

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 18 年度博士課程 進学
氏 名 尾関 丈二
指導教員名 難波 成任

論文題目 ウイルス感染による植物の全身壊死誘導機構に関する解析

植物と植物ウイルスの間では感染過程において様々な相互作用が繰り広げられる。一般にウイルスに対して植物は「感受性」または「抵抗性」を示す。植物においてウイルスによる全身感染が成立する場合を「感受性」と呼ぶ。「感受性」植物においてはウイルス感染により、奇形、モザイク、全身壊死など様々な病徴が引き起こされ作物生産に深刻な被害を与える。これら病徴の誘導機構は植物とウイルスの複雑なせめぎあいの結果と考えられているものの、ほとんど解明されていない。一方、ウイルスが植物に感染できない場合を「抵抗性」と呼ぶ。「抵抗性」植物における防御機構は、農業生産および作物育種の重要性から多くの研究が行われている。

植物が示す「抵抗性」のなかで最も解析が進んでいるのは、「過敏感反応 (hypersensitive response; HR)」である。HR はウイルスが非病原性遺伝子を持ち、植物が対応する抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) を持つ場合に誘導される。HR が誘導されると、 H_2O_2 の生成、カロースの沈着、イオンリーク量の増大、防御関連遺伝子の発現誘導とともに、プログラム細胞死 (programmed cell death; PCD) が誘導される。HR は "the rapid death of plant cells in association with the restriction of pathogen growth" と定義され、HR 誘導時には PCD と共に病原体の増殖を抑制する「抵抗性反応 (resistance

response; RR)」が誘導されると考えられているが、絶対寄生性病原体であるウイルスに対する HR においては PCD によりウイルスが初期感染細胞に封じ込められるため、PCD が RR の役割も担っていると考えられている。しかし、一部の R 遺伝子依存的抵抗性反応においては PCD を伴わない迅速な抵抗性が誘導されることが報告されており、ウイルスに対する HR における PCD と RR の役割ならびにそれらの経路はいまだ明らかではない。

「全身壊死」は、ウイルス感染による病徴のなかでも農作物に最も深刻な被害を与える病徴であるがその誘導機構は不明である。本研究では、ユリなどに感染し深刻な被害を与えているオオバコモザイクウイルス (plantago asiatica mosaic virus; PIAMV) が *Nicotiana benthamiana* に感染して引き起こす「全身壊死」を解析し、その誘導機構を詳細に解析した。

1. PIAMV 感染による全身壊死を決定するウイルス因子の解析

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 PIAMV-Li 分離株 (Li1、Li6 分離株) より感染性 cDNA クローンを構築し、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* に接種した。すると、Li1 接種植物においては 5 日後に接種領域が壊死し 14 日後には全身壊死した。一方、Li6 接種植物は全身感染したものの無病徴であった。両クローンのカメラコンストラクトを構築し、次いで点変異導入を行うことで、PIAMV 感染による全身壊死決定因子を探索した。その結果、PIAMV の複製酵素 (RdRp) の 1154 番目のアミノ酸 (aa. 1154) が病徴決定因子であることを明らかにした。RdRp の aa. 1154 は Li1 ではシステイン (C)、Li6 ではチロシン (Y) であり、この部位のアミノ酸を C (Li1) → Y (Li1-1154Y) とすると接種植物における病徴は無病徴になり、Y (Li6) → C (Li6-1154C) とすると全身壊死を引き起こした。以後、Li1 および Li6-1154C は全身壊死を誘導することから「壊死型」PIAMV、Li6 および Li1-1154Y は無病徴であることから「無病徴型」PIAMV とする。

つぎに病徴とウイルス蓄積量との関係について調べるため接種葉を用いてノーザンブロット解析した。*N. benthamiana* に各感染性 cDNA クローンを接種しウイルス蓄積量を比較したところ、Li1 は Li6 に比べ約 50 倍多く蓄積していたのに対し、Li1-1154Y と Li6-1154C はともに同程度であり、Li6 より約 20 倍多く蓄積していた。Li6-1154C (壊死型) と Li1-1154Y (無病徴型) のウイルス蓄積量が同程度であったことから、病徴型とウイルス蓄積量との間に明瞭な相関関係のないことが明らかとなった。

