、花粉管伸長、免疫応答制御といった幅広い生体反応に関与する。中でも免疫応答に関与すると報告のある RALF ペプチドは、FERONIA (FER) と呼ばれる受容体型キナーゼ、および受容体様タンパク質 LLG 結合して RALF-FER-LLG 複合体を形成し、免疫反応を調整する (Stegmann *et al.*, 2017)。興味深い事に、AtRALF23 や AtRALF33 は免疫反応を負に制御する一方で、AtRALF17 は免疫反応を正に制御するというように、RALF によってその制御が異なる (Stegmann *et al.*, 2017)。これらの反応はいずれも FER 受容体依存的であることから、アポプラスト領域に分泌された RALF が FER と結合することにより、RALF-FER-LLG 複合体の構造に変化を生じさせ、下流のシグナル反応を調節すると示唆されるが、未だ不明な点が多い (Zhang *et al.*, 2020)。シロイヌナズナとイネにおける RALF ファミリーペプチドの系統樹を作製すると、本研究で同定された RALFa は、免疫を負に制御する AtRALF23 や AtRALF33 と同じクレードに属することが示された。

2-3. RALFaペプチドはキチン誘導性PTI反応を増強する植物サイトカインである

シロイヌナズナのホモログ AtRALF23 は免疫を負に制御するが、イネの RALFa は免疫反応にどのように関与するのだろうか。イネの培養細胞に PAMPs (キチンもしくはペプチドグリカン) を処理して qRT-PCR を行うと、PAMPs 処理依存的に RALFa の遺伝子発現が上昇した。そこで、合成 RALFa ペプチドをイネの培養細胞に添加したところ、防御応答遺伝子の発現誘導や ROS の産生といった一連の PTI 反応が誘導された。この反応はさらに、キチンと RALFa ペプチドの同時処理によって相加・相乗効果が認められた。CRISPR-Cas9 を用いて RALFa 遺伝子の欠損体を作製し、その培養細胞にキチンを処理すると、野生型の培

表 1 マルチオミックス解析により同定された植物サイトカイン候補の一覧 (Wang *et al.*, 2020 より一部改変)

Protein family	Total	Medium
Cupin/germin (including PR-15 and PR-16)	22	9
Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein (including PR-14)	18	4
Plastocyanin-like domain containing protein	11	5
Glycine-rich cell wall protein	8	0
Thaumatococcus family domain containing protein (including PR-5)	7	3
Dirigent family protein	6	2
Rapid alkalization factor (RALF) family protein	5	2
SCP-like extracellular protein (including PR-1)	5	0
Cysteine proteinase inhibitor	4	1
Barwin domain containing protein (including PR-4)	4	0
Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor	4	0
Early light-induced protein	3	0
Thionin family protein (including PR-13)	3	0
Pollen Ole e l allergen and extensin family protein	3	1
Gibberellin-regulated GASA/GAST/Snakin family	2	1
Glycine rich protein family protein	2	0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2	1
Ribonuclease T2 family domain containing protein	2	1
Phytosulfokine (PSK)	1	0

養細胞と比較して、キチン処理による PTI 反応が顕著に減少した。以上の結果から、RALFa は PAMPs 認識によって誘導され、PTI 反応を正に制御する植物サイトカインであることが示された。

さらに RALFa のいもち病菌に対する抵抗性への関与を評価するために、RALFa 欠損体に親和性のいもち病菌を接種した。その結果、野生株接種時と比較して、RALFa 欠損体はいもち病菌に対し、より感受性を示した。この結果を確認するために、いもち病菌の懸濁液に RALFa ペプチドを混合して野生型のイネに接種すると、いもち病菌感染による病斑長が低下した。これらの結果から、RALFa は PTI 反応を正に制御し、いもち病菌に対する抵抗性を誘導すると考えられ、免疫を負に制御するシロイヌナズナのホモログ AtRALF23 とは正反対の結果となった。一方で RALFa の免疫応答以外の機能を評価すると、シロイヌナズナにおける機能と同様に、RALFa の過剰発現イネは矮化形質を示し、RALFa ペプチド添加はイネの根部周辺のアルカリ化を誘導した。よって、細胞伸長抑制、細胞外のアルカリ化といった RALF の基本的な機能はシロイヌナズナと共通する一方で、免疫応答に関しては、RALFa の制御はイネとシロイヌナズナとの間で反対となっている可能性が示唆された。

2-4. RALFaはDRUS1受容体型キナーゼと結合して免疫反応を制御する

RALFaはシロイヌナズナのホモログAtRALF23とは異なって免疫反応を正に制御するが、この反応はイネのFERホモログに依存的なのだろうか？シロイヌナズナのFER遺伝子は、イネにおいてDRUS1、DRUS2と呼ばれる2つの遺伝子に相当した (Pu *et al.*, 2017)。興味深い事に、DRUS1、DRUS2それぞれの欠損体を用いたいもち病菌の接種試験の結果、DRUS1は免疫反応を正に、DRUS2は免疫反応を負に制御することが報告されている (Huang *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2020)。筆者らの共免疫沈降解析により、ビオチン化したRALFaペプチドは大腸菌から精製したDRUS1タンパク質と直接相互作用する事が明らかとなった。DRUS1欠損体の培養細胞にRALFaペプチドを処理すると、野生型の培養細胞と比べてRALFaペプチドによって誘導される一連のPTI反応が顕著に減少した。以上の結果から、RALFaは少なくともDRUS1を受容体の一つとして、イネの免疫反応を正に制御すると考えられた。なお、RALFaがDRUS2と相互作用するのか、DRUS2欠損体にRALFaペプチドを処理するとPTI反応にどのような影響を及ぼすのか、さらにDRUS1とDRUS2がどのような進化過程で分岐したのかについては今後の検討課題である。

2-5. RALFa-DRUS1の下流遺伝子の推定

RALFa は少なくとも DRUS1 を受容体として PTI 反応を制御することが示されたが、RALFa-DRUS1 と PTI 反応との間に存在するシグナル伝達の鍵因子は何だろうか。それを調べるために、RALFa もしくは不活性型 RALFa ペプチドと、野生型もしくは DRUS1 欠損体を組み合わせ、経時的な RNA-seq 解析を行った。その結果、RALFa ペプチド処理により、10 分後には既に約 400 個、1 時間後には約 4500 個もの遺伝子が発現変動することが明らかとなった ($|\log_2FC| > 1, p < 0.05$)。遺伝子発現が上昇したものについて GO エンリッチメント解析を行った結果、その多くは細胞壁構成成分の代謝経路やフェニルプロパ

ノイド合成経路に関与する遺伝子群であった。さらにこれらのうち、DRUS1 依存的に発現変動し、いもち病菌の感染に応じて発現変動する遺伝子を抽出した結果、細胞伸長、カルシウム、細胞小胞輸送に関与する遺伝子に加え、WRKY や Harpin-induced protein、NB-ARC/LRR タンパク質といった既知の抵抗性遺伝子が同定された。今後は、これらの遺伝子がイネにおける RALFa-DRUS1 によって誘導され、免疫応答に関与する鍵因子であると予測し、更なる解析を進めていく予定である。

おわりに

本稿では、植物-病原糸状菌相互作用における分泌タンパク質およびペプチドの機能解析と題して、病原糸状菌が分泌するエフェクターLep1 の機能、そして植物が分泌する植物サイトカイン RALF の機能をご紹介した。Lep1 エフェクターの研究を通して、エフェクターの定義を「植物の免疫応答を抑制するもの」だけに限定するよりも、「分泌した生物種にとって有利に働くように effect する分子」と広義に捉えることで、植物と病原菌との相互作用の制御機構の多様性の理解がさらに広がるのではないかと考えている。例えば、*Verticillium dahliae* が分泌する、環境を共にする細菌の生育阻害を促すタンパク質や (Snelders *et al.*, 2020)、*Botrytis cinerea* が分泌する、宿主植物の転写制御を攪乱させるような small RNA も (Stower, 2013, Weiberg *et al.*, 2013)、広義のエフェクターと捉える事が出来るであろう。今後の更なるエフェクター研究が進み、植物感染時における病原菌の巧みな病原機構が更に解明されることを期待する。RALF の研究では、シロイヌナズナのホモログ AtRALF23 が免疫を抑制するように働くのに対して、イネの RALFa は免疫を促進するように機能する事が明らかとなった。この違いは単子葉類と双子葉類の差に起因するのか、RALF が機能する組織の違い (AtRALF23 は根、RALFa は葉) に起因するのか、感染する病原菌との相互作用により機能が分化したのか、RALF が細胞外に分泌された後に、どれだけ離れた細胞、組織まで拡散することができるのか、RALF が病原菌に直接作用する可能性等、その興味は尽きない。今後はこれらの観点を中心に研究を進めると共に、イネに 43 も存在する RALF をどのように使い分けているのか、植物の成長と分化における機能と関連させて解明したい。

謝辞

本稿で紹介した研究のうち、トウモロコシ黒穂病菌のエフェクター研究はドイツマックスプランク陸上微生物学研究所の Kahmann 研究室在籍時に得たものです。Regine Kahmann 博士と当時のラボメンバーに心から感謝申し上げます。また、イネの植物サイトカインの研究を進めるにあたりお世話になった、岡山大学 資源植物科学研究所の河野洋治博士をはじめ、ラボメンバーの皆さまに御礼申し上げます。RALFa の機能解析にあたり、石川県立大学の高原浩之博士、近畿大学の山口公志博士、岩手生物工学研究所の清水元樹博士、神戸大学の足助総一郎博士、国立遺伝学研究所の豊田敦博士、水口洋平博士、岡山大学 資源植物科学研究所の古田智敬博士、兵頭 究博士、Wanqing Wang さんにご助言、または解析の補助を頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本研究はマックスプランク協会、科研費若手研究 (21K1485603)、岡山大学ダイバーシティ推進本部、文部科学省先進ゲノム支援、大原奨農会の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., et al. (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478, 395-398.
- Fukada, F., Rossel, N., Munch, K., Glatter, T. and Kahmann, R. (2021) A small *Ustilago maydis* effector acts as a novel adhesin for hyphal aggregation in plant tumors. *New Phytol.*, 231, 416-431.
- Gully, K., Pelletier, S., Guillou, M.-C., Ferrand, M., Aligon, S., Pokotylo, I., et al. (2019) The SCOOP12 peptide regulates defense response and root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 70, 1349-1365.
- Gust, A. A., Pruitt, R. and Nürnberger, T. (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci.*, 22, 779-791.
- Hemetsberger, C., Mueller, A. N., Matei, A., Herrberger, C., Hensel, G., Kumlehn, J., et al. (2015) The fungal core effector *Pep1* is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytol.*, 206, 1116-1126.
- Hou, S., Liu, D. and He, P. (2021) Phyto cytokines function as immunological modulators of plant immunity. *Stress Biol.*, 1, 8.
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H. and Wu, D. (2019) Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Front. Plant Sci.*, 10, 646.
- Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turrà, D., et al. (2014) The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS Pathog.*, 10, e1004331.
- Huang, Y.-Y., Liu, X.-X., Xie, Y., Lin, X.-Y., Hu, Z.-J., Wang, H., et al. (2020) Identification of FERONIA-like receptor genes involved in rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Phytopathol. Res.*, 2.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C. A. (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10098-10103.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., et al. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444, 97-101.
- Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., et al. (2018) The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell*, 30, 300-323.
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L. S., et al. (2017) *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 409-421.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 66, 513-545.
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzalez, C., Assmann, D., Glatter, T., et al. (2021) A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nat. Microbiol.*, 6, 722-730.
- Ma, L. S., Wang, L., Trippel, C., Mendoza-Mendoza, A., Ullmann, S., Moretti, M., et al. (2018) The *Ustilago maydis* repetitive effector *Rsp3* blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. *Nat. Commun.*, 9, 1711.
- Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7623-7627.
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Assmann, D. and Doehlemann, G. (2013) Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector *Pit2*. *PLoS Pathog.*, 9, e1003177.

- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J. and Ryan, C. A. (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12843-12847.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. and Ryan, C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 253, 895-897.
- Pu, C. X., Han, Y. F., Zhu, S., Song, F. Y., Zhao, Y., Wang, C. Y., et al. (2017) The Rice Receptor-Like Kinases DWARF AND RUNTISH SPIKELET1 and 2 Repress Cell Death and Affect Sugar Utilization during Reproductive Development. *Plant Cell*, 29, 70-89.
- Snelders, N. C., Rovenich, H., Petti, G. C., Rocafort, M., van den Berg, G. C. M., Vorholt, J. A., et al. (2020) Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. *Nat. Plants*, 6, 1365-1374.
- Stegmann, M., Monaghan, J., Smakowska-Luzan, E., Rovenich, H., Lehner, A., Holton, N., et al. (2017) The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science*, 355, 287-289.
- Stower, H. (2013) RNAs attack! *Nat. Rev. Genetics*, 14, 749-749.
- Tanaka, K. and Heil, M. (2021) Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Plant Innate Immunity: Applying the Danger Model and Evolutionary Perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 59, 53-75.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., et al. (2014) A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife*, 3, e01355.
- Tanaka, S., Gollin, I., Rossel, N. and Kahmann, R. (2020) The functionally conserved effector Sta1 is a fungal cell wall protein required for virulence in *Ustilago maydis*. *New Phytol.*, 227, 185-199.
- Teertstra, W. R., van der Velden, G. J., de Jong, J. F., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., Kroon-Batenburg, L. M. J., et al. (2009) The Filament-specific Rep1-1 Repellent of the Phytopathogen *Ustilago maydis* Forms Functional Surface-active Amyloid-like Fibrils. *J. Biol. Chem.*, 284, 9153-9159.
- Wang, P., Yao, S., Kosami, K. I., Guo, T., Li, J., Zhang, Y., et al. (2020) Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics- and proteomics-based screening. *Plant Biotechnol. J.*, 18, 415-428.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., et al. (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342, 118-123.
- Wösten, H. A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Böcker, M. and Kahmann, R. (1996) A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, 15, 4274-4281.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C. A. (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10104-10109.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K. and Sakagami, Y. (1999) *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine; a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13560-13565.
- Yang, Z., Xing, J., Wang, L., Liu, Y., Qu, J., Tan, Y., et al. (2020) Mutations of two FERONIA-like receptor genes enhance rice blast resistance without growth penalty. *J. Exp. Bot.*, 71, 2112-2126.
- Zhang, X., Yang, Z., Wu, D. and Yu, F. (2020) RALF-FERONIA Signaling: Linking Plant Immune Response with Cell Growth. *Plant Commun.*, 1, 100084.

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* が標的とする

宿主因子の網羅的な同定にむけて

松井英讓*・黒江香那**・檜原沙知**・西村隆史**

・山本幹博*・一瀬勇規*

Matsui, H., Kuroe, K., Kashiara, S., Nishimura, T. Yamamoto, M., and
Ichinose, Y.

Towards comprehensive identification of host factors targeted by
Pseudomonas syringae pv. *tabaci*.

Abstract

Pseudomonas species have been extensively studied as an important plant bacterial disease and as a model bacterial disease for understanding plant-microbe interactions. *Pseudomonas* sp. have evolved and acquired various virulence factors to establish infection in host plants. In particular, the type III secretion system (T3SS) of *Pseudomonas* sp. plays an essential role in establishing infection by suppressing the host immune responses through the secretion of multiple type III effectors (T3Es) into the host cell. Our laboratory studies the virulence mechanisms of phytopathogenic bacteria using *Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* (former *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pta*) and *Nicotiana tabacum* as model systems. Although T3Es also play an essential role in *Pta* 6605 as virulence factors, the molecular function and target host factors of the T3Es were largely unknown. We attempt the comprehensive identification of host factors targeted by T3E in *Pta* 6605 using the intracellular proximity labeling method. This method is a proteomics technique that has recently started to be used, and we discuss the effectiveness of this method in identifying effector target factors.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, type III effector, intracellular proximity labelling method.

* 岡山大学学術研究院 環境生命科学研究学域（農）Faculty of Environmental and Life Sciences, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, Okayama, 700-8530, JAPAN

**岡山大学大学院 環境生命科学研究科（農）Graduate School of Environmental and Life Sciences, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, Okayama, 700-8530, JAPAN

はじめに

植物病原菌は、感染に際して、宿主植物の認識を回避するだけでなく、防御応答を抑制する分子機構を進化させてきた。植物病原菌が備えるこれら感染制御機構の精緻さは、植物の備える防御機構の堅牢さを示しており、植物と微生物が如何に複雑に相互作用してきたかを物語っている。

私たちの研究室では、植物—微生物相互作用の解明に向けて、*Pseudomonas* 属細菌を利用し、研究を進めてきた。*Pseudomonas* 属細菌は 60 を越える pathovar に分類され、植物の重要病害としてだけでなく、植物—病原菌相互作用の理解にむけた研究に利用されている (Mansfield et al., 2012; Baltrus et al., 2017; Xin et al., 2018)。ご存じの通り、トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) は、宿主であるトマト、モデル植物シロイヌナズナに感染を成立させることから、植物—微生物相互作用の分子機構の解明に広く用いられてきた (Xin and He, 2013)。加えて、*Pto* DC3000 は Type III effector (T3E) HopQ1-1 の欠損に伴い、非宿主と考えられていたニコチアナベンサミアナタバコにも感染を可能にする (Wei et al., 2007)。すなわち、個々の菌株が保有する T3Es のレパートリーは、植物への感染の成否を決定づけるとも考えられる。実際に、T3Es のレパートリーは種のみならず、菌株間でも異なり、個々の菌株の病原力に影響を与える。T3E の分子機能や相互作用因子の解析については、優れた総説が多数出版されているため参照されたい (Lindeberg et al., 2012; Büttner, 2016; Wei and Collmer, 2018)。一方で、*Pto* DC3000 以外に目を向けると T3Es の分子機能や相互作用因子については未だに不明な点も多い。本稿では、*Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* 6605 (旧名 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: *Pta* 6605) の T3Es の機能解明に向けて、現在の取り組みについてご紹介したい。

1. *Pseudomonas syringae* Type III effector

1-1. Type III effector

次世代シーケンズ解析技術と情報科学技術の発展は、*Pseudomonas* 属細菌間の比較ゲノム解析を可能にした。菌株間のゲノム比較解析から、*Pseudomonas* 属細菌が保有する T3Es は、その構造から少なくとも 70 種類に分類される (Dillon et al., 2019a)。これら T3Es のうち、*avrE*, *hopB/hopAC*, *hopM*, *hopAA* のみが 95% 以上の株に存在する (Dillon et al., 2019b; Baltrus et al., 2011, 2017)。また、*avrE*, *hopM*, および *hopAA* は、Conserved effector locus (CEL) 領域に座上し、*Pseudomonas* 属細菌の病原力に重要な役割を担う。例えば、*Pto* DC3000 - トマトのモデル系では CEL 領域の欠損は病原力に大きな影響を与える (Alfano et al., 2000)。また、*Pto* DC3000 とシロイヌナズナのモデル系では AvrE1, HopM1 は冗長的に機能し、アポプラスト環境の湿潤化の促進に寄与することが知られている (Nomura et al., 2006; Xin et al., 2016; Roussin-Léveillé et al., 2022)。*Pto* DC3000 - ニコチアナベンサミアナのモデル系では、*Pto* DC3000 の多重変異体を利用することで、AvrE1, HopM1, AvrPto, AvrPtoB, HopE1, HopG1 および

HopAM1 が病原力発揮に必須な最小のサブユニットとして報告された (Cunnac et al., 2011; Wei et al., 2015; Chakravarthy et al., 2018)。このように *Pto* DC3000 の T3Es の研究から、病原力因子としての機能が明らかになってきた一方で、分子機能や標的因子が不明なものも多い。

1-2. *Pseudomonas* 属細菌が標的とする宿主因子とその機能

Pseudomonas 属細菌は、推定 20~40 種類の T3E をゲノム中に有すると考えられている。T3Es の分子機能としては、植物免疫関連因子を標的とする例が多く報告されている (Lindeberg et al., 2012; Büttner, 2016; Wei and Collmer, 2018)。例えば、CEL 領域に座する HopM1 は、小胞輸送に関与するシロイヌナズナ MIN7 (ADP ribosylation factor (ARF) guanine nucleotide exchange factor (GEF) protein) と相互作用し、プロテアソームを介してタンパク質分解に関り、同様に AvrE1 も小胞輸送を阻害することが報告されている (Nomura et al., 2006)。近年、AvrE1 が標的とする宿主因子がシロイヌナズナで同定され、細胞膜局在タンパク質 (AHA1, PIP2A, PEN3 など) と相互作用することが示されている (Xin et al., 2021)。現在までにシロイヌナズナと *Pto* DC3000 の系を中心に、24 種類の T3Es (AvrB, AvrE1, HopAR1, AvrPto, AvrPtoB/HopAB1, AvrRpm1, AvrRps4, AvrRpt2, HopA1, HopAF1, HopAI1, HopAO1, HopD1, HopE1, HopF2, HopG1, HopI1, HopM1, HopN1, HopQ1, HopU1, HopW1, HopX1, HopZ1) の標的因子が報告されている。

1-3. エフェクターの標的因子の同定方法とその課題

T3Es の標的因子の同定には、Yeast two-hybrid (Y2H) screening を用いた大規模な相互作用因子の探索 (Mukhtar et al., 2011) や、トマトプロトプラスト系を用いた T3Es (HopAI1, AvrPto, HopA1, HopM1, HopAF1) と標的プロテインキナーゼの網羅的解析 (Brauer et al., 2018) が報告されている。一般的な標的因子の同定手法としては、免疫沈降法 (immunoprecipitation: IP) と Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を組み合わせた IP followed by MS spectrometry (IP-MS) や、標的タンパク質と相互作用することが予想されるタンパク質に対する抗体を用いた共免疫沈降法 (co-immunoprecipitation, Co-IP) が頻用されている (Albers et al., 2019; Xin et al., 2021; Rufián et al., 2021)。

これら手法にはそれぞれ課題も指摘されている。例えば、Y2H 法は、適したライブラリー構築に多大な労力が必要であり、転写因子などの一部のタンパク質は Y2H には適さない。また、IP-MS 法はエフェクターの検出が出来なければ精製が難しく、さらに不溶性タンパク質、特に膜結合性タンパク質の相互作用因子の同定には効率が悪い。加えて、相互作用の維持に関して個々のエフェクターに最適な精製条件の検討が必須である。LC-MS/MS 解析用のサンプルは、界面活性剤を除去するための洗浄操作が必須であり、このステップで親和性の低いタンパク質は乖離、除去される場合が多い。このような課題の克服に向け、近年、細胞内近接標識法 (Proximity labeling, PL) が急速に進展を遂げてきた。

2. 細胞内近接標識法 (Proximity labeling : PL)

2-1. BioID と TurboID の開発

細胞内近接標識法 (PL 法) は、目的タンパク質と酵素を連結し、生細胞内で発現させ、生体内でタンパク質をラベルすることで相互作用因子を同定する方法である。2012 年に Roux らによって BioID が報告された (Roux et al., 2012)。BioID は大腸菌の DNA 結合型ビオチンリガーゼ BirA に変異を導入した酵素であり、ビオチンと ATP の存在下において、biotinol-5'-AMP が生成され、BioID の近傍 (半径約 10 nm 以内) にあるタンパク質のリジン残基をビオチン標識する。ビオチンラベルされたタンパク質をストレプトアビジンビーズで精製することで、生細胞内で起こる相互作用を検出可能である。基質にビオチンを用いることで、生細胞への毒性を低く抑えている。一方、BioID は反応時間が約 18-24 時間必要であることに加え、37°C という高い反応温度が課題であった。

Branon らは BioID の課題を克服した TurboID と miniTurbo を開発した (Branon et al., 2018)。TurboID の選抜には酵母ディスプレイによる指向性進化法が用いられている。BirA-R118S に error-prone PCR を用いて変異を導入した酵母ライブラリーを構築し、ビオチン化が亢進した酵母を選抜する手法を用いて、高い酵素活性 (ビオチン処理時間 10 分程度) と反応温度を低下させることに成功した。それぞれの分子量は、TurboID は 35 kDa、miniTurbo は 28 kDa であり、miniTurbo は、活性は TurboID と比べ低下するものの物理的な相互作用への影響を低減させている。繰り返しになるが、TurboID や miniTurbo では、室温で反応が可能であること、反応時間が短いことが特筆すべき点であり、幅広い生物種で活用されはじめている。

2-2. PL 法を用いた相互作用因子の同定

PL 法 (BioID, TurboID) を用いた標的因子の同定の報告は相次いでいる。例えば、サルモネラ菌では、BioID を用いて 5 つのエフェクターの標的タンパク質の同定が試みられ、8 つの既知の標的を含む、632 の新奇な標的タンパク質の同定に成功している (D'Costa et al., 2019)。植物では BioID を用いて AvrPto のニコチアナベンサミアナに対する 5 種類の標的因子が同定された (Conlan et al., 2018)。同様に、TurboID を利用してタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子産物 N の相互作用因子として E3 ubiquitin ligase UBR7 が報告された (Zhang et al., 2019)。シロイヌナズナでは TurboID による細胞内のタンパク-タンパク質相互作用の網羅的解析も報告されている (Mair et al., 2019)。ゼニゴケでは、SNARE タンパク質 MpSYP12A および MpSYP12B を用いて、IP-MS 法と miniTurbo 法が比較され、miniTurbo の利用により新規な標的因子の同定が可能であることが示されている (Melkonian et al., 2022)。興味深いことに、ゼニゴケはビオチン処理に伴うバックグラウンドノイズが他の植物と比較して極めて低い。バックグラウンドノイズを考慮に入れなくて良い点は、細胞内相互作用を理解するうえでゼニゴケの優れた特徴と考えられる。このように、PL 法は、新しいタンパク質間相互作用解析技術として有用である一方で、Y2H 法や共発

疫沈降法に完全に取って代わる技術ではない点に注意が必要である。少なくとも PL 法で得られた解析結果を異なる手法で検証することが必要である。

3. *Pta* 6605 が標的とする宿主因子の探索

3-1. *Pta* 6605 の Type III effector の病原力への寄与

私たちは *Pta* 6605 の病原力機構の解明に向けた研究を進めてきた。*Pta* 6605 株のゲノム配列から (Matsui et al., 2021)、*Pta* 6605 は推定で 22 種類の T3Es を保有すると考えられた。*Pto* DC3000 は 36 種類の T3Es を保有することから考えると比較的少ない。*Pto* DC3000 はニコチアナベンサミアナタバコに対する病原力に HopG1、HopAM1 が必要であるが、タバコを宿主とする *Pta* 6605 やニコチアナベンサミアナに感染できる *P. syringae* pv. *syringae* B728a は HopG1、HopAM1 を保有しない (Cunnac et al., 2011; Studholme et al., 2009; Studholme, 2011; Matsui et al., 2021; Vinatzer et al., 2006)。そのため、T3Es のレパートリーが果たす役割は、個々の *Pseudomonas* 属細菌で異なると考えられた。

