

審査の結果の要旨

氏名 吉田 哲也

作物生産に甚大な被害をもたらす植物ウイルスの防除は農学上重要な課題である。植物ウイルスに対する有効な化学農薬の開発は困難である一方で、抵抗性品種を利用した防除は有効な植物ウイルス防除法の一つである。植物ウイルスに対する抵抗性のうち、遺伝学的に優性遺伝する抵抗性は優性抵抗性と呼ばれ、主に真正抵抗性を司る nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) 型抵抗性遺伝子が多く単離され、それらの分子生物学的・生理学的機能が研究されている。一方で、近年真正抵抗性とは性質を異にし、非NLR型遺伝子が司る抵抗性が相次いで報告されているが、それらの抵抗性の分子機構についての知見は極めて限られている。

Jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1 (JAX1) はシロイヌナズナから単離された非NLR型抵抗性遺伝子であり、ジャカリンレクチンタンパク質をコードし、ポテックスウイルスの増殖を細胞レベルで阻害する。しかし、JAX1による抵抗性の分子機構の詳細はこれまで不明であった。そこで、申請者は抵抗性機構の解明を目的とし、まずJAX1が標的とするウイルス因子を解明し、植物ウイルスの *in vitro* 翻訳・複製系を採り入れることにより、JAX1によるウイルス感染阻害機構を解析した。

1. JAX1による抵抗性の標的となるウイルス因子の解析

JAX1が標的とするウイルス因子を明らかにするため、申請者はポテックスウイルス属ウイルスの一種である *plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)* の細胞間移行に関連する遺伝子のいずれかを欠損するPIAMV変異体を作成し、*Nicotiana benthamiana*の展開葉においてJAX1と共発現させたところ、いずれの変異体もJAX1による抵抗性を受けた。次いで、これらの遺伝子の全てを欠損しRdRpのみをコードするPIAMVレプリコンの増殖もJAX1により阻害されることを明らかにした。以上から、JAX1はウイルス複製を阻害することを示唆した。

次いで、共免疫沈降法によりJAX1とポテックスウイルスのRdRpの相互作用を解析したところ、PIAMVならびに同じくポテックスウイルス属の *potato virus X (PVX)* のRdRpはJAX1と相互作用したのに対し、JAX1抵抗性打破に関与するアミノ酸置換を導入したRdRp変異体はJAX1と相互作用しなかった。これらの結果を通じて、JAX1はポテックスウイルスのRdRpを標的とすることを明らかにした。

2. ポテックスウイルスに対するJAX1抵抗性の作用機構の解析

JAX1によるウイルス複製の阻害機構を明らかにするため、申請者は脱液胞化タバコBY-2プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いた生化学的解析を行った。BYLはタバコBY2培養細胞由来のプロトプラストよりパーコール密度勾配遠心によっ

てプロテアーゼやヌクレアーゼを多く含む液胞を除去した抽出液であり、高いタンパク質翻訳活性を示し、いくつかの植物ウイルスの*in vitro*翻訳・複製アッセイに利用されている。申請者は本アッセイ系をポテックスウイルス属ウイルスに初めて採り入れ、BYLにPVXレプリコンのRNAを添加・反応させることにより、*in vitro*におけるPVX翻訳・複製系を確立した。次いで、同じく*in vitro*において発現させたJAX1をPVX翻訳・複製系に添加することにより、JAX1によるウイルス複製阻害を*in vitro*において再構成した。その際、JAX1によりウイルスRdRpの翻訳は影響を受けなかったことから、JAX1はポテックスウイルスのRdRpの翻訳ではなくゲノム複製を阻害することを示した。

続いて申請者はJAX1がウイルスRdRp翻訳後ゲノム複製に至るどのウイルス複製過程を阻害しているかを解析した。BYLから超遠心処理により生体膜を除いたBYLS30にPVXレプリコンRNAを添加すると、ウイルスのRdRpの翻訳に加えて複製複合体前駆体の形成が行われると予想される。ここにJAX1を添加したところ、JAX1は高効率でウイルス複製を阻害したことから、JAX1が複製複合体前駆体の形成を阻害することを示唆した。

そこで、申請者はPVXの複製複合体前駆体の検出および当該複合体に対するJAX1の影響を解析した。まず、BYLS30でPVXレプリコンの複製複合体前駆体を形成させた後にスクロース密度勾配遠心により分画し、各画分をBN-PAGEで解析することにより、1,000 kDaを超えるRdRp複合体を検出し、それが複製複合体前駆体であることを明らかにした。JAX1存在下で同様の解析を行ったところ、野生型PVXレプリコンの複製複合体前駆体にJAX1が検出された一方、抵抗性打破PVXレプリコンの当該複合体にはJAX1が検出されなかった。これらの結果より、JAX1がポテックスウイルスの複製複合体前駆体にターゲティングすることで複製を阻害することを示唆した。

以上を要するに、申請者は本研究によりJAX1がポテックスウイルスのRdRpとの相互作用を通じて、ウイルスの複製複合体前駆体にターゲティングすることによりウイルスゲノム複製を阻害することを明らかにした。これらの研究成果は植物ウイルスに対する抵抗性分子機構の一端を明らかにするものであり、学術的および実用的な価値が高い。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。