

博士論文

植物 RNA ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子
EXA1 ホモログの機能に関する研究

遊佐 礼

目次

第 1 部 アジサイに感染する植物ウイルスの日本分離株の全ゲノム配列解読	
第 1 章 緒言	2
第 2 章 材料および方法	4
1.2.1. 供試植物	4
1.2.2. 電子顕微鏡観察(ダイレクトネガティブ染色法)	4
1.2.3. RNA 抽出	4
1.2.4. RT-PCR	5
1.2.5. ゲル精製	5
1.2.6. シーケンス解析	6
1.2.7. 5'RACE 解析	7
1.2.8. ベクターへのクローニング	7
1.2.9. 大腸菌への形質転換	7
1.2.10. 大腸菌からのプラスミド抽出	8
第 3 章 結果	9
1.3.1. 本邦産アジサイにおける HdRSV の検出	9
1.3.2. HdRSV 日本分離株の全ゲノム配列解析	11
1.3.3. HdRSV 日本株に見られたフレームシフト変異	13
第 4 章 考察	15
1.4.1. HdRSV 分離株と HdRSV 感染アジサイの症状の関係	15
1.4.2. 本邦産アジサイから HdRSV が検出されたことの意義	16
第 2 部 植物 RNA ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子 EXA1 ホモログの保存性解析	
第 1 章 緒言	18
第 2 章 材料および方法	21
2.2.1. 供試植物と育成条件	21
2.2.2. BLAST 検索	21
2.2.3. DNA 抽出	21
2.2.4. サザンブロット法	22
2.2.5. RNA 抽出および精製	23

2.2.6.	DNase 処理および RNA 精製	23
2.2.7.	cDNA 合成	24
2.2.8.	RT-PCR	25
2.2.9.	定量 RT-PCR	25
2.2.10.	プラスミドの構築	26
2.2.11.	アグロインフィルトレーション法	28
2.2.12.	ウイルスの機械接種	30
2.2.13.	アラインメントおよび系統解析	30
第 3 章 結果		32
3.1.	<i>N. benthamiana</i> は <i>EXA1</i> ホモログ遺伝子を 2 つコードする	32
3.2.	NbEXA1 のウイルス感染における機能は AtEXA1 と類似している	34
3.3.	NbEXA1 はポテックスウイルス属ウイルスとロラウイルス属ウイルスの感染に必要である	42
3.4.	NbEXA1 のウイルス感染に関する機能はイネとトマトの <i>EXA1</i> ホモログによって相補される	44
3.5.	トマトの <i>EXA1</i> ホモログ発現抑制個体では PepMV の蓄積が阻害される	48
3.6.	<i>EXA1</i> ホモログ遺伝子は広範な植物種において保存される	50
第 4 章 考察		58
4.1.	NbEXA1 を感染時に利用するウイルス	58
4.2.	<i>EXA1</i> のウイルス感染における機能	59
4.3.	<i>EXA1</i> ホモログの機能の保存性	60
4.4.	植物ゲノムにコードされる <i>EXA1</i> ホモログ遺伝子のコピー数	61
4.5.	<i>EXA1</i> を利用したウイルス抵抗性品種の作出に向けた留意点	61
摘要		64
謝辞		65
引用文献		66

第 1 部

アジサイに感染する植物ウイルスの日本分離株の 全塩ゲノム配列解読

第 1 章 緒言

Alphaflexivirus 科 *Potexvirus* 属ウイルスに分類される植物ウイルスは、長さ 470-580 nm、幅 13 nm ほどのひも状の形態を示す。ゲノムは 6,000-7,000 塩基程度の単分節一本鎖 RNA であり、5'末端には Cap 構造が、3'末端にはポリ A 配列が存在する。またゲノム上には、5'末端側から、ゲノムの複製に関わる複製酵素 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)、細胞間移行に関わる 3 つの移行タンパク質 triple gene block protein (TGBp) 1、2、3、ゲノムを外界から保護する coat protein (CP) がコードされる。ウイルス種によっては、この他に 1 つ以上の機能未知のタンパク質をコードする open reading frame (ORF) が予測される種も存在する。*Potexvirus* 属ウイルス全般として感染する植物種は多いが、個々のウイルス種の自然界における宿主範囲は狭いことがほとんどである。また *Potexvirus* 属ウイルスは世界的に分布しており、自然界では主に機械的接触により伝搬されと考えられている (Adams *et al.*, 2012)。

Potexvirus 属ウイルスの 1 種である *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV) は、主にアジサイ属植物を自然宿主とする。HdRSV のゲノム中は先述の 5 つの ORF に加え、CP をコードする領域内に CP とは異なる読み枠の機能未知タンパク質をコードする ORF6 の存在が予測されている。また、HdRSV は北米や欧州、ニュージーランド、日本において発生が報告されている。HdRSV の全ゲノム配列は欧州の 2 分離株が報告されている (Hughes, *et al.*, 2005; Gadiou *et al.*, 2010)。国内における HdRSV の発生については、1968 年に輸入検疫中のオランダ産アジサイの中で葉に「不完全な退緑輪紋または帯状の濃淡斑」を呈するものがあり、電子顕微鏡観察により *Potexvirus* 属ウイルスに類似したひも状ウイルス粒子が観察された

との検出報告があるのみであり (Obata and Yamamoto, 1968)、日本で検出された HdRSV の配列報告例はなかった。

本研究では、国内産のウイルス感染の疑いのあるアジサイ植物 2 個体より HdRSV を検出し、各植物より分離した HdRSV の 2 分離株について全ゲノム配列解読を行った。解読した HdRSV 日本分離株ゲノムサイズは既報の HdRSV 欧州分離株と同程度であり、コードする遺伝子数も同じであった。しかしながら、興味深いことに、日本分離株のゲノムには欧州分離株と比較して、複製酵素と TGBp1 のコード領域にフレームシフト変異を伴う塩基挿入が認められた。この変異によりウイルスの性状が変わる可能性も考えられ、今後の解析が求められる。以上より、本研究において国内で初めて HdRSV 全ゲノム配列解読を行うことができた (Yusa *et al.*, 2016)。第 1 章における解析結果により、次章での *Potexvirus* 属ウイルスの性状解析および感染戦略の理解を深める上で重要なツールである感染性 cDNA クローンの作成に至り、第 2 章での解析に資することとなった。

第 2 章 材料および方法

1.2.1. 供試植物

ウイルスの感染の疑いのある国産アジサイ 2 株を供試した。本アジサイは 2011 年に見出されたものである。

1.2.2. 電子顕微鏡観察(ダイレクトネガティブ染色法)

アジサイ 2 株の症状を呈する葉から 5 mm 角ほどの切片を切り出し、パラフィルム上に 2% リンタングステン酸を滴下し、切片を液にひたす。切片を浸した液に、支持膜付グリッド Cu200 メッシュ(日本電子)を浸し、しばらく静置する。その後、2%リンタングステン酸で軽く洗浄、濾紙にメッシュの角を当てて水気を切ったのち、メッシュが入っていたホルダーに戻し、常温で自然乾燥させる。乾燥後のグリッド表面に対して、透過型顕微鏡(日本電子)を用いてウイルス粒子の有無を観察した。

1.2.3. RNA 抽出

植物片からの RNA 抽出には、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた。まず 0.1-0.3 g の植物片を回収し、液体窒素により瞬間凍結させた。凍結させたサンプルを乳鉢内で摩砕し、1 ml の ISOGEN を加えてサンプルと完全になじませた後、全量をサンプルチューブに回収し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を新しいサンプルチューブに回収し、200 μ l のクロロホルムを加えてボルテックスにより混合し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を新しいエッペンチューブに回収し、上清と等量のイソプロパノールを加えてボルテックスにより

激しく混合し、-80°Cで10分間静置した。その後、15,000 rpm、4°Cで20分間遠心し、上清を除去し、1 mlの70% エタノールを加えて転倒混和した。その後、15,000 rpm、4°Cで5分間遠心し、上清を除去した後、風乾によりエタノールを完全に蒸発させた。その後1% RNase Inhibitor (TaKaRa) を加えた蒸留水(DW; distilled water) 30 μ lに溶解し、分光光度計でRNAの濃度および純度を確認した。

1.2.4. RT-PCR

上記 RNA 抽出により得たアジサイ由来の RNA を供試し、SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) のキットを用いて RT-PCR を行なった。反応系は次の通りである。RNA 溶液 1 μ l、5 μ l の 2x Reaction Mix、それぞれ 0.5 μ l の Forward/Reverse Primer (5 μ M)、0.4 μ l の SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix を加えた後、容量が 10 μ L となるまで DW を加えた。反応時間は、55°C・30 分、94°C・2 分、(94°C・15 秒、55°C・30 秒、68°C・1 分) を 1 サイクルとして 35 サイクル、続いて 68°C・5 分とした。プライマーは表 1-1. に記載のプライマーセット Hd24F/Hd315R、Hd3109F/Hd3612R、Hd24F/Hd3612R、または Hd3109F/oligo-dT を用いた。oligo-dT 以外のプライマーは既報の HdRSV 欧州分離株 (PD 109、HydCZ) の配列に基づいて作成した。

