

学 位 論 文 題 名

クローバー葉脈黄化ウイルス感染に対する
マメ科植物の応答に関する研究

—抵抗性および病徴決定について—

学位論文内容の要旨

クローバー葉脈黄化ウイルス(CIYVV)ベクターを利用した外来遺伝子の発現

宿主の染色体とは独立に増殖するウイルスは、植物細胞での大量遺伝子発現系に適している。マメ科植物は形質転換体の作成が難しく、これまでに外来遺伝子発現に関する報告はほとんどない。加えて、マメ科は遺伝子資源としても多様であり、ダイズなどの重要作物を含む農業上有用な科である。クローバー葉脈黄化ウイルス(CIYVV)はマメ科を中心に広い宿主範囲をもつ。そこで CIYVV を利用し、マメ科をターゲットにした外来遺伝子発現系の構築を試みた。これまでに RNA ウイルスである CIYVV の感染性 cDNA クローン pCIYVV を用いた遺伝子操作系を確立し、また pCIYVV を外来遺伝子発現用に改変し、pCIYVV-Pst/CP を構築している。本研究では pCIYVV-Pst/CP の P1 と HC-Pro の間に green fluorescent protein (GFP) と glutamine synthase (GS) を挿入し、感染に伴う外来遺伝子の発現を、ウエスタンブロットと両タンパクの生物学的活性で確認した。これより CIYVV ベクターを利用した外来遺伝子発現系が確立され、植物内で機能的なタンパクを発現できることが示された。また、GFP (cycle3) を蛍光発光の強い smRSGFP (C3-S65T) に置換することで、インゲンマメでもウイルス感染に伴う蛍光を観察できること、GFP と GS の両方を CIYVV ベクターに挿入した場合、えそ誘導が大きく遅れることを明らかにした。この成果を利用し、以下の宿主-ウイルスの相互作用の解析を試みた。

インゲンマメの CIYVV 抵抗性解析

ウイルス感染は作物の収量、品質の低下につながり、農業上の大きな問題である。ウイルス感染を抑制するためにはウイルス抵抗性品種が用いられているが、抵抗性のメカニズムは明らかでないことが多い。本研究では CIYVV 抵抗性インゲンマメ品種 Jolanda を同定し、この抵抗性について解析を行った。Jolanda は CIYVV 接種に対して病徴を示さず、接種葉での ELISA でもウイルスを検出できなかった。この結果から Jolanda はウイルス感染の初期の過程で、複製あるいは細胞間移行を阻害していると予想された。GFP を発現する CIYVV やレポーター遺伝子を用いた解析を行ったところ、Jolanda では細胞死を伴わずに、1 細胞レベルで複製を阻害する抵抗性が働いていることが示唆された。

この抵抗性の遺伝学的背景を明らかにするために、Jolanda と感受性の大正金時を交配して

得られた個体について遺伝学的解析を行ったところ、この抵抗性は劣性 1 因子に支配されていることが明らかになった。

また、Jolanda の抵抗性を打破する変異ウイルス CIYVV-Br が CIYVV を接種した中育 F15 号から得られた。CIYVV-Br ゲノム RNA に対する cDNA 断片を、pCIYVV/C3-S65T の対応する断片と入れ替えたキメラウイルスを構築し、Jolanda に接種したところ、CI-6k2-VPg の領域が変異ウイルスに由来するキメラが Jolanda に感染した。この領域の塩基配列を解析したところ、VPg の N 端から中央にかけての領域に 3 箇所のアミノ酸置換が見つかり、VPg がこの抵抗性に関与していることが示唆された。

シロイヌナズナでの CIYVV 感染における翻訳開始因子の必要性

シロイヌナズナ、トウガラシ、レタスの翻訳開始因子の 1 つ eukaryotic initiation factor (eIF)4E あるいはそのアイソフォーム eIF(iso)4E が、CIYVV が属する *Potyvirus* の他のウイルスの感染に必要であることが示されている。CIYVV および GFP でタグした CIYVV/C3-S65T はシロイヌナズナ野生株に全身感染する。またシロイヌナズナでは eIF4E、eIF(iso)4E の変異体がすでに単離されている。そこで、CIYVV の感染にこれらの eIF4E タンパク群が必要であるか検討した。シロイヌナズナでは eIF(iso)4E が *Potyvirus* に属するウイルスの感染に必要な因子であると報告されていたが、eIF(iso)4E 変異体である *AtelF(iso)4E-1* に CIYVV は全身感染した。これより eIF(iso)4E は CIYVV 感染に必要ではないことが示された。一方、eIF4E 変異体である *cum-1* では CIYVV 感染せず、抵抗性であった。これらの結果から CIYVV は他の *Potyvirus* に属するウイルスと異なり、eIF(iso)4E ではなく、eIF4E がその感染に必要であることが明らかとなった。従って、*Potyvirus* に属するウイルスはこれらを使い分けていることが示唆された。

CIYVV 感染により誘導されるエンドウの病徴に関する解析

ウイルスが感染して誘導される病徴については、宿主側の遺伝的背景に関する解析があまりなされておらず、知見が乏しい。CIYVV は、エンドウにえそやわい化やモザイクなどの病徴を引き起こすが、品種ごとに病徴が異なることから、宿主側に病徴の決定因子があることが示唆されている。これらの宿主因子を解析するために病徴、特にえそに関して遺伝学的解析を行った。まず、モザイクを起こすエンドウ品種 PI250438 とえそを起こす PI343958 を選抜した。その交配子孫の解析結果は複雑で、病徴決定因子は複数あることが示唆された。しかし、それぞれの病徴に関して固定した F4 系統と PI250438 を交配して得られた F2 世代の中に、えそ:遅れたえそ:モザイクが 1:2:1 に分離する系統があった。これより、えそを起こす主動遺伝子と考えられる半優性の因子の存在を示した。

