

学位論文題名

# Analysis of the mechanism for host gene regulation by the *Cucumber mosaic virus* 2b protein

(*Cucumber mosaic virus* 2b タンパク質による  
宿主遺伝子発現調節機構の解析)

## 学位論文内容の要旨

*Cucumber mosaic virus* (CMV)は3分節ゲノム構造を持つRNA ウイルスで幅広い宿主範囲を持つ。本研究ではCMVを改変したウイルスベクターを用いて宿主遺伝子の転写抑制の誘導やCMV感染と宿主との相互作用について研究を行った。

(1) *Cucumber mosaic virus* ベクターを用いた内在性遺伝子を標的とした transcriptional gene silencing (TGS)の誘導

近年、small interfering RNA (siRNA)が遺伝子の転写抑制を引き起こす、transcriptional gene silencing (TGS)について多くの研究がなされ、siRNAを介して生じるDNA methylationとhistone modificationの変化が引き金となり、遺伝子の転写が抑えられることが明らかとなっている。本研究ではCMVを改変したウイルスベクター(A1ベクター)にペチュニアの*chalcone synthase* (*CHS*) 遺伝子のpromoter領域を挿入したA1-CHSproを用いて*CHS* 遺伝子を標的としたTGSの誘導を試みた。これまでに植物に対し人為的に内在性遺伝子を標的としたTGSを誘導するという研究は多くの論文で試みられてきたが、ウイルスベクターを用いての内在性遺伝子を標的としたTGSの誘導が成功した事例は報告されていない。A1-CHSpro接種当代では、花卉に細かな白い斑点が現れ花粉の稔性が低下した。Real-time RT-PCRによりA1-CHSpro接種当代の花弁での*CHS* 遺伝子のmRNA蓄積量はA1接種個体に比べ、大きく減少していた。この時A1-CHSpro接種当代ではTGSの引き金となる、siRNAも検出されている。またA1-CHSpro接種当代の花弁の*CHS* promoter領域ではDNA methylationとhistone modificationの変化が観察された。さらに、A1-CHSproが存在しない、A1-CHSpro接種後代の花弁でも同様の白い斑点が観察され、*CHS* 遺伝子のmRNAの低下が確認された。この個体の花弁では、*CHS* promoter領域においてDNA methylationとhistone modificationの変化が生じていることが明らかとなった。これらの結果から、A1-CHSproの接種により、*CHS* 遺伝子に対し、後代へと遺伝するTGSの誘導が可能であることが明らかとなった。

(2) *Arabidopsis thaliana* における、CMV 2b によるゲノムレベルでのDNA methylationと

## histone modification の変化

多くの真核生物ではストレスシグナルに反応し DNA methylation や Histone modification などの epigenetic modification を通して遺伝子の発現を制御していることが知られている。また *Arabidopsis* においても、塩害、寒さ、熱といったストレスによりゲノムレベルでの DNA methylation が誘導されることがわかっている。本研究ではこれらのストレスと同様に CMV の感染が *Arabidopsis* においてゲノムレベルでの epigenetic modification を誘導するか解析した。その結果、CMV の感染により、DNA methylation の上昇と Histone modification の変化がゲノムレベルで生じていることが示された。また CMV 2b を組み込んだ形質転換体においても同様の反応が観察されたことから、2b 依存的にゲノムレベルでの DNA methylation の上昇と Histone modification の変化が生じると考えられる。また tiling array を用いた解析により、2b による epigenetic modification の変化は特に CMV の抵抗性に関わる遺伝子の発現を抑制することが示された。つまり、CMV の感染によって生じた、ゲノムレベルでの epigenetic modification の変化は植物がストレスに適応するために誘導したのではなく、CMV が自身の複製に適した条件を作り出すために誘導したと考えられる。

### (3) *Arabidopsis* における、CMV 2b による開花促進

植物において、低肥料や乾燥といった環境ストレスは春化处理と同様に開花を促進することが明らかとなっている。しかし、ウイルス感染によるストレスが開花に影響するかは明らかとなっていない。本研究では CMV の感染が与える開花への影響に着目し研究を行った。その結果、CMV の感染は開花を促進し、その反応は 2b 依存的なものであることが示された。また 2b による開花促進は開花を抑制する *FLOWERING LOCUS C (FLC)* の発現量の低下が *FLC* 遺伝子領域内での histone modification の変化によって生じたために誘導された現象である可能性が示された。つまり、CMV は 2b による *FLC* ORF 領域内の histone modification の変化を介して、*FLC* の発現を抑制することにより開花を促進すると考えられる。