1.2.5. ゲル精製

RT-PCR 産物のゲル精製には UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories) を用いた。チューブに回収したゲルに対して 1 ml の ULTRA SALT を加え、55°Cで10分間静置した。転倒混和してゲルが完全に溶けたのを確認した後、6 μ l の ULTRA BIND を加えて

vortex し、回転攪拌機を用いて室温で 15 分間攪拌した。その後、15,000 rpm・室温で 30 秒間遠心し、上清を除去して沈殿に 1 ml の ULTRA CLEAN を加えて数回転倒混和し、再度遠心した。この遠心・上清除去・ULTRA CLEAN で洗浄の行程を計 3 回繰り返した。遠心後、上清を除去し、減圧乾燥機で 10 分間減圧乾燥させた。減圧乾燥後、15 μ l の DW を加えて沈殿をピペットマンの先につけたチップを用いて攪拌し懸濁させた後、室温で 5 分間静置し、DNA を DW に溶出させた。その後 15,000 rpm・室温で 1 分間遠心し、上清を新しいチューブに回収し、分光光度計で DNA の濃度および純度を計測した。

1.2.6. シーケンス解析

ゲル精製した PCR 産物について塩基配列解読を行うため、シーケンス解析を行った。まず、BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。反応は 10 μ l の容量で行い、0.5 μ l の Big Dye Terminator、1.75 μ l の Sequencing Buffer、それぞれ 0.32 μ l の Forward/Reverse プライマー (5 μ M)、DNA 断片 100 ng 相当を加え、容量が 10 μ l となるまで DW を加えた。反応時間は、96°C・3 分、(96°C・15 秒、48°C・30 秒、60°C・4 分) を 1 サイクルとして 25 サイクルとした。反応終了後、10 μ l の DW を加え、Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare) を用いて反応液をカラム精製した。精製後、減圧乾燥機で 1 時間減圧乾燥し、液体を完全に蒸発させた。沈殿に 15 μ l の Hi Di Formamide (Applied Biosystems) を加え、vortex により攪拌して沈殿を溶かし、瞬間遠心した後に 95°C で 5 分間熱ショックを与えた。その後、氷上で急冷し、シーケンサー (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) により配列の解読を行った。なお、シーケンス反応に用いたプライマーは表 1-1. に記載の通りである。

1.2.7. 5'RACE 解析

HdRAV ゲノムのうち、未解読の 5'末端側配列情報を得るため、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 解析を行った。RACE 解析に用いたのは、5'-RACE System Version 2.0 (Invitrogen) である。プロトコールはマニュアル通りに従った。5'RACE 解析で用いたプライマーは、表 1-1.に記載の通りである。続いて、5'RACE によって得られた増幅産物のベクターへクローニングを行った。

1.2.8. ベクターへのクローニング

5'RACE によって得られた増幅産物に対して 1.2.5.項記載のゲル精製を行って得た産物を供試して、TOPO-TA vector (Invitrogen) への導入を行った。反応は、ゲル精製産物 2 μ l、Salt Solution 1 μ l、pCR2.1-TOPO vector 1 μ l を加えた後、容量が 10 μ L となるまで DW を加えた。室温で 5 分 incubate し、大腸菌への形質転換を行った。

1.2.9. 大腸菌への形質転換

反応後のプラスミド溶液に対して 50 μ l の *Escherichia coli* DH5 α コンピテントセル (TaKaRa) を混合し、30 分氷上で静置した。その後、42°C で 1 分間処理し、5 分間氷上で静置した。続いて、予め 37°C に保温しておいた SOC 液体培地 (bacto-tryptone 20 g, yeast extract 5 g, NaCl 0.5 g, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose) を 1 ml 加え、37°C で 1 時間振盪培養した。形質転換された大腸菌を、LB / Ampicilin (bacto-tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agarose 15 g, Ampicilin 20 mg / 1000 ml) 平板培地上にプ

レーティングし、37°Cで一晩静置した。

1.2.10. 大腸菌からのプラスミド抽出

平板培地での培養後、形成されたコロニーを LB / Ampicilin 液体培地で 37°C、20 時間程度振盪培養した。その後、アルカリ SDS 法を用いた核酸自動分離装置 (KURABO) でプラスミドを抽出・精製した。その後、プラスミドの配列を解読することで、クローニングされた HdRSV の 5'末端側配列を決定した。シーケンス解析は 1.2.6.項を参照した。

表 1-1. プライマー配列とその用途

プライマー名	配列 (5'-3')
RT-PCR	
Hd24F	GAAAAGTTCCACACCCAAACCAA
Hd315R	GCTCGCGTACAGGTCCAGCTCCAA
Hd3109F	AGCCCTCCTCTGGGAGACAATCAA
Hd3612R	TCCTTTCACTGGTGTGGTCTTG
Sequence Reaction	
Hd355F	AGCGTATCGCACTACATGCC
Hd528R	AGCGTGTCTCCCATGAATGC
Hd817F	GGAACTGCATCACTGCCCA
Hd1285F	AAGGCCCTCGAGTGGACGGA
Hd1518F	CAACAACCCCCACGGGACCA
Hd1892F	GCCAAATTCAGGGGCACGAA
Hd2319F	CAAAGTCCAGCCGGCTACA
Hd2795F	ACACAGGGCCAACGCACAGC
Hd3280F	GCAGCCGAGGTGCAGAACAC
Hd3769F	TTAGGCATCATGAGACTTAC
Hd4275F	GTGATGGACACCTTGGTGAG
Hd4710F	ACGCTCAGCCCCATCTTCGA
Hd5191F	GCCCTCATCCACCTCTCTGG
Hd5591F	CCGGCGGCAGAAACGACCAA
Hd6014F	GCCACCCAGTTTACCCGTGG
5'RACE	
HdRSV-GSP1_174R	ATTTGTAGGCCTCTTCTTGG
HdRSV-GSP2_127R	ATGGATGCGAGTACTTGGCTAAC

第 3 章 結果

1.3.1. 本邦産アジサイにおける HdRSV の検出

2011 年に本邦産アジサイにおいて、上位葉に黄色輪紋斑を呈する 1 株(株 1)、および下位葉に退緑輪紋斑を呈する 1 株(株 2)をそれぞれ見出した(図 1-1A、1-1B)。これらの症状はウイルスによる病徴と似ていたため、ウイルスの感染が疑われた。そこで、各株の症状を呈する葉を供試して電子顕微鏡観察を行い、ウイルス粒子の有無を調べた。その結果、いずれの株からも長さ約 500 nm ほどのひも状ウイルス粒子が観察された(図 1-1C、1-1D)。日本ではアジサイに感染するひも状の粒子構造を有するウイルスに関する唯一の報告例は、輸入アジサイにおいて検出された HdRSV であった(Obata and Yamamoto, 1968)。当時の葉の症状の記述は、今回見出された株の葉の症状と類似していること、また電子顕微鏡観察により *Potexvirus* 属ウイルスに似たひも状ウイルスが認められたことから、供試したアジサイ 2 株はいずれも HdRSV に感染している可能性が考えられた。

そこで、症状を呈する葉より全 RNA を抽出し、RT-PCR 反応により HdRSV の検出を行った。RT-PCR の増幅領域は、領域 1 および領域 2 であり、それぞれ Hd24F/Hd315R、Hd3109F/Hd3612R のプライマーセットを用いた(図 1-2A)。これらのプライマーは既報の HdRSV 分離株の配列情報を基にして設計した。RT-PCR の結果、いずれの領域についても特異的な増幅断片が認められ、さらに増幅断片のシーケンス解析を行ったところ、既報の HdRSV 分離株と高い同一性を示した。これらのことから、供試したアジサイ株 1、株 2 はどちらも HdRSV に感染していたことが明らかとなった。