そこで、*Pta* 6605 株の 22 種類の T3Es をそれぞれ欠損した変異体シリーズを構築し、*N. tabacum* cv. *Xanthi* に対する病原力について解析した。しかしながら、単一の T3Es の欠損が病原力に与える影響は小さいものであった。これまでも *Pto* DC3000 で個々のエフェクターの病原力に与える影響は小さいことが議論されており (Cunnac et al., 2011)、*Pta* 6605 の T3Es 変異体の解析結果も一致した。

3-2. 網羅的なエフェクタータンパク質の標的因子の同定に向けて

Pto DC3000 と *Pta* 11528 間の T3Es レパートリーは大きく異なることが示されており (Baltrus et al., 2011; Studholme et al., 2009)、同種間 (*Pta* 6605 と *Pta* 11528) の T3Es レパートリーにも違いがある。そのため、*Pta* の T3E の多くは分子機能、標的因子はほとんど明らかになっていない。そこで、PL 法による標的因子の同定に挑戦した。宿主である *N. tabacum* はゲノム解読されているものの精度に課題がある (Sierro et al., 2014)。そのため、プロテオーム解析可能なニコチアナベンサミアナタバコ (Kourelis et al., 2019) と、*Pta* 6605 をモデル系とした。*Pta* 6605 はニコチアナベンサミアナタバコに対して激しい病徴を誘導し、結果として葉面積を著しく低下させる (図 1)。この病徴は *Pta* 6605 $\Delta hrcC$ 株では抑制されることから、T3E(s) に起因する

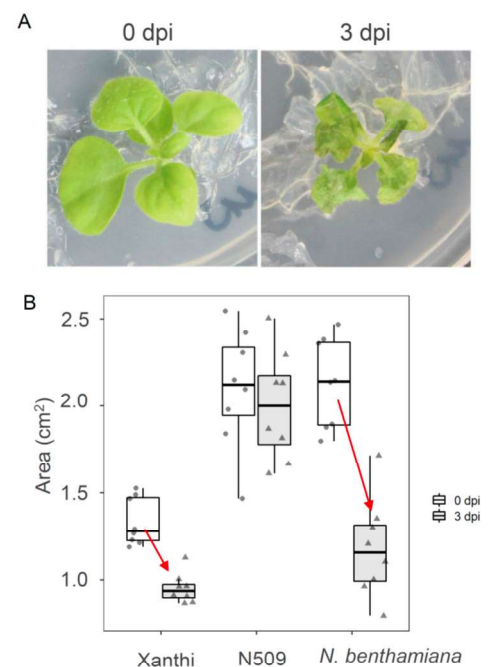


図 1 *Pta* 6605 接種に伴う *N. benthamiana* の病徴進展 (A) 接種 0 日目と 3 日目の病徴進展写真 (B) 接種 0 日目と 3 日目の植物体の面積比較. Xanthi は罹病性品種、N509 は抵抗性品種. (Kashihara and Nishimura et al., 2022 を改変)

と考えられた。

Pta T3Es の標的因子の同定にむけて、T3Es と TurboID-YFP を連結したバイナリーベクターを作製した。実験系としては、アグロインフィルトレーション法を利用した。ビオチン化タンパク質の精製手法は報告されていたが(Zhang et al., 2019; Mair et al., 2019; Zhang et al., 2020)、遊離ビオチンの除去操作が煩雑かつ高コストであったことから、より低コストなビオチン化タンパク質の精製系を構築した。

予備実験として、*Pta* 6605 の T3Es の一つである HopAZ1 の標的因子の同定を試みた。HopAZ1 はタバコ野火病抵抗性タバコ品種 *Nicotiana tabacum* cv. N509 に非病原力因子として認識される機能未知の T3E である(Kashihara et al., 2022)。HopAZ1 の標的因子を探索した結果、多数の相互作用因子の同定に成功した(榎原ら、未発表)。標的因子には Receptor-like cytoplasmic kinase など Pattern-triggered immunity (PTI) 関連因子や細胞膜タンパク質が複数含まれていた。HopAZ1 は microsomal 画分に局在することから(Kashihara et al., 2022)、HopAZ1 の細胞内局在と標的の共通性が認められ、TurboID の有効性を確認できた。そこで、現在、*Pta* 6605 が有する 22 種類の T3Es の標的因子の探索を進めている(黒江ら、未発表)。

おわりに

本研究で用いた PL 法は、タンパク質間相互作用の理解に向けて、今後より発展するものと予想している。Y2H や IP では単離が難しかった標的因子の同定に威力を発揮すると期待される。一方で、PL 法では植物が天然に合成・貯蔵するビオチンによる非特異的なバックグラウンドノイズを除去しにくい点、多数の相互作用因子が同定されることに伴う物理的な相互作用因子の同定が難しいことなどが指摘されている(Leissing et al., 2021)。BioID による HopF2 標的因子の探索を例にすれば、HopF2 の標的とされる BAK1 や MKK2 は同定できておらず、細胞内複合体に HopF2-BioID が物理的にアクセスできない可能性が議論されている(Khan et al., 2018)。一方で、複合体全体を BioID や TurboID で検出する試みもなされており(May et al., 2020)、複合体の全体像の理解に PL 法は有効かもしれない。これまでに、PL 法の利用により *Pta* 6605 の T3E の複数の相互作用因子の同定に成功しており、その有効性が示されたと考えている。今後は、植物-病原菌相互作用における T3E の分子機能の解明を進めていきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究のうち、*Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* 6605 のゲノム解析は、理化学研究所 植物免疫グループ 白須賢博士、浅井秀太博士、増田幸子博士らの協力で行われました。プロテオーム解析ならびに TurboID system 実験系の構築は、Max planck institute for plant breeding research の中神弘史グループリーダー、Anne Harzen 博士、Sara Stolze 博士の協力により行われました。岡山大学植物病理学研究室の豊田和弘教授、能年義輝准教授には、

研究に際しまして様々なご助言をいただきました。関係者の皆様に御礼申し上げます。これらの研究は、山陽放送学術振興財団、科学研究費基盤 B (22H0234814)、科学研究費基盤 C (22K05653)の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Albers, P., Üstün, S., Witzel, K., Kraner, M., and Börnke, F. (2019). A remorin from *Nicotiana benthamiana* interacts with the *Pseudomonas* type-III effector protein HopZ1a and is phosphorylated by the immune-related kinase PBS1. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 32: 1229–1242.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., and Collmer, A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 4856–4861.
- Baltrus, D.A., McCann, H.C., and Guttman, D.S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 18: 152–168.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., and Dangl, J.L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog.* 7: e1002132.
- Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., and Ting, A.Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* 36: 880–887.
- Brauer, E.K., Popescu, G.V., Singh, D.K., Calviño, M., Gupta, K., Gupta, B., Chakravarthy, S., and Popescu, S.C. (2018). Integrative network-centric approach reveals signaling pathways associated with plant resistance and susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *PLoS Biol.* 16: e2005956.
- Büttner, D. (2016). Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 40: 894–937.
- Chakravarthy, S., Worley, J.N., Montes-Rodriguez, A., and Collmer, A. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 polymutants deploying coronatine and two type III effectors produce quantifiable chlorotic spots from individual bacterial colonies in *Nicotiana benthamiana* leaves: Effector polymutants producing coronatine. *Mol. Plant Pathol.* 19: 935–947.
- Conlan, B., Stoll, T., Gorman, J.J., Saur, I., and Rathjen, J.P. (2018). Development of a rapid in planta BioID system as a probe for plasma membrane-associated immunity proteins. *Front. Plant Sci.* 9: 1882.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Russell, A.B., Martin, G.B., and Collmer, A. (2011).

- Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 2975–2980.
- D’Costa, V.M., Coyaud, E., Boddy, K.C., Laurent, E.M.N., St-Germain, J., Li, T., Grinstein, S., Raught, B., and Brumell, J.H. (2019). BioID screen of *Salmonella* type 3 secreted effectors reveals host factors involved in vacuole positioning and stability during infection. *Nat. Microbiol.* 4: 2511–2522.
- Dillon, M.M., Almeida, R.N.D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B.S., Desveaux, D., and Guttman, D.S. (2019a). Molecular evolution of *Pseudomonas syringae* type III secreted effector proteins. *Front. Plant Sci.* 10: 418.
- Dillon, M.M., Thakur, S., Almeida, R.N.D., Wang, P.W., Weir, B.S., and Guttman, D.S. (2019b). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20: 3.
- Kashihara, S., Nishimura, T., Noutoshi, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Ichinose, Y., and Matsui, H. (2022). HopAZ1, a type III effector of *Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci*, induces a hypersensitive response in tobacco wildfire-resistant *Nicotiana tabacum* ‘N509.’ *Mol. Plant Pathol.* (in press) <https://doi.org/10.1111/mpp.13198>
- Khan, M., Youn, J.-Y., Gingras, A.-C., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2018). In planta proximity dependent biotin identification (BioID). *Sci. Rep.* 8: 9212.
- Kourelis, J., Kaschani, F., Grosse-Holz, F.M., Homma, F., Kaiser, M., and van der Hoorn, R.A.L. (2019). A homology-guided, genome-based proteome for improved proteomics in the allopolyploid *Nicotiana benthamiana*. *BMC Genomics* 20: 722.
- Leissing, F., Misch, N.V., Wang, X., Werner, L., Huang, L., Conrath, U., and Beckers, G.J.M. (2021). Purification of MAP-kinase protein complexes and identification of candidate components by XL-TAP-MS. *Plant Physiol.* 187: 2381–2392.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* 20: 199–208.
- Mair, A., Xu, S.-L., Branon, T.C., Ting, A.Y., and Bergmann, D.C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. *eLife* 8: e47864.
- Mansfield, J. et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 13: 614–629.
- Matsui, H., Nishimura, T., Asai, S., Masuda, S., Shirasu, K., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., and Ichinose, Y. (2021). Complete genome sequence of *Pseudomonas amygdali* pv. *tabaci* strain 6605, a causal agent of tobacco wildfire disease. *Microbiol. Resour. Announc.* 10: e0040521.
- May, D.G., Scott, K.L., Campos, A.R., and Roux, K.J. (2020). Comparative application of BioID and TurboID for protein-proximity biotinylation. *Cells* 9: 1070.
- Melkonian, K., Stolze, S.C., Harzen, A., and Nakagami, H. (2022). miniTurbo-based interactomics of two plasma membrane-localized SNARE proteins in *Marchantia polymorpha*. *New*

Phytologist (in press) <https://doi.org/10.1111/nph.18151>

- Mukhtar, M.S. et al. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333: 596–601.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumphlin, N., Jones, J., and He, S.Y. (2006). A Bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313: 220–223.
- Roussin-Léveillé, C., Lajeunesse, G., St-Amand, M., Veerapen, V.P., Silva-Martins, G., Nomura, K., Brassard, S., Bolaji, A., He, S.Y., and Moffett, P. (2022). Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host Microbe* 30: 489-501.e4.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 196: 801–810.
- Rufián, J.S., Rueda-Blanco, J., López-Márquez, D., Macho, A.P., Beuzón, C.R., and Ruiz-Albert, J. (2021). The bacterial effector HopZ1a acetylates MKK7 to suppress plant immunity. *New Phytologist* 231: 1138–1156.
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., and Ivanov, N.V. (2014). The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 5: 3833.
- Studholme, D.J. (2011). Application of high-throughput genome sequencing to intrapathovar variation in *Pseudomonas syringae*: *Pseudomonas syringae* genomics. *Mol. Plant Pathol.* 12: 829–838.
- Studholme, D.J., Ibanez, S., MacLean, D., Dangl, J.L., Chang, J.H., and Rathjen, J.P. (2009). A draft genome sequence and functional screen reveals the repertoire of type III secreted proteins of *Pseudomonas syringae* pathovar *tabaci* 11528. *BMC Genomics* 10: 395.
- Vinatzer, B.A., Teitzel, G.M., Lee, M.-W., Jelenska, J., Hotton, S., Fairfax, K., Jenrette, J., and Greenberg, J.T. (2006). The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Mol. Microbiol.* 62: 26–44.
- Wei, C.-F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.-C., Martin, G.B., Huang, H.-C., and Collmer, A. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*: *Pseudomonas syringae* type III effector mutants. *Plant J.* 51: 32–46.
- Wei, H.-L., Chakravarthy, S., Mathieu, J., Helmann, T.C., Stodghill, P., Swingle, B., Martin, G.B., and Collmer, A. (2015). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector polymutants reveal an interplay between HopAD1 and AvrPtoB. *Cell Host Microbe* 17: 752–762.
- Wei, H.-L. and Collmer, A. (2018). Defining essential processes in plant pathogenesis with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 disarmed polymutants and a subset of key type III effectors: *P. syringae* effector functions in pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 19: 1779–1794.

- Xin, X.-F. and He, S.Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51: 473–498.
- Xin, X.-F., Kinch, L., Cai, B., Paasch, B.C., Kvitko, B., Grishin, N.V., and He, S.Y. (2021). *Pseudomonas syringae* effector AvrE associates with plant membrane nanodomains and binds phosphatidylinositides *in vitro*. bioRxiv preprint <https://doi.org/10.1101/2021.07.08.451616>
- Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S.Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 316–328.
- Xin, X.-F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A.C., Yao, J., Boutrot, F., Chang, J.H., Zipfel, C., and He, S.Y. (2016). Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* 539: 524–529.
- Zhang, Y., Li, Y., Yang, X., Wen, Z., Nagalakshmi, U., and Dinesh-Kumar, S.P. (2020). TurboID-based proximity labeling for in planta identification of protein-protein interaction networks. *JoVE*: 60728.
- Zhang, Y., Song, G., Lal, N.K., Nagalakshmi, U., Li, Y., Zheng, W., Huang, P., Branon, T.C., Ting, A.Y., Walley, J.W., and Dinesh-Kumar, S.P. (2019). TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity. *Nat. Commun.* 10: 3252.

複製酵素の膜結合ドメインの同定から探る

植物ウイルス複製の分子機構

小松健*・佐々木信光*・Richard S. Nelson**・有江力*

Komatsu, K., Sasaki, N., Nelson, S. R. and Arie, T.

Molecular mechanisms underlying replication of plant viruses addressed by the identification of membrane-associated domain of a replicase.

Abstract

Characterized positive-strand RNA viruses replicate in association with intracellular membranes. Regarding viruses in the genus *Potexvirus*, the mechanism by which their RNA-dependent RNA polymerase (replicase) associates with membranes is understudied. Here, by membrane flotation analyses of the replicase of plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), we identified a region in the methyltransferase (MET) domain as a membrane association determinant. An amphipathic α -helix was predicted downstream from the core region of the MET domain and hydrophobic amino acid residues were conserved in the helical sequences in replicases of other potexviruses. NMR analysis confirmed the amphipathic α -helical configuration and unveiled a kink caused by a highly conserved proline residue in the α -helix. Substitution of this proline residue and other hydrophobic and charged residues in the amphipathic α -helix abolished PIAMV replication. Ectopic expression of a GFP-fusion with the entire MET domain resulted in the formation of a large perinuclear complex, where virus replicase and RNA co-located during virus infection. Except for the proline substitution, the amino acid substitutions in the α -helix that abolished virus replication also prevented the formation of the large perinuclear complex by the respective GFP-MET fusion. Small intracellular punctate structures were observed for all GFP-MET fusions and in vitro high molecular weight complexes were formed by both replication-competent and -incompetent viral replicons, and thus were not sufficient for replication competence. We discuss the roles of the potexvirus-specific, proline-kinked amphipathic helical structure in virus replication and intracellular large complex and punctate structure formation.

Key words: plantago asiatica mosaic virus, positive-strand RNA virus, replication, membrane, amphipathic α -helix

* 東京農工大学大学院農学研究院 Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), 3-5-8 Saiwaicho, Fuchu, Tokyo, 183-8509, JAPAN

** Department of Entomology and Plant Pathology, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA

はじめに

植物ウイルスは多くの農作物に感染し被害をもたらしており、特に近年、農業のグローバル化に伴い新たなウイルス病の発生の報告が増加している (Tsuda and Sano, 2014)。一方で、多くの動物ウイルスと同様、植物ウイルスの感染を抑える薬剤は開発されていない。植物ウイルス病の防除戦略を考えるうえで、その感染機構、特にその最初期の過程である複製の分子機構の理解が非常に重要である。

動植物に感染するウイルス、特にプラス鎖 RNA ウイルスの複製は宿主細胞の細胞内膜系を利用して行われる。これまでの動植物ウイルスの研究により、ウイルスの複製の初期段階で、膜局在性のタンパク質により細胞内膜系が改変され、複製複合体と呼ばれる構造が形成されることが示されている。複製複合体は、複製に必要な宿主因子を含む複製装置そのものであり、かつウイルスが RNA サイレンシングなどの宿主細胞の防御機構を回避し効率的に自身を複製するために重要であると考えられ、その形成は複製に不可欠である。

以上より、全てのウイルスが自身のゲノムを複製させるために持つタンパク質である複製酵素は、複製に関わるポリメラーゼ活性に加えて、細胞内膜系に結合する領域を有すると考えられる。しかし、ほとんどのウイルスで、複製酵素に存在する膜結合領域は同定されておらず、予測も困難であった。その理由の一つとして、多くの生物で膜結合に関与することが知られており、アミノ酸配列から予測が不可能ないわゆる「膜貫通領域」が、多くの場合ウイルスの複製酵素には見出されないことがあげられる。

本稿では、世界中でさまざまな農作物に甚大な被害をもたらす、数多くの分子生物学的な研究がなされてきた植物 RNA ウイルスであるポテックスウイルスの複製酵素から、膜結合領域を同定した我々の研究について紹介する。

1. 研究の契機：オオバコモザイクウイルスの複製酵素は膜面に局在する

オオバコモザイクウイルス (*plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) は、*Alphaflexiviridae* 科 *Potexvirus* 属のプラス一本鎖 RNA ウイルスである。PIAMV は約半世紀前にロシア極東地域でオオバコから初めて報告されて以降、1994 年の全長ゲノム塩基配列の決定 (Solovyev et al., 1994) 以外、その詳細な研究はほとんどされてこなかった。しかし今世紀に入って、本ウイルスは食用・鑑賞ユリに壊そ症状を引き起こすことで問題となった。その後、著者らの研究により、本ウイルスは自然生態系中の多年生野草から遺伝的に非常に多様な分離株が数多く見出されることが明らかになってきた (Komatsu et al., 2017)。また、PIAMV はモデル植物シロイヌナズナに効率的に感染することから、その GFP (green fluorescent protein) 発現ウイルスを用いて、ウイルス感染に関わる興味深い宿主因子、および宿主の抵抗性因子が複数同定されている。本ウイルスが本格的に研究され始めてから積み重ねられてきた知見については、最近筆者らが発表した総説をご覧ください (Komatsu and Hammond, in press)。

PIAMV のゲノムには他のポテックスウイルスと同様、複製酵素 (replicase)、3 つの移行タンパク質 (triple gene block protein 1-3)、および外被タンパク質 (coat protein; CP) の 5 つのタンパク質がコードされている。PIAMV の複製は、移行タンパク質と CP を除いた複製酵素

と両末端の非翻訳領域のみをもつ”replicon”でも生じる (Komatsu et al., 2011)。複製酵素には、N 末端側からメチルトランスフェラーゼ (MET)、ヘリカーゼ (HEL)、ポリメラーゼ (POL) の三つのドメインが存在し、MET と HEL の間にはウイルス分離株間で比較的アミノ酸配列の多様な領域が存在している (図 1, Komatsu et al., 2017)。

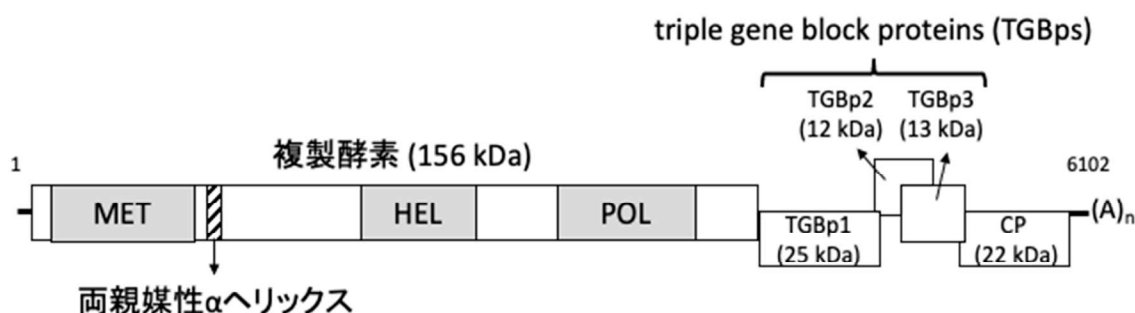


図 1 PIAMV(Li1 分離株)のゲノム構造

筆者らは、PIAMV の食用ユリ分離株 Li1 が *Nicotiana benthamiana* に引き起こす全身壊死に関する研究を進め、PIAMV の複製酵素が蓄積量依存的に細胞死を誘導すること、細胞死誘導能が複製酵素の HEL ドメインに存在することを明らかにしてきた (Komatsu et al., 2011)。この研究の過程で、ウェスタンブロッティングにより複製酵素の蓄積量を調べていた筆者らは、PIAMV の複製酵素が可溶性画分 (S30) からは検出されず、膜画分 (P30) のみ検出されることに着目した (Komatsu et al., 2011)。実際、これまでの植物 RNA ウイルスの複製機構の研究は、ウイルスの複製酵素が宿主細胞の内膜系に局在、それを再構成し複製複合体を形成する機構を明らかにしてきている (den Boon and Ahlquist, 2010; Laliberté and Zheng, 2014)。さらには、その前提と考えられる、複製酵素が膜に局在するメカニズムについてもいくつかのウイルスで報告されていた (Kusumanegara et al., 2012; Liu et al., 2009 など)。PIAMV を含むポテックスウイルスでも、タイプ種であるジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX) を中心に複製機構に関する生化学が活発に展開され、PVX の複製活性が小胞体膜を含む細胞の膜画分から見出されるとの知見があった (Doronin and Hemenway, 1996)。しかし、ポテックスウイルスやその近縁ウイルスの複製酵素が膜に結合するメカニズムは不明であった。

これまでの植物 RNA ウイルスの知見とも合致するが、PIAMV の複製酵素のアミノ酸配列を膜貫通領域予測ソフトに入れても、膜局在に必要と考えられる一連の疎水性アミノ酸は見出されなかった。一方で、PIAMV (replicon) 感染植物組織から抽出した P30 画分には複製活性が存在していること (図省略)、複製酵素の免疫染色により核周辺の小胞体膜に凝集体が認められること (図省略) は、PIAMV の複製酵素が膜に結合して複製活性を持つことを示していた。このことから筆者らは、特に brome mosaic virus (BMV) の研究で取られている手法 (den Boon et al., 2001; Liu et al., 2009) を参考に、PIAMV の複製酵素の膜局在ドメインの同定を試みることにした。

2. 膜局在ドメインとしての湾曲した両親媒性 α ヘリックスの同定

2-1. 複製酵素の膜局在性はMETドメインのC末端領域により決定される

まず、先行研究 (Komatsu et al., 2011) と同様に複製酵素をMET、HEL、POLドメインをそれぞれ含む3つの領域に分割してアグロインフィルトレーションにより *N. benthamiana* で一過的発現させ、抽出したタンパク質を30,000 gの超遠心の上清であるS30と沈殿のP30に分画した。ウエスタンブロッティングの結果、METドメインを含む領域のほとんどがP30に検出され、この領域がPIAMVの複製酵素の膜局在性に関わっていると考えられた。

膜局在性に関わる領域をさらに絞り込むため、membrane flotation assayを行った。この手法では、遠沈管の一番下にP30画分を混合した52%のスクロースを(図2のfraction 5-6の部分)、その上(fraction 2-5)に45%スクロース溶液を、一番上(fraction 1)に10%のスクロース溶液を重層する。これをスイングローターによる長時間の超遠心分離に供試すると、膜に結合しているタンパク質がfraction 1と2に浮遊し、膜に結合していないが凝集しているタンパク質がfraction 5と6に沈降する。これにより、単なるaggregationによりP30に分画されるタンパク質と、生体膜に結合しているタンパク質とを分離することができる。

METドメインを含む複製酵素のN端側領域(404アミノ酸)を6つのサブドメイン(A-F)に分割しmembrane flotation assayとウエスタンブロッティングを行ったところ、最もC末端に近い330-404アミノ酸の部分が高いflotation efficiency(膜結合しているタンパク質の割合)を示し、この領域が膜局在に重要であることが示された(図2)。このことは、GFP融合タンパク質で同様の解析を行った結果からも支持された(図省略)。

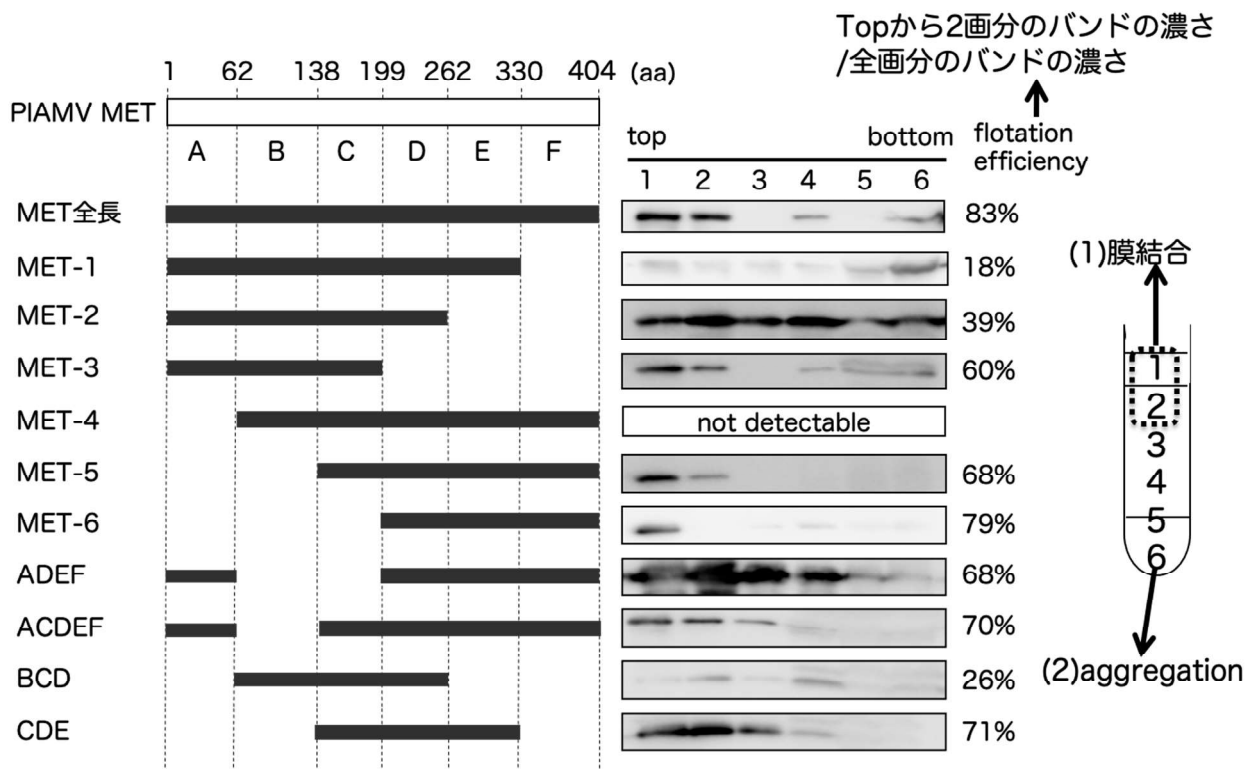


図2 METドメインのdeletion変異体の膜局在性

報告している (Liu et al., 2009)。さらに興味深いことに、また当初気づかなかったことに、得られたヘリックスは 369 番目のプロリンで 36.7°湾曲していた。これまでに動植物のウイルスで両親媒性 α ヘリックスが膜局在性に関わるとの報告がされているが、湾曲した構造を持つものは筆者らの知る限りなかった。

