

学位論文題名

Analysis of induction mechanism for the necrosis on *Arabidopsis thaliana* by *Turnip mosaic virus* infection

(カブモザイクウイルスに感染したアラビドプシスにおける
えそ病徴誘導機構の解析)

学位論文内容の要旨

Turnip mosaic virus (TuMV) はポティウイルスの一種で、そのゲノムは全長 9380bp 程度の一鎖鎖の+鎖 RNA からなる。植物への感染はアブラムシによって非永続的に行われ、宿主範囲は双子葉植物の 43 科、318 種に及ぶ。世界の野菜生産においては *Cucumber mosaic virus* (CMV) について 2 番目に被害が多く、特にカブ、ハクサイ、ダイコンなどのアブラナ科野菜において大きな被害をもたらしている。TuMV の防除はもっぱら媒介昆虫であるアブラムシの防除に頼らざるを得ないが、完全なアブラムシの防除は難しく、またこのウイルスに対して十分な抵抗性の遺伝資源が見出されていない植物も多いため、TuMV に対して有効な防除方法がないのが現状である。TuMV に感染した植物は様々な病徴を示すが、典型的な病徴として葉に濃淡模様を生じる"モザイク"や葉に壊死を生じる"えそ"などがある。これらの病徴により収量や品質に大きな影響が現れるが、えそはモザイクに比べて外観品質を著しく損ね、また致死性を示すこともあるためその被害はモザイクより大きい。このため、ウイルス感染後の病徴をコントロールすることができれば TuMV による被害軽減に役立つが、これまでえそ病徴が発現する仕組みはよく理解されていなかった。本研究は、えそ病徴が発現する仕組みの解明及びえそを誘導する植物側の因子の単離を目的に行われた。

本研究では、植物材料としてアブラナ科のモデル植物である *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) を用いたが、*Arabidopsis* では TuMV のダイコン系統 (TuR1) に感染するとモザイクを示す生態型とえそ(葉脈に沿ったすじえそ)を示す生態型に分かれる。えそを示す *Landsberg erecta* (*Ler*) とモザイクを示す *Columbia* (*Col-0*) との間で交雑実験を行うと、えそが優性で単因子分離を示し明らかに植物側にもえそを誘導する因子があることがわかる。また、TuR1 に感染した *Ler* でウイルスはえそを起こした組織に局在しており、あたかも過敏反応 (*hypersensitive reaction* (HR)) のような様相を呈している。本研究では、これまで病徴として捉えられてきたえそが HR と類似した反応ではないかと考え、いくつかの点からえそと HR の特徴を比較した。HR の誘導には活性酸素種 (reactive oxygen species (ROS)) がセカンドメッセンジャーとして関与していることが知られているため、まずえそを生じている部位においても ROS が生じているかどうか調べた。その結果、ROS の一つである H_2O_2 の発生部位が、細胞死を起こしている部位やウイルスが局在している部位と一致することが明らかとなった。また、HR に伴う防御反応のうち感染特異的タンパク質 (pathogenesis-related (PR) protein) の発現あるいはそれらの発現を誘導するシグナル物質の蓄積といった現象もえその発現とともに観察された。すなわち、salicylic acid (SA) や ethylene の顕著な蓄積や発生及びこれら植物ホルモンによって誘導される *PR1*, *PR3*, *PR5* といった PR 遺

伝子の活性化が認められた。さらに、HR は光条件によってその発現が影響を受けるが、えそにおいても植物を弱光下に置くことによりその発現が抑制され病徴が黄化へと変化した。このように、えそは致死的な病徴であるにもかかわらず、組織レベルで見た場合には HR とよく似た防御反応が誘導されていることが示された。一方、HR と異なる点も明らかとなった。それは細胞死の誘導シグナルとしてえそでは SA が関与している点である。病原菌に対する HR において細胞死の誘導に SA は関与していないと考えられているが、えそでは SA が誘導シグナルとして必要であった。このため、えそは HR 様の細胞死と考えられるものの、細胞死誘導の経路においては HR と異なると考えられた。

上述のえその誘導には植物側の因子が関与しておりこの遺伝子は *TuNI* として報告されている。また、この *TuNI* 遺伝子の fine mapping の結果、*TuNI* の座乗領域には 8 個の遺伝子の存在が予測されている。本研究では、この *TuNI* 遺伝子の単離を目的にさらに候補遺伝子の絞り込みを行った。まず、これらの配列が転写されているかどうか半定量 PCR で確認したところ、発現が確認されたのは、8 個の予測遺伝子のうち early-response to dehydration (ERD) protein-like gene と 3 個の resistance (R)-like genes であった。ERD-like gene については、*Ac/Ds* tagging system により作成された *Ler* 由来の突然変異体を用いて TuMV の接種試験を行ったところ、*Ler* と同様なえそが発現された。すなわち、ERD-like gene は *TuNI* でないことが示された。一方、3 個の R-like genes については互いに配列の相同性が高く複数の R-like genes がえそ誘導に協調的に働いている可能性も考えられたため、本実験ではこれら 3 個の遺伝子に対して同時に post transcriptional gene silencing (PTGS) を誘導し病徴に変化が生じるかどうかを調べた。PTGS を誘導する方法としては、CMV2-A1 ベクターを利用した virus induced gene silencing (VIGS) 及び inverted repeat (IR) を導入して PTGS を誘導する方法を用いた。CMV-based VIGS では 3 個の R-like genes 間で相同な 199bp の配列をベクターに組み込み、このコンストラクトを *Ler* に前接種した。この前接種によりインサートと相同な配列をもった siRNA が検出されたことから、R-like genes の PTGS が誘導されていると判断し、さらに TuMV の TuR1 系統を接種した。その結果、茎頂部において生じるえそが顕著に抑制されたことから 3 個の R-like genes のいずれかが *TuNI* であることが強く示唆された。IR 導入による PTGS 誘導実験では、3 個の R-like genes 間で相同な 471bp の IR を pJM007 ベクターを用いて作成し、それをバイナリーベクター pBI121 に組換えした後、Col-0 個体にまず導入した。その後 *Ler* と交雑を行い、*TuNI* 遺伝子と IR をもつ個体を選抜して以後の解析に用いた。これらの個体では、IR 作成に使用した配列と相同な配列をもつ siRNA が検出されたことから、やはり R-like genes の PTGS が誘導されていると判断された。その上で、TuR1 を接種するとえそ病徴の発現は顕著に抑えられ、かつ *PR1* の発現も大きく低下していた。以上の結果から、3 個の R-like genes のいずれかが *TuNI* であることが明らかとなった。

