

論文内容の要旨

論文題目

Plantago asiatica mosaic virus の病原性決定因子に関する研究

氏 名 高橋 修一郎

植物ウイルスは宿主植物に感染すると、葉にモザイク、斑点、奇形などの特徴的な病徴を生ずるだけでなく、時には植物体全体の萎縮や枯死を引き起こし、農業上甚大な被害をもたらす。しかし、植物ウイルスの病徴発現のメカニズムには不明な点が多く、それを分子レベルで解明することは、ウイルス-植物の複雑な相互作用の一端を明らかにするのみならず、植物ウイルスの有効な防除法の開発にも大きく寄与すると考えられる。

植物ウイルスの多くは一本鎖 RNA をゲノムとしており、自らがコードする複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) を用いて複製する。RdRp は修復機構を持たないため、植物ウイルスは単一の感染植物体内において、病原性等の性質が異なる変異株の集合として存在しているものと考えられる。本研究ではまず、ウイルスが感染したユリ一個体より分離されたウイルス 6 分離株 (Li1~Li6 分離株) がユリ以外の種々の植物において多様な病原性を示すことを見出した。さらに、これらのウイルス分離株のゲノム RNA の全塩基配列の決定を行ったところ、すべて我が国で未記載の *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) であることを明らかにした。次いで、植物ウイルスの引き起こす病徴のうち最も激しいものである植物組織の壊死および植物体の枯死のメカニズムを明らかにすることを目的に、これらの分離株を用いた遺伝子操作系を構築し病徴決定因子を同定するとともに、感染植物体内における蓄積や移行、ならびに植物体の防御応答の解析を行った。

1. ウイルス分離株のゲノム配列の決定

Li1~6 分離株について、感染葉から精製したウイルス試料をもとに、抽出したゲノム RNA から cDNA を合成しクローニングした。ショットガンシーケンス法により各ゲノム cDNA の全塩基配列を決定した結果、これらのウイルス分離株のゲノム全長はいずれも poly (A) を除いて 6102 塩基であった。ゲノムの 5' 末端から RdRp、3 つの移行タンパク質 (triple gene block protein; TGBp)、外被タンパク質 (coat protein; CP) をコードしており、*Potexvirus* 属ウイルスに特徴的なゲノム構造を持っていた (図 1)。

Li1~6 分離株間の全塩基配列の相同性は 99.5% 以上と非常に高く、よって、これらの分離株は同一種に属すると考えられた。これらの配列を既知の *Potexvirus* 属ウイルスの配列と比較したところ、ロシアにおいて発生が報告されている PIAMV と最も相同性が高く、全塩基配列で 78% の相同性を示したことから、PIAMV と同定された。我が国における PIAMV の発生の確認はこれが初めてである。



図 1. PIAMV のゲノム構造

2. キメラコンストラクトを用いた病徴決定領域の特定

Li1~6 分離株はゲノム配列の相同性が互いに非常に高いにも関わらず、多様な病原性を示した。*Nicotiana benthamiana* において Li1 分離株は接種 5 日後に接種葉に壊死斑を呈し、接種 14 日後に植物体は枯死した (枯死型)。一方、Li6 分離株は接種葉で無病徴であり、上葉において軽微なモザイクを呈した (モザイク型)。そこで、これらの病徴を決定するウイルスゲノム領域を詳細に解析するために、まず Li1、Li6 分離株の感染性 cDNA クローン pLi1、pLi6 をそれぞれ構築した。この pLi1、pLi6 を agroinfiltration 法により *N. benthamiana* に接種したところ、pLi1 を接種した植物体においては接種 5 日後に接種領域が壊死し、14 日後には植物体が枯死した。一方、pLi6 を接種した植物体においては、接種領域は無病徴であり後に全身が軽微なモザイクを呈したことから、これらの感染性 cDNA クローンが原病徴を再現することが確認された (図 2)。