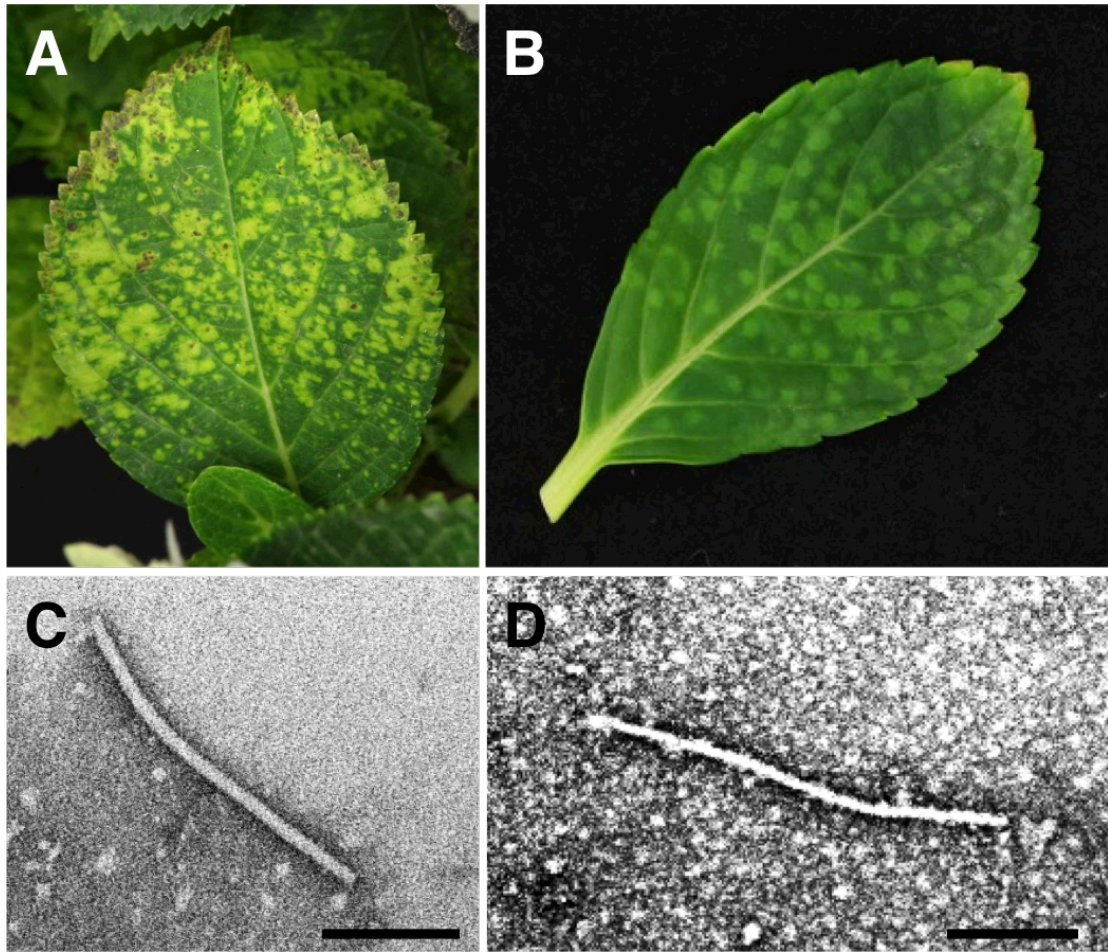


図 1-1. 供試したアジサイの症状と電子顕微鏡観察結果

(A)アジサイ株 1 の葉における黄色輪紋斑

(B)アジサイ株 2 の葉における退色輪紋斑

(C)株 1 より観察されたひも状ウイルス粒子

(D)株 2 より観察されたひも状ウイルス粒子

黒色バーは 200 nm を示す。

1.3.2. HdRSV 日本分離株の全ゲノム配列解析

前述の通り、HdRSV は日本分離株の配列情報が全くなかったため、続いて供試アジサイに感染している HdRSV の全ゲノム配列解析を行った。RT-PCR と同様に、既報の HdRSV 分離株の塩基配列情報を基にプライマーを設計し、株 1 由来の分離株 Gu1、株 2 由来の分離株 Gu2 について全ゲノム配列解析を行った。全ゲノム解析の概要は次の通りである。すなわち、互いにオーバーラップする 2 領域を RT-PCR により増幅し、シーケンス解析により増幅産物の配列の解析を行った(図 1-2)。また、正確な 5'非翻訳領域(5'UTR)の配列を得るため、5'RACE 解析を行い、その増幅産物についてもシーケンス解析を行った(図 1-2)。解析された配列を全てアセンブルすることにより、分離株 Gu1、Gu2 の全ゲノム配列を決定した。

解析した HdRSV 日本分離株のゲノム情報は次のようであった。ゲノム全長は Gu1 が 6,194 塩基、Gu2 が 6,196 塩基であり、この違いは 3'UTR に見られた 2 塩基の挿入あるいは欠失によるものであった。また、Gu1、Gu2 ともにゲノム中に 5'末端側から 6 つの ORF、RdRp、TGBp1、2、3、CP、ORF6 が予測され、既報の HdRSV 分離株とゲノム構造が一致していた。さらに、Gu1 と Gu2 の各領域の配列同一性はゲノム全長で 98.6% 一致で、非常に高い相同性を示した(表 1-2-1)。

続いて、HdRSV 日本株と既報の欧州株の各領域についてペアワイズ解析を行い、配列同一性を算出した(表 1-2-2)。ここで、注目する点は RdRp と CP の配列同一性である。*Alphaflexivirus* 科における種の分類基準では、「RdRp または CP において、配列同一性が塩基で 72% 以上 かつ アミノ酸で 80% 以上であれば同種」とされている(Adams *et al.*, 2012)。これを踏まえると、改めて、今回全ゲノム配列を解析した Gu1 および Gu2 は HdRSV

であることが明らかとなった。

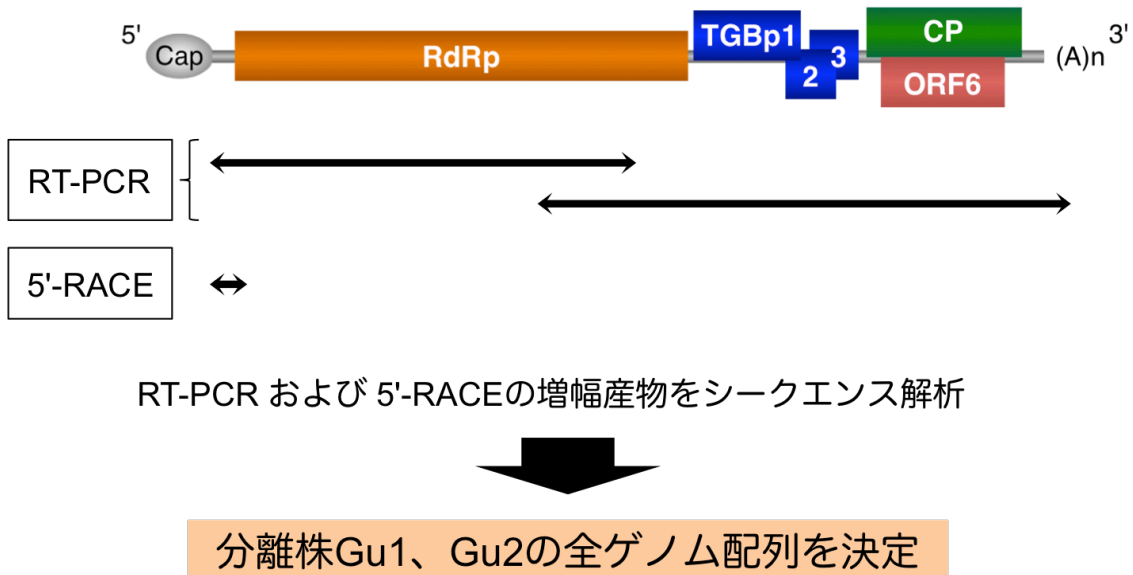


図 1-2. HdRSV ゲノム解読の概要

	5' UTR	RdRp	TGBp1	TGBp2	TGBp3	CP	ORF6	3' UTR	ゲノム全長
塩基	100	98.3	99.3	98.6	99.1	99.1	99.4	99.2	98.6
アミノ酸	-	99.6	100	99.1	98.6	99.1	98.7	-	-

(単位: %)

表 1-2-1. HdRSV 日本株 Gu1、Gu2 間の配列同一性

	5' UTR	RdRp	TGBp1	TGBp2	TGBp3	CP	ORF6	3' UTR	ゲノム全長
塩基	100	95.4- 95.9	96.3- 97.4	96.8- 98.0	98.2- 99.1	96.3- 97.1	96.8- 97.0	94.9- 100	95.9- 96.3
アミノ酸	-	98.0- 98.5	88.8- 89.7	96.5- 99.1	98.6- 100	97.3- 98.7	90.4- 92.4	-	-

(単位: %)

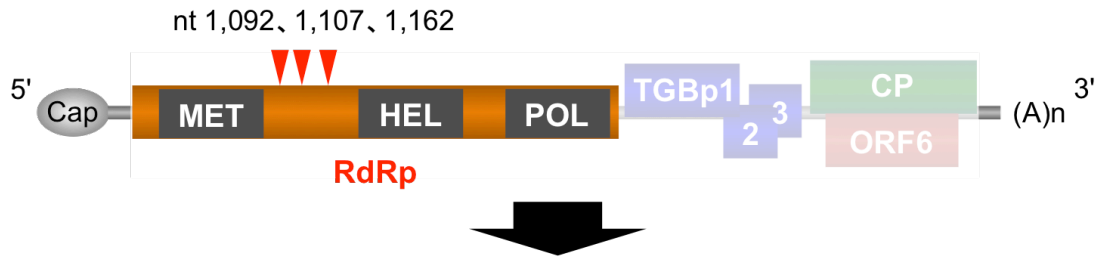
表 1-2-2. HdRSV 日本株 (Gu1、Gu2) と欧州株 (PD 109、HydCZ) 間の配列同一性

