

植物ウイルスの病徴誘導における宿主RNAサイレンシングの役割

志村 華子 (北海道大学大学院農学研究院)

hana@res.agr.hokudai.ac.jp

植物でみられるウイルス病徴には様々なものがあるが、病徴誘導の分子メカニズムが解明されているものはほとんどない。我々はタバコで特異的に起こる黄化病徴に注目し、この病徴がウイルスに寄生する noncoding RNA から生じる siRNA がタバコのクロロフィル合成関連遺伝子に対して RNA サイレンシングを誘導するために起こることを明らかにした。また、ウイルスがもつ RNA サイレンシングサプレッサーに関する研究の中で、RNA サイレンシングサプレッサーをターゲットとした抗ウイルス剤を開発し、基礎研究を実用化につなげる努力を続けている。

はじめに

ウイルスが植物に感染すると、わい化、壞疽、モザイク、黄化や奇形などが病徴として現れる。これらの病徴はウイルスと宿主植物の組み合わせによって異なり、ウイルス病徴の誘導や宿主特異性に関して、その分子メカニズムの詳細が分かっているものは少ない。植物において、ウイルス感染防御のために機能する二大メカニズムは、抵抗性遺伝子 (R 遺伝子) と RNA サイレンシングである。多くの真核生物に存在する RNA サイレンシングは、small RNA (sRNA) が誘導する塩基配列特異的な RNA 分解機構であり、内生遺伝子の発現調節に大きな役割を担っている。植物でも、sRNA による遺伝子発現制御は、組織や器官分化だけでなく性決定にも関わることが分かっている。ウイルスが感染した細胞では、特にウイルス由来の sRNA が多量に生じ、RNA サイレンシングによってウイルス RNA が特異的に分解される。一方、多くの植物ウイルスは、RNA サイレンシングを妨害することができる RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) を持っている。ウイルスの RSS は、ウイルスを分解しようとする RNA サイレンシングを抑える一方で、植物の遺伝子発現調節を行っている RNA サイレンシングも抑制する。RNA サイレンシングがウイルス防御に重要であると認識されるようになってから、RNA サイレンシングを介した植物とウイルスとの相互作用の結果、植物体の健全な発達に異常をもたらし、それが病徴として現れるのではないかと考えられてきた。しかし、ウイルスの病徴誘導に RNA サイレンシングが直接に関与することを示した研究はほとんどなかった。

本発表では、我々が行ってきたタバコ黄化病徴の誘導メカニズムに関する研究において、ウイルスに寄生する noncoding RNA が宿主 mRNA に対して RNA サイレンシングを誘導することが病徴につながることを示した成果について報告する。また、ウイルスの RSS の解析を通じて、ウイルス病徴を軽減させる抗ウイルス薬の開発へつなげたことについても合わせて紹介したい。

RNA サイレンシングによって起こるタバコの黄化病徴

キュウリモザイクウイルス (CMV) には、サテライト RNA (satRNA) と呼ばれる 330~400 塩基の noncoding RNA が寄生していることがある。satRNA は、宿主である CMV に複製と移行を依存しており、satRNA が感染すると CMV の増殖量は減少することから、CMV 単独感染時よりも病徴が軽減されることが多い。しかし、satRNA の種類によっては、CMV の病徴が強まることもある。例えば、四国の CMV 感染タバコで発見された satRNA、Y satellite RNA (Y-sat) が CMV に感染した場合である。