この両親媒性 α ヘリックスの領域を他のポテックスウイルス種と比較すると、L362、L363、L367 などの疎水性のロイシン、R365 の親水性のアルギニンなどに該当する部分は、他種でも性質の類似したアミノ酸が見出された。また、369 番目のプロリンは全てのポテックスウイルスで保存されていた。以上の結果は、他のポテックスウイルスでも当該両親媒性 α ヘリックスが保存されており、これらのアミノ酸の性質がウイルス感染に重要である可能性を示唆するものであった (図 4)。

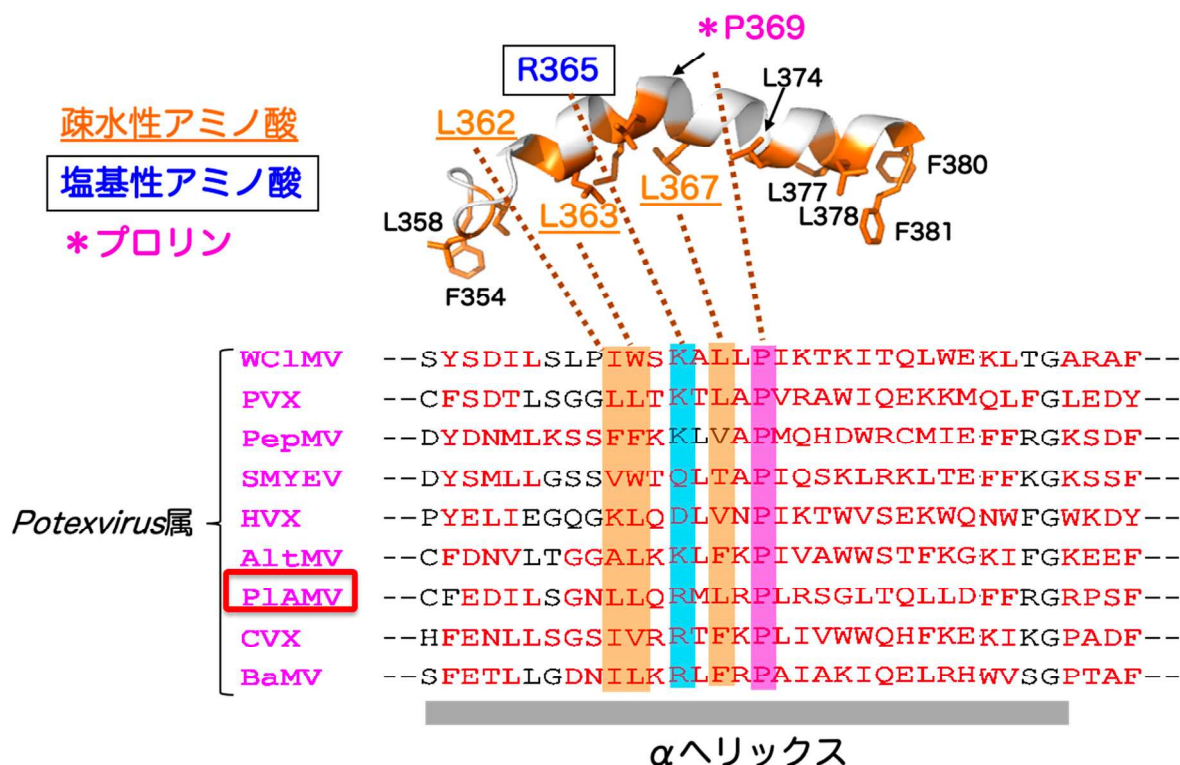


図 4 近縁ウイルスの両親媒性 α ヘリックスに保存される性質の類似したアミノ酸

3. 両親媒性 α ヘリックスを含む MET 領域は核周辺に凝集体を形成する

次に、上記のように膜局在性に関わる湾曲した両親媒性 α ヘリックスを有する MET 領域が実際に細胞内でどのような局在を示すのかを調べた。GFP を C 末端に融合させた MET-GFP を *N. benthamiana* でアグロインフィルトレーションにより一過的に発現させその局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、MET-GFP は小胞体マーカーである ER-mCherry に近接して細胞膜周辺に小胞を形成し、さらに細胞内の核周辺で小胞体に取り囲まれた凝集構造(2.5 μ m 以上)を形成した (図 5 : 上段、矢印は凝集体を示す)。一方で、両親媒性 α ヘリックスを含む 24 アミノ酸の領域だけを GFP と融合させると、前者の小胞は形成されたが後者の凝集体は観察されなかった。このことから、凝集体の形成には両親媒

性 α ヘリックス以外の MET ドメインの全体が必要であると考えられた。MET-GFP の形成する凝集体は、ポテックスウイルス感染時に核周辺に観察されるとの報告があった”X-body”を想起させ (Tilsner et al., 2012)、この MET 領域の凝集体形成能がウイルスの感染に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

4. 両親媒性 α ヘリックスの保存されたアミノ酸の置換は複製を不能にし凝集体形成を阻害する

4-1. アミノ酸置換の複製への影響

動物、植物双方の RNA ウイルスの先行研究では、膜局在に関与する両親媒性 α ヘリックスの保存アミノ酸に変異を導入すると、複製が著しく阻害されることが報告されている (Liu et al., 2009; Gouttenoire et al., 2014)。PIAMV の両親媒性 α ヘリックスの複製への関与を調べるため、PIAMV の Li1 分離株由来の GFP 発現ベクターである Li1-GFP (Minato et al., 2014) を用いて変異ウイルスの複製能を調査した。具体的には、2 章で示した他のポテックスウイルスでも性質が保存されたアミノ酸に、それぞれその性質を失わせるような置換を導入した。疎水性のロイシンにはその側鎖の性質を弱めたアラニン置換を、親水性のアルギニンには電荷が正から負に変わる変異を (R365E)、さらにプロリンには、疎水性の性質は残しつつヘリックスの湾曲をなくすロイシン変異を導入した (P369L)。このように置換変異を導入した Li1-GFP の変異ウイルスを 8 種類作出し、試験管内で合成したそれぞれの転写 RNA を *N. benthamiana* のプロトプラストに導入した。接種 24 時間後に観察を行うと、野生型 Li1-GFP と同様に GFP 蛍光が観察される変異ウイルス (L362A、R365K、L370A および L374A) と、GFP 蛍光が観察されない変異ウイルス (L363A、R365E、L367A および P369L) があることがわかった (図 5 : 矢頭は GFP 蛍光が認められた細胞を示す)。この結果は、プロトプラストから抽出した total RNA を用いてウイルス RNA を検出するノーザンブロッティング解析によっても確かめられ、GFP 蛍光が観察されない変異ウイルスではウイルス RNA のバンドが検出されなかった。ノーザンブロッティングはウイルスのマイナス鎖を検出するプローブでも行い、上記の GFP 蛍光が認められない変異体ではマイナス鎖

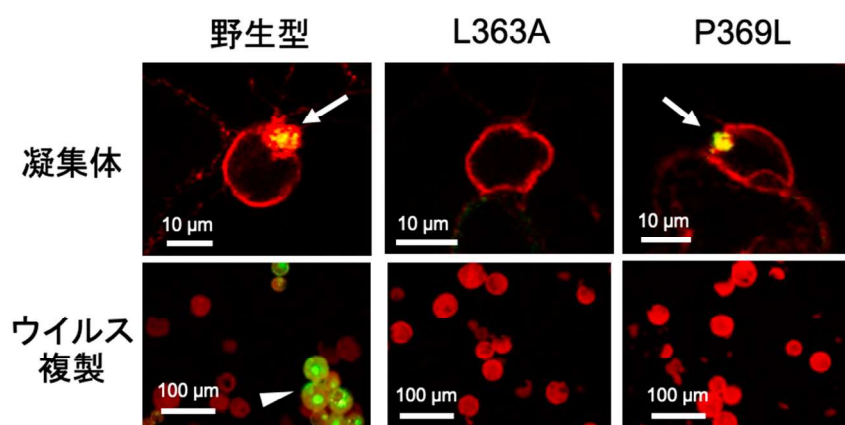


図 5 両親媒性 α ヘリックスの保存されたアミノ酸への変異導入の影響

RNA が検出されることがわかった。マイナス鎖 RNA の合成はポテックスウイルスなどプラス鎖 RNA ウイルスの複製の初期段階であることから、両親媒性 α ヘリックスの保存アミノ酸は、ウイルス複製のごく初期の段階で重要であることが示唆された。

4-2. アミノ酸置換の凝集体形成への影響

次に、同じアミノ酸置換を MET-GFP に導入し、凝集体形成への影響を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。その結果、上記 4-1. のプロトプラストの実験で複製が維持される変異を導入した MET-GFP は全て核周辺の凝集体の形成能を持っていた。逆に、複製が生じなくなる 4 つの変異のうち 3 つ (L363A、R365E、L367A) は、MET-GFP に導入することで凝集体が形成されなくなった。興味深いことに、プロリンをロイシンに置換してヘリックスの湾曲を失わせると考えられる変異 (P369L) は、ウイルスに導入すると複製能を失うが、MET-GFP の凝集体形成は阻害されなかった。

以上の結果は、MET-GFP による凝集体の形成は複製に必要なが十分ではないことを示している (Komatsu et al., 2021)。このことを支持するように、BYL を用いた *in vitro* 翻訳複製系の実験により、P369L 変異体は、ゲノム RNA 合成能を失っているものの、高分子量の複製複合体の前駆体 (premature membrane targeting complex; PMTC、Yoshida et al., 2019) 形成には影響しなかった (図省略)。

おわりに

生化学的解析・バイオイメージング解析・NMR 解析など一連の研究により、長年分子生物学的研究が進んでいながら未解明であったポテックスウイルスの複製に重要な膜局在ドメインを同定することができた。本領域は、ポテックスウイルスだけでなく近縁の属のウイルスにも見出されており、BMV の先行研究の例のように複製複合体の形成など、複製の足場作りに重要な役割を果たしている可能性が高い。

一方、本研究では迫っていない課題も残されている。一つは、なぜ P369L 変異が凝集体形成能を持ちつつも複製能を失っているかという点である。この点に関して筆者らは、P369 が、複製酵素の膜局在と複製複合体の前駆体の形成のあとに、活性を発揮するために宿主因子と相互作用する必要がある、その相互作用に重要である可能性があると考えている。これを明らかにするため、現在、宿主因子の同定を目指して研究を行なっている。

もう一つの課題は、MET-GFP の一過的発現で観察される凝集体が実際のウイルス感染における複製複合体を必ずしも反映していないのではないかという点である。筆者らは免疫染色で見られる核周辺の凝集体との類似性から MET-GFP による凝集体は PIAMV 複製に必要な構造とある程度関連していると考えている。しかし、実際の複製時の複製酵素の局在が生細胞で観察できることで RNA ウイルスの複製の初期段階の機構を明らかにするブレークスルーになり得ることは確かであり、こうした観点から筆者らは複製酵素のライブイメージングにも挑戦している。以上のような多方面からのアプローチにより、ウイルスの複製機構の解明に新しい視点を与えることができると考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究のうち、1. と 2. は東京大学植物病理学研究室 (難波成任教授) で行われ、3. は東京農工大学植物病理学研究室および遺伝子工学研究室との共同研究として行われました。本研究を形にするにあたってお力添えをいただいた多くの皆様、特に 3. の遂行にあたって一緒に頑張っていた農工大の学生のみなさまに感謝申し上げます。また本研究の契機を見出すところから研究を進めていく段階に至るまで、暖

かく見守っていただき自由に研究を展開させていただいた東京大学の難波名誉教授・山次康幸教授に御礼申し上げます。なお、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金（19K06048）および東京農工大学グローバルイノベーション研究院の助成を受けて実施されました。

引用文献

- Ahola T., Karlin DG. (2015) Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biol Direct* 10:16.
- den Boon JA., Chen J., Ahlquist P. (2001) Identification of sequences in Brome mosaic virus replicase protein 1a that mediate association with endoplasmic reticulum membranes. *J Virol* 75:12370–12381.
- den Boon JA., Ahlquist P. (2010) Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* 64:241–256.
- Doronin SV., Hemenway C. (1996) Synthesis of potato virus X RNAs by membrane-containing extracts. *J Virol* 70:4795–4799.
- Gouttenoire J., Montserret R., Paul D., Castillo R., Meister S., Bartenschlager R., Penin F., Moradpour D. (2014) Aminoterminal amphipathic α -helix AH1 of hepatitis C virus nonstructural protein 4B possesses a dual role in RNA replication and virus production. *PLoS Pathog* 10:e1004501.
- 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. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:408-420.
- Komatsu K., Yamashita K., Sugawara K., Verbeek M., Fujita N., Hanada K., Uehara-Ichiki T., Fuji SI. (2017) Complete genome sequences of two highly divergent Japanese isolates of *Plantago asiatica* mosaic virus. *Arch Virol* 162:581-584.
- Komatsu K., Sasaki N., Yoshida T., Suzuki K., Masujima Y., Hashimoto M., Watanabe S., Tochio N., Kigawa T., Yamaji Y., Oshima K., Namba S., Nelson R. Arie T. (2021) Identification of a proline-kinked amphipathic α -helix downstream from the methyltransferase domain of a potexvirus replicase and its role in virus replication and perinuclear complex formation. *J Virol* 95: e01906-20.
- Komatsu K., Hammond J. (2022) *Plantago asiatica* mosaic virus: an emerging plant virus causing necrosis in lilies and a new model RNA virus for molecular research. *Mol Plant Pathol* DOI: 10.1111/MPP.13243.
- Kusumanegara K., Mine A., Hyodo K., Kaido M., Mise K., Okuno T. (2012) Identification of domains in p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic reticulum membranes in Red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 433:131–141.
- Laliberté JF., Zheng H. (2014) Viral Manipulation of Plant Host Membranes. *Annu Rev Virol* 1:237–259.
- Liu L., Westler WM., den Boon JA., Wang X., Diaz A., Steinberg HA., Ahlquist P. (2009) An amphipathic alpha-helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function. *PLoS Pathog* 5:e1000351.
- Minato N., Komatsu K., Okano Y., Maejima K., Ozeki J., Senshu H., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. (2014) Efficient foreign gene expression in planta using a *plantago asiatica* mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch Virol* 159: 885-896.

- Solovyev AG., Novikov VK., Merits A., Savenkov EI., Zelenina DA., Tyulkina LG., Morozov SY. (1994) Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica* mosaic potexvirus. J Gen Virol 75: 259-267.
- Tilsner J., Linnik O., Wright KM., Bell K., Roberts AG., Lacomme C., Santa Cruz S., Oparka KJ. (2012) The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. Plant Physiol 158:1359–1370.
- Tsuda S., Sano T. (2014) Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. J Gen Plant Pathol 80: 2-14.
- Yoshida T., Shiraishi T., Hagiwara-Komoda Y., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Fujimoto Y., Yusa A., Yamaji Y., Namba S. (2019) The Plant Noncanonical Antiviral Resistance Protein JAX1 Inhibits Potexviral Replication by Targeting the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. J Virol 93: e01506-18

特別講演 ウイルス伝搬を考える

～ウイルス学研究でやり残したことも

西村 秀一* Nishimura. H

Virus transmission and unanswered question in my career as a virologist

Key words: viral transmission, airborne, aerosol, viral viability

* 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルスセンター National Hospital Organization, Sendai Medical Center, 2-11-12 Miyagino, Miyagino, Sendai, 983-8520, JAPAN

ものの見方は、その人のよって立つ位置による。談話会の中での講演を求められた。私は主に人間の病原体としてのウイルスのそれも呼吸器系のウイルスといった狭い領域を日常的に扱っている。その立場から植物病理学、植物の病原微生物領域の方々にお話することになる。この領域は門外漢であるが、何を隠そう私は嫌いではない。ウイルス学会などでみなさんの領域のお話聞くと、「隣の芝生はあおい」かどうかわからないが、基礎的な話も応用の話も、人の病原体ウイルスよりも何か明るさというか夢のようなものが感じられ、ウイルス学の楽しさが掻き立てられる感じがして、うらやましいくらいである。

講演の概略予告

さて40分間のこの講演で何を話そうか。最初に動物ウイルスでのウイルスの感染様式と伝搬様式について概説する。内容的には、おもにヒトのウイルス感染症の例を挙げつつ、医学系の学生に総論を講義するようなものである。そのなかにはみなさんが聞いたこともないようなあっと驚くことが、あるかもしれない。

次に、これらの話題の中で私が一番興味を持っている airborne transmission についてヒトでの例をもとに解説する。さらには、それらに関するデータを実験室や野外でどのようにして得ているかを具体的にお見せしたい。

つぎに、私が想像するみなさんの領域における感染伝播、とくに airborne による伝搬について考えてみたい。門外漢がまったくピントを外した話であって、お話にならないかもしれないし、そんなことはみなとっくにやっているという話になるのかもしれない。あるいは、私の話でもみなさんに何らかの気づきとかヒントになり、どこかでみなさんのお役に立てるかもしれない。

怠惰のせいで、講演の具体的内容を本稿の締め切りまで文章としてまとめあげることができなかったので、予告だけでお許しいただきたい。そんな私でも話がみなさんの頭の片隅に少しでも残るよう準備したい。あと、もうすぐキャリアを終えるウイルス学の一学徒

が、ずっと長い間やりたくてやれなかったこと、後進に託したいことも最後に話せればと思っている。

植物成長と防御応答の調節へのサリチル酸 配糖化酵素遺伝子の関与

竹下 稔・小林 優大

Takeshita M. and Kobayashi Y.

Involvement of *salicylic acid glucosyltransferase*
in plant growth and defensive responses

Abstract

The immune-priming effects of SA mimic benzothiadiazole (BTH) on plant pathogens attack have been well studied. However, most parts of the BTH-primed defense response still remain to be clarified. In the present study, we focused on the levels of *salicylic acid glucosyltransferase* (*SAGT*) transcripts which were significantly lower in BTH-primed *Nicotiana tabacum* (Nt) than in the salicylic acid (SA)-primed Nt plants. This observation suggested an operation point of BTH that facilitates enhancement of SA-related host defensive responses. In addition, prior treatment with BTH followed by SA could still suppress transcript levels of *SAGT*, demonstrating that BTH inhibition is not reversible and that BTH is a better defense inducer than SA. Furthermore, *SAGT*-overexpressing (OE) *Nicotiana benthamiana* (Nb) lines accumulated less SA and jasmonic acid (JA) than in wild-type Nb plants. The OE Nb lines developed more severe symptoms and accumulated virus at higher levels, while resistance increased in *SAGT*-silenced (IR) Nb plants. After the BTH treatment, OE Nb plants grew slightly larger than the wild-type Nb plants. These results together indicate that *SAGT* has a pivotal role in the balance between plant growth and SA/JA-mediated immune responses for optimum plant fitness.

Key words: benzothiadiazole (BTH), defence, fitness, growth, immune induction, salicylic acid, salicylic acid glucosyltransferase

宮崎大学農学部 Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
University of Miyazaki, 1-1 Gakuen-kibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.
Email minorutk@cc.miyazaki-u.ac.jp

はじめに

植物は常に様々なストレスを受けながら懸命にその生涯を全うし、生命の営みを次世代に引き継いでいる。植物における生長と防御のトレードオフ (trade-off) は植物ホルモンが関与する分子機構によって制御されていると考えられている (Huot *et al.*, 2014)。植物ホルモンの 1 種であるサリチル酸 (salicylic acid; SA) は植物の生長と生物的、あるいは非生物的ストレスに対する反応に関与し、細胞内の大部分の SA はグルコシル化、あるいはメチル化されていると考えられている (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011)。植物における自然免疫の分子機構である全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance; SAR) の誘導に重要であるサリチル酸メチル (MeSA) の SA への変換は SA-binding protein 2 (SABP2) によって触媒されている (Forouhar *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2010)。一方、SA は SA 2-O- β -D-glucoside (SAG) に変換される (Pastor *et al.*, 2013) (図 1.)。SA のグルコシル化は SA glucosyltransferase (SAGT) としても知られている uridine diphosphate (UDP)-glucosyltransferase によって触媒されている (Vlot *et al.*, 2009)。タバコ (*Nicotiana tabacum*; Nt) の SAGT はジャスモン酸 (jasmonic acid; JA) の誘導体である tuberonic acid (12-hydroxyjasmonic acid; TA) のグルコシル化も触媒し、機械的な付傷でも誘導される (Seto *et al.*, 2011)。SAGT の発現は SA 処理や病原体による攻撃によって誘導されるため、SAGT は SA と SAG のバランス制御において重要な役割を果たすことが推定された。SA 誘導抵抗性は SA をカテコールに変換する NahG の発現によって著しく低減するため、内在性 SA の濃度に依存していることが示唆されている (Chivasa and Carr, 1998)。SA 処理の植物生長への作用は植物種や生育段階によって影響を受け、SAGT によって制御されている内在性 SA の濃度によって変化する (Vlot *et al.*, 2009)。

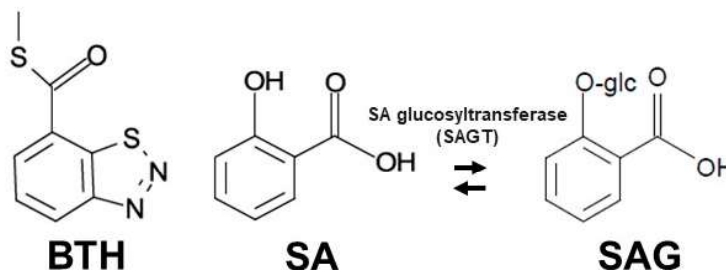


図 1. 化学構造式

薬剤誘導型の免疫反応は病原体からの攻撃から植物を保護する戦略を開発するために盛んに研究されてきた。抵抗性を誘導する薬剤の効果は宿主植物と病原体との組み合わせに依存するが、そのような免疫誘導には SAR に関連する防御関連遺伝子群の発現量上昇が共通して認められる (Dempsey *et al.*, 2017)。人工的な免疫誘導のために用いられる benzothiadiazole (BTH) は 1,2,3-benzothiadiazole-7-thiocarboxylic acid-S-methyl-ester (ASM) としても知られ、最も広く使われている抵抗性誘導剤の一つである。BTH は植物ウイルスを含む広範な植物病原体に対する宿主抵抗性を誘導することができる (Takeshita *et al.*, 2013; Frackowiak *et al.*, 2019; Kobayashi *et al.*, 2020)。BTH による免疫誘導は SA 誘導 SAR の指標としてよく知られている抵抗性関連遺伝子 *pathogenesis-related protein 1 (PR1)* の発現上昇と相関関係にあり、SABP2 が BTH の

acibenzolar への返還を触媒し、その acibenzolar がタバコにおける SAR の誘導に必要であることが報告されている (Tripathi *et al.*, 2010)。また、*NahG* タバコにおいて BTH が濃度依存的に *PR1a* の転写物レベルを上昇させること、SA 蓄積を直接誘導しないことが示されており、これらの結果は BTH が SA 蓄積の下流で抵抗性関連シグナル伝達経路を刺激していることを示唆している (Friedrich *et al.*, 1996)。さらに、BTH は *NahG* 発現 *Arabidopsis* で宿主抵抗性を誘導できるが、*Nim1* (*NPR1*; *NONEXPRESSOR of PATHOGENESIS-RELATED GENES 1*) 変異体では誘導できないことが報告されている (Lawton *et al.*, 1996)。この結果は、BTH が SA 蓄積と *NPR1* 発現の間の SAR 関連伝達経路を刺激することを示唆している。また、BTH は SA より僅かに高い親和性をもって *NPR1* に結合することが報告されている (Wu *et al.*, 2012)。以上の結果から、私たちは BTH が SA よりも効果的に免疫反応を誘導している仕組みをより深く知りたいと考えた。そこでウイルス感染における BTH の抑制効果を調べ、続いて植物基礎抵抗性に関与する複数の宿主遺伝子の転写レベルでの変動を解析した。その結果を受け、私たちは BTH と SA 間の作用の違いに関し、*SAGT* の可能性について焦点を当て、転写レベルでの解析を行った。その結果、BTH は *SAGT* の転写を抑制する作用があるため免疫誘導が促進されている可能性、さらに *SAGT* は SA と BTH を識別できる可能性を見出した。加えて、*SAGT* は SA だけでなく、JA も制御することが示唆された。今回は、*SAGT* が植物生長と防御のバランスを制御する重要な因子であることを示唆する研究内容を紹介したい。

1. BTH 処理後のウイルス感染による病徴の抑制

野生型の Nt と *Nicotiana benthamiana* (Nb) の展開葉 1 枚をキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus; CMV) 接種 2 日前に 0.12 mM の BTH で 5 秒間浸漬処理した (図 2.)。その結果、BTH 処理区の Nt (Nb) における CMV 蓄積量は接種後 9 日 (5 日) 後時点で水処理区と比べて著しく抑制されていた。これらの結果は BTH のウイルスの上位葉への移行抑制効果を示すものであった。また、0.12 mM の BTH 処理では両植物において生育障害は認められなかった。

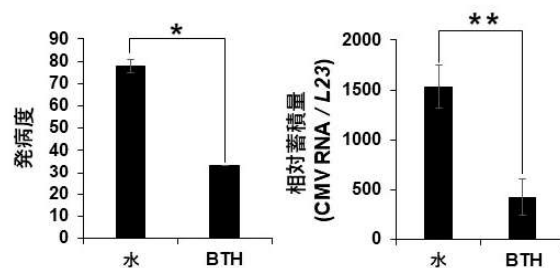


図 2. BTH 処理後の *Nicotiana benthamiana* における発病度および CMV-YRNA 相対蓄積量

2. BTH と SA との間の植物免疫誘導のメカニズムの違い

BTH による免疫誘導を特徴づけるために SA、JA、エチレン (ethylene; ET) 関連シグナル伝達系、SA 蓄積や RNA サイレncing に関与するいくつかの宿主遺伝子の BTH 処理葉における発現状況を解析した。BTH 処理 12 時間後において、*PR1a* と *PR1b* 転写物の相対蓄積量は有意に上昇したが、*SAGT*、*Coil*、*PDF 1.2*、*EREBP1*、*EREBP2*、*ERF1*、*PAL* および *ICS* のそれらは有意に上昇しなかった。また、RNA サイレncing に関与する *RDR1* と *RDR6* 転写物の相