1.3.3. HdRSV 日本株に見られたフレームシフト変異

また、HdRSV 日本株と欧州株間で各 ORF について配列比較を行っていく上で、興味深いことが明らかとなった。まず、複製酵素 RdRp についてフレームシフトが確認された。欧州株と比較して、日本株では 5'末端から数えて 1,092、1,107、1,162 塩基目にそれぞれ 1 塩基ずつ挿入が見られ、これにより、RdRp のアミノ酸配列にフレームシフトが生じていた。すなわち、RdRp の methyltransferase (MET)ドメインと helicase (HEL)ドメイン間の領域において 20 アミノ酸にわたるフレームシフトが生じていた(図 1-3-1)。このフレームシフト領域のアミノ酸配列は、他種 *Potexvirus* 属ウイルスと HdRSV 日本株の間で高い相同性を示した。

また RdRp 同様に、TGBp1 についてもフレームシフトが確認された。欧州株と比較して、日本株では、5'末端から数えて 4510、4582、4583 塩基目にそれぞれ 1 塩基ずつ挿入が見られ、これにより、TGBp1 のアミノ酸配列にフレームシフトが生じていました。すなわち、TGBp1 の helicase モチーフを含む領域について 25 アミノ酸にわたるフレームシフトが生じており、このフレームシフト領域のアミノ酸配列は、RdRp の場合と同様に、他種 *Potexvirus* 属ウイルスと HdRSV 日本株の間で高い相同性を示した(図 1-3-2)。

<HdRSV日本株に見られた塩基挿入>



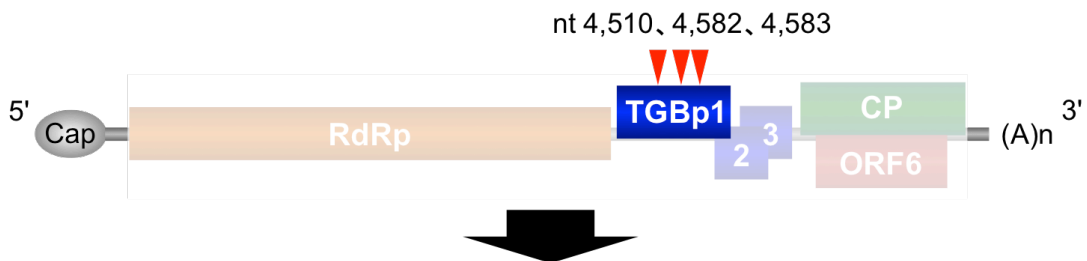
<RdRpアミノ酸配列アラインメント図>

他種	PVX	OLIKSSDLKYSAVELVYLVSYMEFLADLQA---TTCFSDTLSGGLTKTLAPVRAWIQ
potexvirus	PIAMV	OLIQTKDLEQDFDELVRLANYVMHTSKLLE---KDPYELTEGQGKLODLVNPDKTWVS
	HVX	OLISTKELQHYQFSEITLLVNYFEFTATLDS---HTCFEDVPPKLAPKTTAPPLG-LS
HdRSV日本株	Gu1	QLTKTDDLQELDEKEITLVVNYFLLISRLLDS---VTCFDDILSGSALRRLLKPLICWME
	Gu2	QLTKTDDLQELDPKEITLVVNYFLLISRLLDS---VTCFDDILSGSALRRLLKPLICWME
HdRSV欧州株	PD 109	QLTKTDDLQELDPKR-----SHYGELLPHPLEARFSHLLRCILSGSALRRLLKPLICWME
	HydCZ	QLTKTDDLQELDEKR-----SHYGELLPHPLEARFSHLLRCILSGSALRRLLKPLICWME

図 1-3-1. HdRSV 日本株に見られた RdRp 内のフレームシフト変異

赤枠は RdRp の MET-HEL ドメイン間領域に認められたフレームシフト変異部位を表す。

<HdRSV日本株に見られた塩基挿入>



<TGBp1アミノ酸配列アラインメント図>

他種	PVX	PIPEGN-FAILDEYILDNTTRNSYQALFADPYQAPFESLEPHFYLETSTRVPRKVADLI
potexvirus	PIAMV	TCPESNKINLLDEY AALQPLKGSWDVVLADPLQHPGLALRPHFIKSVSHRLCPATTRLI
	HVX	SGPVANLVN ILDEYTA--HRHGSWDVLIADPLQHYERAKLPHYICKRSHRLCPATARLL
HdRSV日本株	Gu1	NVPLSNHFNILDEYPAV-PVKGSDALIADPLQHPENCLPPHFTRNVTHRFGPDTCSLL
	Gu2	NVPLSNHFNILDEYPAV-PVKGSDALIADPLQHPENCLPPHFTRNVTHRFGPDTCSLL
HdRSV欧州株	PD 109	NVPLSNHFNILDEYLRS-QSKDPGTPSSRTP-SNTOKTASPHFTRNVTHRFGPDTCSLL
	HydCZ	NVPLSNHFNILDEYLRS-QSKDPGTPSSRTP-SNTOKTASPHFTRNVTHRFGPDTCSLL

— : ヘリカーゼモチーフ

図 1-3-2. HdRSV 日本株に見られた TGBp1 内のフレームシフト変異

赤枠は TGBp1 内に認められたフレームシフト変異部位を、青線箇所はヘリカーゼモチーフを

表す。

第4章 考察

1.4.1. HdRSV 分離株と HdRSV 感染アジサイの症状の関係

本研究では、まず国内において HdRSV 感染の報告のあったアジサイと類似した症状を呈するアジサイより HdRSV を検出した。しかしながら、1968 年に HdRSV が検出されたアジサイの症状と異なる点もあり、特に既報で記述のあった葉における「帯状の濃淡斑」(モザイク症状に類似した表現であると考えられる)は、供試した株では認められなかった。また、海外の報告では、葉における壊死斑および葉脈透過症状といった国内のアジサイより激しい症状を呈していた(Gadiou *et al.*, 2010)。ウイルスによる症状は、ウイルスの配列や性状など病原体側の要素のみならず、植物側の生理状態や遺伝型などの要素によっても変化し得る。1968 年当時のウイルスと今回分離したウイルスの配列はどの程度異なっているのか興味を持たれる。というのも、アジサイは挿し木による栄養繁殖で繁殖するため、一度ウイルスが何らかの原因でアジサイに感染した場合、そのウイルスを植物体から除去するのは難しい。それゆえ、ウイルス感染個体の早期発見がウイルス感染株の蔓延阻止に向けた方策となる。そのためにも、ウイルスが引き起こす症状を包括的に理解することが重要である。また、多くのウイルス分離株の配列を解読し、保存性が高い領域や変異が入りやすい領域を見出すことで、分子生物学的手法を駆使した新規ウイルス検出技術の確立に繋がると期待される。

1.4.2. 本邦産アジサイから HdRSV が検出されたことの意義

国内における HdRSV の初検出報告の時点と本研究では、およそ 50 年の時間的隔たりがある(Obata and Yamamoto, 1968; Yusa *et al.*, 2016)。いずれにおいてもアジサイの葉に

において明瞭な症状が認められた。一般に、あるウイルスが感染した植物では、そのウイルスが植物体内で増殖し感染部位を広げていく中で、宿主に与える影響が少ないならば、植物とウイルスは共存する方向に収斂すると言われている。その場合、ウイルスが感染していても明瞭な症状は示さなくなり、潜在感染という段階で遷移することになる。先に挙げた通り、HdRSVの検出報告に約50年の隔たりがある1つの理由として、この潜在感染という状況が国内のアジサイに広く蔓延していることが考えられる。潜在感染していたHdRSVが今回のように「顕在化」したのは、国内のアジサイ農家によって接ぎ木等により品種改良された際、台木と穂木の間で遺伝形質が大きく異なったことにより、ウイルスが宿主に与える影響が大きくなったことが発端であると考えても良いだろう。

第 2 部

植物 RNA ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子

EXA1 ホモログの保存性解析

第 1 章 緒言

植物ウイルスの感染過程は、植物体侵入時の細胞におけるウイルスタンパク質の翻訳、ウイルスゲノムの複製、原形質連絡を介した細胞間移行、そして維管束組織を通じた全身移行に大分される。植物ウイルスはそのゲノムサイズが小さく、コードしている遺伝子の数も少ない。そのため、植物ウイルスは前述の各過程において、自身のコードする限られた因子を駆使し、多くの宿主因子を利用することによってはじめて植物への感染を成立させている (Kuchner *et al.*, 2003; Revers and Nicaise, 2014)。これまでの研究により、植物ウイルスが利用する宿主因子が数多く見出され、それらのウイルス感染における分子メカニズムが明らかとなってきている (Hyodo and Okuno, 2014; Ishibashi and Ishikawa, 2016; Nagy and Pogany, 2012)。これらの宿主因子はウイルス感染にとって必須であるため、何らかの原因により宿主因子が欠損した変異体植物がウイルスに対して抵抗性を示すということがある (Kang *et al.*, 2005)。このようなウイルス抵抗性変異体の利点を鑑みると、ウイルスが利用する宿主因子を欠損あるいは機能喪失させることでウイルス抵抗性作物を作出できると考えられている (Chandrasekaran *et al.*, 2016; Pyott *et al.*, 2016; Hashimoto *et al.*, 2016a; Sanfaçon, 2015)。そのため、宿主因子の機能について詳細な解析をすることが肝要であると考えられる。

