

**日本農薬学会**  
**農薬科学研究成果報告書**  
(平成 30 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

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抑制機構の解明

筆頭研究者氏名 小松 健

所属 東京農工大学農学研究院

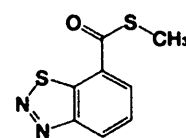
共同研究者名（所属）

研究成果（目的・方法・成果の順に概要を記載してください）

**【目的】**

施設栽培のキュウリや圃場のナシの病害防除においては、殺菌剤が多用される。一方、病原微生物等に殺菌作用を持たないベンゾチアジアゾール系化合物アシベンゾラル S メチル（ASM;右下図）は、持続的な全身抵抗性誘導効果を示すプラントアクティベーター（PA）として知られ、こうした施設栽培における病害防除の場で有効に利用されてきた。

本研究で対象とする植物ウイルスは、栄養繁殖性植物など農作物への被害が依然として大きい。しかし、増殖と感染拡大の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剤の開発は困難である。筆頭研究者は、ASMをはじめとする PA が、ウイルス感染にも抑制効果を示すとのこれまでの報告に着目した。本研究では、これまでに報告されている研究では定性的な実験・現象の観察に留まっていた PA のウイルス感染抑制効果を、蛍光タンパク質によるウイルス感染過程の可視化により定量的に解析することで、PA の新たな作用点を見出しうるのではないかと考えた。将来的な PA のウイルス防除への利用を視野に入れた本研究は、その防除が困難な植物ウイルスの感染の制御戦略の構築に繋がりうる。



アシベンゾラルS-メチル  
(ASM)

**【方法】**

本研究では、PA のウイルス感染抑制メカニズムに迫るため、まずは、すでいくつかのウイルスに対する感染抑制効果がよく知られている PA である、アシベンゾラル S メチル（ASM）を用いる。ASM を噴霧したタバコ属のモデル植物 *Nicotiana benthamiana* に、申請者が構築済みの緑色蛍光タンパク質（GFP）発現オオバコモザイクウイルス（PIAMV-GFP; 次ページ右上図）を接種する。接種後、蛍光顕微鏡観察・画像解析ソフトによる解析を行うことで、ASM による感染抑制がウイルス感染の三段階（①1細胞レベルでの複製、②細胞間移行、③維管束を介した全身移行）のいずれでどの程度生じうるかを、GFP 蛍光斑数や GFP 蛍光強度の定量化、および GFP 斑の植物組織局在の観察により解明する。さらに以上の結果を、RT-qPCR によるウイルス RNA の定量によっても確かめる。

次に、上記の研究で得られた知見を、他種の GFP 発現植物ウイルスを用いて検証する。複数種のウイルスへの効果を比較し、感染抑制過程の共通性を見出すとともに、ASM の効果がウイルスにより異なるかについて詳細に調査する。



さらに、PIAMV-GFP がシロイヌナズナに効率よく感染することを利用し、シロイヌナズナ変異体を用いて ASM によるウイルス感染抑制メカニズムに迫る。ASM はサリチル酸経路を介して病原体の感染を抑制するとの報告があるため、サリチル酸経路の遺伝子や、既知の植物ウイルス抵抗性関連遺伝子のシロイヌナズナ変異体を用い、ウイルス感染抑制にいかなる宿主のシグナル伝達経路が関与するかを明らかにする。

### 【成果】

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、その後、上葉での GFP 蛍光の出現が遅延した。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、接種葉での蛍光斑数の減少が上葉への全身移行の遅延に影響している可能性を考え、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たが、PIAMV-GFP の全身移行は ASM 処理をしない植物では遅延しなかった。以上から、ウイルス種によって効果は異なるが、ASM は複製と移行という2つのウイルス感染段階を独立に抑制することがわかった。また、複数のウイルス種に対して、ASM が共通して複製というウイルス感染のごく初期段階を抑制していることが明らかになった。さらに、ASM が1細胞レベルで PIAMV-GFP の複製を抑制することは、プロトプラスト接種実験でも確かめられた。一方、プロトプラストの生存率は ASM 噴霧の有無では変わらなかった。このことから、ASM によるウイルス感染抑制は、植物ウイルスへの抵抗性反応としてよく知られるプログラム細胞死の誘導を介していないことが示された。

次いで、ASM による PIAMV-GFP の感染抑制効果はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) でも認められることを利用し(右下図)、シロイヌナズナ変異体への接種試験により、ASM によるウイルス感染抑制メカニズムの解明を試みた。その結果、サリチル酸経路のハブ遺伝子である *npr1* 変異体、植物ホルモン生合成が起こらない *dde2/ein2/pad4/sid2* 四重変異体、および抗ウイルス RNA サイレncingが働かない *dcl2/3/4* 三重変異体のうち、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。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のシグナル伝達経路、および抗ウイルス RNA サイレncing経路は関わらないことが示された。この結果は、サリチル酸によるウイルス感染抑制は *NPR1* を介さないとするこれまでの報告とは異なっており、*NPR1* 依存的な新規なウイルス感染抑制メカニズムの存在を示唆している。

以上のように、本研究で用いた *N. benthamiana* と GFP 発現ウイルスの系は、PA がどの段階で、どの程度ウイルス感染抑制効果があるかを示すことができる。この系を利用すれば、各種 PA 間での感染抑制効果を比較することが可能であり、植物ウイルスに高い効果を発揮する薬剤の発掘につながる。さらには、今回「初期感染抑制」という ASM の各種ウイルスに共通した作用を見いだすことができたように、これまで断片化されていた PA のウイルスに対する作用に関する知見を統合し、ウイルス間比較によって、より普遍的な PA の作用を発見できる可能性が高い。



ASM噴霧はシロイヌナズナにおいてもPIAMV-GFP感染を抑制する