

論文内容の要旨

論文題目 ジャガイモ X ウイルスの病徴決定因子に関する研究

氏名 鍵和田 聡

植物ウイルスは、感染した植物にモザイク、黄化、壊死、奇形、萎縮、枯死など様々な病徴を伴う病気を引き起こし、農業生産上深刻な被害をもたらす。こうした病徴は「宿主植物－ウイルス」の組み合わせにより多種多様であり、宿主植物の品種やウイルスの系統によって決まる例も多い。病徴の発現は、ウイルスの増殖に伴う宿主細胞の代謝活動の攪乱や、それに対する植物の抵抗性反応など、ウイルスと植物のせめぎ合いの結果生じるものであると考えられるが、その詳細なメカニズムについてはほとんどわかっていない。

ジャガイモ X ウイルス (*Potato virus X*; PVX) は、ポテックスウイルス属のタイプ種であり、ジャガイモをはじめとするナス科植物を中心に広い宿主範囲を持ち、作物の収量低下など甚大な被害をもたらす。そのゲノムは全長約 6.4 kb のプラス一本鎖 RNA からなる。PVX ゲノムにコードされる遺伝子の機能には不明な点も多く、特に病徴型決定因子に関する知見は極めて乏しい。本研究では、日本各地より蒐集した PVX の系統より病徴型の異なる系統を見出し、その詳細な分子遺伝学的解析に基づきその病徴決定因子を明らかにすることを目的とする。

1. PVX 各系統の病原型とゲノム解析

日本各地より蒐集した PVX の 5 系統 (OS, BH, BS, OG, TO) を種々の検定植物に対して接種したところ、系統により多様な病徴が現れた。とくにタバコ (*SamsunNN*) において、「輪状斑 (OS)」、「モザイク (BH)」、「無病徴 (BS, OG, TO)」に分類される 3 種の異なる特徴的な病徴型が観察された (図 1)。

これら PVX 5 系統のゲノムの全塩基配列を決定する目的で、それぞれの感染罹病葉よりウイルス粒子を精製し、ゲノム RNA を抽出したのち、RT-PCR によりゲノム cDNA を合成した。この PCR 産物をクローニングし、ショットガンシーケンシング法により全塩基配列を決定した。そ

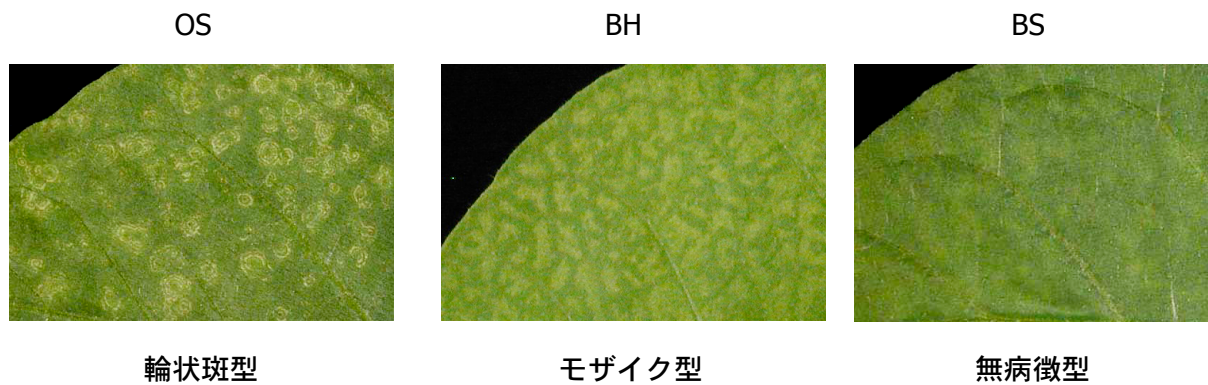


図1 PVX-OS, -BH, -BS のタバコにおける病徴。

の結果、我が国の PVX はゲノムサイズがすべて同じで、欧州系統と一致し (6435 塩基)、南米系統 (6432 塩基) とは異なった。5 系統ともゲノムは5つの ORF から構成され (図2)、5'端から順に、複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp)、細胞間移行タンパク質 (triple gene block proteins; TGBp1-3)、外被タンパク質 (coat protein; CP) がコードされ、各タンパク質には特徴的なモチーフがそれぞれ保存されていた。

それぞれの系統間でゲノムの塩基配列を比較したところ、我が国の PVX の5系統の間では 95-99%、欧州系統とは 95-96%と高い相同性であったのに対し、南米系統とは 77-78%と相同性は低かった。さらに、多数の PVX 系統 (30 系統) について、

解読されている CP 遺伝子の塩基配列に基づき系統樹を作成したところ、我が国の PVX は欧州系統のクラスターに含まれた。我が国の PVX の系統学的位置付けは本研究が初めてである。また、今回解析した PVX 5 系統はタバコにおいて多様な病徴型を示すにも関わらず、互いに極めて近縁であることが明らかになった。