### (4) CMV 2b と宿主の Catalase とのタンパク質レベルでの結合によるえそ病徴の誘導

現在までにウイルスのタンパク質と結合する様々な宿主因子が同定され、それらの結合はウイルスの増殖や全身移行に大きく関わることが報告されている。こうしたウイルス因子と宿主因子の結合が直接、病徴の決定に関わることを明らかにした研究事例はごく少数である。本研究では、CMV-HL の感染は *Arabidopsis* においてえそ病徴に関して CMV 2b と *Arabidopsis* の Catalase 3 (CAT3) が結合することにより生じることを明らかにした。CMV 2b は CAT3 との結合により、 $H_2O_2$  分解の key enzyme である CAT3 の機能を阻害し、その結果として  $H_2O_2$  が蓄積して細胞死が生じる。また 2b と CAT3 との結合は 2b の RNA silencing suppressor としての機能をわずかに阻害するものの、CMV の増殖を大きく抑制するに到らない。つまり 2b と CAT3 の結合は宿主の CMV に対する抵抗性反応ではなく、ウイルスによる病徴誘導機構としての意味合いが強いと考えられる。

# 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 准教授 金 澤 章

学 位 論 文 題 名

## Analysis of the mechanism for host gene regulation by the *Cucumber mosaic virus* 2b protein

(*Cucumber mosaic virus* 2b タンパク質による  
宿主遺伝子発現調節機構の解析)

本研究では *Cucumber mosaic virus* (CMV) を改変したウイルスベクターを用いての宿主遺伝子の転写抑制の誘導や CMV 感染と宿主との相互作用について研究を行った。

### (1) CMV ベクターを用いた内在性遺伝子を標的とした transcriptional gene silencing (TGS) の誘導

近年、small interfering RNA (siRNA) が遺伝子の転写抑制を引き起こす、TGS について多くの研究がなされ、siRNA を介して生じる DNA methylation と histone modification の変化が引き金となることが知られている。本研究では CMV を改変した A1 ベクターにペチュニアの *chalcone synthase* (*CHS*) 遺伝子の promoter 領域を挿入した A1-CHSpro を用いて *CHS* 遺伝子を標的とした TGS の誘導を試みた。A1-CHSpro 接種当代では、花卉に細かな白い斑点が現れた。A1-CHSpro 接種当代の花弁での *CHS* 遺伝子の mRNA 蓄積量は A1 接種個体に比べ、大きく減少した。この時 A1-CHSpro 接種当代では TGS の引き金となる、siRNA も検出された。また A1-CHSpro 接種当代の花弁の *CHS* promoter 領域では DNA methylation と histone modification の変化が観察された。さらに、A1-CHSpro が存在しない、A1-CHSpro 接種後代の花弁でも同様の形質変化と、*CHS* 遺伝子の mRNA の低下、*CHS* promoter 領域での DNA methylation と histone modification の変化の維持が確認された。これらの結果から、A1 ベクターを用いることで、後代へと遺伝する TGS の誘導が可能であることが示された。

### (2) *Arabidopsis thaliana* における、CMV 2b によるゲノムレベルでの DNA methylation

と histone modification の変化

多くの真核生物ではストレスシグナルに反応し DNA methylation や histone modification などの epigenetic modification を通して遺伝子の発現を制御されている。本研究ではこれらのストレスと同様に CMV の感染が Arabidopsis においてゲノムレベルでの epigenetic modification を誘導するか解析した。その結果、CMV の感染により、DNA methylation の上昇と histone modification の変化がゲノムレベルで生じることが示された。また CMV 2b 形質転換体においても同様の反応が観察された。また tiling array を用いた解析により、2b による epigenetic modification の変化は特に CMV の抵抗性に関わる遺伝子の発現を抑制することが示された。つまり、CMV の感染によって生じた、ゲノムレベルでの epigenetic modification の変化は CMV が自身の複製に適した条件を作り出すために誘導したと考えられる。

### (3) Arabidopsis における、CMV 2b による開花促進

植物において、乾燥などの環境ストレスは春化处理と同様に開花を促進することが明らかとなっている。本研究では CMV の感染が与える開花への影響に着目し研究を行った。その結果、CMV の感染は開花を促進し、その反応は 2b 依存的なものであった。また 2b が存在することで開花を抑制する *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) の発現量の低下とその遺伝子領域内での histone modification の変化が生じることが確認された。つまり、CMV は 2b による *FLC* ORF 領域内の histone modification の変化を介して、*FLC* の発現を抑制することにより開花を促進すると考えられる。

### (4) CMV 2b と宿主の Catalase とのタンパク質レベルでの結合によるえそ病徴の誘導

現在までにウイルスのタンパク質と結合する様々な宿主因子が同定されている。本研究では、Arabidopsis において CMV-HL の感染により生じるえそ病徴は、CMV 2b が Arabidopsis の Catalase 3 (*CAT3*) との結合により、 $H_2O_2$  分解の key enzyme である *CAT3* の機能を阻害し、その結果として  $H_2O_2$  が蓄積して生じることを明らかにした。つまり 2b と *CAT3* の結合はウイルスによる病徴誘導機構として考えられる。

よって審査員一同は、稲場純一氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。