本研究では、TuMV に感染した *Arabidopsis* において生じるえそが、R gene を介して誘導される HR、すなわち病原菌に対する抵抗性反応と本質的に大きな違いはないことを明らかにした。こうした知見は、作物生産において TuMV 感染による病徴の制御を考える上で役立つとともに、他のウイルス病における病徴発現の理解にも大きく貢献することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 増 田 税

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 助 教 犬 飼 剛

学 位 論 文 題 名

Analysis of induction mechanism for the necrosis on *Arabidopsis thaliana* by *Turnip mosaic virus* infection

(カブモザイクウイルスに感染したアラビドプシスにおける
えそ病徴誘導機構の解析)

本研究は図表 24、引用文献 61 を含み、3 章からなる総ページ 102 の英文論文である。他に参考論文 3 編が添えられている。

カブモザイクウイルス (TuMV) によるえそモザイク病はアブラナ科野菜における重要病害の一つであるが、このウイルスに対する有効な防除方法はほとんどない。TuMV に感染するとえそやモザイクといった異なる病徴が現れるが、葉菜類や根菜類では特にえそを生じた場合に外観品質の低下が著しい。従って、ウイルスに感染してもえその発生を抑制できればそれだけ被害は軽減されと考えられるが、これまでえそを生じる機構についてはよく理解されていなかった。本研究は、アブラナ科のモデル植物アラビドプシスを材料とし、i) TuMV 感染によって生じるえそは過敏細胞死 (HR) と同様な反応であることを明らかにする ii) 宿主側に存在するえそ誘導遺伝子 *TuNI* の構造を明らかにすることによって TuMV 感染によるえその誘導機構に関する理解を深めることを目的に行ったものである。

感染した TuMV は維管束を通して全身に移行し、葉の維管束周辺組織でえそを起こす。本研究では、まずウイルスはえそを起こした組織より外にはほとんど拡がらず、かつその組織でプログラム細胞死の誘導シグナルである活性酸素が発生していることを示した。また、植物ホルモンであるサリチル酸の蓄積やエチレンの放出及びこれらの物質によって発現が誘導される防御関連遺伝子の mRNA レベルも顕著に増大していることを示した。さらに、これらの反応は遮光条件下で抑制され、えその発生も弱まることを示した。えそで観察されたこれらの特徴は抵抗性反応時に見られる HR と同じであり、このことからえそは HR と同様なプログラム細胞死の一つであると結論した。一方、サリチル酸の合成能あるいはエチレンに対する感受性が低下した突然変異体を用いて交雑実験を行うことにより、えそに

おける細胞死の誘導にもサリチル酸及びエチレンが関与していることを明らかにした。えそはこの点において HR と異なっており、これは植物と病原体との相互作用により誘導される細胞死において初めて見出された知見である。

TuMV 感染によるえその誘導は *TuNI* によって制御されており、この遺伝子がマッピングされている領域内に 8 個の予測遺伝子が存在する。半定量 PCR によって 8 個のうち 4 個の遺伝子が発現していることを確認し、その中の ERD-like gene については突然変異体を用いた解析から *TuNI* ではないことを示した。残り 3 個の遺伝子はいずれも抵抗性遺伝子 (R gene) 産物に存在する nucleotide binding site 及び leucine rich repeat 構造をもった遺伝子で、重複によって生じたものである。これらの R-like gene については、はじめに 3 遺伝子間で保存されている配列を使ってウイルスベクター及びターゲット遺伝子配列の inverted repeat 構造導入による RNA silencing の誘導を行い、3 遺伝子の発現を同時に抑制した。その上で TuMV の接種試験を行い、3 遺伝子の発現抑制によりえその抑制や防御関連遺伝子の mRNA レベルの低下が起きていることを示した。これらの結果から、*TuNI* は 3 個の R-like gene のいずれかであることを明らかにした。

以上の結果より、TuMV 感染によるえそは植物側に存在する R-like gene によって誘導されること及びその誘導シグナルは活性酸素及びサリチル酸、エチレンを介して下流に伝わり HR 様の細胞死を引き起こすとともに防御関連遺伝子の発現を誘導していることが示された。本研究は、えそが単なる受動的な罹病性反応ではなくむしろ抵抗性と同様な病原体に対する能動的な反応であることを明らかにしたものであり、これらの成果はウイルス感染による病徴誘導機構を理解し、さらに病徴の制御方法を考える上で重要な知見を与えるものである。よって、審査員一同は、金甫 民氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。