

## 大学研究室紹介

リレ一随筆

## キャンパスだより(41)

## 京都大学 植物病理学研究室

おくの てつろう み せ かずゆき たかの よしたか かいどう まさのり  
 奥野 哲郎・三瀬 和之・高野 義孝・海道 真典

所在地：京都市左京区北白川追分町

Message from Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Department of Applied Biosciences, Kyoto University. By Tetsuro OKUNO, Kazuyuki MISE, Yosiyata TAKANO, Masanori KAI DO

(キーワード：植物病理学，ウイルス，糸状菌，非宿主抵抗性，RNAサイレンシング，オートファジー)



カキ園場から望む農学・生命科学棟

## はじめに

植物病理学研究室は、京都大学吉田キャンパス、北本構内の農学・生命科学棟の二階の西側半分にある。本研究棟は、2005年に完成した8階建ての新たな研究棟で、本棟には農学研究科から農学専攻の殆どの分野と応用生物科学専攻の2分野（植物病理学研究室と植物遺伝学研究室）および生命科学研究所のいくつかの分野が完成と同時に移転した。本棟の北側にはカキ園場が広がり、その先には五山送り火の「妙」と「法」が望まれる。また、東側には木造の優雅な旧演習林事務所、道を隔てて湯川秀樹博士の基礎物理記念館があり、研究室は比較的恵まれた環境にある。

## I 研究室の歩み

植物病理学研究室は、1924年京都大学農学部発足と同時に設置された農林生物学科の一講座（逸見武雄教授）として発足した。実験遺伝学、昆虫学、応用植物学講座を含む農林生物学科・専攻は、農林学の基礎となる生物学の教育・研究に携わることを意図して創設された学科・専攻で、これは基礎科学が究極において農林学および農林業の発展に貢献するとの考えに基づくものであった（京都大学農学部60年史）。農林生物学科は1995年から始まった大学組織の改組によりなくなり、植物病理学研究室（分野）は現在では、農学部資源生物科学科、農学研究科応用生物科学専攻に属している。ちなみに、資源生物科学科は、昔の農林生物学科、農学科、水産学科、畜産学科、熱帯農学科

等を含む31分野からなり、農学部学生の約3分の1が属する農学部で最大の学科である。また、応用生物科学専攻は昔の農林生物学専攻、水産学専攻、畜産学専攻からの16分野からなる。

植物病理学研究室は、逸見武雄教授が1949年に退官されて以降、赤井重恭（1950～73）、山本昌木（1976～85）、獅山慈孝（1985～89）、古澤巖（1989～2000）の各教授が講座を引継ぎ、現在は教授 奥野哲郎（2000～）、准教授 三瀬和之（2000～）、准教授 高野義孝（2007～）、助教 海道真典（1999～）の4人体制で植物病理学に関わる教育と研究に従事している。

## II 研究室の概要と教育

現在、研究室には学部4回生4名、修士課程学生11名、博士後期課程学生8名、研究生1名、技術補佐員2名、研修員（ポスドク）1名が在籍し、研究に取り組んでいる。うち4名が留学生（タイ、インドネシア、中国、台湾）である。毎年4月に農学部資源生物科学科に所属する学生のうち3～4名が新4回生として加入し、教員の指導のもと卒論研究に取りかかる。ほぼ全員が大学院修士課程に進学する。他の研究室や大学から受験し、修士課程もしくは博士後期課程から加わる学生もいる。

研究室では週1回、全員が参加して90分間のセミナーが行われる。4回生と修士課程の院生が植物病理学に関連する分野の最新の論文を紹介し、活発に議論を交わしている（発表30分間、討論15分間）。また



