ミニレビュー

プラントアクチベーターによる植物ウイルス防御策[#]

小松 健*

東京農工大学大学院農学研究科・生物制御科学部門

(2021年7月1日受理)

Strategies to control plant virus diseases using plant activators

Ken KOMATSU

Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan

Keywords: acibenzolar-S-methyl, plant immunity, systemic acquired resistance, plant viruses, NPR1, long-distance movement.

はじめに

植物ウイルスは、近年新たに報告された植物病の原因の約半分を占め、¹⁾ 農作物への被害は依然として大きい。特に、国際的な種苗流通量の増大に伴い、栄養繁殖性・多年生の植物へのウイルス感染は経済的にも重要な問題となっている。しかし、感染過程を完全に宿主細胞に依存しているウイルスの治療薬の開発は困難であり、さらに抵抗性品種の利用は一部の農作物に限られていることから、新たなアプローチでの植物ウイルス制御策が必要とされている。

プラントアクチベーター (PA) は植物の免疫力を高めることで病原体への抵抗性を付与する薬剤であり、イネいもち病菌など多くの植物病原微生物に持続性のある卓効を示す。²⁾ PAが植物病原菌・細菌類のみならず、植物ウイルスの感染を抑制する効果があることは知られていたが、そのメカニズムは未解明であった。

本稿では、未開拓の部分が多いPAによる植物ウイルス防御策に関する研究について、筆者らが行っている研究も交え

て具体的に紹介したい。

1. 植物ウイルス感染に対する プラントアクチベーター (PA) の効果

1.1. 植物病原体としてのウイルスの特徴

ウイルスはタンパク質とゲノム核酸からなる非細胞性の病原体である。植物のウイルス病は主に虫媒伝搬性のものが問題とされてきたが、これらは防虫ネットや殺虫剤により感染の拡大抑制が可能である。むしろ、近年の国際的な種苗流通量の増大に伴い、栄養繁殖性の植物に感染し、宿主植物の増殖に伴い感染が拡大するウイルスの制御の困難さが改めてクローズアップされつつある。細胞膜外で自律的に増殖できる菌類や細菌類などの他の植物病原体と異なり、ウイルスは非細胞性であり宿主細胞に依存しなければ増殖できないという特徴を有する。このため、ウイルスのみに効果を与える薬剤の開発は非常に難しい。さらに、抵抗性品種の利用は一部の農作物に限られていることから、新たなアプローチでの植物ウイルス防御策が必要とされている。

1.2. PAの植物病原体への作用機構

このような特徴を持つウイルスによる病害の被害を抑制できる可能性のある薬剤が、プラントアクチベーター (Plant activator: PA)、あるいは抵抗性誘導剤と呼ばれる一群の化合

[#] 第46回大会シンポジウムを取りまとめた解説

* 〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

E-mail: akomatsu@cc.tuat.ac.jp

© 日本農薬学会

物である。FRACコードPに分類されるPAは、植物病原に対する直接的な抗菌（抗細菌）作用は示さず、植物本来の生体防御機構を誘導することにより植物病の感染を抑制する。

PAの作用機構としては、病害防御反応に関わる植物ホルモンであるサリチル酸（SA）シグナル伝達経路を活性化し、植物体全身に抵抗性を誘導するものが最もよく知られている。イネいもち病菌に効果の高いプロベナゾールは植物でのSA蓄積を高めることで、多様な防御反応を誘導する。³⁾ 一方、アシベンゾラルS-メチル（ASM）は同様にSAシグナル伝達経路を活性化するが、SA蓄積の顕著な増加は引き起こさないことから、擬似SAとして作用していると考えられる。⁴⁾

PAが活性化させるSA経路の下流では、重要な転写補助因子であるNPR1を介して多様な遺伝子発現変動が生じ、結果としてPRタンパク質の発現やファイトアレキシンなどの防御物質の生合成の亢進、リグニンなど物理的障壁の強化、気孔の閉鎖などの防御反応が誘導される。これらの反応は菌や細菌に対する効果的な防御機構として働くが、いずれもウイルス感染抑制との関係は確かめられていない。

1.3. PAのウイルスに対する効果

SAは生細胞を増殖に必要とする植物病原体への防御反応に関与する植物ホルモンであり、ウイルスへの防御反応にも深い関わりがあることが知られている。SAがタバコモザイクウイルス（TMV）に対する抵抗性反応である過敏反応において重要な役割を果たすことは古くから知られてい

