

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 27 年度博士課程進学

氏名 吉田哲也

指導教員名 山次康幸

論文題目 植物 RNA ウイルスに対する高度抵抗性の分子機構に関する研究

植物ウイルスは植物病害を引き起こす病原体の一つであり、植物ウイルスによる作物生産の損失は糸状菌に次いで大きい。植物ウイルス病が一度発生すると、昆虫、土壌、種子等を介して急速に感染域を拡大させ、特定の作物生産に甚大な被害を及ぼすことがあるため、安定的な作物生産のためには植物ウイルス病の防除が重要である。一方で、糸状菌や細菌とは異なり、ウイルスは独自の代謝系を持たず宿主因子に大きく依存して増殖することから、ウイルスのみを標的とする化学農薬の開発が困難である。このように一般的に植物ウイルスの防除は困難であるものの、抵抗性品種を利用したウイルス防除は環境負荷も小さく、高い防除効果を発揮する場合が多い。そのため、植物がもつウイルス抵抗性メカニズムを研究する意義は大きい。

植物が病原体に対して示す抵抗性のうち、抵抗性品種に最も多く利用され研究も行われている

のが真正抵抗性であり、真正抵抗性を司る抵抗性遺伝子は nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) 型タンパク質をコードする。植物ウイルスに対する抵抗性反応において、NLR 型タンパク質はウイルスに対する受容体として働き、下流にシグナルを伝達し防御応答を誘導することが明らかとなっている。一方、NLR 型遺伝子以外の抵抗性遺伝子 (non-NLR 型抵抗性遺伝子) が近年複数単離されており、真正抵抗性とは異なる性質を示すことが明らかになりつつある。non-NLR 型抵抗性遺伝子は多様な種類のタンパク質をコードしており、それぞれ異なる機能を有すると考えられているが、それらによる抵抗性メカニズムは十分に解明されていない。

これまでに、植物プラス鎖 RNA ウイルスであるポテックスウイルス属ウイルスに対する non-NLR 型抵抗性遺伝子 *jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1* (*JAX1*) がシロイヌナズナより同定されている。*JAX1* は単一のジャカリンレクチンドメインを有するタンパク質をコードしており、potato virus X (PVX) や plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) などのポテックスウイルスに広く抵抗性を発揮する。*JAX1* は細胞レベルでウイルスの増殖を抑制し、複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) 中の 1 アミノ酸置換により PVX は *JAX1* 抵抗性を打破することから、*JAX1* 抵抗性にはウイルスの RdRp が関与することが示唆されている。しかし、*JAX1* がウイルス抵抗性を発揮する分子機構の詳細は不明である。そこで本研究では、*JAX1* 抵抗性の分子機構の解明を試みた。

1. *JAX1* 抵抗性の標的となるウイルス因子の解析

まず、*JAX1* が標的とするウイルス因子の同定を試みた。ポテックスウイルスのコードするタンパク質のうち、移行タンパク質 (triple gene block protein 1, 2, 3; TGBp1, 2, 3) および外被タンパク質 (coat protein; CP) は細胞間移行に必要であることが知られている。green fluorescent protein (GFP) を発現する PIAMV 感染性クローンのこれらの遺伝子をそれぞれ欠損した変異体を作製し、*JAX1* とともに *Nicotiana benthamiana* の展開葉においてアグロインフィルトレーション法により接種し、GFP 蛍光を観察した。その結果、*JAX1* 発現区ではいずれの変異体でも GFP 蛍光が低下し、ウイルス抵抗性が引き起こされた。このことから、*JAX1* 抵抗性発現にはこれらのウイルス因子が必須でないことが示唆された。続いて、PIAMV 感染性クローンから TGBp1, 2, 3 および CP が除去され RdRp のみをコードするレプリコン PIAMV-53U-RdRp を、*JAX1* とともに *N. benthamiana* の展開葉

においてアグロインフィルトレーション法により導入した。リアルタイム PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した結果、JAX1 発現区ではウイルス蓄積量が有意に低下した。このことから、JAX1 による抵抗性は RdRp のみをコードするレプリコンに対しても発揮されることが明らかとなり、JAX1 はウイルスの複製以前の過程を阻害することが示された。