図-1 植物育成室



図-3 植物病理学研究室のメンバー



図-2 毎年、夏に催される研究棟の親睦会

年度初めにはそれまでの成果と年間の研究計画に関する報告を、7月と10月に研究中間報告会として、質疑応答を合わせて15分間程度の発表会を行い、各自の実験の進展状況と問題点の整理をしながら論文作製に向けて準備を行う。また研究テーマごとに全体を4分割してグループミーティングを2週間に1度行っており、生のデータを持ち寄って、研究の進展状況の報告と情報の交換を密に行っている。研究室が所属する大学院応用生物科学専攻では毎年2月に質疑応答を含めて15分間ほどの修士論文発表会を行い、また、学部の資源生物科学科では2月に卒論発表会としてポスターの展示および発表会を行っている。

### Ⅲ 研究紹介

ウイルスと糸状菌による病害を防除するための新たな手法の開発を最終目標に、病原体と植物の相互作用、特に病原体の病原性発現機構と植物の抵抗性機構を分子レベルで明らかにすることを目指し、基礎研究を行っている。ウイルスの研究では、主としてプラス鎖RNAウイルスであるダイアンソウイルスとプロモ

ウイルスをモデルウイルスとして用い研究を行っている。また、糸状菌の研究ではウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) をモデル病原菌として用い研究を行っている。

#### 1 ダイアンソウイルスの増殖と病原性発現機構の研究

##### (1) 翻訳とRNA複製機構

ダイアンソウイルス属 *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) は二分節のプラス鎖RNA (RNA1とRNA2) をゲノムとして持ち、主にマメ科植物を宿主とする小型球形ウイルスである。これまでの研究から、RCNMV ゲノムRNAにはキャップ構造とpoly(A)が存在せず、複製酵素タンパク質はキャップ構造に変わるRNA因子(3' TE-DR1)を介して翻訳されることが分かった。一方、複製酵素が触媒するRNA合成には別のRNA因子が必要とされるが、翻訳とRNA合成は密接にリンクして制御されていることが分かってきた。本研究から、翻訳因子あるいはRNA複製酵素と特異的に相互作用すると考えられる様々なRNA構造が明らかになってきた。これらのRNA構造には、ダイアンソウイルス属に特異的なもの、ダイアンソウイルス属を超え異なる科に属するいくつかのウイルスにも見られるもの、さらには、それらの構造には低分子化合物による遺伝子発現制御に関わるリボスイッチ様RNAの基本構造に類似した構造を持つものも含まれることが分かってきた。このようなRNA構造と異分子との相互作用解析を今後進めることにより、ウイルス特異的なRNA構造をターゲットにした抗ウイルス薬剤開発の道が開かれるものと考えられる。

一方、タンパク質については、現在、免疫学的、生化学的手法を用いて解析研究を行い、ウイルスタンパク質翻訳制御あるいはRNA複製に関わるいくつかの候補宿主タンパク質を得て、解析研究を進めている。

また、ウイルス複製酵素タンパク質ではタンパク質間結合、細胞内局在等の様々な機能ドメインを明らかにしている。さらに研究を進め、ウイルスタンパク質、ウイルス RNA、植物因子、三者間の相互作用解析系の構築を目指している。

### (2) 内在性抵抗性システムの回避と利用の分子機構

RCNMV は RNA サイレンシング抑制活性を持ち、RNA サイレンシング抑制にはウイルス RNA 複製酵素成分 (p27 と p88) とマイナス鎖合成を可能とする RNA 複製複合体形成が必要であることが分かった。本結果は、タンパク質に加えウイルス RNA を RNA サイレンシング抑制に必要とする最初の例であり、ウイルスが RNA サイレンシング因子を複製に利用する可能性を示唆した。また、RCNMV は抗ウイルス因子の一つと考えられる 5' → 3' エクソリボヌクレアーゼを利用して、ウイルスと宿主 mRNA の翻訳を制御するノンコーディングウイルス RNA を生成することを明らかにした。これらの事例は、ウイルスが宿主の抵抗性機構を巧みに感染に利用する可能性を示唆するものである。

