

感受性植物におけるウイルスの強毒性発揮機構の研究

学位論文内容の要旨

細菌や糸状菌などは農薬で防除できるが、ウイルスには、ウイルス伝播に関わる昆虫や菌類を標的にする間接的なものを除いて効果的な農薬は存在しない。そこで、ウイルス病を防ぐには抵抗性品種が用いられる。その中のひとつ、過敏反応 (HR) による抵抗性は病原体が持つ非病原性遺伝子と宿主が持つ抵抗性遺伝子の特異的な組み合わせで誘導される。HR が誘導されると、病原体はその中または周辺領域に局在化し、感染を拡大することができない。しかし、いくつかの例外を除いてほとんどの抵抗性は打破されている。これは、ウイルス、特に RNA ウイルスが変異を蓄積しやすい性質を持つことに起因すると考えられている。この様に、現在までのところウイルスの感染自体を安定的に抑制することは困難であり、また感染した後に防除する農薬もないことから、違う視点でも防除策を考える必要がある。その為には従来の抵抗性発揮の機構に加えて、病気の発症機構についての知見の蓄積が重要であるので、感受性植物におけるウイルスの強毒性発揮機構に関する研究をおこなった。

クローバ葉脈黄化ウイルス(CIYVV)はエンドウやソラマメなどのマメ科作物に感染し、多くの品種を枯死させる。CIYVV no30 分離株 (CI-no30) をエンドウの PI 118501 に接種すると、接種葉では 1 週間以内に細胞死が観察され、さらに全身に感染して植物体全体で細胞死が見られる。細胞死は脈の周辺領域で誘導され、“脈えそ”と呼ばれる病徴が誘導される。また、エンドウの PI 226564 に CIYVV 90-1Br2 系統 (CI-90-1Br2) を接種すると、接種葉・上葉ともに“激しい黄化”を伴った細胞死が誘導される。本研究では CIYVV が誘導する脈えそと激しい黄化の 2 つのタイプの致死性の全身細胞死が発揮される機構を理解することを目指した。また、ソラマメから単離された新規宿主因子の機能を解析し、ウイルス抵抗性との関係についても調べた。

以前の遺伝解析から CI-no30 が PI 118501 に誘導する致死性の全身細胞死は不完全優性 1 因子 (*Cyn1*) によって支配され、また *Cyn1* が座する領域は *Medicago truncatula* とのシンテニーから抵抗性遺伝子がクラスターを形成している領域であると示唆されていた。そこで、CI-no30 が誘導する細胞死は HR に伴う細胞死と類似した機構で誘導されるのではないかと考え、抵抗性反応が起きているのかを調べた。その結果、細胞死が生じた組織では抵抗性反応に重要なサリチル酸経路のマーカー遺伝子 (*SA-CHI*) と HR 関連経路のマーカー遺伝子 (*HSR203J*) の発現量が顕著に上昇していた。CI-no30 (CI-WT) の変異株である CI-CB と CI-D193Y は細胞死を誘導する能力が低下している

が、SA-CHI と HSR203J の発現を誘導する能力も低下していた。さらに、サリチル酸経路を活性化する薬剤である benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) を処理したところ、CI-CB および CI-D193Y の細胞死誘導能が部分的に回復した。以上から、CI-no30 の強毒性にはサリチル酸経路が高く活性化されることが重要であることが示唆された。CI-CB は P1 と HCPro に 1 箇所ずつ、CI-D193Y は HCPro に 1 箇所のアミノ酸置換があり、P1/HCPro の RNA サイレンシング抑制活性が CB、D193Y の順に低下していることが分かっている。そこで、P1/HCPro の RNA サイレンシング抑制活性が毒性発揮に重要なのかを調べるために他種ウイルスの *Tomato bushy stunt virus* がコードする RNA サイレンシング抑制因子 p19 を CI-D193Y ベクターに導入し、毒性が回復するか調べた。その結果、CI-D193Y/p19 は致死性の全身細胞死を誘導し、サリチル酸経路や HR 関連経路を活性化する能力も回復していた。よって、RNA サイレンシングの抑制が CI-no30 の強毒性に重要であることがわかった。

PI 226564 で CI-90-1Br2 分離株が致死性の全身細胞死を誘導する原因となるウイルス因子の探索を行った。CI-90-1Br2 と CI-no30 のキメラウイルスを作成し、P3 が原因因子のひとつであることが分かった。しかし、P3 配列を CI-90-1Br2 と交換した CI-no30 の毒性は CI-90-1Br2 より弱く、強毒性発揮には P3 以外の因子も必要であることが分かった。また、点変異を導入した実験から、CI-90-1Br2 の P3 の 28 番目のアミノ酸残基をアルギニンからメチオニンに置換すると毒性が上昇することが明らかとなった。

これまでにソラマメで CIYVV の強毒性に関わる宿主因子がスクリーニングされ、XYPPX repeat 構造を持つ機能未知の遺伝子 *k158* が単離された (*Vfkl58*)。 *Vfkl58* の予想 ORF は 191 アミノ酸をコードし、N 末端側に XYPPX repeat を 9 つ持ったグリシンに富む (29.3%) タンパク質であった。XYPPX repeat は様々なタンパク質に存在するが機能は不明である。本研究では *Nicotiana benthamiana* を使い、*Potato virus X* (PVX) ベクターで *Vfkl58* のホモログ候補 (*Nbkl58-1,-2*) の発現抑制または過剰発現を行った。その結果、発現抑制で PVX による病徴が厳しくなった。また、発現抑制個体に *Cucumber mosaic virus* や *Turnip mosaic virus* を接種すると、コントロールと比較して早期に枯死した。PVX ベクターで *Nbkl58-1* を過剰発現すると PVX の病徴発現は遅延した。Tissue print で過剰発現したときの PVX の拡がりを調べると抑制されていた。また、アグロバクテリウムによる葉組織での一過的発現系では *Nbkl58-1* の過剰発現で PVX の蓄積量が低下していた。以上から *Nbkl58* がウイルス抵抗性へ機能している可能性が示唆された。