そこで、これらの感染性 cDNA クローンをもとに種々のキメラコンストラクトを構築し、

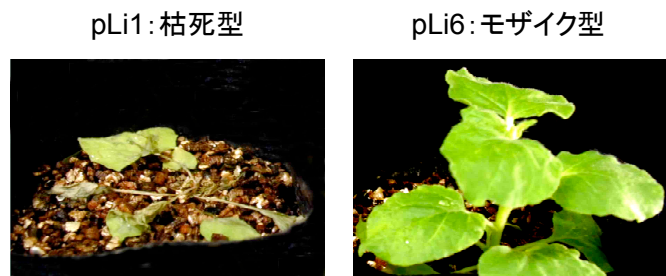


図 2. pLi1、pLi6 の *N. benthamiana* における病徴

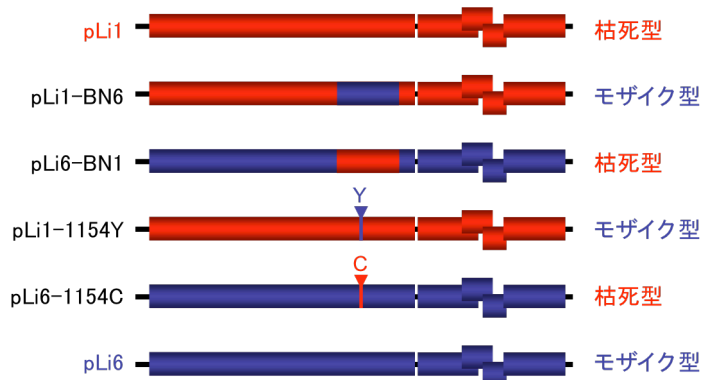


図 3. 各種変異株のコンストラクトと病徴型

N. benthamiana における病徴の解析を行ったところ、ゲノムの nt. 3213~4107 の領域が「枯死型」の病徴を決定していることが判明した。pLi1、pLi6 のゲノム配列の比較から、この領域には2カ所のアミノ酸相違が存在したため、さらに部位特異的変異導入による病徴の解析を行ったところ、RdRp の 1154 番目のアミノ酸がシステインである場合には「枯死型」の病徴を示したのに対して、チロシンである場合には「モザイク型」の病徴を示した (図 3)。このことから、RdRp の 1154 番目のアミノ酸が病徴型を決定していることが明らかとなった。

3. 病徴型とウイルス蓄積量の関係

病徴型の異なるウイルスの感染組織内における蓄積量を比較解析する目的で、「枯死型」の pLi1、pLi6-1154C および「モザイク型」の pLi6、pLi1-1154Y を agroinfiltration 法により接種し、接種領域におけるウイルスのゲノム RNA および CP の蓄積をそれぞれノーザンブロット法およびウェスタンブロット法により解析した。その結果、pLi1 においては pLi6 に対して約 50 倍のウイルスゲノム RNA の蓄積が見られたのに対して、pLi1-1154Y、pLi6-1154C においては pLi6 に対して約 20 倍の蓄積を示した (図 4)。同様の結果が、CP の蓄積量についても確認された。従って、RdRp の 1154 番目のアミノ酸の変異により病徴型だけでなくウイルス RNA および CP の蓄積量も変化するが、病徴型と蓄積量は相関しないことが示された。

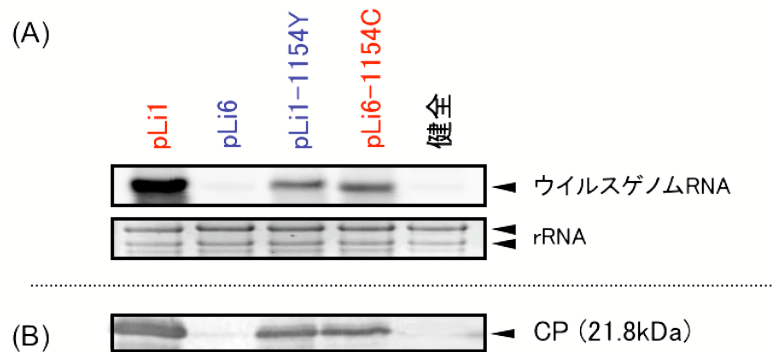


図 4. 接種 4 日後における(A)ノーザンブロット解析、(B)ウェスタンブロット解析。

4. 病徴型とウイルス長距離移行の関係

ウイルスの病徴型と長距離移行の関係を調べる目的で、pLi1、pLi1-1154Y、pLi6-1154C、pLi6 の上葉への長距離移行を RT-PCR 法および immuno-tissue blot 法により日を追って比較した。その結果、いずれのウイルスも接種 5 日後に接種葉においては検出されたが上葉においては検出されず、長距離移行は認められなかった。一方、接種 7 日後には、いずれのウイルスも接種葉および上葉の双方において検出され、ウイルスの長距離移行が認められた (図 5)。このことから、病徴型と長距離移行の間に関連は認められなかった。