た。⁵⁾ この知見と合致するように、SA経路と関わりの深いPAに関しても、植物病原菌・細菌類のみならず、植物ウイルスの感染を抑制する効果があるとの報告は数多くあり、ASMはその代表である。一方で、PAによるウイルス感染抑制に関するこれまでの知見はウイルスも宿主植物も異なる研究によるものが多く、そのメカニズムの理解はいまだ断片的である。⁶⁾

このように、常に細胞質内に存在し、抗菌性物質などが効果を持たない植物ウイルスが、宿主のいかなる反応によりその感染を抑制されているのかに関しては謎が多い。植物ウイルスへの防御反応は、RNAサイレンシングとプログラム細胞死の2つに大別される。⁷⁾ PAおよびSA経路のこれら2つの防御反応との関係がこれまでに調べられてきたが、ともにウイルス抵抗性への寄与は明確には示されていない。^{8,9)} PAの植物ウイルスへの感染抑制効果に関する研究は、植物の持つウイルスへの防御反応のメカニズムの解明に繋がる。以下では、筆者らが手がけてきた、ASMとタバコ属のモデル植物で多様な植物ウイルスが感染できる *Nicotiana benthamiana* を用いた研究について紹介する。

2. 緑色蛍光タンパク質（GFP）発現ウイルスを用いたPAのウイルス防御効果の解析

2.1. ウイルス感染の3段階の定量化

植物ウイルスの感染は、①1細胞レベルでの複製、②細胞間連絡を介した隣接細胞への細胞間移行、③維管束を介した

図1. 植物ウイルス感染の3段階。植物ウイルスの宿主への感染は、1細胞レベルでのゲノムの複製、プラズマデスマタ（細胞間連絡）を介した隣接細胞への細胞間移行、維管束を介した非接種葉への全身移行の3段階からなる。いずれも緑色蛍光タンパク質（GFP）発現ウイルスの挙動により可視化できる。

・オオバコモザイクウイルス (PIAMV) -GFPベクター

図2. オオバコモザイクウイルス (PIAMV)-GFP ベクター. PIAMVは約6kbの一本鎖RNAゲノムを持つひも状ウイルスである. そのゲノムには, 図1で示した3段階の感染過程に関わる, 複製酵素 (RdRp), 3つの移行タンパク質 (TGBp1-p3), 外被タンパク質 (CP) という5つのタンパク質 (四角) をコードする. PIAMV-GFPベクターは, そのうちCPコード領域にGFPを組み込んだもので, *Nicotiana benthamiana*のほか, シロイヌナズナに効率よく全身感染する.

た全身移行, という3段階に分けられる (図1). 筆者らは, PAの植物ウイルスへの作用機構解明の足がかりとするため, 複数の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ウイルスで, これらの3段階を定量的に評価する系を構築した. *N. benthamiana*の葉に, GFP発現ウイルス (オオバコモザイクウイルス: PIAMV-GFP¹⁰) (図2), ジャガイモXウイルス: PVX-GFP, カブモザイクウイルス: TuMV-GFP) を接種し, GFP蛍光観察を行なった. ①の指標として接種葉における蛍光斑数を, ②の指標として蛍光斑の直径を, ③の指標として上葉で蛍光が観察される接種後日数をそれぞれ調べ, PA処理植物とコントロールの非処理植物とでこれらの数値を比較した.

2.2. ASMのウイルス感染段階への効果

筆者らの研究では, 既に他のウイルスへの感染抑制効果が報告されていたASMをPAとして用いた.^{4,11)} ASMを噴霧

した植物では接種葉でのPIAMV-GFPの蛍光斑数が減少し (図3A), その後, 上葉でのGFP蛍光の出現が遅延した (図3B). 一方, 接種葉での蛍光斑サイズはASM噴霧により変化しなかった. また, ASM噴霧はPVXおよびTuMVの接種葉でのGFP蛍光斑数を減少させ, TuMVの蛍光斑サイズを減少させるとともにPVXの全身移行を遅延させた. さらに, ウイルス接種濃度を下げ接種葉のGFP斑数をASM噴霧葉で出現する程度にまで減少させても, 全身移行は遅延しなかった. 以上から, ASMは3種ウイルスに共通して上記の①, すなわち1細胞レベルでの複製という感染初期の段階を抑制しうることがわかった. ASMが1細胞レベルでPIAMV-GFPの複製を抑制することは, *N. benthamiana*の葉から単離したプロトプラストへの接種実験で確かめられた (図4). さらに, プロトプラスト実験でASM処理後にウイルスを接種した際の生細胞の数を計測した結果, ASMはプログラム

図3. (A) ASMのPIAMVの初期感染への効果. ASMを噴霧した植物では, ウイルス接種葉において, PIAMV-GFPの蛍光斑数が有意に減少する. (B) ASMのPIAMVの全身移行への効果. ASMを噴霧した植物では, ウイルスの全身感染が有意に遅延する.