CMV はタバコに感染すると緑色のモザイク病徴を引き起こすが、CMV と Y-sat が感染すると鮮やかな黄化病徴となる (図1)。Y-sat 以外の他の satRNA と CMV の感染ではこのような黄化病徴はみられない。この Y-sat による特異的な黄化誘導は、世界中の植物ウイルス学者に注目され、1990 年頃から様々な研究が行われてきた。この研究に契機が訪れたのは、Wang et al. (2004) がウイルスの RSS を発現させた組換えタバコでは Y-sat 感染時の黄化病徴が起らないことを報告し、Y-sat の黄化誘導には RNA サイレンシングが関わることを示唆してからである。しかしその後も、Y-sat による黄化誘導メカニズムは長い間不明のままであった。その中で我々は、Y-sat による黄化誘導メカニズムの解明を目指し、Y-sat の inverted repeat 配列を発現する組換えタバコを作製した。その組換えタバコを用いた様々な解析によって、Y-sat 感染時に発現が低下するタバコ遺伝子の中に、Y-sat の塩基配列と 22 塩基の相補配列を持つものを見出した。その遺伝子、magnesium protoporphyrin chelatase subunit I (*ChlI*)は、クロロフィル合成関連遺伝子の一つであった。さらに、Y-sat が感染した植物体では Y-sat 由来の大量の siRNA が生じること、Y-sat 由来の siRNA によって *ChlI* の mRNA が切断されることなどを明らかにした (Shimura et al. 2011)。すなわち、CMV と Y-sat が感染したタバコでは *ChlI* 発現量の低下が起き、その結果クロロフィル欠失が生じて黄化が誘導されること、そしてその *ChlI* 発現量の低下は RNA サイレンシングによるものであることを証明したのである (図2)。これは、ウイルス感染時に起こる病徴に宿主の RNA サイレンシングが関与することを実験的に示した最初の例となった。その後、satRNA と同じ noncoding RNA であるウイロイド (ウイロイドは植物の polymerase で複製する点が satRNA と異なる) でも、ウイロイド由来の siRNA が植物の mRNA に RNA サイレンシングを誘導することが報告され (Navarro et al. 2012)、病徴誘導に宿主植物の RNA サイレンシングが関与することが徐々に明らかになってきている。一方、ウイルスゲノム由来の siRNA が植物 mRNA に RNA サイレンシングを起こすという報告はまだなく、この病徴誘導メカニズムは起源不明とされる subviral noncoding RNA のみ起こる限られた現象といえるのかもしれない。



図1. Y satellite RNA (Y-sat)感染による病徴の変化。CMVが感染した植物 (左) ではモザイク病徴が現れるが、CMVとY-satが感染した植物 (右) ではクロロフィルが消失した黄化病徴が現れる。

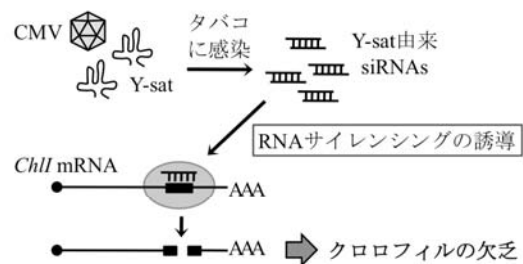


図2. Y-satによるタバコ黄化病徴のメカニズム。CMVとY-satが感染するとY-sat由来のsiRNAが生じ、それが宿主の *ChlI* mRNAにRNAサイレンシング誘導する。*ChlI*の発現量低下はクロロフィル欠乏を引き起こし、葉が黄化する。

RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) を標的とした抗ウイルス剤の開発

RSS として報告されているウイルスタンパク質は、短い二本鎖 RNA (siRNA や miRNA) に結合する結果として RNA サイレンシングを抑制するものが多い。RSS は、ウイルスの複製、移行や病原性にまで影響し (Asaoka et al. 2009)、RSS 機能を欠失させたウイルスは病徴が弱くなることが多い (図3)。このような現象を発端として、我々はウイルスの RSS をターゲットとした抗ウイルス剤の開発にチャレンジした。まず、表面プラズモン共鳴測定およびゲルシフトアッセイを組み合わせ、RSS 活性を抑制する物質の探索システムを開発した (Shimura et al. 2008a)。この系を用いることで、数千の化

化合物ライブラリから迅速かつ的確に RSS と siRNA の結合を抑制する化合物を選抜することが可能であった。次に、*in vitro* スクリーニングで見出された化合物が、*in vivo* でも効果があるかを明らかにするため、RSS の活性を比較・定量できるプロトプラストを用いた一過的 RNA サイレンシング誘導系を確立した (Shimura et al. 2008b)。確立したプロトプラスト系を用いて *in vitro* スクリーニングで選抜された候補化合物を評価したところ、それらの化合物は細胞レベルでも RSS 活性を低下させることを確認でき、さらに、これらの化合物をウイルス感染植物に投与したところ、ウイルス病徴の発現が実際に抑制されることも確認することができた (Shimura et al. 2008a)。得られた数種の化合物のうちの 1 つは、ビタミン C として知られるアスコルビン酸によく似た構造をもっていたことから、アスコルビン酸やその類縁体にも RSS の活性阻害を通じた RNA サイレンシング促進作用があるのではないかと考えた。アスコルビン酸およびその類縁体による抗ウイルス効果についても検証したところ、ウイルスを接種した植物体でウイルス感染点の拡大が抑制されるなどの結果を得ることができた (Fujiwara et al. 2013)。現在、アスコルビン酸類縁体を農薬として実用化できるか検討している段階にある。



図3. RNAサイレンシングサプレッサー (RSS) の病徴への影響. CMVが感染した植物 (中央) は健全植物 (左) に比べて矮化やモザイク病徴が現れている. 一方, RSSを欠失したCMV感染個体 (右) では, 病徴が大きく軽減している.