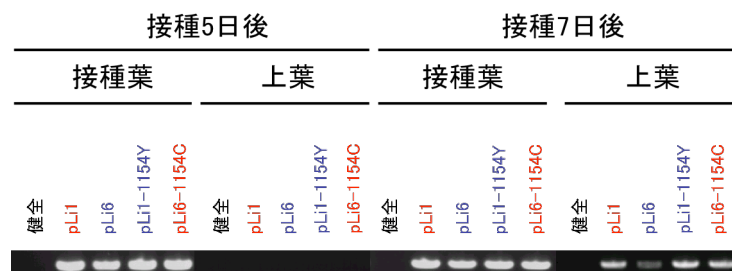


図 5. 各種変異体の長距離移行の比較

5. 病徴型と PCD 誘導能の関係

接種葉に壊死病斑を生じる例として、プログラム細胞死(programmed cell death; PCD) の誘導による防御応答反応である過敏反応 (hypersensitive response; HR) が知られている。そこで、「枯死型」の病徴を示す pLi1、pLi6-1154C の接種により観察される接種領域の壊死斑と PCD 誘導との関係を解析した。pLi1、pLi1-1154Y、pLi6-1154C、pLi6 を接種した *N. benthamiana* 葉を用いて、PCD の指標とされている活性酸素種の検出を DAB 染色により行ったところ、枯死型の病徴を示す pLi1、pLi6-1154C の接種領域においてのみ活性酸素種の発生が認められ、これらの壊死が PCD によるものであることが示唆された (図 6)。このことから、pLi1、pLi6-1154C による接種領域の壊死、および連続的に引き起こされる植物体の枯死に植物が誘導する防御応答反応が関与していることが示唆された。

結論

本研究では、ウイルスに感染したユリ一個体から単離された複数のウイルス分離株が、そのゲノム配列において非常に高い相同性を示すにも関わらず、種々の植物において多様な病原性を示すことを明らかにした。次いで、これらの分離株を用いることで局部的壊死および植物体全体の枯死を決定するウイルスゲノム上の領域を解析し、RdRp の 1154 番目の 1 アミノ酸がこれらの病徴型を決定していることを明らかにした。これらの病徴と感染組織における蓄積量や上葉への移行には関連は認められなかったが、「枯死型」の病徴を示すウイルスの接種領域においては活性酸素種が検出され、植物の防御応答である PCD の誘導が示唆された。以上の結果から、植物体の枯死につながる局部壊死が植物の防御応答と関連しており、この防御応答の誘導の有無が RdRp の 1 アミノ酸により決定されていることが示唆された。本研究は、一個体内に共存するウイルス配列の多様性により植物における防御応答誘導能が大きく異なることを示唆した点において、植物とウイルスの研究に新規な視点を与えるものであり、植物の防御応答反応を利用した耐病性植物の開発に有用な示唆を与えるものと考えられる。

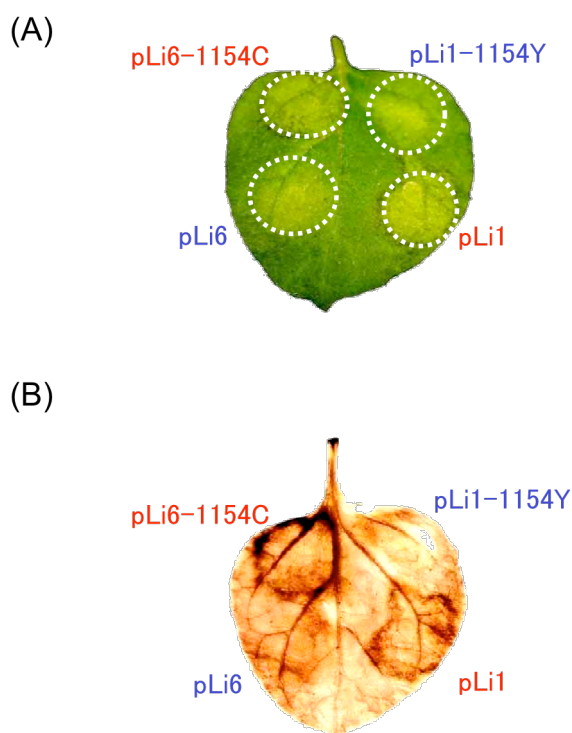


図 6. 接種 4 日後の接種領域における DAB 染色
(A) 染色前、(B) 染色後