

## 論文内容の要旨

論文題目 植物ウイルス感染による全身壊死の分子機構に関する研究

氏名 小松 健

植物とウイルスの間では、感染というイベントを巡り様々な相互作用が繰り広げられる。一般に、植物がウイルスの攻撃を受け感染しウイルスが病原性を示す場合、植物はウイルスに対して「感受性」であり、逆に植物にウイルスが感染できない場合、その植物はウイルスに対して「抵抗性」であるとして区別されてきた。ウイルスは「感受性」の植物に対し奇形、黄化、モザイクや枯死などの病徴を引き起こし作物に深刻な収量低下をもたらす。しかし、これまでは、農業生産上の重要性から、植物がウイルスに「抵抗性」を示す機構については多くの研究が行われてきたが、「感受性」の植物に病徴が引き起こされる機構はほとんど研究されてこなかった。

こうした「抵抗性」のうち最も研究が進んでいるのは、植物の持つ抵抗性 (R) タンパク質に依存した過敏感反応 (hypersensitive response; HR) による抵抗性機構である。HR によりウイルスの初期感染細胞には局所的な壊死が誘導され、これによりウイルスは局所的に封じ込められ全身感染しない。一方、ウイルスが「感受性」の植物に全身感染して示す特徴的な病徴である「全身壊死」は、植物への被害の大きさにも関わらずその機構はほとんど明らかではない。本研究では、日本でも花などに大きな被害を及

ぼしている植物ウイルスであるオオバコモザイクウイルス (*Plantago asiatica mosaic virus*; PIAMV) に着目し (図 1)、本ウイルスの感染により *Nicotiana benthamiana* に引き起こされる全身壊死について、ウイルス側と植物側の双方からその分子機構の解析を行った。

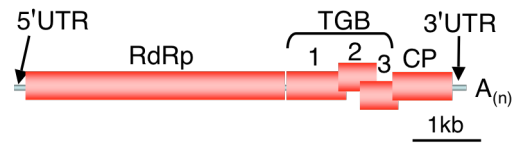


図 1 PIAMV のゲノム構造

1. PIAMV 感染による全身壊死は HR と同じ反応である

PIAMV 感染による全身壊死を簡便かつ再現性よく解析するため、ユリより分離された PIAMV 分離株

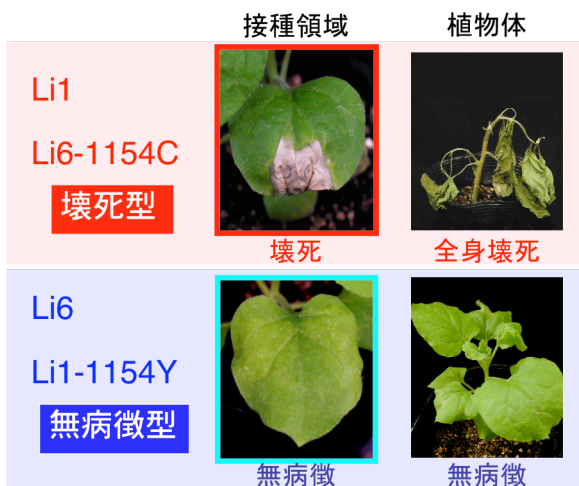


図 2 *N. benthamiana* の接種領域および植物体における PIAMV 分離株の病徴

株に由来する 4 つのウイルスである Li1 (*N. benthamiana* の植物体に全身壊死を引き起こす)、Li1-1154Y (無病徴)、Li6 (無病徴)、Li6-1154C (全身壊死) について、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の展開葉に接種し、接種領域における病徴を比較した。Li1 と Li6-1154C (「壊死型」) は接種 10 日後には接種領域全体が一様に壊死したのに対し、Li6 と Li1-1154Y (「無病徴型」) の接種領域では 2 週間以上経過しても壊死は観察されなかった (図 2)。

この PIAMV の接種領域を、核 DNA の断片化を検出する TUNEL 法によって解析したところ、無病徴型の Li6 では緑色の蛍光は検出されなかったが、壊死型の Li6-1154C では緑色の蛍光が検出