アスパラガスウイルスの RSS の解析

市販されているアスパラガスには、アスパラガスウイルス 1 と 2 (AV-1、AV-2) が感染していることが多いが、これらのウイルスはそれぞれ単独感染では無病徴であることから見た目では感染を判断することができない。海外の研究では、AV-1 と AV-2 が重複感染した株ではウイルスフリー株に比べて若茎数の減少や草丈の低下が生じるという報告があり、アスパラガスデクライン (数年で樹勢が著しく衰退する現象) の原因になるとも考えられている。我々は、この AV-2 の 2b タンパク質 (AV2-2b) に RSS としての機能があるかを調査し、AV2-2b はウイルス増殖を抑制する local silencing を阻害できないが、ウイルスの全身移行を抑制する systemic silencing に対しては弱い RSS 活性を有することを明らかにした (Shimura et al. 2013)。また、AV-2 はタバコの茎頂組織全域に感染できることも明らかにしている (Kawamura et al. 2014)。AV-2 の種子伝染性と弱い RSS 活性をもつ 2b との関連の解析を通じて、現在は北海道の代表的農産物であるアスパラガスウイルスフリー化し、アスパラガスの収量を増大させる研究に力を入れている。

終わりに

病徴誘導のメカニズムに関しては、植物ウイルスがコードするタンパク質が病徴誘導因子として機能するとされる。しかし、病徴は宿主との相互作用の中で生み出されることも多い。RNA サイレンシングが内生遺伝子の調節とウイルスの感染防御のどちらも担っていることを考慮すると、ウイルスの病徴に宿主 RNA サイレンシングが多かれ少なかれ関与することは明白である。タバコの黄化病徴の研究では、宿主 mRNA と相補性のある subviral RNA 由来の siRNA が病徴誘導に関わっていたが、現在のところ、植物ウイルス由来の siRNA が宿主 mRNA を切断する例はない。しかし動物では、ウイルス由来の miRNA が宿主 mRNA の発現制御を行う例も報告されている (Gottwein et al. 2007)。近年

のシーケンズ技術の著しい発展により、動物だけでなく植物においてもゲノム内の様々なウイルス様配列が見つかっている。そのような内在性ウイルス様配列と宿主の病気との関連を考えることは、ウイルスの存在意義について思いをめぐらすことになり非常に興味深い課題である。

謝辞

本研究を行うにあたり、北海道大学農学研究院の増田税教授、上田一郎教授ならびに日本曹達(株)佐野慎亮博士をはじめ、多くの方々よりご指導とご鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。また、多大なご協力とご支援を頂きました北海道大学農学研究院細胞工学研究室、植物病原学研究室、園芸学研究室の皆様にも深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Asaoka R, Shimura H, Arai M, Masuta C (2010) A progeny virus from a cucumovirus pseudorecombinant evolved to gain the ability to accumulate its RNA silencing suppressor leading to systemic infection in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 332-339
- 2) Fujiwara A, Shimura H, Masuta C, Sano S, Inukai T. (2013) Exogenous ascorbic acid derivatives and dehydroascorbic acid are effective antiviral agents against *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 198-204.
- 3) Gottwein, E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, Cullen BR. (2007) A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450: 1096-1099.
- 4) Kawamura R, Shimura H, Mochizuki T, Ohki ST, Masuta C. (2014) Pollen transmission of Asparagus virus 2 (AV-2) may facilitate mixed infection by two AV-2 isolates in asparagus plants. *Phytopathology* 104: 1001-1006
- 5) Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio, F. (2012) Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* 70: 991-1003.
- 6) Shimura H, Kogure Y, Goto K, Masuta C (2008a) Degree of RNA silencing and the ability of a viral suppressor vary depending on the cell species in a protoplast system. *J Gen Plant Pathol* 74: 326-330
- 7) Shimura H, Fukagawa T, Meguro A, Yamada H, Oh-hira M, Sano S, Masuta C (2008b) A strategy for screening an inhibitor of viral silencing suppressors, which attenuates symptom development of plant virus. *FEBS Lett* 582: 4047-4052
- 8) Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burguán J, Masuta C. (2011) A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog* 7:e1002021.
- 9) Shimura H, Masuta C, Yoshida N, Sueda K, Suzuki M. (2013) The 2b protein of Asparagus virus 2 functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442: 180-188.
- 10) Wang M-B, Bian X-Y, Wu LM, Liu L-X, Smith NA, Isenegger D, Wu R-M, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM. (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 3275-3280.