対蓄積量は BTH 処理後に持続的な上昇を示さなかった。しかしながら、BTH 処理 12 日後までの各遺伝子の転写物蓄積レベルを調べると、*SAGT* 転写物の相対蓄積量は持続的に抑制されていることを見出した。そこで、私たちは BTH が誘導する植物免疫における *SAGT* の役割に焦点を当てて解析することとした。

BTH 処理をした Nt における *SAGT* 転写物の相対蓄積量は処理後 12、48 時間の時点で低下したが、一方 SA 処理をした Nt では 6 時間後に上昇した後、12、48 時間の時点では水処理区と同等のレベルで推移した。また、Nb で同じ試験を実施したところ、同様の傾向が認められた (図 3.)。

SAGT に加えて、*PR1a*、*Coil*、*PDF 1.2*、および *RDR6* について同様に解析した。その結果、BTH 処理区の *PR1a* 転写物の相対蓄積量は処理後 12、48 時間の時点で、著しく上昇していたが、SA 処理区では処理後 6 時間後に著しく上昇した後、12 時間の時点で非処理区と同等のレベルまで急速に減少した。これらの結果は、BTH 誘導型の抵抗性が SA のそれよりも長時間持続することを示唆した。その他の *Coil*、*PDF 1.2*、および *RDR6* 転写物の相対蓄積量は両処理区において類似して推移した。

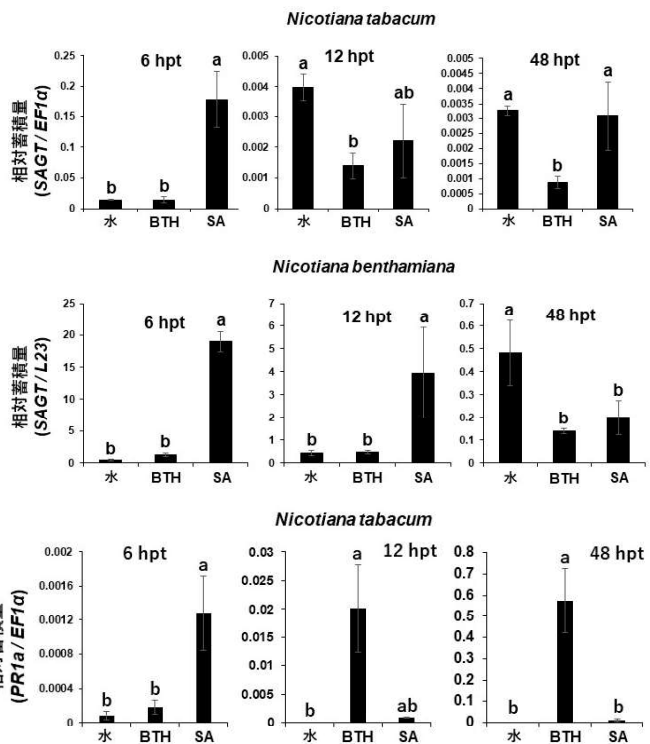


図 3. BTH処理後の*SAGT*および*PR1a*転写物の相対蓄積量

3. BTHによる *SAGT* 転写物と *SAG* の蓄積レベルの低下

BTH による *SAGT* 発現抑制の安定性を調べるために BTH 処理 42 時間後に SA 追加処理を行い、その 6 時間後の *SAGT* 転写物の相対蓄積量を対照区である水処理後の SA 追加処理区のそれと比較した (図 4.)。その結果、BTH 処理後の SA 追加処理区では対照区の *SAGT* 転写物よりも有意に抑制されていた。したがって、BTH は強力に *SAGT* の発現を抑制することが示唆された。次に SA あるいは BTH 処理後の Nt と Nb において、SA と *SAG* の蓄積量を測定した (図 5.)。

SA および BTH 処理区の Nt では処理 6 時間後の時点で SA の一過的な上昇が認められたが、12 時間後までには水処理区と同等のレベルにまで低下した。一方、SA 処理区のみで処理 6、12、48 時間後に著しい *SAG* 蓄積量の上

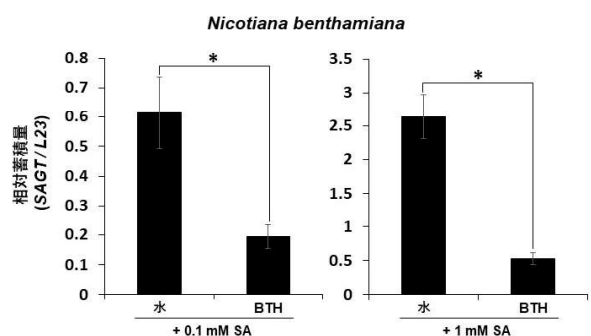


図 4. BTH処理後にSAを追加処理した場合の*SAGT*転写物の相対蓄積量

昇が認められた。Nbにおける同じ試験でも同様の傾向が認められた。以上の結果からも、BTHとSAによるSAGT転写制御は本質的に異なることが示唆された。

4. SAGTによるバイオマス生産の促進とSAおよびJAに関する負の制御

BTHは植物バイオマス生産を減少させるとの報告がなされているため (Canet *et al.*, 2010)、形質転換体であるSAGT過剰発現NbとSAGT発現抑制Nbを用い、SAGT転写物等や植物生長への影響を調べた (図6.)。BTH処理後のSAGT過剰発現NbではSAGT転写物が蓄積し、SAGTが高レベルで発現していた。さらに、予測通りこれらの植物では非形質転換体と比べて低レベルのSAと高レベルのSAGが蓄積していた。また、興味深いことにSAGT過剰発現Nbでは非形質転換体より低レベルのJAやTAが検出され、より多くのtuberonic acid glucoside (TAG)の蓄積が認められた。これらの現象から、SAGT触媒によるグルコシル化によりJAがTA経路でTAGに変換されたためJAの蓄積量が減少したことが推察された。この結果はSAGTがTAをTAGに変換できるとする報告と一致する (Seto *et al.*, 2011)。BTHを散布処理したSAGT過剰発現Nbは同じ処理をした野生型Nbと比較してより多くのバイオマスを生産する傾向にあった。一方、BTHを散布処理したSAGT発現抑制Nbは少なくとも野生型Nbより多くのバイオマスを生産することはなかった。以上の結果から、SAGTは生長と防御のトレードオフにおいて、重要な機能を果たしていることが示唆された。

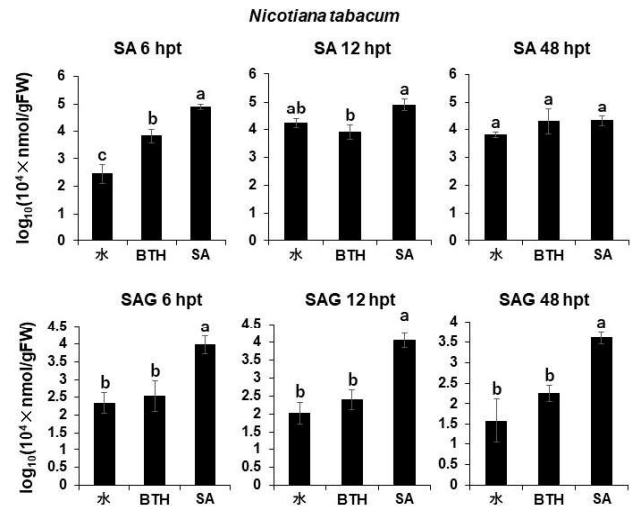


図5. 各処理区におけるSAおよびSAGの相対蓄積量

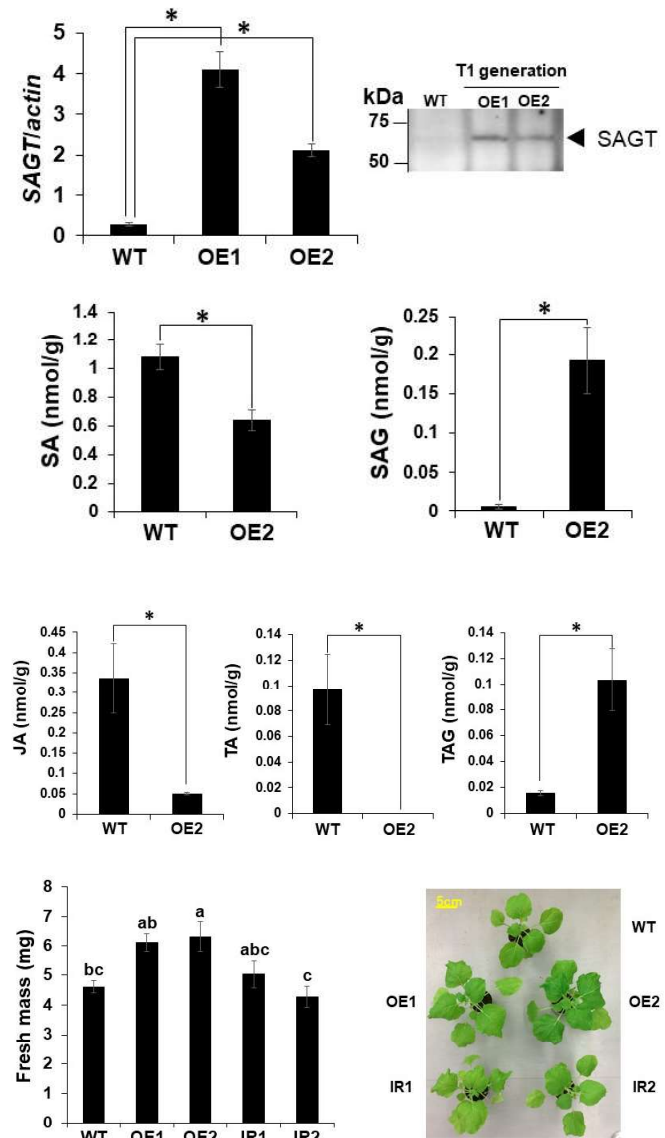


図6. *Nicotiana benthamiana*のSAGT過剰発現ライン(OE1, OE2)とSAGT発現抑制ライン(IR1, IR2)の性状

5. 植物免疫における *SAGT* の役割

SAGT の植物防御反応における直接関与を確かめるために *SAGT* 過剰発現 Nb と *SAGT* 発現抑制 Nb にキュウリモザイクウイルス (CMV) を接種した (図 7.)。 *SAGT* 過剰発現 Nb ではクロロシスと黄色モザイク症状が野生型 Nb よりも持続的に引き起こされたが、 *SAGT* 発現抑制 Nb では幾分症状が軽症化した。また、 *Pseudomonas syringae* を感染させたところ、 *SAGT* 発現抑制 Nb では HR 反応が認められ、 SA 関連宿主抵抗性が誘導されたことが示唆された。 CMV RNA の蓄積量は野生型と比較して *SAGT* 過剰発現 Nb で 3 倍程度、 *SAGT* 発現抑制 Nb で 4 分の 1 程度であった。さらに、 *SAGT* 転写物蓄積レベルは *SAGT* 過剰発現 Nb で上昇し、 *SAGT* 発現抑制 Nb で減少していた。以上の結果から、 *SAGT* は宿主防御反応において重要な役割を持つことが示唆された。

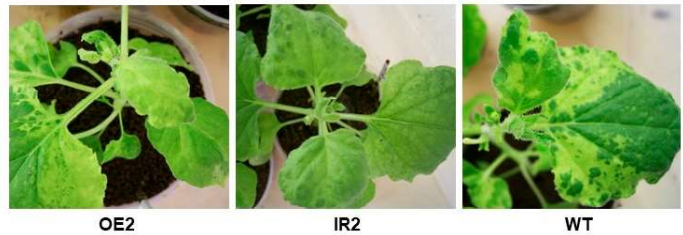


図 7. CMV-Y に感染した *SAGT* 過剰発現ライン (OE2) と *SAGT* 抑制ライン (IR2) の病徴

6. *SAGT* の植物生長と防御のトレードオフへの関与

BTH 処理後に *PR1a* と *PR1b* 転写物の蓄積量の増加と *SAGT* 転写物の蓄積量の減少が認められたが、他の JA/ET 関連遺伝子や RNA サイレncing 関連遺伝子のそれらについては増加が認められなかった。この結果は *Arabidopsis thaliana* 変異体を用いた解析結果とも一致した (Lawton *et al.*, 1996)。加えて、SA の合成や RNA サイレncing に関わる遺伝子には変動が認められなかった。そこで、BTH 誘導型抵抗性の鍵となる因子は何なのか、BTH と SA 間の作用の違いを決めているものは何なのか、という疑問が生じた。私たちは *SAGT* に焦点を当て、これらの疑問を解き明かすことを試みた。

BTH 処理はウイルスに対する宿主抵抗性を誘導するのみならず、病徴の抑制にも効果を示した。SA との比較のもと、BTH の作用点を追究するために数種の抵抗性関連遺伝子の発現誘導を調べたところ、長期間にわたる *PR1a* の発現誘導と *SAGT* の発現抑制が顕著であった。その後、BTH は SA とは異なり、継続的かつ安定的に *SAGT* の発現を抑制することが示された。このことは BTH が SA より効果的に SA 関連宿主抵抗性を誘導する有力な説明材料の一つとなった。 *SAGT* が触媒する SA の SAG への変換の阻害は生物あるいは非生物学的ストレス下における SA の高レベルの蓄積を結果的にもたらすと考えられる。BTH 処理は SA 蓄積地点の下流の抵抗性伝達経路を刺激し、SA 蓄積を直接的には促進しない (Friedrich *et al.*, 1996)。そのため、私たちは BTH の重要な役割の一つは SA の SAG への変換を阻害するための *SAGT* 転写物レベルの抑制であると結論付けた。BTH が SA よりも強力な抵抗性誘導剤であるという結果は BTH が SA よりも NPR1 に対して僅かながらより高い親和性をもつことでも部分的に説明できるかも知れない (Wu *et al.*, 2012)。 *SAGT* に基づく私たちの結果は BTH 誘導型植物免疫の分子機構にさらなる説明を与えることとなった。私たちは BTH が単に SA 様の活

性を示す誘導体ではなく、強力なSAGT転写サプレッサーであることを示した。

植物生長におけるSAの作用は植物種間で異なる。SA処理はダイズの生長を促進し (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998)、より大きいコムギの穂の生長を促進する(Shakirova *et al.*, 2003)。低レベルのSA (50 μM)はカモミールの生長を促すが、高レベルのSA (250 μM)は抑制作用がある(Kováčik *et al.*, 2009)。また、100 μM あるいは1 mM のSA処理は*A. thaliana*の毛茸の発達を抑制する(Traw and Bergelson, 2003)。SA処理は光合成、蒸散や気孔の開閉に影響を与える植物ホルモンのバランス変化を生じさせる(Shakirova *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2006; Abreu and Munné-Bosch, 2009)。適切なSAレベルは正常な植物生長の制御に欠かせなく、SAは開花や老化にも影響する(Khurana and Cleland, 1992; Morris *et al.*, 2000)。SAGT過剰発現NbはSAGの蓄積レベルとBTH処理後の植物の生重量を野生型より相対的に増加させたが、SAGT発現抑制Nbは増加させなかった。これらの結果はSAGTがSAとSAGを制御することにより抵抗性の活性化とバイオマス生産のためのリソース分配による植物の適合性の最適化に重要な役割を果たしていることを示唆している。BTH処理後に*A. thaliana*の生重量が減少する原因はBTHによる薬害ではなくSA関連シグナル伝達系の活性化によるものとする報告もなされている(Canet *et al.*, 2010)。

私たちはBTH処理後10日間程度はSAGT発現抑制により、SAとJAの蓄積量が増加するが、高レベルのSAによってJA関連遺伝子の発現が抑制され、結果的にSA関連遺伝子の活性化とバイオマスの増加抑制を招くと推察した(Caarl's *et al.*, 2015) (図8.)。一方、SA処理後はSAGT発現が活性化し、SA, JA関連抵抗性が抑制の方向に制御され、結果的に数日間の一過性の抵抗性反応で終息すると考えた。BTH処理後のSAGT過剰発現植物における恒常的なSAGT過剰発現はSAならびにJA関連抵抗性を同時に抑制し、野生型植物より多くのバイオマス生産をもたらすが、SAGT発現抑制植物ではSA関連抵抗性が強まり、バイオマスが減少傾向に向かうという仮説を提唱した(図8.)。SAGTとJA間の関連性に関するさらなる解析はSA (もしくはBTH) とJAがどのように植物生長と防御反応間のバランスを制御しているのかに関して理解を深めるために必要である。

おわりに

これまで私たちのSAGTに関する研究結果と符合する論文がいくつか報告されている。*AtSGT1* を過剰発現する*A. thaliana* は野生型と比較して*P. syringae*

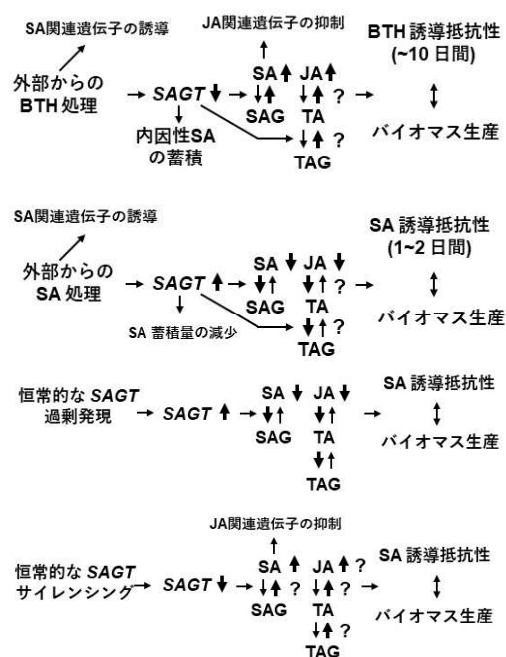


図8. BTHおよびSA処理に対する植物の応答とSAGT過剰発現ラインならびにSAGT発現抑制ラインにおけるSAGTの機能に関するモデル

により感受性となり (Song *et al.*, 2008)、SAGT阻害剤は*P. syringae* に対する抵抗性を高める (Noutoshi *et al.*, 2012)。また、*Butyrivibrio fibrisolvens* H17c由来の β -glucosidaseを過剰発現するタバコはSAGのSAへの変換を通してSAの蓄積を促進し、tobacco mosaic virusに対する抵抗性を高める (Yao *et al.*, 2007)。一方、プロベナゾール感受性のイネのUDP-glucose:SA glucosyltransferaseである*OsSGT1*の発現抑制はプロベナゾール依存イネいもち病抵抗性を低減する (Umamura *et al.*, 2009)。イネにおけるSAとSAGの比率の役割はNbなどの他の植物とは異なっているのかも知れない。事実、イネにおいてSAGはSAと同様に抵抗性を誘導する (Bundó and Coca, 2016)。*A. thaliana*において生物的に誘導されたSARとBTH処理により誘導された免疫は免疫反応時に共通のシグナル伝達システムを共有するが幾分異なるとの報告がある (Gruner *et al.* 2013)。*A. thaliana*のUDP-glucosyltransferase (*SAGT* synonym)遺伝子にはBTHあるいはSAによって発現量が増加したり減少したりするものがあるため、個々の遺伝子はBTHあるいはSAに対し異なる反応を示すと考えられる。私たちはアイソフォーム中の特定のSAGTが病原体の感染に活発かつ特異的に反応すると推定している。今回、少なくとも*Nicotiana*属の2種植物において*SAGT*植物生長と防御反応の間のtrade-offにおいて重要な役割を果たしていることを示唆した。

使用した図の一部は、Kobayashi *et al.* (2020) © 2020 The Authors. *Molecular Plant Pathology* published by British Society for Plant Pathology and John Wiley & Sons Ltd の図を改変したものであり、基にした図はクリエイティブ・コモンズの表示 4.0 国際ライセンスで提供されています。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

謝辞

本研究の遂行にあたり、共同研究を実施して頂いた北海道大学大学院農学研究院 増田 税教授ならびに研究室関係諸氏、松浦英幸教授ならびに研究室関係諸氏、国立研究開発法人産業技術総合研究所 福澤徳穂博士、松村 健博士、愛媛県農林水産研究センター果樹研究センター 兵頭紋佳氏、名古屋大学大学院農学研究科 吉岡博文准教授に感謝いたします。ASM(BTH)を無償提供して頂いたシンジェンタジャパン株式会社に厚く御礼申し上げます。本研究の一部はJSPS科研費 JP18K05655、JP21J15403の助成を受けたものです。

引用文献

- Abreu, M.E. and Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60, 1261-1271.
- Bundó, M. and Coca M. (2016) Enhancing blast disease resistance by overexpression of the calcium-dependent protein kinase *OsCPK4* in rice. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1357-1367.
- Canet, J.V., Dobón, A., Ibáñez, F., Perales, L. and Tornero, P. (2010) Resistance and biomass in *Arabidopsis*: a new model for salicylic acid perception. *Plant Biotechnol. J.* 8, 126-141.

- Caarls, L., Pieterse, C.M., Van and Wees, S.C. (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 25, 170.
- Chivasa, S. and Carr, J.P. (1998) Cyanide restores *N* gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* 10, 1489-1498.
- Dempsey, D'Maris A. and Klessig, D. F. (2017) How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biol.* 15, 23.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F. and Tong, L. (2005) Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1773-1778.
- Frąckowiak, P., Pospieszny, H., Smiglak, M. and Obrępańska-Stęplowska, A. (2019) Assessment of the efficacy and mode of action of benzo(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) and its derivatives in plant protection against viral disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1598.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut-Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Metraux, J.P., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996) A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61-70.
- Gruner, K., Griebel, T., Návarová, H., Attaran, E. and Zeier, J. (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4, 252.
- Gutiérrez-Coronado, M.A., Trejo-López, C. and Larqué-Saavedra, A. (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 563-565.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L. and He, S.Y. (2014) Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Mol. Plant* 7, 1267-1287.
- Khurana, J.P. and Cleland, C.F. (1992) Role of salicylic acid and benzoid acid in flowering of a photoperiod-insensitive strain, *Lemna paucicostata* LP6. *Plant Physiol.* 100, 1541-1546.
- Kobayashi, Y., Fukuzawa, N., Hyodo, A., Kim, H., Mashiyama, S., Ogihara, T., Yoshioka, H., Matsuura, H., Masuta, C., Matsumura, T. and Takeshita, M. (2020) Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness. *Mol. Plant Pathol.* 21, 429-442.
- Kováčik, J., Grúz, J., Backor, M., Strnad, M. and Repčák, M. (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Rep.* 28, 135-143.
- Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. and Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10, 71-82.
- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M., Carr, J.P. and Buchanan-Wollaston, V. (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23, 677-685.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., Kamiya, Y. and Shirasu, K. (2012) Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic-acid

- glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 3795-3804.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113-116.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. and Flors, V. (2013) Primed plants do not forget. *Environ. Exp. Bot.* 94, 46-56.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321-3338.
- Seto, Y., Hamada, S., Ito, H., Masuta, C., Matsui, H., Nabeta, K. and Matsuura, H. (2011) Tobacco salicylic acid glucosyltransferase is active toward tuberonic acid (12-hydroxyjasmonic acid) and is induced by mechanical wounding stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 2316-20.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, V., Fatkhutdinova, R.A. and Fatkhutdinova, D.R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164, 317-322.
- Song, J.T., Koo, Y.J., Seo, H.S., Kim, M.C., Choi, Y.D. and Kim, J.H. (2008) Overexpression of AtSGT1, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 69, 1128-1134.
- Stevens, J., Senaratna, T. and Sivasithamparam, K. (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regul.* 49, 77-83.
- Takeshita, M., Okuda, M., Okuda, S., Hyodo, A., Hamano, K., Furuya, N. and Tsuchiya, K. (2013) Induction of antiviral responses by acibenzolar-s-methyl against cucurbit chlorotic yellows virus in Melon. *Phytopathology*, 103, 960-965.
- Traw, M.B. and Bergelson, J. (2003) Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 1367-1375.
- Tripathi, D., Jiang, Y.L. and Kumar, D. (2010) SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Lett.* 584, 3458-3463.
- Umemura, K., Satou, J., Iwata, M., Uozumi, N., Koga, J., Kawano, T., Koshiba, T., Anzai, H. and Mitomi, M. (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. *Plant J.* 57, 463-472.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. and Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177-206.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C. (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* 1, 639-647.
- Yao, J., Huot, B., Foune, C., Doddapaneni, H. and Enyedi, A. (2007) Expression of a β -glucosidase gene results in increased accumulation of salicylic acid in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc NN genotype. *Plant Cell Rep.* 26, 291-301.

果樹ウイルスの病原性に関する研究

八重樫元*, **・山岸紀子**・吉川信幸**・磯貝雅道*

Yaegashi, H., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Isogai, M.

The study on the pathogenicity of fruit tree viruses.

Abstract

Fruit trees, including apple and citrus, as well as grapevine, are susceptible to many viral infections. Next-generation sequencing (NGS) techniques have accelerated the discovery of unknown viruses from fruit trees. Apple russet ring and apple green crinkle are graft-transmissible viral-like diseases that were first reported over 60 years ago; however, their causal virus(es) remain unknown. The comprehensive detection of viruses from an apple russet ring- and an apple green crinkle-diseased tree using NGS revealed co-infections in three known viruses: apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem pitting virus (ASPV), and apple stem grooving virus. To isolate ACLSV and ASPV from the diseased apple trees, the cDNAs of ACLSV and ASPV full-length genomic RNAs were amplified independently by reverse-transcriptional PCR, and infectious ACLSV and ASPV RNAs were synthesized independently by *in vitro* transcription using bacterial RNA polymerase. Several sequence variants of ACLSV and ASPV were successfully isolated from the diseased apple trees and transferred into herbaceous hosts. To investigate the pathogenicity of ACLSV and ASPV sequence variants on apple fruit, we utilized the apple latent spherical virus vector, which induces early apple seedling flowering and fruiting within a year. Co-inoculations of this vector and the ACLSV or ASPV sequence variant to germinated apple seeds by particle bombardment revealed that one sequence variant of ACLSV caused russet ring symptoms and one sequence variant of ASPV caused green crinkle symptoms. Our approach will contribute to the further understanding of fruit tree virology.

