

Analyses of the resistance to *Clover yellow vein virus*
in pea (*Pisum sativum*) by using green
fluorescent protein tagged virus.

（緑色蛍光蛋白質でタグしたクローバー葉脈黄化ウイルスを用いた
エンドウにおけるウイルス抵抗性の解析）

学位論文内容の要旨

202系統のエンドウについて、クローバー葉脈黄化ウイルス抵抗性を接種検定した結果、28系統が選抜された。さらにこのうち6系統を感受性の系統PI 250438と交配して抵抗性の遺伝的背景を調べた。6系統すべてで、交配したF₁は感受性となったので、抵抗性はすべて劣性因子によるものと思われた。さらにPI 347295とPI 378159系統を選んで、F₂を解析した結果、両系統ともに抵抗性は劣性1因子によって支配されていることがわかった。

クローバー葉脈黄化ウイルスに対するエンドウの抵抗性について、緑色蛍光蛋白質（GFP）でタグしたウイルスを利用して解析した。タグすることで、ウイルスの感染、移行を生きた細胞で観察することが可能となった。両系統ともに、通常の感染葉を磨砕した汁液を機械接種しても全く感染しなかった。しかし高濃度の接種源を用いるかパーティクルガン法で感染を確認できた。GFPでタグされたウイルスは、感染性プラスミドcDNA (pCIYVV/C3-S65T) または、プラスミドより回収したウイルス粒子 (CIYVV/C3-S65T) として接種に利用した。パーティクルガン法でpCIYVV/C3-S65Tを切り葉に接種後GFP蛍光をモニターして解析した結果、2種類の異なる抵抗性機作が示唆された。すなわち、PI 347295では、ウイルスは一つの細胞で増殖したが、細胞間移行しなかった。この結果はCIYVV/C3-S65Tを高濃度で汁液接種しても同じであった。一方PI 378159とW6-15452では、パーティクルガン法で接種した葉で3日後には、感染点から周辺細胞に移行増殖しているウイルスが観察できた。7日後には、ウイルスは葉脈に到達した。

パーティクルガン法か高濃度のウイルスの汁液接種では、PI 378159の上葉

から高頻度にウイルスが回収された。採集されたウイルスは、今度通常の汁液接種でも感染したので、明らかに抵抗性を打破した変異株であった。さらにパーティクルガン法で接種した PI 378159 の接種葉にできた感染点からも通常の汁液接種で PI 378159 に感染する変異株が高頻度に分離できた。従って一度感染が成立するとこの抵抗性は容易に打破されることが明らかにできた。

抵抗性がクローバー葉脈黄化ウイルスの系統に特異的か否か調べるために、PI 347295、PI 378159 および W6-15452 に数系統のウイルスを接種して反応をみた。PI 347295 は、分離株 90-1、I89-1、および MB3 に感染した。W6-15452 では、MB3 と N 分離株が全身感染した。しかし、PI 378159 には、いずれの分離株も感染できなかった。また、既にインゲン品種 *Jolanda* の抵抗性を打破する変異株 CIYVV-Br2 はいずれのエンドウ系統にも感染できなかった。

PI 378159 の抵抗性が eIF4E のアミノ酸配列の違いによって決定されていることは安部（2004）が報告した。すなわち、感受性エンドウ品種の eIF4E を発現する CIYVV ベクターウイルスは PI 378159 に容易に汁液接種で感染する。また既に、CIYVV のエンドウ抵抗性遺伝子としてアメリカで *cyv-1* と *cyv-2* が報告されている。そこで、PI 378159 に見られる抵抗性が *cyv-2* に対応するか調べた。CIYVV/C3-S65T に対して *cyv-2* を持つエンドウは抵抗性であった。感受性エンドウ品種の eIF4E を発現する CIYVV ベクターウイルスは、*cyv-2* 抵抗性遺伝子を持つエンドウ系統に容易に汁液接種で感染した。また pCIYVV/C3-S65T をパーティクルガン法で *cyv-2* を持つエンドウに接種して GFP の蛍光をモニターすると、ウイルスは PI 378159 に接種した時と同じ挙動を示した。eIF4E のアミノ酸配列を調べたところ、*cyv-2* を持つ系統と PI378159 で同じであり、さらに *Pea seed-borne mosaic virus* 抵抗性 *sbm-1* をもつエンドウ系統とも同じであった。

W6-15452 エンドウ系統の抵抗性を打破する CIYVV 変異株を得た。抵抗性を打破する遺伝子を特定するために野生株とキメラウイルスを作成して抵抗性打破能力を調べたところ、*NIa* 遺伝子の変異が関与していることが明らかになった。

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

Analyses of the resistance to *Clover yellow vein virus* in pea (*Pisum sativum*) by using green fluorescent protein tagged virus.