2. PIAMV 感染による全身壊死の性状解析

抵抗性植物における HR の指標として複数の解析手法が知られている。本研究では PIAMV 感染による全身壊死について調べるため、ほぼ全ての HR の指標について包括的に解析した。各感染性 cDNA クロームを接種し、トリパンプルー染色により壊死細胞を染色したところ、「壊死型」PIAMV の接種領域では青く染色されたが「無病徴型」PIAMV では染色されなかった。DAB 染色により H_2O_2 生成を褐色の染色として検出したところ、「壊死型」PIAMV の接種領域では褐色に染色されたのに対して「無病徴型」PIAMV の接種領域では染色されなかった。アニリンブルー染色によりカロース沈着を検出したところ、「壊死型」PIAMV の接種領域ではカロース沈着が確認されたが「無病徴型」PIAMV の接種領域では確認されなかった。ウイルス接種領域におけるイオンリーク量を測定したところ、「壊死型」PIAMV の接種領域では「無病徴型」PIAMV の接種領域よりもイオンリーク量が顕著に増加していた。HR において誘導される防御関連遺伝子の発現量を調べたところ、「壊死型」PIAMV の接種植物では「無病徴型」PIAMV の接種植物やコントロールに比べて発現量が上昇していた。TUNEL 法により核 DNA の断片化を調べたところ、「壊死型」PIAMV の接種領域では核 DNA の断片化が認められたのに対し「無病徴型」PIAMV の接種領域では認められなかった。以上より、PIAMV 感染による全身壊死においては、HR と同様の反応が誘導されていることが明らかとなった。

3. PIAMV 感染による全身壊死に関わる宿主因子の解析

HR に重要な因子として SGT1/RAR1 複合体などが報告されているほか、MAPKKK α および MEK2 を含む MAPK カスケードと呼ばれるリン酸化経路が防御応答シグナル伝達で主要な役割を果たすことが報告されているため、VIGS 法によりそれらの遺伝子発現をノックダウンし、これら因子が PIAMV 感染による全身壊死に関わるかどうかを調べた。その際にウイルス接種領域における壊死とウイルス蓄積量に着目することにより、それぞれ PCD と RR へのこれら因子の関与について調べた。

まずウイルス接種領域における壊死に着目した。SGT1 および RAR1 ノックダウン植物に Li1 を接種したところ、接種領域における壊死が抑制され H_2O_2 生成も認められなかった。また、MAPKKK α および MEK2 ノックダウン植物に Li1 を接種したところ、接種領域での壊死は抑制され H_2O_2 生成も認められなかった。以上のことから、SGT1/RAR1 複合体および MAPKKK α を含む MAPK カスケードは、PIAMV 感染による全身壊死において PCD の誘導に関わることが明らかとなった。

つぎにウイルス接種領域におけるウイルス蓄積量に着目し、Li1 および Li1-1154Y のウイルス蓄積量をノーザンブロット解析により調べた。Li1 蓄積量は SGT1 および

RAR1 ノックダウン植物ではコントロールに比べて増加したのに対して、MAPKKK α および MEK2 ノックダウン植物ではコントロールと同程度であった。一方、Li1-1154Y 蓄積量はどの遺伝子をノックダウンしてもコントロールと同程度であった。SGT1 および RAR1 のノックダウンにより *N. benthamiana* に全身壊死を誘導する PIAMV のウイルス蓄積量が増加したことから、全身壊死を誘導する PIAMV のウイルス蓄積は、ウイルス感染時に SGT1/RAR1 複合体を介した RR により抑制されていることが示された。一方、MAPKKK α および MEK2 のノックダウンは PIAMV のウイルス蓄積量を増加させなかったことから、MAPKKK α および MEK2 を含む MAPK カスケードが RR に関わっていないことが示された。

ジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX) は PIAMV と同じ *Potexvirus* 属ウイルスであるが、対応する *R* 遺伝子 (*Rx*) を持つ *N. benthamiana* (*Rx* 形質転換 *N. benthamiana*) において HR を誘導する。*Rx* を介した PVX に対する HR においても SGT1/RAR1 複合体、MAPK カスケードと PCD、RR の関与について調べた。*Rx* 形質転換 *N. benthamiana* に PVX-GFP を接種すると HR による壊死が誘導されウイルス蓄積は検出されなかった。SGT1 をノックダウンし PVX-GFP を接種したところ、HR による壊死が抑制され、ウイルスが蓄積した。一方、MAPKKK α をノックダウンしたところ、HR による壊死は抑制されたが、ウイルス蓄積は検出されなかった。以上のことから、PVX による HR においても、全身壊死を誘導する PIAMV と同様に、SGT1/RAR1 複合体、MAPK カスケードともに PCD の誘導に関わる一方で、SGT1/RAR1 複合体は RR に関与するが MAPKKK α を介した MAPK カスケードは RR に関わっていないことが示された。

以上を要するに、PIAMV による全身壊死の解析を通じて、ウイルスゲノムのわずかな相違により病徴が劇的に変化することを明らかにした。また、全身壊死は HR と同様の反応で誘導されるが、ウイルスが局所的に封じ込められないため HR が植物体全体で誘導されていることを明らかにした。さらに、全身壊死や HR に関与する因子の解析を通じていずれの反応においても PCD と RR がそれぞれ誘導されており、それらの誘導は一部別の経路を経由することを明らかにした。