Key words: apple chlorotic leaf spot virus, apple stem pitting virus, apple latent spherical virus, pathogenicity, virus-induced flowering, virus-induced gene silencing, apple

* 岩手大学農学部 Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate, 020-8550, JAPAN

** 岩手大学次世代アグリイノベーションセンター Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate, 020-8550, JAPAN

はじめに

リンゴ、ブドウ、カンキツなどのいわゆる果樹類は永年性作物であり、果樹類を宿主とするウイルスもまた永続的に感染する。果樹ウイルスの主な伝染経路は接木であり、ときに甚大な被害をもたらす。過去には、海外からリンゴ品種を輸入し、その穂木を国内の台木に接木したところ、リンゴ高接病と呼ばれるウイルス性病害が発生した。本病害は、海外から輸入した穂木が外観健全であったものの、実はリンゴクロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) やリンゴステムピッチングウイルス (ASPV) およびリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) に感染しており、国内で用いられていた台木 (マルバカイドウなど) がこれらのウイルスに感受性であったために引き起こされ、台木の樹皮や木部にえそ斑や褐色のピッチング (凸凹の溝) が生じ、樹は衰弱してやがて枯死してしまう。他にも、葉でのモザイク症状や果実で引き起こされるリンゴ輪状さび果病やリンゴ奇形果病などが知られており、果樹ウイルスは様々な病害を引き起こすことが知られている。しかしながら、その発病メカニズムはほとんど解明されておらず、病原ウイルスが未解明であるものも残されているのが現状である。

果樹ウイルス研究においては、植物ウイルス研究で行われている一般的な手法が利用できないことがある。例えば、カーボランダムを用いた宿主植物への汁液接種は、多くの植物ウイルスで利用されている基本的なウイルス接種法であるが、果樹ウイルスの場合は、汁液接種により果樹の葉へウイルス感染させるのは困難である場合が多い。それゆえ、果樹からのウイルスの検出・同定、果樹におけるウイルスの病原性、および宿主との相互作用に関する研究が進んでいるとは言い難い。筆者らは、この現状を打破し、リンゴにおいてウイルスの病原性を研究するための実験系の確立を目指してきた。本稿では、筆者らが進めてきた研究の現状を紹介したい。

1. これまでの果樹ウイルス研究

植物ウイルス研究の第一歩として、病気を引き起こすウイルスの検出・同定が必要である。果樹ウイルスの特徴として、感染植物内での濃度が低いこと、複数のウイルス種が混合感染していること、タバコなどの一般的な草本植物に感染しないため分離が困難なことが挙げられる。それゆえ他作物に比べてウイルスの検出・同定が遅れ、多くの病原未解明のウイルス性病害が残されてきた。これまでは、既知の果樹ウイルスのほとんどが RNA ウイルスであったため、感染組織に複製中間体として蓄積する二本鎖 RNA を鋳型として cDNA を合成し、ランダムにクローニングしてサンガー法でシーケンシングする方法が利用されてきたが、効率的とは言い難かった。しかしながら、次世代シーケンサー (NGS) の登場により状況は一変した。クローニングを必要とせず、網羅的にウイルスを検出することができる NGS 解析は、上述したように低濃度で混合感染している場合が多い果樹ウイルス検出のブレークスルーとなり、Maliogka ら (2018) の総説では、果樹ウイルスで NGS 解析が行われ始めてから 5 年間で、32 種もの新規ウイルスが発見されたことが報告されている。これまで果樹から発見されたウイルスのほとんどはプラス鎖 RNA ウイルスであったが、マイナス鎖 RNA ウイルス (Rott et al., 2014) や DNA ウイルス (Liang et al., 2015) も発見され、果樹においても多様なウイルスが存在することが明らかになった。現在も NGS

解析を利用した果樹からのウイルス探索は世界中で行われており、今後も新種ウイルスが続々と報告されると想像される。筆者らの研究グループでも、果樹の病原未同定ウイルス性病害の NGS を行っており、新規ウイルスを発見してきた。その例を紹介する。

リンゴモザイク病は、イラルウイルス属のリンゴモザイクウイルス (ApMV) により引き起こされるが、農研機構・果樹茶業研究部門・リンゴ研究拠点に保存されているリンゴモザイク様症状を呈する 3 樹 (P129、PK28、PK45) からは、ApMV が検出されない。これらの樹では、葉のモザイク症状に加え、えそ斑の症状も観察されることから、別種ウイルスが感染している可能性が考えられた。そこで、P129 より抽出した二本鎖 RNA を鋳型として cDNA を合成し、イルミナ社の次世代シーケンサー (HiSeq2000) を用いて NGS 解析を行った。その結果、P129、PK28、および PK45 からは ApMV とは同属であるが別種の新規イラルウイルスが発見され、リンゴえそモザイクウイルス (ApNMV) と命名した (Noda et al. 2017)。本ウイルスは、中国でのリンゴモザイク様症状を呈する樹の 80%以上から検出され、中国でリンゴモザイク病と考えられていた病害は、主に ApNMV により引き起こされていることが明らかにされた。

オウトウ芽枯病は、授粉用品種を高接ぎした「佐藤錦」の芽が枯れるウイルス性の病気で、平成 5 年に山形県で発生して以降甚大な被害を出している新興病害であるが、病原は未同定である。オウトウ芽枯病についても NGS 解析を試みたところ、芽枯病罹病樹から、7 種の既知ウイルスと 1 種の新種ウイルスが検出された (Yaegashi et al. 2020)。しかしながら、どのウイルスがオウトウ芽枯病の病原なのかは未解明であり、今後の研究課題として残されている。

2. リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病

リンゴ輪状さび果病は、果実表面に特徴的な輪状のさびが現れる接木伝染性病害であり (図 1A)、1954 年にカナダで初めて報告され、国内では 1972 年に初めて発生が報告された。本病害の病原ウイルスとして、ACLSV が疑われてきたが、ACLSV は本病を発症していないリンゴ樹からも広く検出されることから、病原であるかは不明のままであった。

リンゴ奇形果病は、1929 年に青森県で発生が報告され、1934 年には接木伝染性であることが証明された。世界で初めて記載されたリンゴのウイルス性病害であり、1934 年にはカナダやニュージーランドでも発生が報告された。本病の特徴は、果実でのみ奇形の症状が

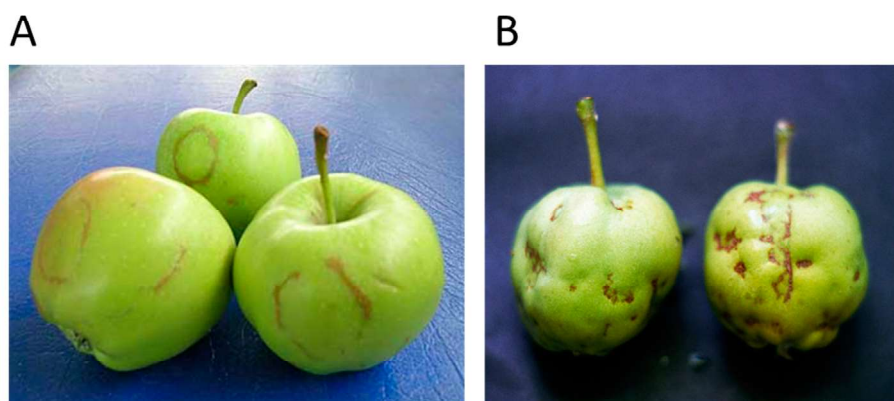


図 1 リンゴ輪状さび果病 (A) とリンゴ奇形果病 (B)

現れ (図 1B)、枝や葉には症状は観察されない。幼果でとくに顕著な症状が現れ、果実の一部が不規則にへこみ、奇形になる。へこんだ部分は後にコルク状になり、激しい場合には亀裂が生じる。リンゴ奇形果病罹病樹からは ACLSV、ASPV、および ASGV が検出され、これらのうち ASPV が病原ではないかと疑われてきたが、ASPV もまた本病を発症していない外観健全なリンゴ樹からも検出されることから、病原であるかは不明であった。

著者らは、リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病について、未知ウイルスが病原である可能性を考え、NGS 解析を行った。材料は、農研機構・果樹茶業研究部門・リンゴ研究拠点に保存されているリンゴ輪状さび果病罹病樹 (PK51) とリンゴ奇形果病罹病樹 (P190) を用い、それぞれの罹病組織から抽出した二本鎖 RNA を鋳型として cDNA を合成し、イルミナ社の次世代シーケンサー (HiSeq2000) を用いて NGS 解析を実施した。その結果、PK51 と P190 のどちらのサンプルにおいても ACLSV、ASPV、および ASGV の 3 種の既知ウイルスが検出され (Li et al., 2020)、新規ウイルスは検出されなかった。Liang ら (2015) は、ウイルス感染に対する抵抗性機構であるサイレンシング誘導の指標となるスモール RNA (sRNA) を材料としてバイローム解析を行い、中国のリンゴ樹から一本鎖 DNA ウイルスを発見している。そこで筆者らも PK51 と P190 から抽出した sRNA を用いてバイローム解析を行ったが、やはり ACLSV、ASPV、および ASGV の 3 種既知ウイルスが検出され、未知ウイルスは検出されなかった。

以上の結果から、リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病の病原ウイルスは、ACLSV、ASPV、または ASGV のいずれかであると考えられた。そこで筆者らはリンゴ輪状さび果病では ACLSV、リンゴ奇形果病では ASPV に注目し、リンゴでの病原性の解析を進めることにした。ACLSV と ASPV は、プラス鎖 RNA をゲノムとするひも状粒子のウイルスであり、ACLSV はベータフレキシウイルス科トリコウイルス属に、ASPV はベータフレキシウイルス科フォベアウイルス属に分類される。ACLSV は、リンゴをはじめとするバラ科果樹類に広く感染し、ASPV はリンゴ、ナシ、およびセイヨウナシに感染している。

3. 果樹ウイルスの単離・戻し接種系の開発

リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病罹病樹には、上述した 3 種ウイルスが混合感染しており、著者らが対象とした ACLSV や ASPV の草本植物での宿主範囲は狭く、ACLSV では *Chenopodium quinoa*、*C. amaranticolor* および *Nicotiana occidentalis*、ASPV では *N. occidentalis* に限られる。さらに ASGV もまた *C. quinoa* や *N. occidentalis* を草本宿主としている。それゆえ、混合感染している罹病組織から汁液接種により ACLSV と ASPV を草本植物に単離するのは困難であると考えた。そこで筆者らは、ACLSV と ASPV のゲノムがプラス鎖 RNA ウイルスであることを利用し、ウイルス感染性 RNA を試験管内で単離・合成する手法を着想した (図 2)。本法ではまず、1) 罹病樹から全 RNA を抽出し、2) これを鋳型として T7 (または T3) ポリメラーゼのプロモーター配列を付加したウイルスゲノム 5' 末端配列のフォワードプライマーとポリ A 配列を含む 3' 末端配列に相補的なリバースプライマーを用いて RT-PCR でウイルスゲノム全長を増幅する。続いて、3) T7 (または T3) ポリメラーゼを用いた試験管内転写反応により全長ウイルス RNA を合成する。さらに、4) 合成したウイルス RNA をパーティグルガン法で *C. quinoa* または *N. occidentalis* に接種し、

各ウイルスの単独感染個体を得るという戦略である。

PK51 より試験管内単離・合成した ACLSV-RNA を *C. quinoa* または *N. occidentalis* に接種したところ、ACLSV 単独感染個体が得られ、ASPV や ASGV は検出されなかった。しかしながら、上述の NGS 解析の結果から、PK51 には複数の ACLSV 配列変異株が混在していると考えられた。そこで、外被タンパク質 (CP) 遺伝子の塩基配列同一性が 99% 以下の場合を異なる配列変異株とし、ACLSV 感染 *C. quinoa* または *N. occidentalis* での ACLSV の CP 遺伝子の塩基配列を解析したところ、5 タイプの配列変異株が検出され (RRACV1~5 と命名)、塩基配列同一性は 83.8~92.4% であった。これらの配列変異株のうち RRACV2 は、*N. occidentalis* において退緑やえそ、ねじれといった特有の強い症状を示し、ACLSV 配列変異株間で病原性が異なることが明らかとなった。P190 より試験管内単離・合成した ASPV-RNA を *N. occidentalis* に接種した場合でも、ASPV 単独感染個体が得られた。ACLSV と同様に配列変異株の解析を行ったところ、P190 からは 8 タイプの ASPV 配列変異株が検出され、塩基配列同一性は 75.4~89.7% であった。以上のように、本法は複数のウイルス種が混合感染しているリンゴ罹病組織から特定のウイルス種を単離するのに有効であることが示された。

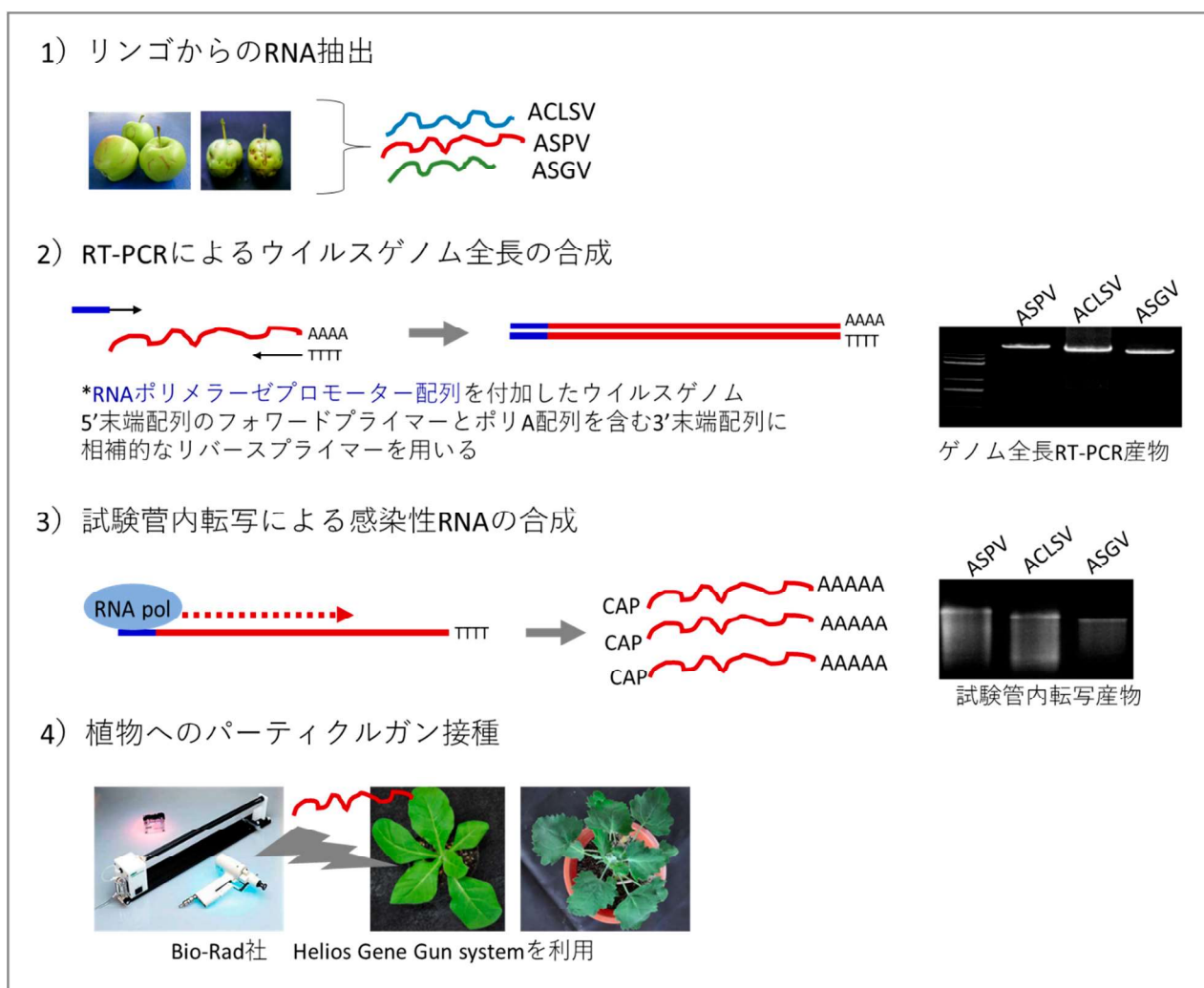


図2 リンゴ罹病樹からのウイルスの試験管内単離・合成法

上述した手法により、リンゴからのウイルス種の単離は可能となったが、その病原性を研究するには、元宿主であるリンゴでの接種系の確立が必要である。しかしながら、前述したようにリンゴなどの果樹において、カーボランダムを用いた汁液接種でウイルス感染させるのは困難であり、果樹ウイルス研究の大きな障壁となっていた。一方、Yamagishiら (2010) は、リンゴの発根直後の種子（子葉）がウイルス感染に対し感受性が高いこと、ウイルス RNA のパーティクルガン接種が高効率であることを明らかにし、リンゴにおいてリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) や ACLSV のゲノム RNA をパーティクルガン法により接種すると、ほぼ 100% の感染率で感染実生を得ることができることを明らかにした。

そこで ASPV についてもリンゴの発根直後の種子に対するパーティクルガン接種が可能であるかを調べたところ、接種後 25°C で育成させた場合には感染実生個体は得られなかったが、18~20°C で一定期間育成させた後に 25°C で育成させると 70% 以上の感染率であった。この理由は明らかではないが、18~20°C での育成期間が長いほど感染率は高くなることから、感染初期の低温が ASPV の全身移行に影響を与えるのかもしれない。

4. リンゴ小球形潜在ウイルスベクターの利用

パーティクルガン接種法の確立により、ALSV と ASPV をリンゴに接種できるようになったが、リンゴ輪状さび果病とリンゴ奇形果病はいずれも果実で症状が現れるため、ウイルス感染実生が果実を实らせるまで、少なくとも 6~7 年待たなくてはならない。この問題を解決するために、筆者らは ALSV ベクターによる高速開花技術の利用を試みた。

ALSV は、チェラウイルス属の径約 30 nm の小球形ウイルスであり、二分節のプラス鎖 RNA をゲノムとする。ALSV は、自然界ではリンゴでのみ感染が認められているが、実験的にはリンゴをはじめとするバラ科果樹類やブドウ、カンキツ、ナス科、ウリ科、マメ科などのさまざまな植物種に感染する。ALSV の興味深い特性のひとつに、ほとんどの宿主植物で病徴を示さずに潜在感染することが挙げられる。このような特性からウイルスベクターとして好適ではないかと考えられ、外来遺伝子の発現あるいはウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) による遺伝子発現抑制をできる ALSV ベクターとして改変された (Li et al., 2004; Igarashi et al., 2009)。

開花までに 6~7 年かかるリンゴでの早期開花させることを目的に、シロイヌナズナの花成促進遺伝子である *FT* 遺伝子の発現とリンゴの花成誘導抑制因子と考えられる *TFL1* 様遺伝子の発現抑制を同時に行うように設計した ALSV ベクター (ALSV-AtFT/MdTFL1) を作出し、リンゴの発根直後の種子にパーティクルガン接種したところ、接種後 2 か月で開花し、6~8 か月後には果実を实らせることに成功している (Yamagishi et al. 2011 ; Yamagishi et al. 2014)。ALSV ベクターによる高速開花技術は世代促進による育種年限短縮を目的に作出されたものであるが、本技術を利用すれば、短期間で ACLSV および ASPV のリンゴ果実での病原性を解析できると考えられた。

リンゴ輪状さび果病罹病樹より単離された ACLSV 配列変異株 (RRACV1~5) と ALSV-AtFT/MdTFL1 をリンゴの発根直後の種子にパーティクルガン法で混合接種したところ、RRACV2 を接種した実生個体において、葉にリング状の退緑が現れ、果実においても輪状さび果の症状が観察された (Li et al., 2020)。さらに RRACV2 感染実生を品種「ゴールドデン

「ゴールデンデリシャス」に接木接種したところ、接種 3 年後にリンゴ輪状さび果病が再現され、RRACV2 が病原であることが証明された (図 3; Li et al., 2020)。

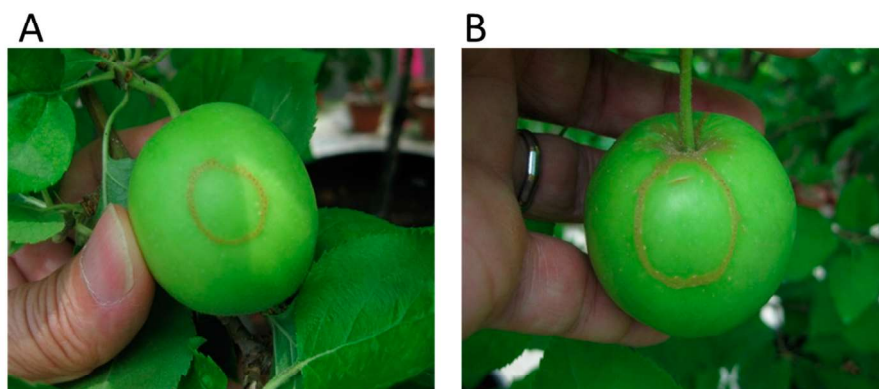


図 3 品種「ゴールデンデリシャス」果実でのリンゴ輪状さび果病の再現。
(A) リンゴ輪状さび果病罹病樹 (PK51) を接木接種後 3 年目の果実
(B) RRACV2 感染リンゴ実生を接木接種後 3 年目の果実

リンゴ奇形果病罹病樹より得られた ASPV 配列変異株 (GCSPV1~8) についても ALSV-AtFT/MdTFL1 と共にリンゴの発根直後の種子に混合接種した結果、GCSPV2 が感染した実生個体において、激しい奇形果症状が観察され、GCSPV2 がリンゴ奇形果病の病原であることが示唆された (Li et al., 2020)。また、リンゴ奇形果病罹病樹 (P190) より単離・合成した感染性 RNA を *N. occidentalis* への接種を経ずに、リンゴに直接戻し接種し、得られた ASPV 感染実生を品種「ゴールデンデリシャス」に接木接種したところ、接種翌年にリンゴ奇形果病が再現された (図 4; 八重樫ら、令和 4 年度日本植物病理学会大会)。これらの結果から、リンゴ奇形果病の病原は ASPV であると結論づけた。しかしながら、病徴が再現された奇形果病発症樹における ASPV の配列変異株を解析したところ、少なくとも 5 種の配列変異株が混在していることが明らかとなっており、どの配列変異株がリンゴ奇形果病を引き起こすのかについては未解明である。

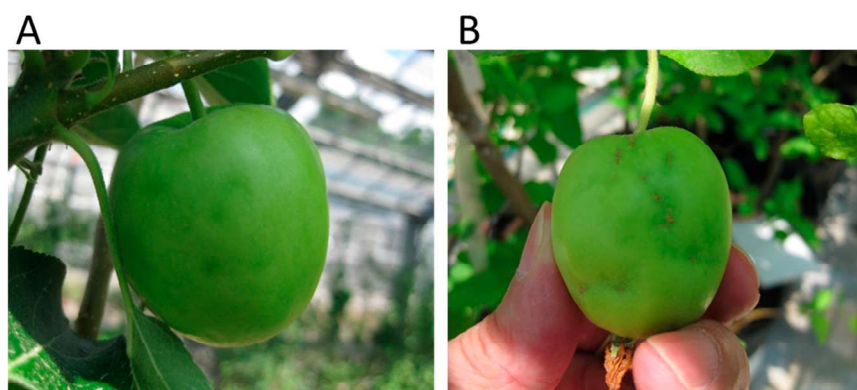


図 4 品種「ゴールデンデリシャス」果実でのリンゴ奇形果病の再現。
(A) リンゴ奇形果病罹病樹 (P190) を接木接種後 1 年目の果実
(B) P190 由来 ASPV 感染リンゴ実生を接木接種後 1 年目の果実

5. 感染性 cDNA クローンの作出による逆遺伝学的実験系の確立

本稿で紹介したウイルス感染性 RNA の単離・合成法とパーティクルガン法によるリンゴへの接種系の確立により、複数のウイルス種が混合感染しているリンゴ樹から特定のウイルス種をリンゴに感染させることが可能となったが、リンゴ樹に混在している配列変異株の単離までを確実に行うことはできず、病原性解析の課題として残されている。この課題を解決し、配列変異株の病原性を解析するには、配列変異株の感染性 cDNA クローンの作出が有効であると考えられる。しかしながら、配列変異株が混在している ACLSV や ASPV のウイルスゲノムの cDNA をいくつかの断片に分けてクローニングすると、配列変異株間でのキメラが作出されてしまう可能性があるため、筆者らは RT-PCR により ACLSV または ASPV の全長ゲノム cDNA を増幅し、バイナリーベクター pBI121 上のカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターとノパリンシンターゼターミネーターの間に相同組換えを利用してクローニングする手法を採用した。本法で作出された cDNA クローンはアグロバクテリウムに導入され、アグロイノキュレーション法により、*N. occidentalis* へ接種され感染性が調べられる。本法によりリンゴ輪状さび果病を引き起こす RRACV2 の感染性 cDNA クローンの作出に成功し（中嶋ら、令和 4 年度日本植物病理学会大会）、*N. occidentalis* の上葉において RRACV2 に特有の退緑やねじれを伴う激しい症状が観察された（図 5）。現在は、*N. occidentalis* とリンゴにおいて病原性の異なる P205 分離株とのキメラを作出し、RRACV2 の病原性に関わるウイルスゲノム領域の特定を進めている。ASPV についてもリンゴ奇形果病が再現された「ゴールデンデリシャス」に感染している 5 種の配列変異株の感染性 cDNA クローン化に成功し（八重樫ら、令和 4 年度日本植物病理学会大会）、草本宿主である *N. occidentalis* およびリンゴでの病原性の差異を解析している。今後 ASPV の病原性に関わるウイルスゲノム領域の特定を進めていきたい。

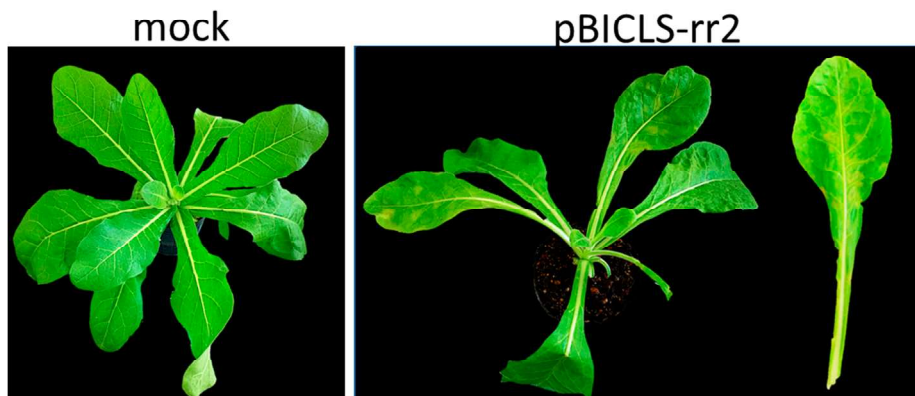


図 5 ACLSV リンゴ輪状さび果病分離株 RRACV2 の感染性 cDNA クローン (pBICLS-rr2) を接種した *N. occidentalis* における病徴 (接種後 29 日).
*接種後約 10 日目から上葉でえそ斑が観察され、その後葉のねじれをともなう激しい症状が観察される