以上の結果から、CI-no30 はエンドウ PI 118501 において、全身で HR 様の機構で細胞死を誘導しており、通常病原体感染への防御機構に働くサリチル酸経路が、逆に病気を発症させる原因となっていることが明らかとなった。また、CI-90-1Br2 の PI 226564 の強毒性には P3 を含めた複数の因子が関与しており、複雑な強毒性発揮機構が存在する可能性が考えられた。さらに、*k158* 遺伝子による新規なウイルス抵抗性が存在する可能性が示唆された。

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 助 教 中 原 健 二

学 位 論 文 題 名

感受性植物におけるウイルスの強毒性発揮機構の研究

本論文は、和文122頁、図49、表4、引用文献118を含む4章からなり、他に参考論文2編が添えられている。

クローバ葉脈黄化ウイルス(CIYVV)は、多くのエンドウの品種を枯死させる。CIYVV no30 分離株 (Cl-no30) をエンドウの PI 118501 に接種すると、接種葉では1週間以内に細胞死が観察され、さらに植物体全体で細胞死が見られる。また、エンドウの PI 226564 に CIYVV 90-1Br2 分離株 (Cl-90-1Br2) を接種すると、接種葉・上葉ともに“激しい黄化”を伴った細胞死が誘導される。本研究では CIYVV が誘導する脈えそと激しい黄化の2つのタイプの致死性の全身細胞死が発揮される機構を解析した。また、ソラマメから単離された新規宿主因子の機能を解析し、ウイルス抵抗性との関係について調べた。

以前の遺伝解析から Cl-no30 が PI 118501 に誘導する致死性の全身細胞死は不完全優性1因子 (*Cyn1*) によって支配され、また *Cyn1* が座する領域は *Medicago truncatula* とのシンテニーから抵抗性遺伝子がクラスターを形成している領域であると示唆されていた。そこで、Cl-no30 が誘導する細胞死は、ウイルス抵抗性機構の一つである過敏感反応 (HR) に伴う細胞死と類似した機構で誘導されるのではないかと考え、抵抗性反応が起きているのかを調べた。その結果、細胞死が生じた組織では抵抗性反応に重要なサリチル酸経路のマーカー遺伝子 (*SA-CHI*) と HR 関連経路のマーカー遺伝子 (*HSR203J*) の発現量が顕著に上昇していた。また細胞死を誘導する能力と、*SA-CHI* と *HSR203J* の発現を誘導する能力は相関することを明らかにした。さらに、サリチル酸経路を活性化する薬剤である benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) を処理したところ、細胞死誘導が弱い変異株の誘導能を相補した。以上から、Cl-no30 の強毒性にはサリチル酸経路が高く活性化されることが重要であった。P1/HCPPro の RNA サイレンシング抑制活性が毒性発揮に重要なのかを調べるために、他種ウイルスの *Tomato bushy stunt virus* がコードする RNA サイレンシング抑制因子 p19 を、サイレンシング抑制活性の弱い変異株ベクターに導入し、毒性が回復するか調べた。変異株は、致死性の全身細胞死を誘導し、サリチル酸経路や HR 関連経路を活性化する能力も回復していた。よって、RNA サイレンシ

グの抑制が Cl-no30 の強毒性に重要であることがわかった。

PI 226564 で Cl-90-1Br2 分離株が致死性の全身細胞死を誘導する原因となるウイルス因子として、P3 がそのひとつであることが分かった。しかし、Cl-90-1Br2 と Cl-no30 のキメラウイルスを用いた解析から、強毒性発揮には P3 以外の因子も必要であることが分かった。

これまでにソラマメで CIYVV の強毒性に関わる宿主因子として、XYPPX repeat 構造を持つ機能未知の遺伝子 *k158* が単離された (*Vfk158*)。本研究では *Nicotiana benthamiana* を用い、*Potato virus X* (PVX) ベクターで *Vfk158* のホモログ候補 (*Nbk158-1, 2*) の発現抑制または過剰発現を行った。その結果、発現抑制で PVX による病徴が厳しくなった。また、発現抑制個体に *Cucumber mosaic virus* や *Turnip mosaic virus* を接種すると、コントロールと比較して早期に枯死した。PVX ベクターで *Nbk158-1* を過剰発現すると PVX の病徴発現は遅延し、拡がりが増加抑制されていた。また、*Nbk158-1* の過剰発現で PVX の蓄積量が低下していた。以上から *Nbk158* がウイルス抵抗性へ機能している可能性が示唆された。

以上の結果から、Cl-no30 はエンドウ PI 118501 において、全身で HR 様の機構で細胞死を誘導しており、通常病原体感染への防御機構に働くサリチル酸経路が、逆に病気を発症させる原因となっていることが明らかとなった。また、Cl-90-1Br2 の PI 226564 での強毒性には P3 を含めた複数の因子が関与しており、複雑な強毒性発揮機構が存在する可能性が考えられた。さらに、*k158* 遺伝子による新規なウイルス抵抗性が存在する可能性が示唆された。

以上、本研究は、感受性植物でウイルスが発揮する病原性機構に多くの新規知見をもたらし、その成果は関連学会においても高く評価されている。よって、審査員一同は、厚見 剛氏が博士（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。