

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 尾関 丈二

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返される。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。「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-Li 分離株 (Li1、Li6 分離株) を *Nicotiana benthamiana* に接種すると、Li1 接种植物においては 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 接种植物は全身感染したものの無病徴であった。両ウイルスの感染性ゲノム cDNA クローンのキ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。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。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

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)」であるが、PIAMV 感染による全身壊死と抵抗性植物における HR に関わりについて解析した。HR の指標として複数の解析手法が知られており、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。「壊死型」と「無病徴型」PIAMV の感染性 cDNA クローンを接種し、各種の染色や検出を行ったところ、「壊死型」PIAMV の接種領域では、トリパンプルー染色による細胞死、DAB 染色による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成、アニリンブルー染色によるカロース沈着、イオンリーク量の増大、防御関連遺伝子の発現誘導、TUNEL 法による核 DNA の断片化が検出されたが、「無病徴型」PIAMV の接種領域ではそれらはいずれも検出されなかった。以上の反応は全て HR に典型的な反応であり、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を示している。従って、ウイルスによる全身壊死という病徴が典型的な抵抗性反応である 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ることによって引き起こされることを明らかにした。

### 3. PIAMV 感染による全身壊死に関わる宿主因子の解析

ウイルスに対する HR には細胞死(PCD)が伴うが、植物の自発的な PCD によりウイルスが死細胞内に封じ込められると考えられているものの、実験的に実証されていない。本研究では HR や全身壊死に関わる植物因子を解析し、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、HR や全身壊死における細胞死(PCD)とウイルス抑制反応(RR)の位置づけについて解析した。

まずウイルス接種領域における細胞死に着目した。VIGS 法により SGT1、RAR1、MAPKKK $\alpha$  および MEK2 をノックダウンし、Li1 を接種したところ、接種領域での壊死は抑制され H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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。

一方、これらの遺伝子が PIAMV と同じ *Potexvirus* 属ウイルスであるジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX) に対する HR に関与するかについて解析した。対応する R 遺伝子 *Rx* をもつ植物体を用いて解析を行ったところ、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 $\alpha$  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。従って、全身壊死や HR に関与する経路の解析により、いずれにおいても細胞死(PCD)とウイルス抑制反応(RR)が異なる経路を経て誘導されることを明らかにした。

以上を要するに、本研究の成果はウイルスによる病徴発現と抵抗性反応が表裏一体であることを示しており、従来の抵抗性育種によるウイルス防除に警鐘を鳴らす成果であるといえる。また、ウイルスに対する HR において細胞死が果たす役割は十分に明らかにされていなかったが、本研究によりその一端が解明された。この意義は大きく、この成果を応用すれば細胞死を伴わない抵抗性反応も実現可能であると想定される。以上のように本研究の成果は、学術上また応用上きわめて価値が高い。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。