おわりに

筆者らは、果樹という永年性作物とそれに永続的に感染するウイルスとの相互作用研究は、単年性作物で得られた知見とは異なる、新たな知見をもたらすと信じて研究を展開してい

る。本稿で紹介した研究は、リンゴなどの果樹においてウイルスの病原性を解析するための実験系確立を目指したものであり、NGSの利用やパーティクルガン法によるリンゴへの接種系の開発などにより、リンゴ輪状さび果病では発生から66年、リンゴ奇形果病では発生から91年の年月を経て病原ウイルスの同定に至った。本稿で紹介した手法が、果樹ウイルスの病原性解析に広く利用されることを期待している。本稿でも紹介したように果樹ウイルスは、配列変異株が混在した状態で感染しており、このような性質が病原性研究の障壁となっている。現在では、ACLSVやASPVの感染性cDNAクローンの作出にも成功しており、果樹ウイルスの病原性の分子メカニズム解明、および配列変異株が混在していることの意義の解明に向けて着実に進展している。一方、なぜ果樹ウイルスは汁液接種が難しいのか？という根本的な問いを無視することはできないと考えている。本課題は、ウイルス学的にも非常に興味深い点であり、国内外での果樹ウイルス研究をさらに発展させる鍵となる。今後の課題として挑戦していきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究のうち、ACLSVやASPVの接木接種と接种植物の維持は、国立研究開発法人農業食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門の伊藤伝氏に実施していただきました。また本研究は、国立研究開発法人農業食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・リンゴ研究領域、岩手大学農学部植物病理学研究室および岩手大学次世代アグリイノベーションセンターで実施されたものであり、研究に関係していただいた皆様に感謝申し上げます。なお本研究は、文部科学省（科研費基盤B）の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H. and Yoshikawa, N. (2009). Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology* 386: 407-416.
- Li, C., Sasaki, N., Isogai, M. and Yoshikawa, N. (2004) Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch. Virol.* 149: 1541-1558.
- Li, C., Yaegashi, H., Kishigami, R., Kawakubo, A., Yamagishi, N., Ito, T. and Yoshikawa, N. (2020). Apple russet ring and apple green crinkle diseases: fulfillment of Koch's postulates by virome analysis, amplification of full-length cDNA of viral genomes, *in vitro* transcription of infectious viral RNAs, and reproduction of symptoms on fruits of apple trees inoculated with viral RNAs. *Front. Microbiol.* 11: 1627.
- Liang, P., Navarro, B., Zhang, Z., Wang, H., Lu, M., Xiao, H., Wu, Q., Zhou, X., Di Serio, F. and Li, S. (2015) Identification and characterization of a novel geminivirus with a monopartite genome infecting apple trees. *J. Gen. Virol.* 96: 2411-2420.
- Maliogka, V.I., Minafra, A., Saldarelli, P., Ruiz-García, A.B., Glasa, M., Katis, N. and Olmos, A. (2018) Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses* 10(8): 436.
- Noda, H., Yamagishi, N., Yaegashi, H., Xing, F., Xie, J., Li, S., Zhou, T., Ito, T. and Yoshikawa, N. (2017) Apple necrotic mosaic virus, a novel ilarvirus from mosaic-diseased apple trees in Japan and China. *J. Gen. Plant Pathol.* 83: 83-

- Rott, M.E., Kesanakurti, P., Berwarth, C., Rast, H., Boyes, I., Phelan, J. and Jelkmann, W. (2018) Discovery of negative-sense RNA viruses in trees infected with apple rubbery wood disease by next-generation sequencing. *Plant Dis.* 102: 1254–1263.
- Yaegashi, H., Oyamada, S., Goto, S., Yamagishi, N., Isogai, M., Ito, T. and Yoshikawa, N. (2020) Simultaneous infection of sweet cherry with eight virus species including a new foveavirus. *J. Gen. Plant Pathol.* 86: 134–142.
- Yamagishi, N., Sasaki, S. and Yoshikawa, N. (2010) Highly efficient inoculation method of apple viruses to apple seedlings. *Julius-Kuhn-Archiv.* 427: 226–229 .
- Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T. and Yoshikawa, N. (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Mol. Biol.* 75: 193–204.
- Yamagishi, N., Kishigami, R. and Yoshikawa, N. (2014) Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotech. J.* 12: 60–68.

リンドウ畑発の基礎研究を目指して

藤崎恒喜*・舘田知佳*,†・ドミンゲズ ジョン*・関根健太郎**・西原昌宏*

Fujisaki, K., Tateda, C., Dominguez, J.J.A., Sekine, K.T. and Nishihara, M.

Basic research of plant-pathogen interactions from gentian fields

Abstract

Gentian (*Gentiana* L.) is an important ornamental flower in Japan. In gentian fields, several diseases caused by fungal and viral pathogens are observed. With the aim of establishing new disease control strategies, we analyzed the infection mechanism of *Septoria gentianae* and *Colletotrichum acutatum*, and found that these fungal pathogens use systemic induced susceptibility (SIS) as an infection strategy in gentians. Focusing on *S. gentianae*, we observed an interesting increase in the host stomatal density of newly developed leaves after primary infection. Further analyses lead to the identification of a fungal effector protein CSEP49, which could increase stomatal density in newly developed leaves. Since *S. gentianae* utilizes stomata to enter host tissues, these data suggest that *S. gentianae* increase the host stomatal density for its secondary infection via CSEP49. In addition, our results indicated that stomatal density could be a potential factor to control *S. gentianae* infection, and natural variation on stomatal density among gentian cultivars could be a key material.

Viruses, which sometimes cause unknown disease symptoms, are also major pathogens of gentians. To date, we have established and improved methods of diagnosis and analyzed several unidentified diseases. Recently, we identified *Sikte waterborne virus* strain C1 (SWBV-C1) as a novel gentian pathogen, which exhibits low temperature-dependent multiplication in gentian and *Arabidopsis thaliana*. Further characterization suggests that SWBV-C1 was generated by adaptive evolution in gentian fields. In addition, the low temperature-dependent multiplication of SWBV-C1 was utilized for the establishment of a synchronous and high-throughput virus infection system in *A. thaliana*. This system could forward identification of host factors useful in controlling viral diseases.

Key words: Gentian, *Septoria gentianae*, *Colletotrichum acutatum*, Systemic induced susceptibility, virus diagnosis, *Sikte waterborne virus*, *Arabidopsis thaliana*

* 公益財団法人 岩手生物工学研究センター Iwate Biotechnology Research Center, 22-174-4 Narita, Kitakami, Iwate, 024-0003, JAPAN

**琉球大学農学部 Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa, 903-0213, JAPAN

† Present Address: 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 Plant Immunity, Division of Biological Science, Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara, 630-0192, JAPAN

はじめに

野外の農業現場では毎年様々な病害が発生し、有効な防除対策のないものや原因不明のものも多い。リンドウ (*Gentiana* L.) は岩手県が全国出荷量の半分以上を占める県の主力花き作物である。岩手県の栽培品種としては、ササリンドウ (*G. scabra*)、エゾリンドウ (*G. triflora*) およびそれらのハイブリッドが使用されている。多年生のマイナー作物であり、露地栽培を基本とすることから糸状菌病やウイルス病を中心とした様々な病害が発生する作物でもある。それゆえに、原因不明症状／新規病原体／ユニークな現象に出会うこともあり、実は基礎研究として非常に魅力的な側面を持っている。一般に、農業現場で発生した病害の診断や防除対策は岩手県農業研究センターなどの公設試験研究機関が担っているが、岩手県では岩手生物工学研究センターがそれら公設試と直接連携し、基礎研究の側面から現場対応を支援している。本稿ではリンドウの糸状菌病／ウイルス病を例に、農業現場発の研究で得られた最近の基礎的知見について紹介したい。

1. リンドウの糸状菌病と全身感受性誘導

リンドウに病気を起こす糸状菌はリンドウ葉枯病菌 (*Septoria gentianae*)、リンドウ黒斑病菌 (*Alternaria alternata*)、リンドウ褐斑病菌 (*Mycochaetophora gentianae*)、リンドウ花腐菌核病菌 (*Ciborinia gentianae*) など、様々な種が知られている。農薬による防除を基本としているが、リンドウ黒斑病菌、リンドウ花腐菌核病菌のように抑えきれないものもいることや、近年の低コスト化／低労力化／環境負荷の低減に向けた取り組みから、リンドウ糸状菌病の発病機構の理解とその制御は重要な研究課題となっている。その中の1つリンドウ葉枯病菌はリンドウ葉の気孔から葉組織に侵入する病原糸状菌で、葉に特徴的な病斑を形成し、初期感染した葉からその後生長した上位の葉へと感染を伸展させていく。私たちはリンドウ葉枯病菌防除に向けた罹病性／抵抗性決定機構の解析の過程で、初期感染が成立した植物体において、病原体が存在していない上位葉（新生葉）のリンドウ葉枯病菌に対する感受性が増大する現象を見出した（舘田ら 令和4年度日本植物病理学会発表, Tateda et al., 2019）。一般に、局所的な病原体の感染に伴って、上位の葉への抵抗性が誘導される全身獲得抵抗性（Systemic acquired resistance: SAR）の存在が古くから知られているが、本現象はそれとは逆に全身的な感受性が誘導される Systemic induced susceptibility (SIS) であると考えられた。植物-病原体間相互作用における SIS の知見（Cui et al. 2005; Lake and Wade, 2009; Seybold et al., 2020）は限られており、シロイヌナズナやコムギで現象の報告があるが、その実態はよくわかっていない。今回発見したリンドウ葉枯病菌による SIS は、リンドウ葉枯病菌が初期感染葉から新生上位葉へ進展することを容易にし、野外圃場においても病原菌の生存戦略上重要な現象であると考えられる。

その後、リンドウにおける SIS は他の病原体の感染時にも見出されることがわかった。リンドウ炭疽病は *Colletotrichum acutatum* もしくは *C. gloeosporioides* によって引き起こされる病害で、野外では茎頂部を中心に発病する傾向も認められる（猫塚ら 平成17年度日本植物病理学会発表）。本病を実験室内で再現するため、節培養により継代維持している通年的に利用可能な培養リンドウの葉組織にリンドウ炭疽病菌 (*C. acutatum*) を接種した。

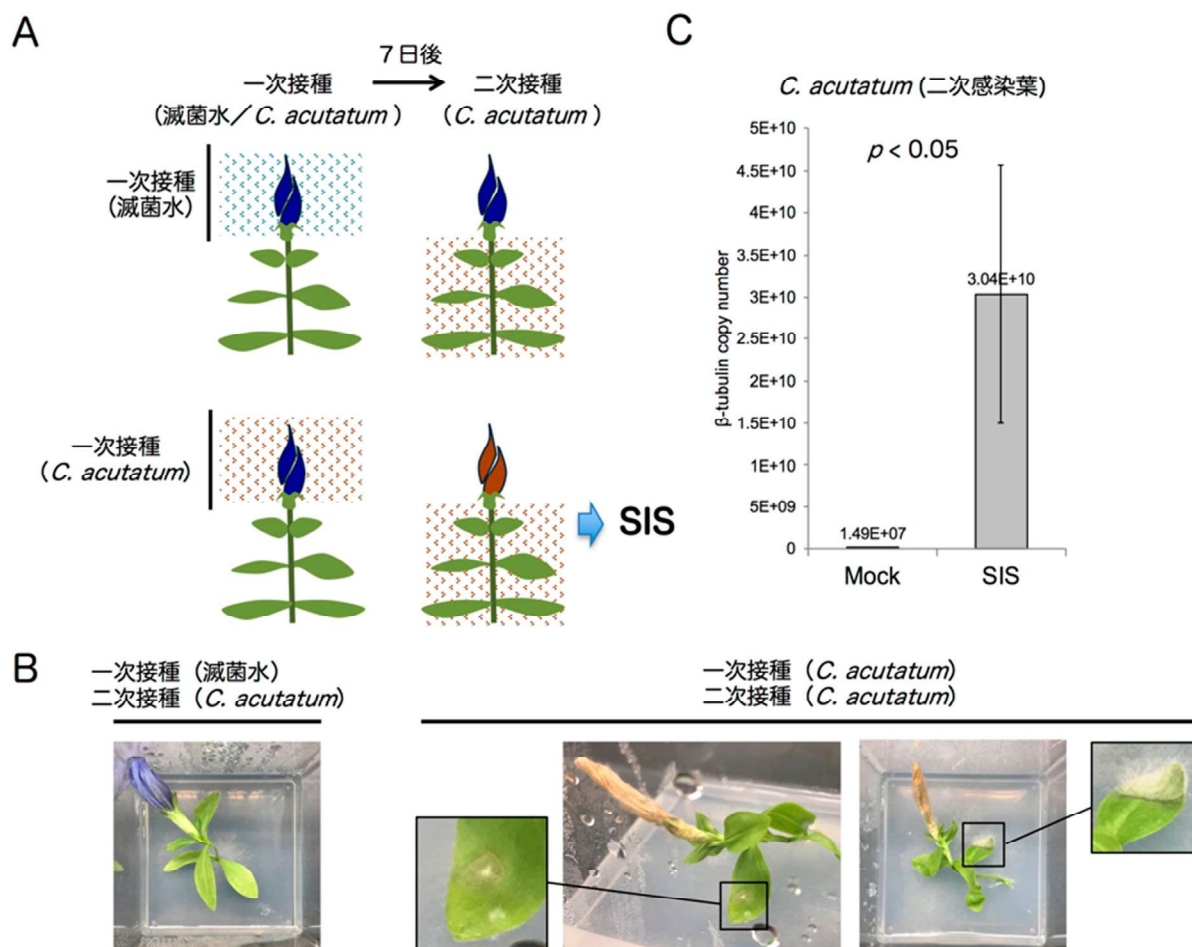


図1 リンドウ炭疽病菌によって誘導されたSIS

接種実験の手順 (A)、病徴 (B) および菌の増殖量 (C)

花蕾のついていない培養リンドウでは初期感染行動を起こすものの明瞭な病徴が示されなかったのに対し、花蕾を形成している培養リンドウでは菌の初期感染が花蕾で成立し、その後植物体全体を枯死させることがわかった。さらに、花蕾にリンドウ炭疽病菌が一次感染した個体においては、葉での二次感染が容易に成立することがわかり、リンドウ炭疽病菌の一次感染による SIS が引き起こされていることがわかった (図1) (ドミンゲズら 令和3年度日本植物病理学会東北部会発表)。このことは、野外圃場でリンドウ炭疽病が茎頂部を中心に発症する傾向があることと矛盾しない。このようにリンドウ葉枯病菌とリンドウ炭疽病菌で見出された現象は、自然界のリンドウにおける糸状菌の感染動態を理解する上で、重要な情報であると考えられた。

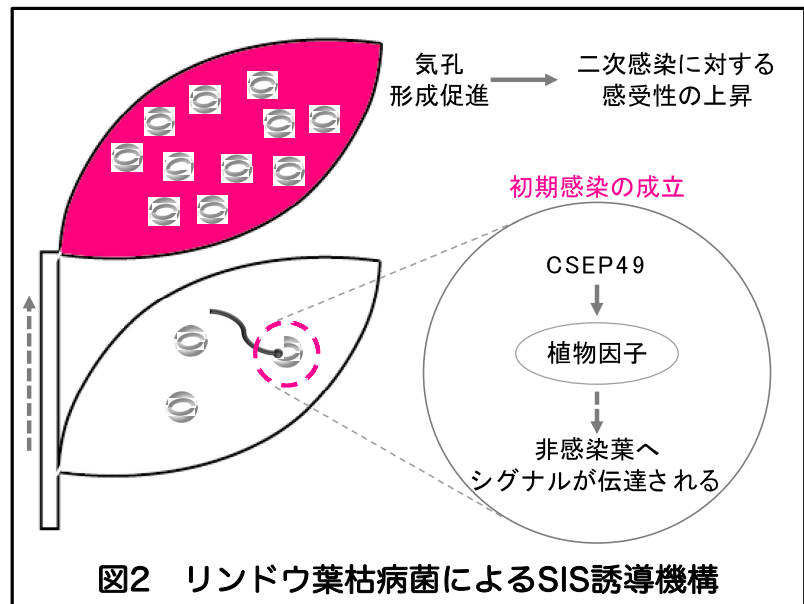
2. リンドウ葉枯病菌感染による SIS の実態解明と感染制御

リンドウ葉枯病菌の初期感染が一次感染葉で成立し、感受性が増大した上位の葉ではどのようなことが起こっているのだろうか。私たちは、一次感染成立後の上位の新生葉において、リンドウ葉枯病菌の侵入口である気孔の数が増加していることを発見した。気孔は病原体の主要な侵入口として重要な攻防の場であり、気孔の開閉制御を中心とした植物と

病原体との相互作用は多くの研究がなされてきている。一方で気孔の数そのもの（気孔密度）を全身的に制御する攻防は知られていない。

リンドウの品種／系統のうち、「To 系統」は、リンドウ葉枯病菌を無傷接種しても全く病徴の観察されない強い抵抗性を示すが、有傷接種時には、他のリンドウ品種と同様の病徴をともなう一次感染の成立が確認される (Tateda et al., 2019)。この To 系統の非感染上位葉における気孔形成促進は、リンドウ葉枯病菌を無傷接種した際には誘導されず、有傷接種時においてのみ誘導された。

さらに、ベンサミアナタバコ葉にリンドウ葉枯病菌胞子をシリンジインフィルトレーション法により処理するとリンドウと同様に新生上位葉における気孔密度の増加が認められたのに対し、リンドウ葉枯病菌胞子を煮沸により死滅させた場合は気孔密度の増加が観察されなかった。このことから、非感染上位葉における気孔形成促進には、リンドウ葉枯病菌の一次感染の成立が必須であり、感染時に発現



する病原性因子の関与が示唆された。そこで、リンドウ葉枯病菌感染時のトランスクリプトーム解析から、同菌のエフェクター候補遺伝子 (Candidate Secreted Effector Proteins: CSEPs) を同定した。これらの CSEPs をアグロバクテリウムを介してベンサミアナタバコ葉で一過的に発現させた後に、新生上位葉の気孔の数を調べた結果、CSEP49 を発現させたタバコの上位葉で気孔密度の増加が認められた。また、CSEP49 を処理したリンドウの新生葉においても、気孔形成促進効果が認められた。これらのことはリンドウ葉枯病菌が自身の二次感染を有利にするため、CSEP49 による新生葉の気孔密度増加を介して、SIS を引き起こしている可能性を示しており (図2)、現在その詳細を解析中である (館田ら 令和4年度日本植物病理学会発表)。

以上の結果は気孔侵入型病原体の防除における気孔密度制御の重要性を示唆している。リンドウの様々な品種／系統のうち、ササリンドウの品種／系統は、エゾリンドウの品種／系統よりもリンドウ葉枯病菌に抵抗性を示す (図3)。興味深いことに、このリンドウ葉枯病菌に対する感受性強度は、リンドウの葉の向軸面に存在する気孔密度と相関していた。「To 系統」は、葉の向軸面にほとんど気孔が存在していない系統である。そ



のため、To 系統に、リンドウ葉枯病菌を無傷接種しても全く病徴の観察されない強い抵抗性を示すが、気孔を介さずに有傷接種により直接胞子を葉組織内に入れると、他のリンドウ品種と同様の病徴を示す。また、気孔形成促進活性を持つペプチド処理によりリンドウの気孔の数を人為的に操作すると、リンドウ葉枯病菌に対する感受性も操作されることがわかった (Tateda et al., 2019)。これらのことから、気孔密度操作が気孔侵入型病原体の感染制御において重要であり、新規耐病性戦略構築上の有望な対象形質となりうること、また、リンドウにおいては少なくとも自然変異として活用可能な遺伝資源が存在することが明らかとなった。

3. 網羅的ウイルス診断技術の開発

糸状菌病とともにリンドウの農業現場で頻発している病害がウイルス病である。ウイルスは微小／難培養／生態学的知見の不足／早い進化速度といった理由から、他の病原体に比べて診断が難しい場合があり、原因不明症状と見なされることも少なくない。岩手生物工学研究センターでは以前に、罹病株から2本鎖RNAを精製し、そのRNA配列情報からウイルスを同定する DECS 法 (dsRNA isolation, exhaustive amplification, cloning and sequencing) を開発し (Kobayashi et al., 2009)、リンドウこぶ症やリンドウ子房輪紋症といった原因不明症状の解析に活用した。その結果、それぞれリンドウこぶ症関連ウイルス (GKaV) (Kobayashi et al., 2013) および、リンドウ子房輪紋ウイルス (GORV) (Atsumi et al., 2015)

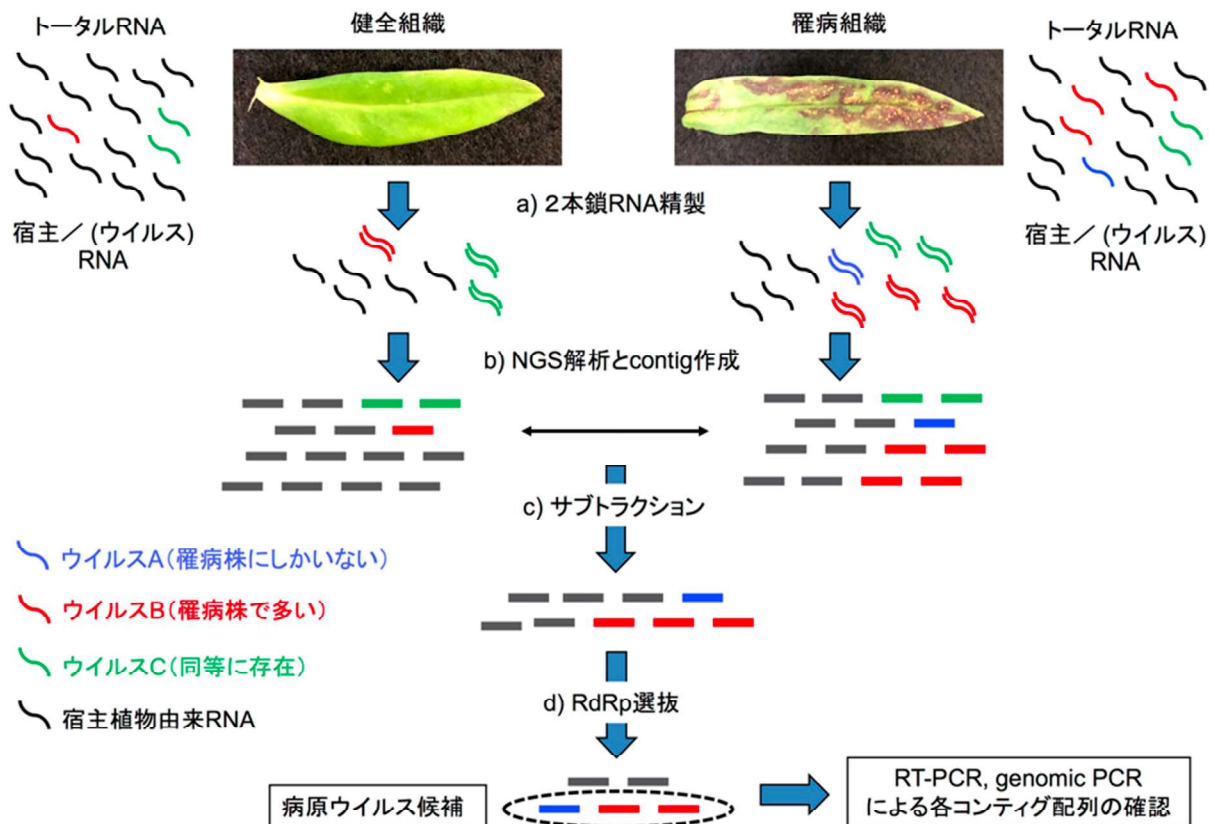


図4 リファレンス配列非依存的なRNAウイルス同定スキーム

といった新種のウイルスを同定している。近年は NGS の活用によって、少量存在するウイルスの同定率も上がったが、偽陽性が少なくない／データベース上に存在しない新規性の高いウイルスは同定しづらいといった課題も残されている。

私たちは上記方法でリンドウの原因不明症状の解析に取り組む一方、健全株と罹病株の比較解析を基本としたリファレンス配列に依存しないウイルス同定スキームの確立も試みている。まず、リンドウこぶ症の培養組織をモデルに、罹病株と健全株の間で NGS による 2 本鎖 RNA 精製画分の比較解析を行った。罹病株で存在比が多いコンティグ配列について、RNA ウイルスで保存性の高い RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ドメインや Helicase ドメインで絞り込みを行なったところ (図 4)、少数の宿主由来のコンティグとともに、ウイルスゲノムのほぼ全長をカバーするコンティグが同定された。さらに、当該コンティグを RT-PCR 及び genomic PCR による罹病株／健全株間の比較解析に供試することで、相同性検索を経ずにウイルス由来コンティグのみを抽出することができた。今後は本法の様々なウイルス病害への有効性について検討していく予定である。

4. リンドウの新規病原ウイルスの同定／性状解析と基礎ウイルス研究への活用

こうした網羅的ウイルス診断技術を用いて、近年私たちは、原因不明症状を示すリンドウから 2 種のトムブスウイルス、リンドウウイルス A (GeVA) およびシクテウオーターボーンウイルス (SWBV) を同定した。ユニークな特性として両ウイルスは低温 (18°C) ではリンドウおよびシロイヌナズナで効率よく増殖・発病するが、より高温 (GeVA では 23°C 以上、SWBV では 28°C 以上) ではウイルス感染が認められなくなることがわかった。リンドウおよびシロイヌナズナにおける高温での増殖抑制は遠縁のキュウリモザイクウイルス (CMV) では観察されず、RNA silencing 等の既知の植物免疫システムの関与も認められていない (Fujisaki et al., 2020)。両ウイルスともタバコやセンニチコウなどでは高温／低温ともによく増殖するため、この低温依存的増殖には宿主特異的な植物-ウイルス間相互作用が背景に存在すると考えられた。ゲノム配列を決定したところ、GeVA は新種のトムブスウイルスであると考えられた (Fujisaki et al., 2018)。一方、SWBV は国内のスターチス等で感染報告がある既知のウイルスで、リンドウへの病原性は GeVA よりも強く、遺伝子操作系の確立にも成功した (Fujisaki et al., 2021)。その後の解析で、スターチス由来の系統も含めた多くの SWBV 系統がシロイヌナズナや大半のリンドウ品種に感染できないこと、リンドウから単離された特定の系統 (C1) のみがゲノム RNA の 3'非翻訳領域への変異により、低温依存的にリンドウおよびシロイヌナズナに効率よく感染・発病することを見出した。これらのことは野外のリンドウ圃場において、SWBV の適応進化が起こった可能性を示している。

3'非翻訳領域への変異によりリンドウおよびシロイヌナズナに 18°C で感染できるようになった SWBV-C1 であるが、28°C では相変わらず感染できない。シロイヌナズナを用いた解析の結果、SWBV-C1 は 18°C では効率よく増殖し、最終的に激しい病徴を引き起こすが、28°C では 1 細胞レベルでウイルス増殖が認められなかった。