図4. プロトプラスト接種実験におけるASMの効果. ASMを処理した葉から抽出したプロトプラストにPIAMV-GFPを接種すると、蛍光を発する細胞の数（下写真）が減少し、定量RT-PCRにより調べたウイルスRNAの蓄積量が顕著に減少する。

細胞死によらずにウイルス感染抑制を引き起こしていることがわかった。

また、ウイルス種によって効果は異なるが、ASMが上記のウイルス感染の3段階のうち2つのステップ、①複製と③全身移行に独立に影響を与えるケースも見出された（図5）¹²⁾ さらに、凍結切片を用いた植物内部のGFP蛍光観察によるウイルス感染動態の調査により、ASMにより、③全身移行のステップの阻害が維管束への侵入の段階で生じていることを示唆する結果が得られている。これらの結果は、PAのウイルス感染に対する多面的な抑制効果を示すものである。

2.3. ASMによるウイルス感染抑制に関わる宿主因子

上述のASMによる植物ウイルス感染抑制反応に関わる宿主因子を解明すべく、PIAMVがシロイヌナズナに効率よく感染することを利用し、複数の変異体への接種試験を行った。接種試験に用いたサリチル酸経路のハブ遺伝子である *npr1* 変異体¹³⁾ 植物ホルモン生合成が起らない *dde2/ein2/pad4/sid2* 四重変異体¹⁴⁾ および抗ウイルスRNAサイレンシングが

働かない *dcl2/dcl3/dcl4* 三重変異体¹⁵⁾ のうち、ASMの感染抑制効果は *npr1* 変異体でのみ失われることを見出した（図6）。以上より、ASMによるウイルス感染抑制にはNPR1が関与する一方、植物病原体への抵抗性に関わるサリチル酸、ジャスモン酸及びエチレン、および抗ウイルスRNAサイレンシング経路は関わらないことが示された。

これまで、NPR1は一部の例外を除き、ウイルス抵抗性反応には必ずしも関与しないと考えられてきた。¹⁶⁻¹⁹⁾ 上記の結果は、PAによる植物ウイルス感染抑制反応にNPR1が関与することを示しており、抗菌性物質の生産や物理的障壁の強化、気孔の閉鎖といった菌や細菌への防御機構として働きうる反応以外に、未知のウイルス感染抑制経路が存在している可能性を示唆している。今後は、NPR1の下流で働く抗ウイルス因子の解明を目指すとともに、細菌などのモデル病原体との比較解析を行いつつ、PAによるウイルスに対する全身獲得抵抗性の評価などを行なっていきたい。

ま と め

本稿で紹介した *N. benthamiana* と GFP 発現ウイルスを用いた系では、PAのウイルス感染抑制効果が「どの段階で」「どの程度」あるかを示すことができ、異なるPA間での比較が可能である。また、ウイルス間比較により「複製抑制」のような、より普遍的なPAの作用を発見できる点で意義が大きいと考えられる。

一方でこれまでのところ、PAによるウイルス感染防御は完全ではなく、また長期的な効果についても検討が必要である。しかし、本稿で紹介したようなPAの植物ウイルスへの感染抑制効果に関する研究は、多様なPAによる植物ウイルスへの効果に関する調査にも展開が可能である。さらに、モデル植物での知見を生かして、非モデル植物種でのPAのウイルス感染抑制効果の検証を進めることで、PAによる新たな植物ウイルス防御策の立案に繋がることが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、平成30年度「農業科学研究奨励金」（課

	複製	細胞間移行	全身移行
PIAMV	○	×	○
PVX	○	×	○
TuMV	○	○	×

○：抑制効果あり
×：抑制効果なし

図5. 異なる3種植物ウイルスへのASMの感染抑制効果. オオパコモザイクウイルス (PIAMV)、ジャガイモXウイルス (PVX)、カブモザイクウイルス (TuMV) のそれぞれのウイルスの3つの感染段階（複製、細胞間移行、全身移行）に対するASMの抑制効果の有無をまとめた。