ウイルスの感染に必要な宿主因子の機能喪失変異による抵抗性は、一般的に「劣性抵抗性」と呼ばれる (Robaglia and Caranta, 2006)。植物ウイルスに対して劣性抵抗性を有する作物では、広く利用されている遺伝子として、翻訳開始因子 *eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E*、*eIF4G* とそのアイソフォーム *eIFiso4E* が挙げられる (Revers and Nicaise,

2014; Sanfaçon, 2015)。eIF4E は真核細胞において諸タンパク質の翻訳に関わる因子であるが、同因子の機能喪失変異によって様々な種のウイルスに対する抵抗性が付与される。例えば eIF4E に関する劣性抵抗性は、ポティウイルス、バイモウイルス、ククモウイルス、イポモウイルス、ソベモウイルス、カルモウイルス、ワイカウイルスに対して有効であることが示されている(Wang and Krishnaswamy, 2012)。またポティウイルス属ウイルスとポレロウイルス属ウイルスでは、シロイヌナズナのコードする 2 コピーの eIF4E を、同属であるが別種の近縁なウイルスが使い分けることが明らかとなっている(Nicaise *et al.*, 2007; Reinbold *et al.*, 2013; Sato *et al.*, 2005)。従って、eIF4E とは異なる因子に由来する劣性抵抗性を有し、広範なウイルス種に抵抗性を示す作物品種を作出することが必要である。

アルファフレキシウイルス科ポテックスウイルス属に属するウイルスのうち、特にジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX)、シンビジウムモザイクウイルス (cymbidium mosaic virus; CymMV)、ペピーノモザイクウイルス (pepino mosaic virus; PepMV)、オオバコモザイクウイルス (plantago mosaic virus; PIAMV) は経済的に主要な作物に感染し、深刻な被害をもたらす (EPPO, 2011; Hanssen and Thomma, 2010; Zettler *et al.*, 1990)。ポテックスウイルス属ウイルスが感染時に必要とする宿主因子は複数報告されているが (Chen *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016)、宿主因子の欠損による抵抗性がポテックスウイルス属ウイルスのどの種に対して有効か、そしてそれはどのような植物においてであるかについて検証された例は今までに報告がなかった。

私の所属する研究室において、PIAMV が感染時に利用する新規宿主因子として Essential for poteXvirus Accumulation 1 (EXA1) が同定されている (Hashimoto *et al.*, 2016b)。EXA1 は、プロリンリッチな配列に結合する約 50 アミノ酸からなる GYF ドメインと、eIF4E と

の結合が予測される Y-X₄-L-L モチーフの 2 つの機能ドメインを有する (Kofler and Freund, 2006; Mader *et al.*, 1995)。またプロトプラストを用いた実験により、EXA1 の欠損によって PIAMV のウイルス RNA の蓄積量が単細胞レベルで大幅に低下することが示されている (Hashimoto *et al.*, 2016b)。このことから、EXA1 は PIAMV のゲノム RNA の複製もしくはウイルスタンパク質の翻訳に関与することが考えられる。さらに他研究グループにより、EXA1 は細菌や卵菌に対する抵抗性に関わることが示されているが、この抵抗性における EXA1 の詳細な機能は未知である (Matsui *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017)。ポテックスウイルスをはじめ多様な病原体に対して有効であるとされる EXA1 は、これら病原体に対して抵抗性を有する作物を作出する上で有望な遺伝子であると考えられるが、EXA1 欠損による劣性抵抗性が今まで解析対象となっていないポテックスウイルス属、あるいはそれに近縁な属のどの種のウイルスに対して有効であるかについては不明であった。

本研究では、virus-induced gene silencing (VIGS) 法を用いることで、*Nicotiana benthamiana* とトマト (*Solanum lycopersicum*) において、それぞれの植物が有する EXA1 ホモログ遺伝子のウイルス感染における機能について解析を行った。また、イネおよびトマトの EXA1 ホモログが *N. benthamiana* の EXA1 ホモログの機能を相補できるかどうか調べた。本研究により、ポテックスウイルス属ウイルスとロライルス属ウイルスの感染における EXA1 の機能は、複数の植物種において保存されていることが明らかとなった (Yusa *et al.*, under review)。

第 2 章 材料および方法

2.2.1. 供試植物と育成条件

N. benthamiana、トマト(品種:マイクロトム)、イネ(品種:コシヒカリ)は 25°C、明期 15 時間・暗期 9 時間の条件で育成した。ただしトマトにおける VIGS の実験には、トマト品種 Brandywine black を用い、VIGS の適温である 22°C、明期 15 時間・暗期 9 時間の条件で育成した(Jiang *et al.*, 2008)。

2.2.2. BLAST 検索

公開されている植物ゲノム情報より EXA1 ホモログ遺伝子の配列を検索するため、シロイヌナズナの EXA1 である AtEXA1 のタンパク質配列をクエリーとして tBLASTN 検索を行った。*N. benthamiana* のゲノムは Sol Genomic Network (<https://solgenomics.net/>)、その他の植物については Phytozome database v. 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) のウェブページを参照した。

2.2.3. DNA 抽出

DNA 抽出には 0.3 g の植物片(*N. benthamiana*、イネあるいはトマト)を供試した。乳鉢内で液体窒素を用いて摩砕し、700 μ L の 2x CTAB Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0.2% 3-mercapto-1,2-propanediol) を加えてさらに摩砕した。その後試料をサンプルチューブに移し、65°C で 30 分間 incubate した。15,000 rpm、室温で 15 分間遠心後、上清を新しいサンプルチューブに 400 μ L 分回収し、等量のクロロホル

ム/イソアミルアルコール (24:1, v/v) を加えてボルテックスにより激しく混和させた。15,000 rpm、室温で 15 分間遠心後、上層を新しいサンプルチューブに回収し、試料中の RNA を分解させるため、5 μ g の RNase A (ニッポンジーン) を加えて 37°C で 1 時間 incubate した。その後 400 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1, v/v) を加えてボルテックスにより激しく混和させた。15,000 rpm、室温で 15 分間遠心後、上清を新しいサンプルチューブに回収し、20 μ l の 3M 酢酸ナトリウム、500 μ l の 100% エタノールを加えた後、-80°C で 10 分間静置した。その後 15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心し、上清を除去した。1 ml の 70% エタノールを加えて沈殿を洗浄し、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を除去し、風乾により沈殿を乾燥させた後、50 μ l の DW に溶解させ、分光光度計で DNA の濃度および純度を確認した。

2.2.4. サザンブロット法

上記 DNA 抽出により得た *N. benthamiana* のゲノム DNA を 5 g 分供試し、*Dra* I (ニッポンジーン)、*Hind* III (NEB) もしくは *Nde* I (NEB) によってそれぞれ制限酵素処理を行った。その後、DIG application Kit (Roche) を用いてサザンブロット解析に供試した。プロトコールはキットに付属のマニュアルに従った。また、*N. benthamiana* の *EXA1* ホモログ遺伝子 (*NbEXA1*) 検出用の特異的 DNA プローブは、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて作成した。プロトコールは同様にキット付属のマニュアルに従った。プローブ作成には、*Xh-NbEXA1-268F/Bm-NbEXA1-567R* または *NbEXA1g-5015F/NbEXA1g-5500R* のプライマーセットを用いて PCR を行った。

2.2.5. RNA 抽出および精製

植物片からの RNA 抽出には、ISOGEN (ニッポンジーン) および DNase I (タカラバイオ)、もしくは ISOSPIN Plant RNA Kit (ニッポンジーン) を用いた。後者のキットを用いて抽出を行う際は、キット付属のマニュアルに従った。前者については次のような手順で RNA の抽出・精製等を行った。まず 0.1-0.3 g の植物片を回収し、液体窒素により瞬間凍結させた。凍結させたサンプルを乳鉢内で摩砕し、1 ml の ISOGEN を加えてサンプルと完全になじませた後、全量をサンプルチューブに回収し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を新しいサンプルチューブに回収し、200 μ l のクロロホルムを加えてボルテックスにより混合し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を新しいエッペンチューブに回収し、上清と等量のイソプロパノールを加えてボルテックスにより激しく混合し、-80°C で 10 分間静置した。その後、15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心し、上清を除去し、1 ml の 70% エタノールを加えて転倒混合した。その後、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去した後、風乾によりエタノールを完全に蒸発させた。その後 1% RNase Inhibitor (TaKaRa) を加えた蒸留水 (DW; distilled water) 30 μ l に溶解し、分光光度計で RNA の濃度および純度を確認した。

2.2.6. DNase 処理および RNA 精製

続いて、得られた RNA 溶液に対して DNase 処理を行った。すなわち、RNA 溶液に DNase I (TaKaRa) を 37°C で 30 分間作用させた。反応は 50 μ l の容量で行い、RNA 5 μ g 相当量の RNA 溶液、5 μ l の 10x DNase I Buffer (TaKaRa)、2 μ l の Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa)、0.5 μ l の RNase Inhibitor (TaKaRa) を加えた後、容量が 50 μ L となるまで DW を加えた。