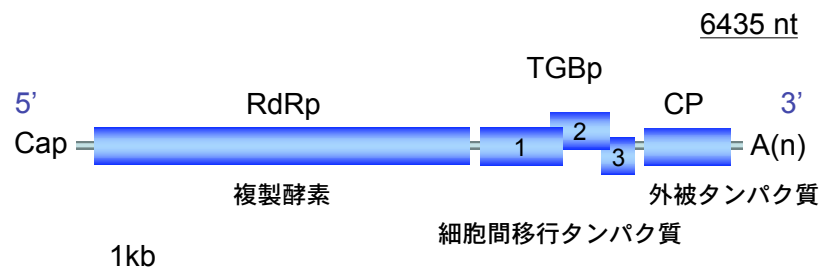


図2 PVX のゲノム構造。

2. 病徴発現に関わる因子の解析

PVX 5 系統のうち、タバコ (SamsunNN) において壊死性の輪状斑を生ずる OS (輪状斑型) と、無病徴で全身感染する BS (無病徴型) の全ゲノム配列の相同性は 97%と極めて高かった。そこで、これらの病徴の違いに関わるウイルスゲノムの領域についてまず解析した。

両系統のウイルスゲノムの全長 cDNA クローンをそれぞれ 35S プロモーター下流に連結し、感染性 cDNA クローン pSP-OS および pSP-BS を構築した。PVX の増殖用宿主である *Nicotiana benthamiana* に接種したところ、両系統共に感染し、それらの感染葉を接種源にタバコ (SamsunNN) に接種したところそれぞれ原病徴を再現した。そこでこれらの感染性 cDNA クローンを用いて、両ウイルスの病徴型決定領域を解析する目的で、キメラウイルスの構築、および部位特異的変異導入による変異株の作製を行い、その接種試験によってそれぞれの病徴型を確認

した。その結果、RdRp の 1422 番目のアミノ酸 (RdRp₁₄₂₂) がアスパラギン酸の場合に「輪状斑型」を示し、グルタミン酸の場合に「無病徴型」となることが明らかになった (図3)。

感染組織内におけるウイルス量と病徴型との関係を調べる目的で OS、BS 2 系統の植物体内における複製量の比較を行った。まず、タバコの接種葉の直上葉におけるウイルス蓄積量をウエスタンおよびノーザンブロット解析により比較したところ、OS 感染植物で「輪状斑型」の病徴が現れる接種 10 および 14 日目では系統間に差は認められなかった。このことから、病徴発現の有無はウイルスの蓄積量の違いが原因ではないと考えられた。

また、タバコ葉における病徴とウイルス分布との関係を調べる目的で immuno-tissue blot による比較解析を行った。その結果、「輪状斑型」病徴を発現する OS 感染植物と「無病徴型」の BS 感染植物はともに、接種直上葉において、接種葉から茎維管束を経て移行してきたウイルスが葉脈を経て葉肉細胞に入り拡散してゆくという一致したウイルス分布パターンを示した。また、両系統のウイルス感染領域の面積比較においても OS と BS には差がなかった。この解析から、OS 感染による輪状斑の病徴の発現領域とウイルス蓄積領域を比較すると、病徴はウイルスの蓄積に 2 日程度遅れて生じることも明らかとなった。

キメラウイルスおよび部位特異的変異導入株の接種試験の結果により、RdRp₁₄₂₂ が病徴型決定因子であることが示されたことから、病徴決定にはウイルスの複製効率が関与しているのではないかと考え、1 細胞レベルにおける OS と BS のゲノム RNA の複製量を比較した。それぞれの PVX の RNA ゲノムをタバコ BY2 の培養細胞から単離したプロトプラストにエレクトロポレーションにより導入した。接種 9-18 時間後にプロトプラストから RNA を抽出しウイルスゲノム RNA についてノーザンブロット解析を行ったところ、有意な差は認められず、両系統のゲノム RNA 複製効率は同程度であると考えられた。

以上の結果から、壊死を伴う輪状斑の形成には RdRp₁₄₂₂ が関与することが明らかになったが、これはウイルスの複製や移行といったウイルス自身の性質の差によるものではなく、ウイルスと宿主との相互作用が要因であることが推測され、そこにウイルス複製酵素のアミノ酸置換が関与することが示唆された。

そこでこれに加え、タバコに「モザイク型」病徴を引き起こす BH 系統を用いて感染性 cDNA クローン (pSP-BH) を構築し、病原性の解析を行った。「無病徴型」感染する BS との間で種々のキメラウイルスを構築し、病徴決定因子の解析を行った結果、やはり RdRp₁₄₂₂ のアミノ酸がアスパラギン酸のときに「モザイク型」となり、グルタミン酸では「無病徴型」であった (図3)。以上の結果から、RdRp₁₄₂₂ のアミノ酸は、アスパラギン酸の場合「輪状斑型」あるいは「モザイク型」の病徴を発現する「病徴発現因子」であり、グルタミン酸の場合「病徴隠蔽因子」であることが分かった。