そこで、こうした温度による厳密な SWBV の増殖制御を利用して、ウイルス感染・発病を高度に制御可能なハイスループットの宿主-ウイルス間相互作用の解析実験系の確立を試みた。本系は SWBV-C1 の全長ゲノムを Estradiol 誘導プロモーターの制御下で発現させる形質転換シロイヌナズナ (Col-Estp-SWBV-C1-RZ) を基本としている。一般に発現誘導プロモーターを用いても、誘導前

にわずかに発現したウイルスが植物育成過程で自立増殖してしまうため、同調的なウイルス増殖制御が困難な場合が多い。しかし、本系ではシロイヌナズナで低温依存的に増殖する SWBV を用いて、Estradiol 処理と温度シフトを組みわせることで

(28°Cで育成後、18°Cに移して Estradiol を処理)、簡便かつ高精度の感染制御が可能となると考えられる。実際、作出した形質転換シロイヌナズナに Estradiol を処理し、18°Cに温度シフトすると SWBV 様の病徴が観察されたが 28°Cでは観察されず、ウイルス外被タンパク質 (CP) の蓄積も検出されなかった(図5)。

ウイルス増殖制御の精度を確認するため、形質転換体の組織破砕液を SWBV 高感受性のベンサミアナタバコに接種した。その結果、18°Cでは Estradiol を処理しなくても全ての系統で破砕液が病原性を示し、わずかに発現した SWBV がある程度自立増殖していると考えられたのに対し、28°Cではほとんどの形質転換体系統 (15 系統中 14 系統) で組織破砕液の病原性が確認されず、誘導プロモーターと温度シフトを組み合わせることで、高精度のウイルス増殖制御が可能であることが確認された。

現在、この実験系を利用して、まず SWBV 感染に関わる宿主因子の順遺伝学的同定を試みている。Ethyl methanesulfonate (EMS) 処理をした Col-Estp-SWBV-C1-RZ シロイヌナズナ (M₂ 世代) において、エストラジオール処理と温度シフトにより感染を発動させたところ、病徴を示さない、もしくは緩和された系統が複数認められた。それらについて二次スクリーニングとして SWBV-C1 粒子を接種したところ、ウイルス増殖効率が低下、もしくは認められない系統が得られてきている。約半年間で 3 万系統以上の変異株のスクリーニングを低労力で行い、ウイルス感染関連因子変異株候補を複数同定することができたこと

そこで、こうした温度による厳密な SWBV の増殖制御を利用して、ウイルス感染・発病を高度に制御可能なハイスループットの宿主-ウイルス間相互作用の解析実験系の確立を試みた。本系は SWBV-C1 の全長ゲノムを Estradiol 誘導プロモーターの制御下で発現させる形質転換シロイヌナズナ (Col-Estp-SWBV-C1-RZ) を基本としている。一般に発現誘導プロモーターを用いても、誘導前にわずかに発現したウイルスが植物育成過程で自立増殖してしまうため、同調的なウイルス増殖制御が困難な場合が多い。しかし、本系ではシロイヌナズナで低温依存的に増殖する SWBV を用いて、Estradiol 処理と温度シフトを組みわせることで (28°Cで育成後、18°Cに移して Estradiol を処理)、簡便かつ高精度の感染制御が可能となると考えられる。実際、作出した形質転換シロイヌナズナに Estradiol を処理し、18°Cに温度シフトすると SWBV 様の病徴が観察されたが 28°Cでは観察されず、ウイルス外被タンパク質 (CP) の蓄積も検出されなかった(図5)。

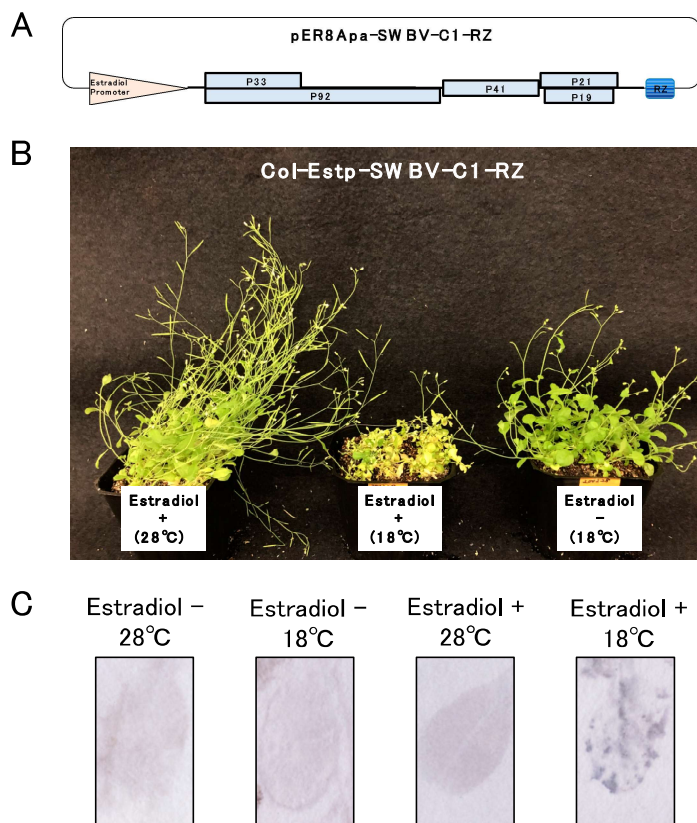


図5 シロイヌナズナのSWBV感染誘導系におけるエストラジオール処理と温度の影響

SWBV-C1ゲノム発現カセット (A) および、本系におけるウイルス病徴 (B) と外被タンパク質の蓄積 (C)

は、本実験系の有用性を示すものとなっている。今後は得られた変異株の詳細な解析を進め、ウイルス増殖関連因子の同定を行うことで、ウイルス感染・発病機構の理解と制御法の確立に結びつけていきたい。

おわりに

本稿の内容を含めたこれまでのリンドウ研究の成果から、リンドウには様々な病原体に対する多様な抵抗性機構と遺伝資源が存在することが分かりつつある。本研究でこれまでの基礎研究の成果を元に、複数の糸状菌およびウイルスに強い多重抵抗性リンドウの作出に向けた試みを開始している。今後は個々の病原体に対する抵抗性機構の分子レベルでの解析を進めるとともに、異なる病原体に対する異なる抵抗性機構の間での拮抗的／相乗的相互作用の理解を深めることも応用上重要となってくるであろう。

岩手生物工学研究センターは岩手県農業研究センターの応用研究を支援・促進するための基礎研究を実施している。基礎研究は短期的な出口が見えづらい反面、新規性の高い応用研究には基礎研究の充実が不可欠である。リンドウの耐病性研究はまだ駆け出しの段階であるが、基礎的知見の蓄積を背景とした応用研究を行うことで農業現場での諸問題の解決に取り組んでいきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、岩手県農業研究センター（病理昆虫研究室、花き研究室）との連携のもと、岩手生物工学研究センター（園芸資源研究部、ゲノム育種研究部）で行われました。関係者の皆様に御礼申し上げます。また、研究の過程で三瀬和之准教授（京都大学）、小林括平教授（愛媛大学）、海道真典准教授（摂南大学）にご助言、ご支援をいただきました。これらの研究は、科研費（基盤 C:18K05660）（基盤 C:18K05661）（基盤 C:21K05604）（若手:21K14850）の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Atsumi, G., Tomita, R., Yamashita, T. and Sekine, K.T. (2015) A novel virus transmitted through pollination causes ring-spot disease on gentian (*Gentian triflora*) ovaries. *Journal of General Virology* 96: 431-439.
- Cui, J., Bahrami, A.K., Pringle, E.G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C.L., Pierce, N.E. and Ausubel, F.M. (2005) *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:1791-1796.
- Fujisaki, K., Abe, Y., Tateda, C., Iwai, M., Kaido, M. and Mise, K. (2020) Host specific preference for low temperature in the multiplication of a tombusvirus, gentian virus A. *Virus Research* 286:198048.
- Fujisaki, K., Tateda, C., Abe, Y., Dominguez, J.J.A., Iwai, M., Obara, K., Nakamura, T., Iwadate, Y., Kaido, M. and Mise, K. (2021) Infectious in vitro transcripts from cDNA clone of a Japanese gentian isolate of Sikte waterborne virus, which shows host-specific low temperature-preferred multiplication. *Archives of Virology* 166:1991-1997.
- Fujisaki, K., Tateda, C., Shirakawa, A., Iwai, M. and Abe, Y. (2018) Identification and characterization of a tombusvirus isolated from Japanese gentian *Archives of Virology* 163:2477-2483.

- Kobayashi, K., Atsumi, G., Iwadate, Y., Tomita, R., Chiba, K., Akasaka, S., Nishihara, M., Takahashi, H., Yamaoka, N., other authors (2013) Gentian Kobu-sho-associated virus: a tentative, novel double-stranded RNA virus that is relevant to gentian Kobu-sho syndrome. *Journal of General Plant Pathology* 79: 56-63.
- Kobayashi, K., Tomita, R. and Sakamoto, M. (2009) Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *Journal of General Plant Pathology* 75: 87-91.
- Lake, J.A. and Wade, R.N. (2009) Plant-pathogen interactions and elevated CO₂: morphological changes in favour of pathogens. *Journal of Experimental Botany* 60:3123-3131.
- Seybold, H., Demetrowitsch, T.J., Hassani, M.A., Szymczak, S., Reim, E., Haueisen, J., Lübbers, L., Rühlemann, M., Franke, A., Schwarz, K. and Stukenbrock, E.H. (2020) A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications* 11:1910.
- Tateda, C., Obara, K., Abe, Y., Sekine, R., Nekoduka, S., Hikage, T., Nishihara, M., Sekine, K.T. and Fujisaki, K. (2019) The host stomatal density determines resistance to *Septoria gentianae* in Japanese gentian. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32:428-436.

植物ウイルスとゲノム編集

石橋和大

Ishibashi, K.

Plant viruses as tools and targets of genome editing technology

Abstract

Genome editing is an emerging technology for easy and convenient targeted mutagenesis. CRISPR-Cas9 has revolutionized biological research in this decade and is a promising technology for crop or livestock improvement and clinical applications. Here, I summarize recent technical advances in plant genome editing from the perspectives of a plant virus researcher. First, plant viruses are versatile tools as vectors for delivery of genome editing agents into plant cells. Advantages of virus vectors include i) high-level expression by virus vectors induces more efficient genome editing than conventional foreign gene expression systems, ii) the use of RNA virus vectors enables DNA-free genome editing, and iii) heritable genome editing in meristematic tissues can circumvent laborious tissue culture, a technical bottleneck in application of genome editing to wider plant species. Second, genome editing has been used for production of virus-resistant plants. Examples include a tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)-resistant tomato produced by quadruple knockout of the homologs of *Arabidopsis TOM1*. Thus, genome editing has enabled transfer of knowledge from basic research using a model plant into crop improvement, beyond the availability of genetic resources.

Key words: genome editing, virus vector, virus resistance, susceptibility genes

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 Institute of Agrobiological Sciences, NARO, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8602, JAPAN

はじめに

人類は数千年の年月をかけて農作物の改良に取り組んできた。20世紀になるとメンデル遺伝学、突然変異育種、DNA マーカーなどの利用により品種改良は格段に加速した。さらに 2012 年に登場した Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) によるゲノム編集は、容易に生物のゲノム配列を改変し得る革命的な技術であり、新たな育種法として動植物の機能改変への利用に向けた研究が進められている。本稿では、黎明期を過ぎて発展期にあるゲノム編集技術と植物ウイルス研究との関係について、ゲノム編集における道具としての植物ウイルスベクターの利用と、ウイルス耐病性育種におけるゲノム編集の利用の両面から最近の動向を紹介したい。

1. ゲノム編集酵素

突然変異育種はランダムな変異を誘発した集団から目的形質を有する個体を選抜するため、多大な労力が必要であった。これに対し、標的とする遺伝子座にピンポイントで変異を導入する技術の開発が 1990 年代頃から行われてきた。標的変異導入は、ゲノム上の特定の領域を認識する機能と、当該領域に変異を導入する機能を兼ね備えた「ゲノム編集酵素」を用いることにより可能になる。変異導入には大きく分けて、二本鎖 DNA の切断に伴う非同源末端結合 (Non-homologous end joining; NHEJ) による修復のエラーで変異を誘発する方法と、相同組換え (Homologous recombination; HR) による方法の 2 種類がある。NHEJ ではどのような変異が導入されるかをコントロールすることは困難であるのに対し、HR では任意の鋳型と置き換えることによりゲノムを自在に改変することが可能であるが、多くの高等植物では HR の効率が低いため、成功例は薬剤耐性を付与する遺伝子改変など効率的な選抜が可能な形質の付与にほぼ限られている。本稿では HR については触れないため、詳細は他の総説等を参照されたい (Van Vu et al., 2019; Huang and Puchta, 2019)。NHEJ による修復エラーの利用を前提とすれば、ゲノム編集酵素に要求される変異導入のための機能としては二本鎖 DNA の切断ができれば十分である。一方、ゲノム上の任意の配列を標的として認識するようにゲノム編集酵素を設計することは長らく困難であった。

第一世代のゲノム編集酵素として開発されたのがジンクフィンガータンパク質である。ゲノム編集酵素としてのジンクフィンガータンパク質は、DNA を認識するジンクフィンガードメインを改変することにより異なる認識配列を標的とするよう図ったものであり、これを FokI などの DNA 切断酵素と融合することにより標的部位の切断が誘導され、NHEJ を介してゲノムに変異が導入される (Kim et al., 1996)。しかし、ジンクフィンガータンパク質による DNA 配列の認識機構には不明な点も多く、特定の配列を認識するような改変が困難であったこと、変異導入効率も低かったことなどから、広く使われる技術とはならなかった。

第二世代のゲノム編集酵素である Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) は、*Xanthomonas* 属細菌が分泌するエフェクタータンパク質 (TAL) の DNA 結合領域に存在する 34 アミノ酸からなる特徴的な反復配列のうち、12 番目と 13 番目の残基が DNA の 1 塩基を特異的に認識していること、この残基を置換することにより標的配列を改変可能であることの発見を機に、改変型 TAL を DNA 切断酵素と融合することにより任意の配列

への変異導入が可能になったものである (Christian et al., 2010)。TALEN は非常に有用なゲノム編集ツールではあったが、「34 アミノ酸×認識配列の塩基数」から成るゲノム編集酵素遺伝子の構築が容易ではないのが難点であり、またほどなく CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術が開発されたことから、やはり遍く使われる技術にはならなかった。しかし、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集では RNA が構成要素となっているのに対し、TALEN はタンパク質のみでゲノム編集が可能であることから、核酸フリーのゲノム編集技術等の需要は有り続けている。

第三世代のゲノム編集酵素として利用されている CRISPR-Cas9 システムは、元々細菌のゲノムに存在する機能不明の反復配列として見つかったものが、外来核酸に対する獲得免疫機構を担っており配列特異的な核酸の切断を引き起こすことが明らかになったことから、ゲノム編集に利用可能であることが示されたものである (Jinek et al., 2012)。中でも最初にゲノム編集酵素として利用された *Streptococcus pyogenes* 由来の SpCas9 は DNA 切断効率が高く、何よりガイド RNA (gRNA) を介して DNA 配列を認識するため標的配列の設計が非常に容易であることから、これまでのゲノム編集酵素の問題点の多くを解消するものであり、爆発的に広まって今やゲノム編集酵素の代名詞となっている。

非常に使いやすい SpCas9 ではあるが、技術的な制約となり得るのが Protospacer adjacent motif (PAM) 配列である。PAM は細菌が自身のゲノムと外来核酸を見分けるのに重要な役割を果たしており、配列は種ごとに決まっています SpCas9 では標的配列の下流に NGG が必要である。これはすなわち、ゲノム中の GG を含む領域の近傍しか SpCas9 によるゲノム編集の標的配列となり得ないことを意味する。この性質は遺伝子の破壊が目的である場合には大きな問題にならないが、後述するピンポイントの改変を行う際に障害となる。そこでこれを解消するため、異なる PAM 配列をもつ様々な細菌由来の CRISPR-Cas システム (表 1) の利用や、SpCas9 の PAM を認識するアミノ酸残基を改変することにより PAM の制約を緩めた変異体などが開発されるなど (Nishimasu et al., 2018; Walton et al., 2019)、ゲノム編集の標的部位を拡大するための技術開発が盛んに行われている。

表 1. 様々な CRISPR-Cas システム

クラス	タイプ	サブタイプ	エフェクター	標的	TracrRNA 要求性	PAM/PFS
1 (multi-Cas proteins)	I	A, B, C, D, E, F, U	Cascade	dsDNA	No	—
1	III	A, B, C, D	Cascade	ssRNA	No	—
1	IV	A, B	Cascade	dsDNA	No	—
2 (single-Cas protein)	II	A	SpCas9	dsDNA	Yes	NGG
2	II	A	SaCas9	dsDNA	Yes	NNGRRT
2	II	B	FnCas9	dsDNA/ssRNA	Yes	NGG

クラス	タイプ	サブタイプ	エフェク ター	標的	TracrRNA 要求性	PAM/PFS
2	II	C	NmCas9	dsDNA	Yes	NNNNGATT
2	V	A	Cas12a (Cpf1)	dsDNA	No	5' AT-rich PAM
2	V	B	Cas12b (C2c1)	dsDNA	Yes	5' AT-rich PAM
2	V	C	Cas12c (C2c3)	dsDNA	Yes	5' AT-rich PAM
2	VI	A	Cas13a (C2c2)	ssRNA	No	3'PFS: non-G
2	VI	B	Cas13b (C2c4)	ssRNA	No	5'PFS: non-C; 3'PFS:NAN/NNA
2	VI	C	Cas13c (C2c7)	ssRNA	No	—
2	VI	D	Cas13d	ssRNA	No	—

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集におけるもう一つの技術的制約は、NHEJ では導入される変異がランダムで生じる主に欠失もしくは挿入に限られることである (図 1A)。これもまた遺伝子の機能を破壊するには十分であるが、遺伝子破壊だけでは付与可能な形質に限りがあるため、より高度な改変を行うには狙った変異をピンポイントで導入する技術が望まれる。この問題を克服するため、二か所存在する SpCas9 のヌクレアーゼ活性部位のうち一か所 (nCas9) あるいは二か所とも (dCas9) に変異導入して二本鎖切断を起こさなくした誘導体に、塩基修飾により特定の変異を導入する酵素 (デアミナーゼなど) を融合することにより、部位特異的に塩基置換を導入する技術が開発されている (図 1B)。このとき nCas9 あるいは dCas9 は、gRNA と協働して標的部位の二本鎖 DNA をほどく働きを担っており、一本鎖部分に塩基修飾酵素が作用して変異が導入されると考えられている。この技術は導入する変異の種類を指定できるようにするものであり、NHEJ によるランダムな変異導入と比べると大きな進歩であるが、現在までに開発された塩基編集酵素により誘導可能な変異のパターンは 3 種類 (C から T、A から G、C から G) のみであり、任意の変異導入に向けてはさらなる技術革新が必要である。さらに自由度の高いゲノム編集技術として、Cas9 に逆転写酵素を融合させた prime editing と呼ばれる方法が開発されている (Anzalone et al., 2019) (図 1C)。この方法では、導入したい配列を RNA として gRNA に付加しておき、Cas9 (nCas9) により切断された DNA が逆転写酵素の働きにより合成された DNA と相同組換えによって修復されるのを利用して任意の変異を導入する。このときに用いる逆転写酵素としてマウス白血病ウイルス (MLV) 由来のものが多く使われているが、植物研究者になじみの深いカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の逆転写酵素でも可能である (Lin et al., 2020)。Prime editing はある程度の長さの挿入および欠失を含む任意

の変異導入が可能のため、今後ゲノム編集のスタンダードとなり得る有望な技術であるが、現在は変異導入効率が低いことが問題であり、効率の改善に向けた様々な取り組みがなされている。

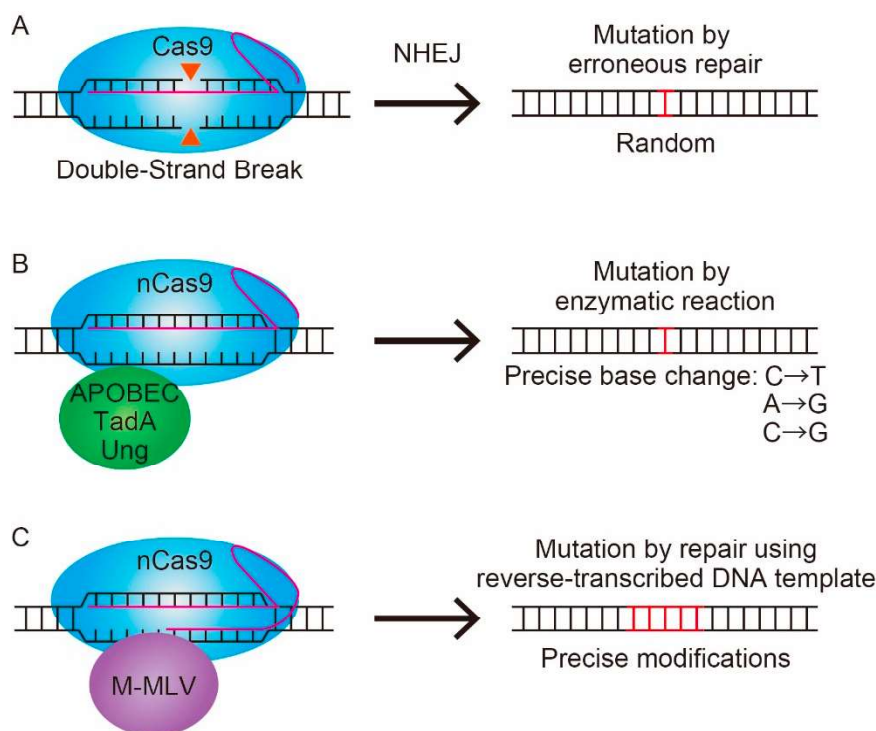


図 1. Cas9 誘導体による様々なゲノム編集

2. ゲノム編集酵素のデリバリーとウイルスベクター

植物のゲノム編集は多くの場合、アグロバクテリウム法などによりゲノム編集酵素を発現する遺伝子を導入することにより行われている。この方法では、後代で導入した変異と外来遺伝子を分離することにより、外来遺伝子フリーのゲノム編集個体が得られる。しかし、栄養繁殖性などの理由で外来遺伝子を除けない場合には、この方法は使えない。また、形質転換が困難なため、そもそもゲノム編集の成功が報告されていない植物も多いため、代替法の開発が行われている。一つには、プロトプラストに Cas9 と gRNA の複合体 (RNP) を直接導入し、個体を再分化させる方法があり、様々な植物で成功している (Woo et al., 2015)。この方法で得られたゲノム編集植物は外来遺伝子をもたないが、適用はプロトプラストからの個体再生系が確立されている植物に限られること、操作が煩雑で職人技を必要とすること、培養変異が生じる可能性があることなどのデメリットがある。また、パーティクルボンバードメント法により茎頂組織に直接ゲノム編集酵素あるいはゲノム編集酵素遺伝子を導入する方法も開発され、コムギなどで成功している (Hamada et al., 2018)。この方法は再分化をさせる必要がないという大きなメリットがあるが、今のところ適用範囲が比較的大きな茎頂組織をもつ植物に限られる。

ゲノム編集酵素を一過的に大量に発現することが効率の良いゲノム編集に重要であると考えられたことから、筆者らの研究室ではウイルスベクターを利用した植物のゲノム編集法の開発に取り組んでいる。このときに問題となるのがゲノム編集酵素の「大きさ」で

ある。一般にウイルスベクターから発現する遺伝子のサイズは小さいほど良いとされており、SpCas9のように4 kbpもある大きな遺伝子の発現成功例はほとんどない。幾つか理由は考えられるが、ウイルスにとって自身の増殖に無関係の配列をゲノムにもつことは負担であり、当該配列を欠失した変異株が出現するとそれが優先的に増殖するため、挿入配列が安定的に保持されないことが多い。このため、ウイルスベクターを用いたCRISPR-Cas9によるゲノム編集では、SpCas9を発現する形質転換植物に、100塩基程度と短いgRNAを発現するウイルスベクターを接種する例が多く報告されている。しかし、この方法ではそもそも形質転換植物を作出する必要があるため、ウイルスベクターを用いるメリットが小さくなってしまっている。そこで我々はSpCas9を発現可能なウイルスベクターのスクリーニングを行い、ジャガイモXウイルス(PVX)ベクターが比較的安定してSpCas9遺伝子を保持可能なことを見出した。ウイルスベクターが全身移行する間にSpCas9遺伝子が欠落してしまうため、接種個体全身に変異を導入することはできなかったが、接種葉には効率良く変異が導入され、ベンサミアナタバコの接種葉より再分化した個体およびその次世代個体は導入変異を有していた(Ariga et al., 2020) (図2)。PVXはRNAをゲノムにもつRNAウイルスであるため、この方法ではDNAを植物細胞に導入せずにゲノム編集に成功することになる。一方、中国のグループはsonchus yellows net virus (SYNV)ベクターが安定的にSpCas9を発現可能であることを見出している(Ma et al., 2020)。ウイルスベクターを用いてCas9を発現し、非形質転換植物のゲノム編集に成功したのは今のところこの2例のみである。

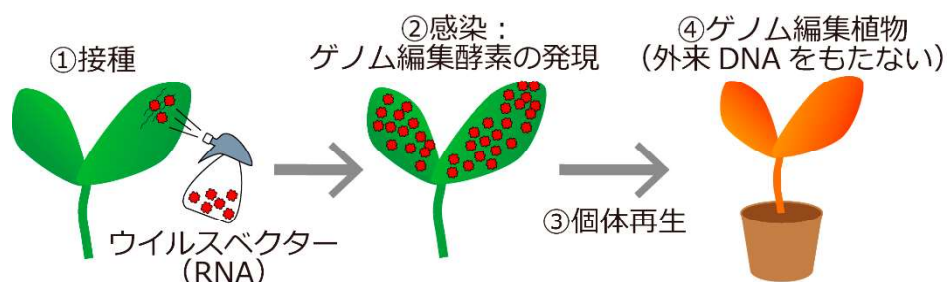


図2. PVXベクターを用いたベンサミアナタバコのDNAフリーゲノム編集

上記の方法では、ウイルス感染組織から個体を再分化させるための組織培養が必要であり、これが適用の幅を大きく制限している。一方Virus-induced gene silencing法は、ウイルスを接種するだけで容易に宿主の遺伝子の発現抑制が可能であり、その簡便さと適用範囲の広さから幅広く使われるようになった。同様に、もしゲノム編集酵素を発現するウイルスベクターを生長点に侵入させて変異導入することができれば、ウイルスベクターを接種するだけの超簡便なゲノム編集法となり、組織培養ができない植物のゲノム編集も可能となる可能性がある。実際にSpCas9形質転換植物にgRNAを発現するウイルスベクターを接種するモデル実験系では、接種個体から種子を取るだけでゲノム編集個体が得られることが、タバコ茎えそウイルス(TRV)、ムギ斑葉モザイクウイルス(BSMV)、cotton leaf crumple virus (CLCrV)で示されている(Ellison et al., 2020; Li et al., 2021; Lei et al., 2021)。我々は、Cas9とgRNAの両方を発現するウイルスベクターでこれを可能にするための技術開発を現