DNase 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿による RNA 精製を行った。すなわち、100 μ l となるように DW を加え、100 μ l のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加えてボルテックスにより激しく混合し、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心した。上清を新しいサンプルチューブに回収し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えて混合し、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心した。上清を新しいサンプルチューブに回収し、10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム、250 μ l の 100% エタノールを加えた後、-80°C で 10 分間静置した。その後 15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、上清を除去した。1 ml の 70% エタノールを加えて沈殿を洗浄し、15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清を除去し、風乾により沈殿を乾燥させた後、15 μ l の DW (1% RNase Inhibitor) に溶解させ、分光光度計で RNA の濃度および純度を確認した。

2.2.7. cDNA 合成

DNase 処理および精製後の RNA を用いて cDNA 合成反応を行った。DNase 処理をした RNA 溶液を用いて cDNA 合成反応を行った。cDNA の合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を利用した。反応は 10 μ l の容量で行い、RNA 500 ng 相当量の RNA 溶液、1 μ l の 10x RT Buffer、0.4 μ l の 25x dNTP Mix (100 mM)、1 μ l の RT Random Primers、0.5 μ l の MultiScribe™ Reverse Transcriptase を加えた後、容量が 10 μ l となるまで DW を加えた。反応時間は、25°C・10 分、37°C・120 分を 1 サイクルとした。

2.2.8. RT-PCR

RT-PCR は、*EXA1* ホモログ遺伝子もしくはコントロールとなる標準遺伝子の mRNA 検出に用いた。反応系は次のようである。前項の cDNA 合成産物 1 μ l、20 μ l の 2x PCR buffer for KOD FX (TOYOBO)、8 μ l の dNTPs (2 mM)、それぞれ 1.2 μ l の Forward/Reverse Primer (5 μ M)、0.8 μ l の KOD FX (TOYOBO) を加えた後、容量が 40 μ L となるまで DW を加えた。反応時間は、94°C・2 分、(98°C・10 秒、55°C・30 秒、68°C・1 分)を 1 サイクルとして 35 サイクル、続いて 68°C・7 分とした。プライマーは表 2-1.に記載のものを用いた。*NbEXA1*、*OsEXA1*、*SIEXA1* の検出には、それぞれ *NbEXA1*-rt12F/*Nt-NbEXA1*-5451R、*Bm-OsEXA1*-F/*OsEXA1*-1480R、*Kp-SIEXA1*-5U-F/*SIEXA1g*-3301R のプライマーセットを用いた。

また、トマトにおける tobacco rattle virus (TRV) の検出には、SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) のキットを用いた。反応系は次の通りである。前々項の DNase 処理後の RNA 100 ng、10 μ l の 2x Reaction Mix、それぞれ 1.0 μ l の Forward/Reverse Primer (5 μ M)、0.8 μ l の SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix を加えた後、容量が 20 μ L となるまで DW を加えた。反応時間は、55°C・30 分、94°C・2 分、(94°C・15 秒、55°C・30 秒、68°C・1 分)を 1 サイクルとして 35 サイクル、続いて 68°C・5 分とした。プライマーは表 2-1.に記載のプライマーセット TRV-F/R を用いた。

2.2.9. 定量 RT-PCR

前々項の cDNA 合成反応液を DW で 50 倍希釈し、定量 RT-PCR に供試した。プライマーは表 2-1.に記載のものを用いた。*N. benthamiana* およびトマトにおける定量には、それぞれ *Nb18S* rRNA または *SIActin* を標準遺伝子として用いた。反応は 20 μ l の容量で行い、5 μ l

の 50 倍希釈 cDNA 溶液、0.8 μ l のプライマー (5 μ M、各遺伝子について Forward と Reverse の 2 種類ずつ)、10 μ l の SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を加えた後、容量が 20 μ l となるように DW を加えた。定量 RT-PCR 用の機器は Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いた。反応時間は、95°C・30 秒、(95°C・5 秒、60°C・30 秒) を 1 サイクルとして 40 サイクル、続いて 95°C・15 秒、60°C・30 秒、95°C・15 秒とした。

2.2.10. プラスミドの構築

まずウイルスの感染性 cDNA クローンを構築した。ポテックスウイルス属ウイルスである *Alternanthera mosaic virus* (AltMV)、*CymMV*、*Hydrangea ringspot virus* (HdRSV) およびピロウイルス属ウイルスである LoLV の完全長 cDNA 配列 (Iwabuchi *et al.*, 2016; Keima *et al.*, 2017; Yusa *et al.*, 2016; Vaira *et al.*, 2008) を、それぞれ表 2-1. 記載のプライマーセット AltMV-1F/KpGR3nest、CymMV-1F/KpGR3nest、HdRSV-24F/KpGR3nest、Lol-1F/Lol-7650R-polyA40 を用いて PCR 増幅した。次に、AltMV、CymMV、HdRSV については、plum pox virus の感染性 cDNA クローンベクターである pPPVOu (Maejima *et al.*, 2014) を鋳型として、バイナリーベクター pCAMBIA 1301 の 35S プロモーター配列と各ウイルスゲノムの 5' 末端配列を含む DNA 断片を PCR 増幅した。それぞれ表 2-1. 記載のプライマーセット KpGR3nesF/Alt35SR、KpGR3nesF/CymMV_35S_R、KpGR3nesF/Hd35SR を用いた。また LoLV については、ポリ A 配列と pCAMBIA 1301 の NOS ターミネーター配列を連結させた DNA 断片を、表 2-1. 記載のプライマーセット 20polyA-NOS/Lol35SR を用いて PCR 増幅した。5' 末端配列と 3' 末端配列が相同な各 DNA 断片を用いて相同組み換え反応により、pCAMBIA 1301 の 35S プロモーターから NOS ターミネーター間に各ウイルスの完全長

cDNA 配列が組み込まれたバイナリーベクター pAltMV、pCymMV、pHdRSV、pLoLV をそれぞれ得た。この反応には GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen) を用い、プロトコールはキットに記載のものに従った。

続いて、*EXA1* ホモログ遺伝子の全長ゲノム配列をバイナリーベクターへ導入した。*N. benthamiana*、イネもしくはまたはトマトから抽出したゲノム DNA を鋳型として、*NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SlEXA1* 全長配列を、*NbEXA1-F/NbEXA1-R*、*Bm-OsEXA1-F/Nt-OsEXA1-R*、または *Kp-SlEXA1-5U-F/Nt-SlEXA1-R* のプライマーセットをそれぞれ用いることで PCR 増幅した。各 DNA 断片に制限酵素処理を行った後、Gateway エントリーベクター pENTA (Himeno *et al.*, 2010) にライゲーション反応により導入した。なお得られた DNA 断片のうち、*NbEXA1a* および *SlEXA1* については pENTA のマルチクローニングサイト内の *KpnI* と *NotI* 認識配列間の領域に、*OsEXA1* については *BamHI* と *NotI* 認識配列間の領域に導入した。続いて Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を用いることで、*att* 配列間の相同組み換え反応により、各 *EXA1* ホモログ配列を pENTA からバイナリーベクター pEarleyGate 100 (Earley *et al.*, 2006) へ導入した。これにより、p35S-*NbEXA1ag*、p35S-*OsEXA1g*、p35S-*SlEXA1g* をそれぞれ得た。

さらに *NbEXA1* 発現抑制 *N. benthamiana* の作出を目的として、apple latent spherical virus (ALSV) の VIGS 用バイナリーベクター pCAM-ALSV1、pCAM-ALSV2 を用いた (Kitazawa *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2004; Yamagishi *et al.*, 2011)。このうち後者のベクターに *NbEXA1* の配列断片を導入した。*Xh-NbEXA1-268F/Bm-NbEXA1-567R* のプライマーセットを用い、*N. benthamiana* の抽出 DNA を鋳型とした PCR により得られた DNA 断片を pCAM-ALSV2 マルチクローニングサイト内の *XhoI* と *BamHI* 認識配列間の領域に導入し、

pCAM-ALSV2-*NbEXA1a*を得た。また *SlEXA1* 発現抑制トマトの作出を目的として、TRV の VIGS 用バイナリーベクター pTRV1、pTRV2 を用いた (Liu *et al.*, 2002)。このうち後者のベクターに *SlEXA1* の配列断片を導入した。*Xh-SlEXA1-865F/Bm-NbEXA1-1365R* のプライマーセットを用い、トマトの抽出 DNA を鋳型とした PCR により得られた DNA 断片を pTRV2 マルチクローニングサイト内の *Xho* I と *Bam*H I 認識配列間の領域に導入し、pTRV2-*SlEXA1* を得た。

2.2.11. アグロインフィルトレーション法

アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) は Ti プラスミド上に座乗する T-DNA 領域を植物細胞内の核ゲノム中に組み込む性質を有する。この性質を利用して、T-DNA 領域に任意の配列を導入することで、アグロバクテリウムを介して目的遺伝子を植物細胞内で一過的に発現させることができる (本論文では、この手法を「アグロインフィルトレーション法」と呼称する)。本研究では、*N. benthamiana* における ALSV の接種や EXA1 ホモログの機能相補性の検証、あるいはトマトにおける TRV の接種のためにアグロインフィルトレーション法を利用した。その方法は次の通りである。