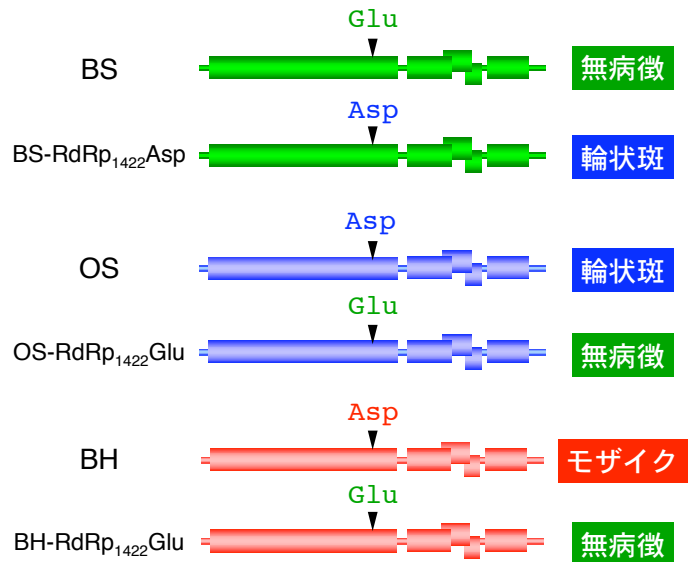


図3 PVX の病徴発現に関与する因子。RdRp₁₄₂₂ が Asp の場合に病徴発現型となり、Glu の場合に無病徴型となる。

3. 病徴型の決定に関わる因子の解析

次に、「モザイク型」および「輪状斑型」の両病徴型を決定する領域を解析する目的で、pSP-OS と pSP-BH を用いてキメラウイルスおよび部位特異的変異導入株を構築して接種試験を行った。その結果、ゲノムの 5'非翻訳領域 (5'UTR) の 58 番目の塩基 (5'UTR₅₈) が「A」の場合には「輪状斑型」、「G」の場合には「モザイク型」となることが明らかになった(図 4)。

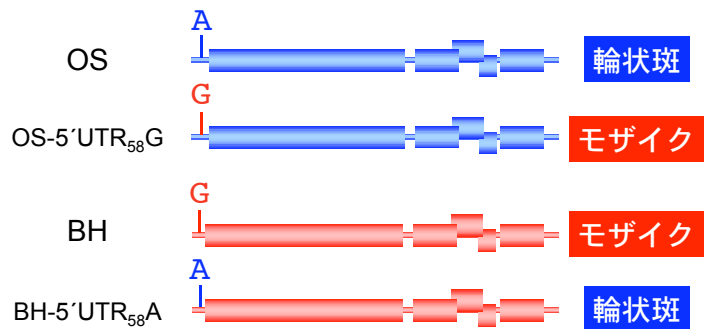


図4 PVX の病徴型に関与する因子。5'UTR₅₈ が A の場合に輪状斑型となり G の場合にモザイク型となる。

病徴型とウイルス蓄積量との関係を調べるため、OS および BH の病徴の出ている接種直上葉についてウエスタンおよびノーザンブロット解析による比較を行ったところ、接種後 10, 14 日目において差がないことが分かった。このことから、病徴型の決定もウイルス蓄積量によるものではないと考えられた。次いで、pSP-OS および pSP-BH をもとに 5'UTR₅₈ を自然界の PVX には見出されていない U および C に替える部位特異的変異導入株を構築した。その結果、5'UTR₅₈ の U 変異株はともに「輪状モザイク型」の病徴を示したことから、5'UTR₅₈ が病徴型決定因子であることが強く示唆された。しかし、5'UTR₅₈ の C 変異株は *N. benthamiana* では後代ウイルスに全く変異は認められないにもかかわらず、タバコ (SamsunNN) に接種すると、5'UTR₅₈ が必ず A に復帰変異することから、ウイルスの増殖過程において宿主依存的な強い淘汰圧が働いているものと推定された。

一方、pSP-OS, pSP-BH および pSP-BH について RdRp₁₄₂₂ をアスパラギン酸やグルタミン酸から、自然界の PVX にはないアラニンに置換した変異株は、「輪状モザイク型」の病徴を示した。このことから、RdRp₁₄₂₂ のアミノ酸を含む領域は 5'UTR₅₈ を含む病徴型を決定する領域に深く関与することが示唆された。

結論

本研究では、病徴型の異なる PVX を用いて、タバコ (SamsunNN) における病徴決定因子に関する解析を行った。その結果、病徴型は 5'UTR₅₈ の 1 塩基により決定され、病徴の発現と隠蔽には RdRp₁₄₂₂ の 1 アミノ酸が関与していることが明らかになった。病徴型の異なる OS, BH, BS においてウイルスの蓄積量には差が認められなかったことから、病徴の発現には 5'UTR₅₈ と RdRp₁₄₂₂ に加え、宿主との相互作用が深く関わっていることが示唆された。以上を要するに、本研究では、「タバコ-PVX」の組合せにより、病原体が宿主植物において発現する病原性を解析するための実験系を構築した。さらに、ゲノム上のごくわずかな配列の変化により、植物ウイルスの病原性は宿主植物において多様性を示すことを明らかにし、「宿主-病原体」のせめぎ合いの相互作用を理解する上で重要な基盤的知見を得ることができた。