これまでにウイルス感染の広がり、蓄積と病徴について、知見はほとんどない。本研究で CIYVV 感染で誘導されるエンドウのえそとモザイクについて、ウイルス感染の挙動と病徴の相関を検定した。GFP でタグしたウイルスを用いた感染のモニタリング、ウエスタンブロットによる解析および遺伝学的解析から、ウイルス感染の広がり、蓄積の違いがえそ病徴誘導には影響しないことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 増 田 税

副 査 講 師 畑 谷 達 児

学 位 論 文 題 名

クローバー葉脈黄化ウイルス感染に対する マメ科植物の応答に関する研究

—抵抗性および病徴決定について—

本論文は、図42、表14、引用文献130を含み6章からなる総頁数134の和論文である。他に参考論文3編が添えられている。

本研究は、green fluorescent protein (GFP) でタグしたクローバー葉脈黄化ウイルス *Clover yellow vein virus* (CIYVV) の感染性 cDNA を開発し、これを利用してインゲンマメのウイルス抵抗性機構とエンドウのえそ病徴誘導を遺伝学的・細胞生物学的に解析することを目的とした。その内容は以下のように要約される。

クローバー葉脈黄化ウイルス (CIYVV) ベクターを利用した外来遺伝子の発現

これまでに CIYVV の感染性 cDNA クローン pCIYVV を用いた遺伝子操作系はすでに確立されている。本研究では pCIYVV の P1 と HC-Pro 遺伝子の間に GFP と glutamine synthase (GS) を挿入し、これらの発現をウエスタンブロットとタンパクの生物学的活性で確認した。これより CIYVV ベクターを利用した外来遺伝子発現系が確立され、また、GFP (cycle3) を蛍光発光の強い smRSGFP (C3-S65T) に置換した感染性クローン pCIYVV/C3-S65T を用いると、インゲンマメでもウイルス感染に伴う蛍光を観察できることを明らかにした。この成果を利用し、以下の宿主-ウイルスの相互作用を解析した。

インゲンマメの CIYVV 抵抗性解析

CIYVV 抵抗性インゲンマメ品種 Jolanda を同定し、この抵抗性について解析を行った。Jolanda はウイルス感染の初期の過程で、複製あるいは細胞間移行を阻害していることを明らかにした。GFP を発現する CIYVV やレポーター遺伝子を用いた解析から、Jolanda では細胞死を伴わずに、1 細胞レベルで複製を阻害する抵抗性が働いていることが示された。また、Jolanda と感受性の大正金時を交配して得られた個体について遺伝学的解析を行ったところ、この抵抗性は劣性 1 因子に支配されていることが明らかになった。

さらに、Jolanda の抵抗性を打破する変異ウイルス CIYV-Br を分離した。CIYV-Br ゲノム RNA に対する cDNA 断片を、pCIYV/C3-S65T の対応する断片と入れ替えたキメラウイルスを用いて抵抗性に関与するゲノム領域を特定した。その結果、VPg がこの抵抗性に関与していることが示唆された。

シロイヌナズナでの CIYV 感染における翻訳開始因子の必要性

シロイヌナズナ、トウガラシ、レタスの翻訳開始因子の 1 つ eukaryotic initiation factor (eIF)4E あるいはそのアイソフォーム eIF(iso)4E が、CIYV が属する *Potyvirus* 属の他のウイルスの感染に必要であることが示されている。CIYV はシロイヌナズナ野生株に全身感染する。また、eIF(iso)4E 変異体である *AteIF(iso)4E-1* にも全身感染した。これより eIF(iso)4E は CIYV 感染には必要ではないことが示された。一方、eIF4E 変異体である *cum-1* は CIYV に抵抗性であった。これらの結果から CIYV は他の *Potyvirus* 属のウイルスと異なり、eIF(iso)4E ではなく、eIF4E がその感染に必要であることが明らかとなった。

CIYV 感染により誘導されるエンドウの病徴に関する解析

エンドウのえそ病徴誘導に関して遺伝学的解析を行った。モザイクを起こす品種 PI250438 とえそを起こす PI343958 の交配子孫の解析結果より、病徴決定因子は複数あることが示唆された。しかし、交配子孫で見られた 4 つの病徴に関して固定した F4 系統と PI250438 を交配して得られた F2 世代の中に、えそ:遅れたえそ:モザイクが 1:2:1 に分離する系統があった。これより、えそを起こす主動遺伝子と考えられる半優性の因子の存在を示した。さらに、GFP でタグしたウイルスを用いた感染のモニタリング、ウエスタンブロットによる解析および遺伝学的解析から、感染の広がり、ウイルスの蓄積の違いがえそ病徴誘導には影響しないことが明らかとなった。

以上のように、CIYV に対するインゲンの抵抗性機構とエンドウのエソ病徴発現機構が遺伝学的・細胞生物学的に明らかにされた。これらの研究成果は、関連学会で学術上高く評価されている。

よって審査員一同は、佐藤 昌直が博士（農学）の学位を受けるのに十分が資格を有するものと認めた。