(緑色蛍光蛋白質でタグしたクローバー葉脈黄化ウイルスを用いた
エンドウにおけるウイルス抵抗性の解析)

本論文は、図 13、表 25、引用文献 97 を含み 11 章からなる 110 頁の英語論文である。他に参考論文 1 編が添えられている。

クローバー葉脈黄化ウイルス (CIYVV) 抵抗性を接種検定して、28 系統を選抜した。さらにこのうち 6 系統を感受性の系統 PI 250438 と交配して抵抗性の遺伝的背景を調べた。6 系統すべてで、交配した F_1 は感受性となったので、抵抗性はすべて劣性因子によるものと思われた。さらに PI 347295 と PI 378159 系統を選んで、 F_2 を解析した結果、両系統ともに抵抗性は劣性 1 因子によって支配されていた。

CIYVV に対するエンドウの抵抗性について、緑色蛍光蛋白質 (GFP) でタグしたウイルスを利用して解析した。両系統ともに、通常の感染葉を磨砕した汁液を機械接種しても全く感染しなかった。しかし高濃度の接種源を用いるかパーティクルガン法で感染を確認できた。GFP でタグされたウイルスは、感染性プラスミド cDNA (pCIYVV/C3-S65T) または、プラスミドより回収したウイルス粒子 (CIYVV/C3-S65T) として接種に利用した。パーティクルガン法で pCIYVV/C3-S65T を切り葉に接種して GFP 蛍光をモニターした結果、2 種類の異なる抵抗性機作が示唆された。すなわち、PI 347295 では、ウイルスは一つの細胞で増殖したが、細胞間移行しなかった。一方 PI 378159 と W6-15452 では、パーティクルガン法で接種した葉で 3 日後には、感染点から周辺細胞に移行増殖しているウイルスが観察できた。7 日後には、ウイルスは葉脈に到達した。

パーティクルガン法か高濃度ウイルスの汁液接種では、PI 378159 の上葉から高頻度

にウイルスが回収された。採集されたウイルスは、今度通常の汁液接種でも感染したので、明らかに抵抗性を打破した変異株であった。さらにパーティクルガン法で接種した PI 378159 の接種葉にできた感染点からも通常の汁液接種で PI 378159 に感染する変異株が高頻度に分離できた。従って一度感染が成立するとこの抵抗性は容易に打破されることが明らかにできた。

抵抗性がクローバー葉脈黄化ウイルスの系統に特異的か否か調べるために、PI 347295、PI 378159 および W6-15452 に数系統のウイルスを接種して反応をみた。PI 347295 と W6-15452 では、系統特異性がありいくつかの系統は感染した。しかし、PI 378159 には、いずれの系統も感染できなかった。また、既にインゲン品種 Jolanda の抵抗性を打破する変異株 CIYVV-Br2 はいずれのエンドウ系統にも感染できなかった。

PI 378159 の抵抗性が eIF4E のアミノ酸配列の違いによって決定されている。また既に、CIYVV のエンドウ抵抗性遺伝子としてアメリカで *cyv-1* と *cyv-2* が報告されている。そこで、PI 378159 の抵抗性が *cyv-2* に対応するか調べた。CIYVV/C3-S65T に対して *cyv-2* を持つエンドウ数系統は抵抗性であった。感受性エンドウ品種の eIF4E を発現する CIYVV ベクターウイルスは、*cyv-2* 抵抗性を打破した。また pCIYVV/C3-S65T をパーティクルガン法で *cyv-2* を持つエンドウに接種すると、ウイルスは PI 378159 に接種した時と同じ挙動を示した。eIF4E のアミノ酸配列を調べたところ、*cyv-2* を持つ系統と PI378159 で同じであった。

W6-15452 エンドウ系統の抵抗性を打破する CIYVV 変異株を得た。抵抗性を打破する遺伝子を特定するために野生株とキメラウイルスを作成して抵抗性打破能力を調べたところ、*NIa* 遺伝子の変異が関与していることが明らかになった。

以上、本研究ではエンドウにおける CIYVV 抵抗性には二つの異なるメカニズムがあることを明らかにして、これを詳細に解析した。これらの成果はエンドウにおける抵抗性遺伝資源の解析にとどまらず、ポティウイルスによる作物の抵抗性分子機構の解明に大きく寄与するものである。よって、審査員一同は、アンドレ・マルセロ・シルバが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。