まず、バイナリーベクター形質転換用のアグロバクテリウムコンピテントセルを作製した。手順は次のようである。-80°C 保存のアグロバクテリウム EHA105 菌株のグリセロールストックを、2x YT 液体培地で菌液の濁度が OD₆₀₀ = 0.5 (OD; optical density) 程度になるまで 28°C で振盪培養した。その後、培養液を水中で 10 分間静置し、3,000 x g、室温で 5 分間遠心し、集菌した。上清を除去し、沈殿に 5 ml の 20 mM CaCl₂ を加えてボルテックスにより攪拌した後、3,000 x g、室温で 5 分間遠心し、集菌した。上清を除去し、500 µl の 20 mM CaCl₂ を加

えて沈殿を溶解させ、コンピテントセルストックを作製した。

続いて、作製したコンピテントセルにバイナリーベクターを形質転換した。この際、アグロバクテリウムへの形質転換は、freeze-thaw 法により行った (An, 1995)。すなわち、10 μ l のコンピテントセルに対し、形質転換するバイナリーベクターを 1 μ l 程度加え、液体窒素により 1 分間急冷した後、100 μ l の SOC 培地を加えて 28°C で 3 時間振盪培養した。培養後、カナマイシンを添加した LB 固形培地上に塗布し、28°C で 48 時間静置・培養した。

固形培地上に形成された形質転換アグロバクテリウムの単一コロニーをピックアップし、3 ml のカナマイシン入りの 2x YT 液体培地で 28°C・一晩振盪培養した。その後、3,000 x g、室温で 10 分間遠心して菌体を沈殿させた。上清を除去し、菌体をアグロインフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.7), 150 μ M アセトシリゴン) に再懸濁させた。懸濁液の OD₆₀₀ 値を分光光度形により計測し、懸濁液をアグロインフィルトレーションバッファーで希釈した。*N. benthamiana* に ALSV を接種する場合は OD₆₀₀ 値を 0.5 に、それ以外の場合は 1.0 に調整した。その後懸濁液を遮光し、室温で 3 時間程度静置した後、先端に針のついていない 1 ml シリンジを用いて *N. benthamiana* 展開葉の背軸側から菌液を注入した。またトマトにおいては、播種から 1 週間程度育成した個体を用い、子葉の背軸側から菌液を注入した。なお、アグロインフィルトレーションに用いるアグロバクテリウムに形質転換を行ったバイナリーベクターは次の通りである。*N. benthamiana* への ALSV の接種に用いた pCAM-ALSV1、pCAM-ALSV2、pCAM-ALSV2-*NbEXA1a*、pBin-P19 (一過的発現系を安定化させるための因子をコードするベクター)、トマトへの TRV の接種に用いた pTRV1、pTRV2、pTRV2-*SlEXA1*、*N. benthamiana* におけるその他ウイルスの接種に用いた pAltMV、pCymMV、pHdRSV、pLoLV、pWCIMV (white clover mosaic virus (WCIMV) の

感染性 cDNA クローンベクター、Ido *et al.*, 2012)、pPIAMV-GFP (Minato *et al.*, 2014)、pPVX-GFP (Komatsu *et al.*, 2010)、p53U-RdRp (Komatsu *et al.*, 2011)、EXA1 ホモログの相補性検証に用いた p35S-*NbEXA1ag*、p35S-*OsEXA1g*、p35S-*SlEXA1g*。 *N. benthamiana* への ALSV の接種には、pBin-P19、pCAM-ALSV1 に加え、pCAM-ALSV2 もしくは pCAM-ALSV2-*NbEXA1a* をそれぞれ形質転換したアグロバクテリウムの菌液を 1:1:1 の液量比で混合して用いた。トマトへの TRV の接種には、pTRV1 と、pTRV2 もしくは pTRV2-*SlEXA1* をそれぞれ形質転換したアグロバクテリウムの菌液を 1:1 の液量比で混合して用いた。

2.2.12. ウイルスの機械接種

機械接種を行った植物は、*N. benthamiana* およびトマト(品種:Brandywine black)である。前項のアグロインフィルトレーション法により PIAMV-GFP、PepMV、potato virus M (PVM) もしくは youcai mosaic virus (YoMV) (Yamaji *et al.*, 2006) を感染させた *N. benthamiana* の葉 0.2 g に対して 1 ml の 0.1M リン酸バッファー (pH 7.0) を加え、乳鉢内で摩砕した。得られた摩砕液にカーボランダムを加えたものを接種源とし、市販の綿棒を用いて、展開葉の向軸面になるべく葉柄と並行の方向に擦ることで接種を行った。

2.2.13. アラインメントおよび系統解析

EXA1 ホモログのタンパク質配列をもとに、ソフトウェア GeneDoc 2.6 を用いてアラインメント解析を行った。また、同様にソフトウェア MEGA 6.06 を用いて系統解析を行った。どちらの解析においても、タンパク質配列のマルチプルアラインメントは MUSCLE

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) のプログラムを使用した。なお、GYF ドメインおよび eIF4E 結合モチーフのコンセンサス配列の描写には、WebLogo3 アプリケーション (<http://weblogo.threepiusone.com/>) を用いた。