図6. シロイヌナズナとその変異体におけるPIAMV-GFPに対するASMの効果。ASM非噴霧（control）あるいは噴霧植物にPIAMV-GFPを接種し、接種葉1枚に生じた全ての蛍光斑数を数えた。ASM処理により野生型Col-0, *dcl2/dcl3/dcl4*三重変異体, *dde2/ein2/pad4/sid2*四重変異体では蛍光斑数が減少したが, *npr1*変異体では蛍光斑数は減少しない。

題名：プラントアクティベーター（植物防御活性剤）による植物ウイルス感染機構の解明）の支援のもと遂行したものです。本稿執筆の機会をいただいたこととともに、農薬学会のみなさまにこの場をお借りして心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) P. K. Anderson, A. A. Cunningham, N. G. Patel, F. J. Morales, P. R. Epstein and P. Daszak: *Trends Ecol. Evol.* **19**, 535–544 (2004).
- 2) M. Zhou and W. Wang: *Front. Plant Sci.* **9**, 1692 (2018).
- 3) K. Yoshioka, H. Nakashita, D. F. Klessig and I. Yamaguchi: *Plant J.* **25**, 149–157 (2001).
- 4) L. Friedrich, K. Lawton, W. Ruess, P. Masner, N. Specker, M. G. Rella, B. Meier, S. Dincher, T. Staub, S. Uknes, J. P. Metraux, H. Kessmann and J. Ryals: *Plant J.* **10**, 61–70 (1996).
- 5) J. Malamy, J. P. Carr, D. F. Klessig and I. Raskin: *Science* **250**, 1002–1004 (1990).
- 6) P. Palukaitis, J. Y. Yoon, S. K. Choi and J. P. Carr: *Curr. Opin. Virol.* **26**, 141–148 (2017).
- 7) J. Y. Moon and J. M. Park: *Front. Microbiol.* **7**, 2068 (2016).
- 8) M. G. Lewsey and J. P. Carr: *J. Gen. Virol.* **90**, 3010–3014 (2009).
- 9) A. M. Murphy, T. Zhou and J. P. Carr: *Curr. Opin. Virol.* **42**, 8–17 (2020).
- 10) N. Minato, K. Komatsu, Y. Okano, K. Maejima, J. Ozeki, H. Senshu, S. Takahashi, Y. Yamaji and S. Namba: *Arch. Virol.* **159**, 885–896 (2014).
- 11) M. Takeshita, M. Okuda, S. Okuda, A. Hyodo, K. Hamano, N. Furuya and K. Tsuchiya: *Phytopathology* **103**, 960–965 (2013).
- 12) Y. Matsuo, F. Novianti, M. Takehara, T. Fukuhara, T. Arie and K. Komatsu: *Mol. Plant Microbe Interact.* **32**, 1475–1486 (2019).
- 13) H. Cao, J. Glazebrook, J. D. Clarke, S. Volko and X. Dong: *Cell* **88**, 57–63 (1997).
- 14) K. Tsuda, M. Sato, T. Stoddard, J. Glazebrook and F. Katagiri: *PLoS Genet.* **5**, e1000772 (2009).
- 15) I. R. Henderson, X. Zhang, C. Lu, L. Johnson, B. C. Meyers, P. J. Green and S. E. Jacobsen: *Nat. Genet.* **38**, 721–725 (2006).
- 16) J. P. Carr, M. G. Lewsey and P. Palukaitis: *Adv. Virus Res.* **76**, 57–121 (2010).
- 17) P. Kachroo, K. Yoshioka, J. Shah, H. K. Dooner and D. F. Klessig: *Plant Cell* **12**, 677–690 (2000).
- 18) C. E. Wong, R. A. Carson and J. P. Carr: *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 75–81 (2002).
- 19) Y. Liu, M. Schiff, R. Marathe and S. P. Dinesh-Kumar: *Plant J.* **30**, 415–529 (2002).

略歴

小松 健（こまつ けん）

生年月日：1979年7月26日

最終学歴：東京大学大学院新領域創生科学研究科博士課程

研究テーマまたは主な職歴：植物ウイルスの病原性決定・複製・ホストジャンプ機構の解明。2009年4月日本学術振興会特別研究員PD, 2013年4月東京大学大学院農学生命科学研究科助教, 2014年1月東京農工大学農学研究院特任准教授, 2019年1月同准教授

趣味：将棋鑑賞, 積読