以上の結果から、JAX1 は RdRp を標的とする可能性が考えられたため、JAX1 と RdRp の相互作用を解析した。PVX および PIAMV の RdRp を JAX1 とともに *N. benthamiana* の展開葉においてアグロインフィルトレーション法により導入し、共免疫沈降法を用いて相互作用を解析した。その結果、PVX および PIAMV のいずれにおいても野生型 RdRp は JAX1 と相互作用したが、JAX1 抵抗性打破に關与するアミノ酸変異を導入した RdRp 変異体は JAX1 と相互作用しなかった。以上の結果から、JAX1 は RdRp を標的としており、RdRp の機能を阻害することで抵抗性を発揮する可能性が示唆された。

2. ポテックスウイルスに対する JAX1 抵抗性の分子機構の解析

JAX1 がポテックスウイルスの増殖を阻害するメカニズムを詳細に解析するため、まず *in vitro* におけるポテックスウイルス複製系を確立した。複数のウイルスにおいて *in vitro* 複製系が確立されている脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) 中での PVX の複製を解析した。BYL に PVX の RNA および翻訳や複製の基質を添加しインキュベートしたところ、RdRp の翻訳および PVX の新生 RNA の合成が認められ、BYL を用いた PVX の *in vitro* 複製系の確立に成功した。続いて、この系を用いて JAX1 の PVX に対する影響について解析した。野生型 PVX、PVX の RdRp のみをコードするレプリコン PVX-53U-RdRp-WT および JAX1 抵抗性を打破する変異体レプリコン PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA を JAX1 とともに BYL 中で翻訳・複製反応に供試した。その結果、JAX1 存在下において、野生型 PVX および PVX-53U-RdRp-WT の複製は顕著に阻害されたが、PVX-53U-RdRp-A1092C の複製は影響を受けなかった。また、いずれの RdRp の翻訳も阻害されなかった。以上の結果から、JAX1 は PVX の RdRp の翻訳に影響せず、複製を阻害することが明らかとなった。

続いて、超遠心処理により生体膜を除いた BYL 画分 (BYLS30) を用いて、JAX1 がウイルス複製のいずれの過程で作用しているのかを解析した。植物プラス鎖 RNA ウイルスの複製の過程を詳

細に区別すると、細胞質における RdRp の翻訳、RdRp およびウイルス RNA を含む複製複合体前駆体の形成、複製複合体前駆体の生体膜への結合、生体膜上での複製複合体の形成、複製複合体での新生 RNA 合成などに分けられる。BYLS30 においては、RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成が生じると考えられる。そこで BYLS30 に PVX-53U-RdRp-WT の RNA を添加し、一定時間ごとに JAX1 を添加後、膜画分を添加し複製活性を調べたところ、早期に JAX1 を添加するほど効率よく複製が阻害された。このことから、JAX1 は活性を有する複製複合体前駆体の形成を阻害する可能性が高いと考えられた。

そこで、PVX の複製複合体前駆体の検出および JAX1 の当該複合体への影響の解析を試みた。野生型レプリコン PVX-53U-RdRp-WT および変異体レプリコン PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA を BYLS30 中でインキュベートし、複製複合体前駆体を形成させた後に、それらをスクロース密度勾配遠心により分画し、各画分を blue native-PAGE およびウエスタンブロット解析に供試した。また各画分に膜画分を添加後、複製活性試験に供試した。その結果、いずれの RNA を用いた場合も、複数の画分に RdRp を含み 1,000 kDa を超える高分子量複合体が検出され、これらの画分に複製活性が検出された。このことから、当該複合体が PVX 複製複合体前駆体であると考えられた。JAX1 存在下で同様の解析を行ったところ、PVX-53U-RdRp-WT の高分子量 RdRp 複合体に JAX1 が検出され、この複合体を含む画分の複製活性は顕著に低下した。一方、PVX-53U-RdRp-A1092C の当該複合体には JAX1 は検出されず、この複合体を含む画分は複製活性を保っていた。これらの結果から、JAX1 は PVX の複製複合体前駆体にターゲティングし、当該複合体に何らかの影響を与えることで複製を阻害することが示唆された。

本研究により、JAX1 がポテックスウイルスの RdRp を標的とすること、複製複合体前駆体にターゲティングし複製を阻害することにより抵抗性を発揮することが示された。これは今までに報告されていない新たなウイルス抵抗性メカニズムである。本研究の成果はウイルスに対する抵抗性機構の解明に学術面から寄与するとともに実用的にも将来的なウイルス病耐性戦略の構築に貢献しうると考えられる。