在進めている。

3. ゲノム編集によるウイルス抵抗性植物の作出

細菌の外来核酸に対する免疫機構であり、配列特異的に核酸を切断するという CRISPR-Cas システムの特徴は、そのまま抗植物ウイルス戦略に転用可能である。既に多数の例が報告されているので個別に紹介することは控えるが、DNA ウイルスのゲノムを標的とする gRNA および SpCas9 を形質転換した植物において当該ウイルスに対する抵抗性が付与可能であり、RNA ウイルスに対しては Cas13a を用いることにより同様の方法で抵抗性が付与可能である。しかしこの方法は、ゲノム編集酵素を発現させておく必要があり、遺伝子組換え植物としての利用が前提になる。

一方、ウイルスの増殖は宿主の機能を利用して行われるため、このような特定の宿主因子をコードする遺伝子に機能喪失変異を有する植物ではウイルスは増殖することができない。これまでに劣性（潜性）の抵抗性遺伝子として遺伝資源から見つかったものや、モデル生物を用いた順遺伝学的スクリーニング、ウイルス複製機構の解析による逆遺伝学的アプローチなどにより、多くのウイルス増殖に関与する宿主因子が同定されている。これらの遺伝子に変異導入することによりウイルス抵抗性植物が作出できると考えられるが、内在性遺伝子の機能喪失は植物の生育に悪影響を及ぼすことが多く、いかに植物への副次的な悪影響を抑えてウイルス抵抗性を付与できるかが重要となる。

劣性（潜性）のウイルス抵抗性遺伝子として同定されたものの多くはポティウイルス属のウイルスに対するものであり、翻訳開始因子（eIF4E）をコードしている（Shopan et al., 2020）。eIF4E は mRNA のキャップ構造に結合し、翻訳開始複合体形成の足掛かりになるタンパク質である。ポティウイルス属ウイルスのゲノムの 5'末端には 7-メチルグアノシンのキャップ構造はなく、代わりにウイルスがコードする VPg タンパク質が共有結合している。この VPg が eIF4E と結合して翻訳開始複合体を呼び込む働きを担うが、このとき複数ある eIF4E アイソフォームのうち特定のものだけを利用する。したがって、特定の eIF4E アイソフォームを欠失した植物では当該因子を利用するウイルスは増殖できないが、宿主 mRNA の翻訳は他のアイソフォームによって問題なく行われるため、植物の生育には影響しない。

表 2 にゲノム編集を用いて宿主のゲノムに変異導入を行ったことによるウイルス抵抗性植物の作出例を挙げた。標的の多くが翻訳開始因子であることは、ポティウイルス属に重要なウイルスが多く含まれるために研究者人口が多いことを差し引いても、この方法でのウイルス抵抗性植物の作出は一筋縄ではいかないことと同時に、新たな技術開発の余地が大きいことを表していると考えられる。

宿主因子への変異導入による抵抗性付与とは一線を画すが、特筆すべき例としてバナナで問題となっている内在性ウイルス（endogenous banana streak virus; eBSV）の不活化が挙げられる（Tripathi et al., 2019）。eBSV は宿主のゲノムに組み込まれており、乾燥などのストレスを受けると転写が活性化してウイルス粒子が産生される。eBSV 配列を標的としたゲノム編集により、内在性ウイルスゲノムに変異導入を行ったところ、BSV の感染が見られなくなった。すなわち、ゲノム編集技術により eBSV によるウイルス病を治療することができたと言え、ゲノム編集技術の特長を生かした重要な活用例である。

表2. ゲノム編集によるウイルス抵抗性植物の作出例

植物種	標的遺伝子	標的ウイルス	参考文献
キュウリ	<i>eIF4E</i>	CVYV, ZYMV, PRSV-W	Chandrasekaran et al. (2016)
シロイヌナズナ	<i>eIF(iso)4E</i>	TuMV	Pyott et al. (2016)
イネ	<i>eIF4G</i>	RTSV	Macovei et al. (2018)
キャッサバ	<i>nCBP-1/-2</i>	CBSV	Gomez et al. (2019)
イトバショウ	<i>(e)BSV</i>	BSV	Tripathi et al. (2019)
トマト	<i>eIF4E1</i>	PVY ^N , CMV	Atarashi et al. (2020)
	<i>eIF4E1</i>	PepMoV	Yoon et al. (2020)
	<i>eIF4E1</i>	PVY	Kumar et al. (2022)
	<i>eIF4E2</i>	PVMV	Kuroiwa et al. (2021)
	<i>Pelo</i>	TYLCV	Pramanik et al. (2021)
	<i>TOM1a-d</i>	ToBRFV, ToMV	Ishikawa et al. (2022)
オオムギ	<i>eIF4E</i>	BaMMV	Hoffie et al. (2021)
コムギ	<i>PDIL5-1</i>	WYMV	Kan et al. (2022)

4. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) 抵抗性トマトの作出

最後に我々のグループによるウイルス抵抗性植物作出例を紹介したい。トマトの栽培においては、1970年代頃まではトマトモザイクウイルス (ToMV) による被害が問題となっていたが、抵抗性遺伝子 *Tm-2²* を導入した品種が広く利用されるようになり、ToMV の被害は大きく減少していた。2014年に中東で ToMV と同じトバモウイルス属の ToBRFV が発見された。ToBRFV は *Tm-2²* を有するトマトにも感染することが可能で、おそらく汚染種子を介して世界中に急速に拡大しており、国際的なトマトの安定供給に対する大きな懸念材料となっている (Zhang et al., 2022)。

我々は、シロイヌナズナの順遺伝学的スクリーニングにより、トバモウイルス属のウイルスが増殖に利用する遺伝子 *TOM1* を同定していた (Yamanaka et al., 2000)。*TOM1* を欠損したシロイヌナズナではトバモウイルスが増殖できなくなる一方、生育に目立った負の影響は見られないことから、トバモウイルスに対する抵抗性付与方法として *TOM1* の破壊は非常に効果的であると考えられた。実際に、RNAi によって *TOM1* ホモログを発現抑制することにより、トバモウイルス抵抗性タバコの作出に成功している (Asano et al., 2005)。ゲノム編集技術の進歩により、様々な作物で標的遺伝子の破壊が容易になったことから、我々は CRISPR-Cas9 を用いてトマトの *TOM1* 遺伝子を破壊することにより、ToBRFV に抵抗性を示すトマトの開発を試みた。トマトには発現が認められた *TOM1* ホモログが4個存在したため、この4個の遺伝子に変異導入を行ったところ、4個の *TOM1* ホモログが同時に破壊されたトマトでは ToBRFV の増殖は認められず、強力な抵抗性が付与されたことがわかった。一方、*tom1* 4重変異トマトは野生型植物とほぼ同様に生育し、導入変異による顕著な負の影響は認められなかった。植物が、ウイルスが増えるためだけに必要な遺伝子を持っているとは考えにくいから、*TOM1* には他に本来の機能があるものと推測しているが、

現在のところ見当もついていない。

ゲノム編集により、*TOM1* の破壊は大きなデメリットを伴わずに強力なトバモウイルス抵抗性を付与可能な有用技術であることが判明したことから、現在種苗会社との共同研究によりウイルス抵抗性品種の開発を進めている。また、他の植物種にも容易に適用が可能なのがゲノム編集のメリットであり、現在有効なトバモウイルス抵抗性遺伝子が存在しない植物（ウリ科など）においても、新たな抵抗性遺伝資源の創出に繋がると期待している。

おわりに

私が植物ウイルス研究を始めた 2000 年代前半は、シロイヌナズナのゲノム解読が完了したばかりで、植物の基礎研究として優れた成果の多くはシロイヌナズナを用いて得られていたが、一方でこれらの成果が直接農作物の改良に役立つことはあまりなく、基礎研究と応用研究の間には高い障壁があった。ゲノム編集技術によりこの障壁の少なくとも一部に穴が開き、基礎研究で得られた知見をそのまま農作物の形質改変に役立てることができるようになった。言い換えると、「役に立たない」と言われてきた基礎研究が「役に立つ」見通しが立ってきた。社会受容などの点でまだまだ課題は山積しているものの、将来的には品種改良はゲノムの改変により形質をオーダーメイドで付与していく方向に進んでいくものと考えられる。一方で、ゲノム上のどの領域をどのように改変すれば望む形質が得られるかについての情報整備がまだまだ十分とは言えないため、今後は遺伝子機能解明などの基礎研究の重要性がますます増していくだろう。

謝辞

本稿で紹介した我々のグループの研究のうち、PVX ベクターを使ったゲノム編集技術の開発は有賀裕剛博士が、ToBRFV 抵抗性トマトの作出は石川雅之博士が主に行ったものです。他にも農研機構の遠藤真咲博士、龍谷大の土岐精一教授、タキイ種苗の加野彰人博士をはじめ、多くの共同研究者の方々にご協力いただきました。関係者の皆様に御礼申し上げます。またこれらの研究は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム (SIP) 次世代農林水産業創造技術「新たな育種技術 (NBT) の改良・開発」、SIP スマートバイオ産業・農業基盤技術「バイオ産業・農業に貢献する精密ゲノム編集基盤技術の開発」、および生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業 (JPJ007097)」の支援を受けて実施しました。

引用文献

- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A. and Liu, D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576: 149-157.
- Ariga, H., Toki, S. and Ishibashi, K. (2020) Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants. *Plant Cell Physiol.* 61: 1946-1953.
- Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka, T., Nishiguchi, M., Hirai, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. (2005) Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Lett.* 579: 4479-4484.
- Atarashi, H., Jayasinghe, W.H., Kwon, J., Kim, H., Taninaka, Y., Igarashi, M., Ito, K., Yamada, T., Masuta, C. and

- Nakahara, K.S. (2020) Artificially Edited Alleles of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E1 Gene Differentially Reduce Susceptibility to Cucumber Mosaic Virus and Potato Virus Y in Tomato. *Front. Microbiol.* 11:564310.
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T. and Gal-On, A. (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17: 1140-1153.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186: 757-761.
- Ellison, E.E., Nagalakchmi, U., Gamo, M.E., Huang, P.-J., Dinesh-Kumar, S. and Voytas, D.F. (2021) Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat. Plants* 6: 620-624.
- Gomez, M.A., Lin, Z.D., Moll, T., Chauhan, R.D., Hayden, L., Renninger, K., Beyene, G., Taylor, N.J., Carrington, J.C., Staskawicz, B.J. and Bart, R.S. (2019) Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *eIF4E* isoforms *nCBP-1* and *nCBP-2* reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotech. J.* 17: 421-434.
- Hamada, H., Liu, Y., Nagira, Y., Miki, R., Taoka, N. and Imai, R. (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.* 8: 14422.
- Hoffie, R.E., Otto, I., Perovic, D., Budhagatapalli, N., Habekuß, A., Ordon, F. and Kumlehn, J. (2021) Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley. *Front. Genome Ed.* 3: 784233.
- Huang, T.-K. and Puchta, H. (2019) CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. *Plant Cell Rep.* 38: 443-453.
- Ishikawa, M., Yoshida, T., Matsuyama, M., Kouzai, Y., Kano, A. and Ishibashi, K. (2022) Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1* in tomato. *Plant Physiol.* 189: 679-686.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.
- Kan, J., Cai, Y., Cheng, C., Jiang, C., Jin, Y. and Yang, P. (2022) Simultaneous editing of host factor gene *TaPDIL5-1* homoeoalleles confers wheat yellow mosaic virus resistance in hexaploid wheat. *New Phytol.* 234: 340-344.
- Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1156-1160.
- Kumar, S., Abebie, B., Kumari, R., Kravchik, M., Shnaider, Y., Leibman, D., Bomstein, M., Gaba, V. and Gal-On, A. (2022) Development of PVY resistance in tomato by knockout of host eukaryotic initiation factors by CRISPR-Cas9. *Phytoparasitica* <https://doi.org/10.1007/s12600-022-00991-7>.
- Kuroiwa, K., Thenault, C., Nogue, F., Perrot, L., Mazier, M. and Gallois, J.-L. (2022) CRISPR-based knock-out of *eIF4E2* in a cherry tomato background successfully recapitulates resistance to pepper veinal mottle virus. *Plant Sci.* 316: 111160.
- Lei, J., Dai, P., Li, Y., Zhang, W., Zhou, G., Liu, C. and Liu, X. (2021) Heritable gene editing using FT mobile guide RNAs and DNA viruses. *Plant Methods* 17: 20.
- Li, T., Hu, J., Sun, Y., Li, B., Zhang, D., Li, W., Liu, J., Li, D., Gao, C., Zhang, Y. and Wang, Y. (2021) Highly efficient

- heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. *Mol. Plant* 14: 1787-1798.
- Lin, Q., Zong, Y., Xue, C., Wang, S., Jin, S., Zhu, Z., Wang, Y., Anzalone, A.V., Raguram, A., Doman, J.L., Liu, D. R. and Gao, C. (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nat. Biotech.* 38: 582-585.
- Ma, X., Zhang, X., Liu, H. and Li, Z. (2020) Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR–Cas9. *Nat. Plants* 6: 773-779.
- Macovei, A., Sevilla, N.R., Cantos, C., Jonson, G.B., Slamet-Loedin, I., Čermák, T., Voytas, D.F., Choi, I.-R. and Chadha-Mohanty, P. (2018) Novel alleles of rice *eIF4G* generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to *Rice tungro spherical virus*. *Plant Biotech. J.* 16: 1918-1927.
- Nishimasu, H., Shi, X., Ishiguro, S., Gao, L., Hirano, S., Okazaki, S., Noda, T., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Mori, H., Oura, S., Holmes, B., Tanaka, M., Seki, M., Hirano, H., Aburatani, H., Ishitani, R., Ikawa, M., Yachie, N., Zhang, F. and Nureki, O. (2018) Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 360: 1259-1262.
- Pramanik, D., Shelake, R.M., Park, J., Kim, M.J., Hwang, I., Park, Y. and Kim, J.-Y. (2021) CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Pathogen-Resistant Tomato against *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* and Powdery Mildew. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 1878.
- Pyott, D.E., Sheehan, E. and Molnar, A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol.* 17: 1276-1288.
- Tripathi, J.N., Ntui, V.O., Ron, M., Muiruri, S.K., Britt, A. and Tripathi, L. (2019) CRISPR/Cas9 editing of endogenous *banana streak virus* in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Commun. Biol.* 2: 46.
- Van Vu, T., Sung, Y.W., Kim, J., Doan, D.T.H., Tran, M.T. and Kim, J.-Y. (2019) Challenges and Perspectives in Homology-Directed Gene Targeting in Monocot Plants. *Rice* 12: 95.
- Walton, R.T., Christie, K.A., Whittaker, M.N. and Kleinstiver, B.P. (2019) Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science* 368: 290-296.
- Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S., Corvalan, C., Cho, S. W., Kim, H., Kim, S.-G., Kim, S.-T., Choe, S. and Kim, J.-S. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotech.* 33: 1162-1164.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. and Ishikawa, M. (2000) *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10107-10112.
- Yoon, Y.-J., Venkatesh, J., Lee, J.-H., Kim, J., Lee, H.-E., Kim, D.-S. and Kang, B.-C. (2020) Genome Editing of eIF4E1 in Tomato Confers Resistance to Pepper Mottle Virus. *Front. Plant Sci.* 11: 1098.
- Zhang, S., Griffiths, J.S., Marchand, G., Bernards, M.A. and Wang, A. (2022) *Tomato brown rugose fruit virus*: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. *Mol. Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/mpp.13229>.

All Over Science

Reagents

Instruments

BioChemicals

Equipment

FineChemicals

ClinicalChemicals

OrganicChemicals

Medical Appliances

わたしたちは、あなたの一番近くで研究をサポートします

POLESTAR

—仙台和光純薬株式会社—

試薬・理化学機器・臨床検査薬・

医療機器の購買サイト

<https://www.science-tour.com>

仙台和光純薬株式会社

Sendai WAKO PureChemical, Ltd

Tel: 022(239)2700 Fax: 022(239)2705

Email: Info@sendaiwako.com

<http://www.sendaiwako.com>

プラントフレックとは…

省エネ・低コスト・低発熱を特長とした植物育成用蛍光灯型 LED !

色は

薄桃  と

電球色  の2色!



省エネ
低コスト
低発熱



人工気象器

調光仕様 恒温/恒湿・恒湿

植物育成用蛍光灯型 LED

プラントフレック 搭載タイプ



庫内

天井にはφ40mmの測定口を標準装備!



■用途

植物細胞・組織培養
植物の耐環境試験
恒温 恒湿 保存実験



照明は5面照射で、0%時消灯、20~100%設定による無段階調光が可能!



日本医化器械製作所
人工気象器
ページ



他にも多数機種あります!



対話式液晶タッチパネルを採用



JIS C 1609-1 : 2006
一般形 AA 級照度計に
準拠!



価格も本体もお手軽な光測定器!
植物用光源の測定に最適!

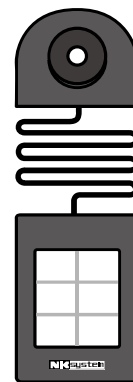


専用ソフトウェアでデータ管理



ライト LA-105 アナライザー

定価
¥198,000



光学部と
本体は
分離可能!



付属のUSBケーブルで
遠隔測定も可能!
ケーブルの長さは
288cm!

お客様の研究環境を支える

NKsystem Bio & Clean 研究設備・機器

株式会社 日本医化器械製作所

ホームページはこちら ▶▶▶ <http://www.nihonika.co.jp>

E-mail: info@nihonika.co.jp

- 本社 〒543-0014 大阪市天王寺区玉造元町3番9号 ☎06-6765-0223 (代)
- 東京支店 〒183-0015 東京都府中市清水が丘1丁目3番地8号 ☎042-365-3245 (代)
- 札幌支店 ☎011-786-7203 (代)
- 関東営業所 ☎029-855-7401 (代)
- 福岡営業所 ☎092-235-3490 (代)
- 羽曳野工場 ☎072-958-1919 (代)
- 仙台営業所 ☎022-349-9525 (代)
- 名古屋営業所 ☎052-910-3275 (代)
- 広島出張所 ☎082-427-6789 (代)
- 高松出張所 ☎087-815-5105 (代)

メタボロミクス リピドミクス 受託解析は へ

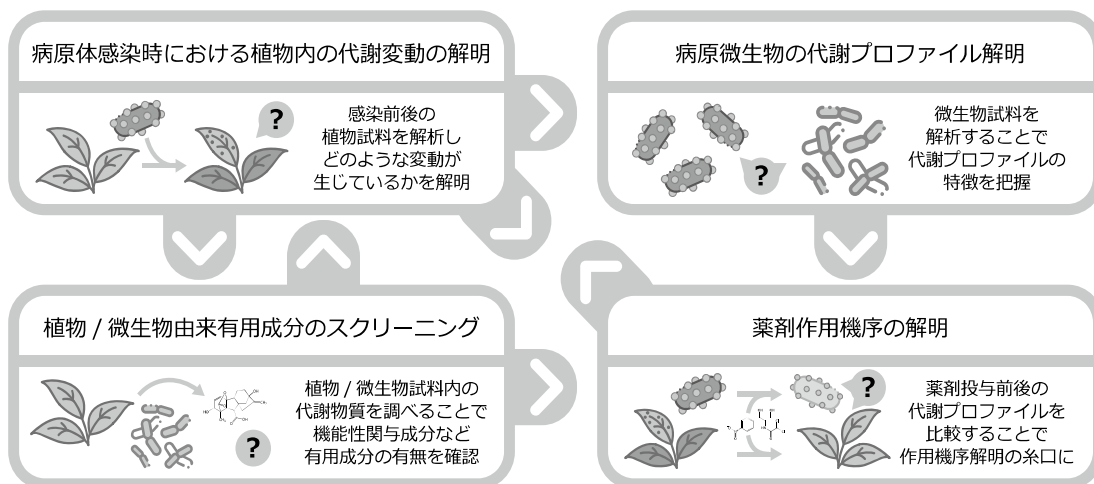
私たちヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(HMT)は、創業から19年目を迎えたメタボローム解析のリーディングカンパニーです。

■ メタボローム解析・リピドーム解析とは

生体内に存在する多数の代謝物質（アミノ酸、糖リン酸、有機酸などの低分子）について、その種類や濃度を網羅的に分析する手法を「メタボローム解析」あるいは「メタボロミクス」と呼びます。その中でも特に脂質代謝物質の網羅解析のことを「リピドーム解析」あるいは「リピドミクス」と呼びます。

HMTでは、アミノ酸・糖リン酸・核酸・有機酸など約 **1,000** 種の水溶性・イオン性代謝物質や、脂肪酸・アシルカルニチン・胆汁酸・ステロイド誘導体などの脂溶性・中性代謝物質を網羅的に測定することが可能です。

■ 試験デザイン例（測定対象物質一覧はページ下部記載の弊社ホームページからご確認いただけます）

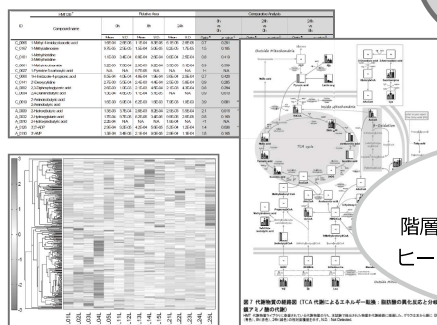
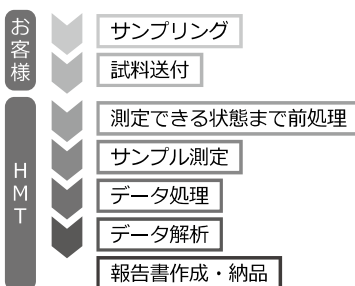


■ お客様はサンプルを送るだけ

サンプリング済みの試料を送っていただくだけで解析が可能です。
※病原性のある微生物・ウイルス等を含む試料を解析する場合、お客様側で除タンパク等の前処理を実施していただく必要がございます。

< 解析可能サンプル例 >

体液（血液・唾液・尿・CSF等）、
糞便、動植物組織、培養細胞、
微生物、食品 など



Excel, PDFの報告書には
主成分分析(PCA)、
階層的クラスタリング解析(HCA) 結果の
ヒートマップ、パスウェイマップ(高等動物用)
等が掲載されます。



ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

〒104-0033
東京都中央区新川 2-9-6
シュテルン中央ビル 5 階
TEL: 03-3551-2180

ご質問やお見積りなど、お気軽にお問い合わせください。
右記より各種資料をダウンロードいただけます。
<https://humanmetabolome.com/jpn/download/>



LAMP 法用遺伝子増幅検出装置（濁度）

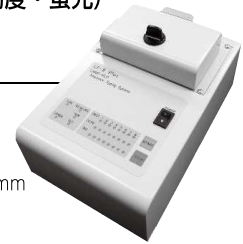
LT-16

サンプル数 : 8 ウェル×2
 サンプル容量 : 25 μ L
 外寸 (mm) : 260 mm×350 mm×127,5 mm


LAMP 法用遺伝子増幅検出装置（濁度・蛍光）

LF-8 Plus

サンプル数 : 8 ウェル
 サンプル容量 : 25 μ L
 外寸 (mm) : 260 mm×170 mm×127,5 mm


LAMP 法による等温核酸増幅のためのマスターミックス試薬

LAMP MASTER シリーズ

- 濁度検出用 **LAMP MASTER for Turbidity**
 従来から LAMP 法の検査装置として使用される濁度測定装置で検出できます
- 蛍光検出用 **LAMP MASTER for Fluorescence**
 増幅 DNA を LF-8 Plus やリアルタイム PCR 装置等の蛍光検出装置により検出できます
- 目視検出用 **LAMP MASTER for Turbidity (Visible Dye)**
 可視光下で目視での DNA 増幅判別が可能です

装置に関する詳細はこちら >>




試薬に関する詳細はこちら >>



富士フィルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号 TEL : 06-6203-3741 (代表)
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目 4 番 1 号 TEL : 03-3270-8571 (代表)

 試薬 HP <https://labchem-wako.fujifilm.com>

 E-mail : ffwk-labchem-tec@fujifilm.com
 フリーダイヤル 0120-052-099

営業所 : 九州・中国・東海・横浜・筑波・東北・北海道

<https://apro-s.com/>


アンテグラル・バイオサイエンス事業部は
**株式会社ファーマフーズ 『アプロサイエンスグループ』として
 新たなスタートをきりました**

ファーマフーズは、ストレス緩和・リラックス・疲労感の軽減の効果でチョコレートや飲料等に配合されている GABA を主力とし、多くの機能性素材を開発・販売しています。また、通信販売事業では、独自の機能性素材を配合した最終製品を販売しております。近年の大ヒット商品である 育毛剤 ニューモ は、CM 等でご覧になれることもあるかもしれません。そして、私達が参画するバイオメディカル部は、独自の抗体作製技術「ALAgene® technology」を用いた創薬事業を行っております。最近の成果としては、自己免疫疾患の創薬標的分子に対する抗体を大手製薬企業に導出しております。これらの事業を拡大・発展させる道筋において、私たち、アンテグラル（旧アプロサイエンス）のプロテオーム解析技術が高く評価され、今回の事業統合に至りました。

なお、アンテグラル（旧アプロサイエンス）が 30 年に渡ってご提供して参りました、プロテオーム解析を中心とした受託サービスや研究用試薬の事業は、すべて継続し、引き続き皆さまのお役に立てる事業であり続けたいと考えております。今後の事業組織の呼称は、原点に立ち戻り、アプロサイエンスといたします。『国内トップレベルの実績と技術力』と紹介いただけるこの名称に相応しい事業であり続けられるよう、担当者一同、全力で取り組んで参りたいと思います。

株式会社ファーマフーズ・アプロサイエンスグループとして、これまで通りに、これまで以上に、お付き合いを宜しく申し上げます。

植物感染生理談話会論文集 (第 56 号)

原稿受理 令和 4 年 6 月 3 0 日
印 刷 令和 4 年 8 月 1 5 日
発 行 令和 4 年 8 月 2 2 日

発行者 日本植物病理学会
会 長 増田 税
〒114-0015 東京都北区中里 2-28-10 日本植物防疫協会内
TEL : 03-5980-0281
編集者 令和 4 年度植物感染生理談話会事務局
高橋英樹・安藤杉尋・宮下脩平
〒980-8572 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1
東北大学大学院農学研究科
印 刷 有限会社 中村印刷
〒981-4262 宮城県加美郡加美町字一本杉 215