現在、RNA 複製にリンクしたサイレンシング抑制に関わる因子の探索、およびノンコーディングウイルス RNA のさらなる機能解析を進めている。

### (3) 細胞間移行タンパク質の細胞内動態と細胞間移行機構

植物ウイルスは自身がコードする移行タンパク質 (MP) の働きによって原形質連絡を通過して隣接細胞へと細胞間移行する。蛍光タグ標識した RCNMV MP の宿主植物細胞内における局在性を詳細に調べた結果、これまで報告されてきた原形質連絡に加えて、ゲノム RNA1 の複製が起きる条件下でのみ細胞周縁部の小胞体膜 (ER) に RCNMV 複製酵素成分タンパク質 p27 と共局在することが明らかとなった。この現象は、複製酵素複合体を構成する宿主因子タンパク質の一つが MP をリクルートした結果であり、おそらく ER 上で MP は複製酵素複合体に接近して RCNMV ゲノム RNA を捕捉し、その結果効率的なウイルス細胞間移行を実現するのではないかとという作業仮説を立てている。現在、MP の細胞内局在性とウイルス移行機能との相関について調査するとともに、RCNMV MP と相互作用する宿主タンパク質を免疫学的手法で精製、質量分析で同定し、その機能解析を進めている。

## 2 プロモウイルス—植物間相互作用機構の研究

プロモウイルスは三分節のプラス鎖 RNA をゲノムとしても球形ウイルスである。これまでに、タイプ

種の *Brome mosaic virus* (BMV) をはじめ 6 種が報告されており、米国チームや我々によって全ウイルス種のゲノムの構造解析が完了している。BMV は植物ウイルスの中でも特に RNA 複製に関与するウイルス因子や宿主因子に関して多くの先駆的な研究がなされてきたが、BMV の移行機構や感染機構に関しては知見が少ない。植物ウイルスの複製と細胞間移行の関連性が指摘される中、我々は複製に関する多くの知見の集積された BMV の移行・感染機構を解析することは植物ウイルスのライフサイクルを総合的にとらえるのに好適な系であると考え、様々な手法を用いてウイルス因子と宿主因子を同定し、植物への感染機構、宿主特異性および病徴発現機構を研究している。

BMV の移行で重要な 3a タンパク質 (B3a) に関して、原形質連絡への局在化能、核酸への結合能およびリン酸化能が明らかとなり、変異体や BMV 系統の解析から B3a 中の機能領域が同定された。また、ベンサミアーナタバコから B3a の相互作用因子として同定された新規ポリペプチド結合複合体の  $\alpha$  因子 NbnACa1 は、原形質連絡に B3a を効率的に蓄積させて、BMV の細胞間移行をサポートしていることが示唆された。オオムギから外被タンパク質 (BCP) の相互作用因子として同定された HCP1 は BCP と結合することで BMV の感染をサポートすることが示唆された。この結果、BCP は粒子成分である以外に宿主植物因子との相互作用を行い感染に関与しているという新たな役割が示された。

宿主特異性に関して、他のプロモウイルスとの比較研究から、BMV は接種葉の維管束組織で 3a 遺伝子の関与する細胞間移行の欠損が原因の一つとなってササゲに全身感染しないことが明らかとなった。*Spring beauty latent virus* (SBLV) との比較解析から、BMV はシロイヌナズナで複製過程の非親和性により全身感染できないことが示された。現在さらに BMV とイネを用いた新たなモデル系の構築と解析を開始している。

SBLV はシロイヌナズナ S96 に感染し全身壊疽を誘起する。この病徴発現に関わる因子として、ゲノム上で隣接する 2 個の病害抵抗性遺伝子様遺伝子を同定した。現在、病徴発現の制御機構を詳細に解析している。

## 3 植物と病原糸状菌の相互作用機構の研究

### (1) 病原糸状菌の感染戦略に必要な分子機構に関する研究

ウリ科植物に病害を引き起こすウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) をモデル病原糸状菌として位置付け、その感染戦略の分子機構の研究を行っている。これまでに、MAP キナーゼカスケード、cAMP 伝達経路などの複数の細胞内信号経路が、本菌