され、プログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) の特徴である核 DNA の断片化が確認された (図 3)。また、細胞壊死を検出するトリパンブルー染色を行ったところ、壊死型の Li1 と Li6-1154C の接種領域は一様に青色に染色され細胞壊死が認められたが、無病徴型の Li1-1154Y と Li6 の接種領域は染色されなかった。次に、HR における壊死に伴い生じるとされる  $H_2O_2$  を DAB 染色により検出したところ、壊死型の PIAMV の接種領域は一様に茶褐色に染色され  $H_2O_2$  の生成が確認されたが、無病徴型の PIAMV の接種領域は染色されなかった。また、HR において蓄積することが知られているカロースをアニリンブルー染色により検出した結果、壊死型の PIAMV の接種領域は紫外光下で一様に白色の発光を呈しカロースの蓄積が認められたが、無病徴型の PIAMV では発光は認められなかった。また、細胞の崩壊に伴って認められるイオンリークの量は、壊死型の PIAMV の接種領域において増大していた。さらに、HR において発現が誘導されると報告されている防御関連遺伝子 (*PR-1a*, *hsr203j*, *HINI*) の mRNA 量をノーザンブロット解析により調べた結果、壊死型の PIAMV の感染組織においては、非感染植物ならびに無病徴型の PIAMV 感染組織に比べて 3 種の防御関連遺伝子の発現が誘導されていることがわかった (図 4)。

以上より、壊死型の PIAMV の感染による *N. benthamiana* の全身壊死は、PCD であり、核 DNA の断片化、 $H_2O_2$  の生成、カロースの蓄積、防御関連遺伝子の発現などが認められたことから、抵抗性の植物に典型的に認められる HR によるものであることが示された。

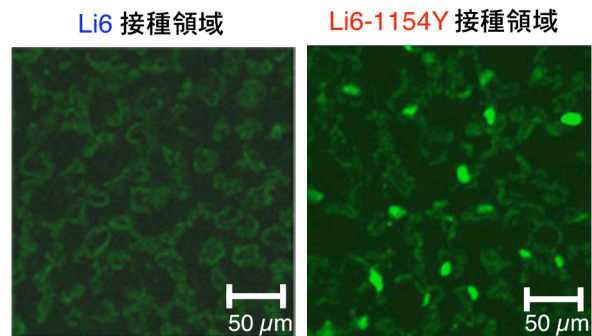


図 3 TUNEL 法による核 DNA 断片化の検出。以降、壊死型の PIAMV を赤字で、無病徴型を青字で示す。

以上より、壊死型の PIAMV の感染による *N. benthamiana* の全身壊死は、PCD であり、核 DNA の断片化、 $H_2O_2$  の生成、カロースの蓄積、防御関連遺伝子の発現などが認められたことから、抵抗性の植物に典型的に認められる HR によるものであることが示された。

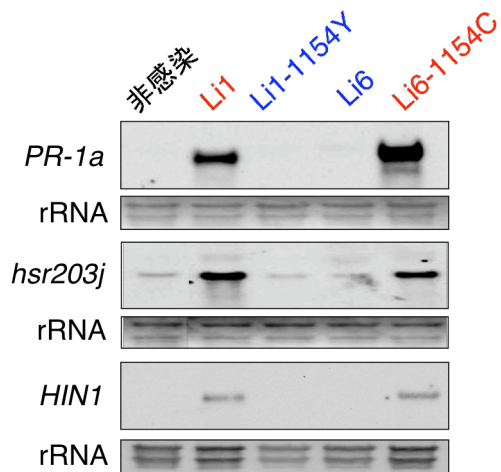


図4 防御関連遺伝子の発現解析

## 2. PIAMV 感染による全身壊死誘導メカニズムの解析

次にPIAMV感染による全身壊死誘導メカニズムの解析を行うため、抵抗性植物におけるHR誘導に重要な因子であるSGT1と

RAR1の、TRV (*Tobacco rattle virus*) ベクターを利用したVIGS (virus-induced gene silencing) 法によるノックダウンを試みた。SGT1およびRAR1の部分配列を含むTRVを接種3週間後に両因子のmRNAが減少していることを確認した。そこに壊死型のLi1を接種したところ、接種6日後に、両因子のノックダウン植物では、Li1による接種領域の壊死が抑制され、また接種領域における $H_2O_2$ の生成も認められなかった(図5A)。一方、いずれの遺伝子をノックダウンした植物においても、無病徴型のLi1-1154Yの接種領域には壊死および $H_2O_2$ の生成は認められなかった。またSGT1、RAR1のノックダウンにより壊死が抑制されたLi1接種領域においては、壊死が認められたコントロールの植物におけるLi1接種領域に比べてイオンリーク量が顕著に少なかった。

次に、壊死が顕著になる前の接種領域における両ウイルスの蓄積量をノーザンブロット解析により調べた結果、SGT1、RAR1のノックダウン植物では、接種4日後において、コントロールの植物に比較してLi1の蓄積量は増加したが、Li1-1154Yの蓄積量はコントロールと同程度であった(図5B)。

以上の結果から、PIAMVによる壊死には、SGT1、RAR1の関与する既知のHR誘導カスケードが関与していることが示された。

## 3. PIAMVにおける壊死のエリシターの解析

HRはウイルスがコードする特定のタンパク質(エリシター)と宿主のRタンパク質の相互作用により誘導される。PIAMVが*N. benthamiana*に引き起こす全身壊死がHRであり、また既知のHR誘導カスケードが関与することが示されたことから、次にPIAMVにおける壊死のエリシターについて解析した。

壊死型のLi1をもとに細胞間移行タンパク質(triple gene block proteins; TGBp1-3)および外被タンパク質(coat protein; CP)遺伝子を発現しない変異ウイルスを構築しその壊死誘導能を解析した結果、これら変異ウイルスの接種領域では壊死が観察されなかった。しかし、一過的なタンパク質の発現量を上昇させるp19タンパク質を共発現させると、これら変異ウイルスは全て接種6日後までに壊死を誘導した。一方、p19のみの発現、および無病徴型のLi1-1154Yとp19との共発現では壊死は観察されなかった。

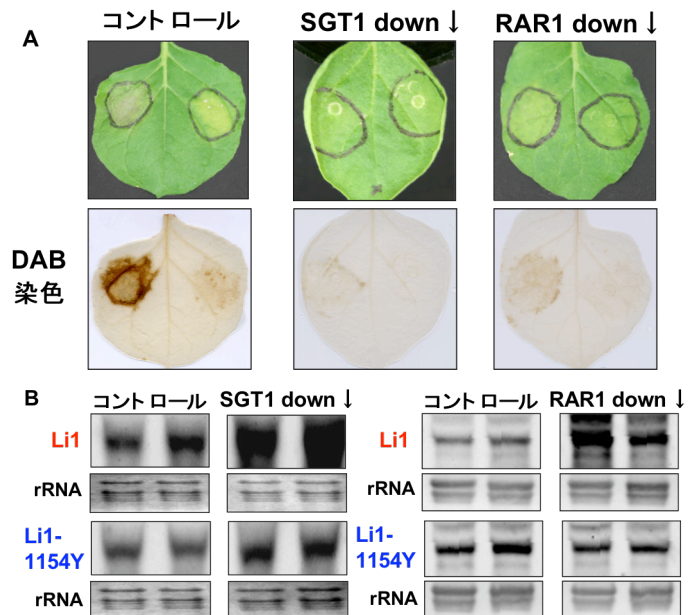





図5 SGT1、RAR1のノックダウン解析

(A)壊死誘導・ $H_2O_2$ 生成の観察。左半分はLi1(壊死型)を、右半分はLi1-1154Y(無病徴型)を接種した。

(B)PIAMVのウイルス蓄積量の解析

		複製	RdRp 発現	壊死 誘導
53U-RdRp1		+	+	+
5U-RdRp1		-	+	+
53U-RdRp1-fs		-	-	-

▶: 35S promoter    ■: nos terminator

表 1 各種変異ウイルスの複製、RdRp 発現と壊死誘導能

さらにフレームシフトによって RdRp が発現しない 53U-RdRp1-fs を構築し p19 と共発現させたところ壊死は認められず、また本研究で作出した RdRp 抗体によるウェスタンブロット解析でも RdRp は検出できなかった (表 1)。このことから、PIAMV の RdRp のタンパク質が壊死のエリシターであり、PIAMV 感染による壊死を誘導していることが示唆された。

## 結論

本研究では、PIAMV の感染により「感受性」の植物に引き起こされる全身壊死が、PCD を伴い  $H_2O_2$  の生成や防御関連遺伝子の発現誘導などが認められたことから、従来ウイルスに対して「抵抗性」の植物に典型的に認められる HR によるものであることを明らかにした。さらに、SGT1 と RAR1 の関与する既知の HR 誘導カスケードが、全身壊死の誘導にも関与していることを初めて明らかにした。また、PIAMV の RdRp が *N. benthamiana* に壊死を誘導するエリシターとして働いていることが示された。

以上を要するに、本研究によって、ウイルスに「感受性」の植物において認められる病徴である「全身壊死」が、ウイルスに「抵抗性」の植物に典型的に認められる HR によるものであることを明らかにし、「全身壊死」の誘導機構に関する基盤的知見が得られた。今後、この知見をもとに本メカニズムの全容が明らかになることが期待される。

次に、TGBp1-3 と CP をコードせず、5'末端非翻訳領域 (5'UTR) と RdRp コード領域、および 3'末端非翻訳領域 (3'UTR) のみを持つ変異ウイルス (53U-RdRp1) を構築したところ、その接種領域では明瞭な壊死が認められた。そこで 3'UTR を欠き複製が起こらないと考えられる 5U-RdRp1 を構築し接種したところ、この変異ウイルスは p19 と共発現させた場合にのみ壊死を示した。この 5U-RdRp1 の接種領域からは mRNA の相補鎖は検出されず複製が起きていないと考えられたが、p19 を共発現した場合の RdRp の蓄積量は 53U-RdRp1 と同程度であった。