の感染戦略に必須であることを明らかにしている。さらに、浸透圧制御型 MAP キナーゼカスケードが、農薬であるフルジオキシニルの作用発揮に必要であることを発見している。また、ペルオキシソーム代謝機能、転移 RNA 修飾機能が、感染機構において重要な役割を担っていることを明らかにしている。さらに、最近になり、ペルオキシソーム自身がオートファジー機構によって分解されることの必要性を明らかにしている。現在は、特に、このオートファジー機構、および RNA 制御機構がどのように感染に貢献しているかについて、その分子基盤の解明に挑戦している。並行して、植物抵抗性を抑制するような分泌タンパク質の探索を開始している。また、上記の研究から得られた知見を農業場面に応用するために、独自の低コスト・ハイスループット型の糸状菌病防除化合物スクリーニング法の開発を試みている。

#### (2) 植物の非宿主抵抗性を支える分子機構に関する研究

ウリ類炭疽病菌は、その宿主植物であるキュウリに病気を引き起こす一方、コマツナなどの非宿主植物には全く病気を引き起こさない。この抵抗性は、非宿主抵抗性と呼ばれ、本抵抗性は様々な病原菌と対峙しなければならない植物における必須の生存戦略である。しかし、この抵抗性を支える分子メカニズムに関する知見は極めて限られている。現在、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、この抵抗性のメカニズム解明に取り組んでおり、これまでに、うどんこ病菌への

非宿主抵抗性に必要な *PEN* 遺伝子のうち、炭疽病菌への非宿主抵抗性には *PEN1* は必須ではない一方、*PEN2*、*PEN3* が一定の貢献をしていることを明らかにしている。さらに、EDR1 と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素、および LIC1 と名付けた MACPF ドメインを有するタンパク質が、本抵抗性発現において重要な役割を演じていることを、最近になり発見している。

#### IV 他大学や地域との交流

数年に一度、奥野の前任地である高知大学植物病理工学研究室を研究室ほぼ全員で訪れ、研究会とリクリエーションの場を設けて交流を深めている。また、徳島大学・疾患酵素学研究センターの疾患プロテオミクス研究部門（谷口寿章教授）とはタンパク質の質量分析解析で共同研究体制にある。

#### おわりに

植物病理学は基礎から応用に至る幅広い領域を含む学門分野である。我々の研究室ではウイルスと糸状菌による植物病害の新たな防除法開発に向けて基礎研究を行っているが、細菌菌も含めた植物病害防除は安定した食料供給達成のための重要課題であり、植物病理学の役割は今後益々重要になると考えられる。我々研究室一同、今後も植物と病原体の相互作用機構を含めた植物病理学の基礎分野の充実に努力していく所存である。

#### (新しく登録された農業 53 ページからの続き)

**移植水稲**：水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ウリカワ、ミズガヤツリ（東北）、ヘラオモダカ、セリ、ヒルムシロ、オモダカ、クログワイ（東北）、コウキヤガラ（東北）、エゾノサヤヌカガサ（北海道）、シズイ（東北）、アオミドロ・藻類による表層はく離

**直播水稲**：水田一年生雑草、マツバイ、ホタルイ、ウリカワ、ヒルムシロ、セリ

#### ●フルセトスルフロン水和剤

22544：バックアタック DF（石原産業）09/12/16

フルセトスルフロン：10.0%

**移植水稲**：ノビエ、ホタルイ、ヘラオモダカ（東北）、ウリカワ、クログワイ（九州を除く）、ヒルムシロ、コウキヤガラ（東北、関東・東山・東海、九州）

**直播水稲**：ノビエ

#### ●フルアジホップ P・DCMU・2, 4-PA 粒剤

22550：ロングヒッター A 粒剤（石原産業）09/12/16

フルアジホップ P：2.4%，DCMU：4.8%，2, 4-PA：6.0%  
樹木等（公園、庭園、堤とう、駐車場、道路、運動場、宅地、のり面、鉄道等）：一年生雑草、スギナ、多年生雑草