表 2-1. プライマー配列とその用途

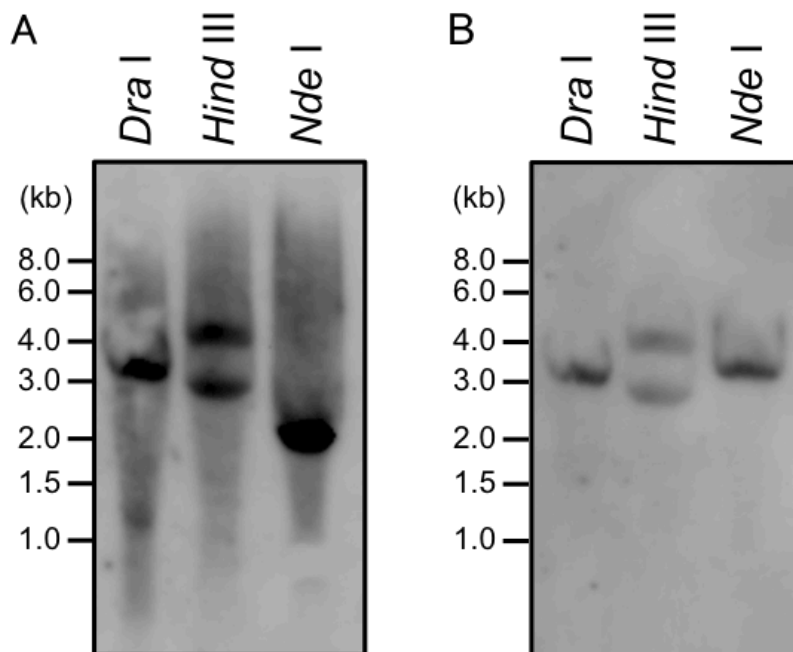
プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	用途
qRT-PCR		
Nb18S-193F	ATACGTGCAACAAACCCGAC	qRT-PCR for Nb18S rRNA
Nb18S-280R	TGAATCATCGCAGCAACGG	qRT-PCR for Nb18S rRNA
NbEXA1-r112F	AAGTGGATGACGATCTGTTCTGG	qRT-PCR for NbEXA1 mRNA, and Detection for mRNA of NbEXA1
NbEXA1-r112R	TCCTTCACTGGGTGGTCTTGG	qRT-PCR for NbEXA1 mRNA
SlEXA1-r1F	TGGAGGACGATTGTTTTGG	qRT-PCR for SlEXA1 mRNA
SlEXA1-r1R	TTCCCACACTGCCTTGACTT	qRT-PCR for SlEXA1 mRNA
PIRep-F3	AATCCCAGACTTCCATGAGCACC	qRT-PCR for PIAMV
PIRep-R3	TTTTCTTTGCGCCGAGCTTCTC	qRT-PCR for PIAMV
PVXCP-159F	CGCAACAAATGAGGACCTCAGCAAG	qRT-PCR for PVX-CP
PVXCP-239R	GCAGCCTGTGCCATAGTGTCTGTG	qRT-PCR for PVX-CP
WCIMV-5636F	GTCCTTCCGAAGCTGAACTCTTAG	qRT-PCR for WCIMV
WCIMV-5717R	TTAGTGCCACGGCGTTTTG	qRT-PCR for WCIMV
HdRSV-r11F	ACAGTGGGTGAAGAAAATGGAGA	qRT-PCR for HdRSV
HdRSV-r11R	CGCGCTGTGTTGGAAATG	qRT-PCR for HdRSV
PepMV-r1F	GACTTCTCAAATCTAATACAGC	qRT-PCR for PepMV
PepMV-r1R	CACATCAGCATAAGCAGCAGC	qRT-PCR for PepMV
CymMV-r16F	CCCCGAGGATGTTATAGAAGGA	qRT-PCR for CymMV
CymMV-r16R	GGTATCTGGTGCGGTTGTAGG	qRT-PCR for CymMV
AltMV-r12280F	CCCACCTCCCTTTCTCC	qRT-PCR for AltMV
AltMV-r12245R	ATTGGCGTTGACCACTCTCC	qRT-PCR for AltMV
LoLV-r17F	CAGCAATGCGAGGGACTATCTAC	qRT-PCR for LoLV
LoLV-r17R	TGTCCGGGTTTTGAGTTGG	qRT-PCR for LoLV
PVM-r1F	GTCCACCCCAAGAGAGAAAG	qRT-PCR for PVM
PVM-r1R	TCAGCATTGAGCGAACTAAACAC	qRT-PCR for PVM
TMV-r183K-2048F	CGGCAGATTCTGTTAAATTCGT	qRT-PCR for YoMV
TMV-r183K-2165R	GACACCGCAGCAGATAGTGA	qRT-PCR for YoMV
plasmid construction		
Xh-NbEXA1-268F	CCGCTCGAGGAACCCGGTGCAGCTGACCG	Construction for pCAM-ALSV-NbEXA1, and PCR for DIG probe
Bm-NbEXA1-567R	CGCGGATCCTTTGCTAGGGTTGATCCATTCC	Construction for pCAM-ALSV-NbEXA1, and PCR for DIG probe
Xh-SlEXA1-865F	CCGCTCGAGGCGTGAAGGTGTTTCCCTCCTCC	Construction for pTRV2-SlEXA1
Bm-SlEXA1-1365R	CGCGGATCCTTAGCCGGCAGATGTGAAC	Construction for pTRV2-SlEXA1
NbEXA1-F	GACTGGATCCGGTACATGGGTGACAAAGCTGAATTC	Construction for p35S-NbEXA1g
NbEXA1-R	TCTCGAGTCCGGCCGCTAATCTTCCACAGCTGAATC	Construction for p35S-NbEXA1g
Kp-SlEXA1-5U-F	CGGGGTACCAGACTTCTTCTCCCTTCTCC	Construction for p35S-SlEXA1g, and Detection for mRNA of SlEXA1
Nt-SlEXA1-R	ATAGTTTAGCGCGCGCAATGAACCCACCTCAGCTAAAG	Construction for p35S-SlEXA1g
Bm-OsEXA1-F	CGCGGATCCATGGCCGCGACTCCGGACCGCGCCAT	Construction for p35S-OsEXA1g, and Detection for mRNA of OsEXA1
Nt-OsEXA1-R	ATAGTTTAGCGCGCGCACTAATCTTCCACGTTCTGGATCTCA	Construction for p35S-OsEXA1g
AltMV-1F	GAAAAGTAAAGCAAAGCAAAGC	Construction for pCAM-AltMV
Alt35SR	GCTTTGCTTTGCTTTACTTTTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC	Construction for pCAM-AltMV
CymMV-1F	GAAAACCAAACCTCACGTCT	Construction for pCAM-CymMV
CymMV-35S-R	AGACGTGAGGTTGGTTTTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC	Construction for pCAM-CymMV
Hd24F	GAAAAGTCCACACCCAAACCAA	Construction for pCAM-HdRSV
Hd35SR	GTTTGGGTGTGGAACTTTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC	Construction for pCAM-HdRSV
LoLV-1F	GAAAACCAAACCAACCAACACCAGC	Construction for pCAM-LoLV
LoLV-7650R-polyA40	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTACGCGCAAAACCGAGGGTGT	Construction for pCAM-LoLV
20polyA-NOS	AAAAAAAAAAAAAAAAAACCGTTACGTAGCGGTACCCC	Construction for pCAM-LoLV
LoLV35SR	GGTGTGGTTGGTTGGTTTTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC	Construction for pCAM-LoLV
KpGR3nest	GGGGTACCGCTACGTACGGCATGACAGTG	Construction for pCAM-AltMV, CymMV, HdRSV and LoLV
KpGR3nesF	CCGTTACGTAGCGGTACCCCTCAAACATTTGCAATAAA	inverse-PCR for pCAMBIA1301
RT-PCR		
Nt-NbEXA1-5451R	ATAGTTTAGCGCGCGCACTAATCTTCCACAGCTGTAATC	Detection for mRNA of NbEXA1
SlEXA1g-3301R	CGGATGTGCATTGAGATGGT	Detection for mRNA of SlEXA1
OsEXA1-1480R	GATCTTGTAAATATAAGATAAG	Detection for mRNA of OsEXA1
TRV-F	GCTGCTAGTTCCATCTGCAC	Detection for TRV
TRV-R	GCACGGATCTACTTAAAGAAC	Detection for TRV
Southern blot analysis		
NbEXA1g-5015F	TACAGAAATGGGAAGAGATTTCC	PCR for GYF domain-specific DIG probe
NbEXA1g-5500R	GCCTCCGTTGCTGAATGC	PCR for GYF domain-specific DIG probe

第 3 章 結果

3.1. *N. benthamiana* は *EXA1* ホモログ遺伝子を 2 つコードする

まず *N. benthamiana* のゲノムにコードされる *EXA1* ホモログを同定する目的で、シロイヌナズナの *EXA1* ホモログ *AtEXA1* のアミノ酸配列をクエリーとして *N. benthamiana* のゲノム配列 (Bombarely *et al.*, 2012) に対して tBLASTN 検索を行った。その結果、*AtEXA1* と同一性の高く、互いに独立したコンティグ (Niben101Scf04831Ctg001 、 Niben101Scf01371Ctg001) に座する 2 つの遺伝子が *EXA1* ホモログ遺伝子候補として予測された。この結果を確かめるべく、予測された遺伝子のうちコンティグ Niben101Scf04831Ctg001 に座する遺伝子の 2 つの領域に設計したプローブを用いてサザンブロット解析を行った。なおこの領域は、コード領域の 5' 末端側配列 300 bp と、GYF ドメインに相当する配列であり、2 遺伝子間での同一性はそれぞれ 98.3%、97.7% であった。その結果、どちらのプローブを用いても 2 つのゲノム上の領域がプローブと反応していた (図 2-1-1)。以上のことから、*N. benthamiana* ゲノムには *EXA1* ホモログ遺伝子が 2 つコードされることが明らかとなった。以降 Niben101Scf04831Ctg001、Niben101Scf01371Ctg001 に座する *EXA1* ホモログ遺伝子をそれぞれ *NbEXA1a*、*NbEXA1b* と呼称することとした。この 2 遺伝子はイントロンを含んだ全長ゲノム配列で 92.8% の高い同一性を有することから、互いの遺伝子を独立に定量するための特異的 PCR プライマーを設計することは困難であった。そのため、まずこの 2 遺伝子の mRNA を検出するため、先のプローブ設計に用いた 5' 末端側配列に相同なプライマーを用いて RT-PCR 反応を行った。RT-PCR 産物をクローニングし、シーケンス解析によりその配列を解読したところ、解読を行った 50 以上のクローンすべ

てが *NbEXA1a* の配列と同一であることが明らかとなった。このことから、*NbEXA1a* の mRNA の転写量は *NbEXA1b* に比べて極端に多く、*NbEXA1b* の mRNA はこの系では検出限界以下であると判断した。続いて、*NbEXA1a* の全長ゲノム配列の解読を行った。*NbEXA1a* は 1,714 アミノ酸からなり、*AtEXA1* との相同性は 45.1%であった。また *AtEXA1* と同様に eIF4E 結合モチーフと GYF ドメインが予測され、それはそれぞれ *NbEXA1a* の 3 番エクソン、6 番エクソンに相当する領域に相当していた(図 2-1-2)。すなわち、*NbEXA1a* は *AtEXA1* と同様のドメイン構造を有していることが明らかとなった。以降では、*NbEXA1a* と



NbEXA1b を総称して *NbEXA1* と扱うことにした。

図 2-1-1. サザンブロット解析による *N. benthamiana* のコードする *EXA1* ホモログ遺伝子の検出

(A) N 末端側配列の 300 bp 領域のプロープを用いた結果

(B) GYF ドメインに相当する配列領域のプロープを用いた結果

図の上部の各レーンは、ゲノム DNA の消化に用いた制限酵素を示す。また図の左側は泳動

に用いたマーカーの位置を示す。



図 2-1-2. *NbEXA1a* の cDNA 構造図

山部位はイントロン、黒色領域はエキソンを示す。また eIF4E 結合モチーフおよび GYF ドメインは縞模様で、VIGS の標的領域かつプローブの標的領域、および定量 RT-PCR 増幅領域は下線で示した。

3.2. *NbEXA1* のウイルス感染における機能は *AtEXA1* と類似している

続いて、*AtEXA1* と同様のドメイン構造を持つ *NbEXA1* がウイルス感染とどう関わるか調べた。*N. benthamiana* において *NbEXA1* の発現を抑制するため、ALSV による VIGS 系を利用した。*NbEXA1* コード領域の 5'末端配列 300 bp を ALSV ベクターのマルチクローニングサイト内に導入した。この 300 bp の領域は前述の通り、*NbEXA1a* と *NbEXA1b* の間で 98.3% 同一であるため、この領域を用いることで両者を同時に発現抑制することが可能であると考えた。*NbEXA1a* の部分配列を有する ALSV (*ALSV-NbEXA1a*) を接種することで、*NbEXA1* の発現抑制個体を作成した。この項では、以降の実験の対照区として、野生型の ALSV を接種した個体を用いることとした。接種 27 日後において、*ALSV-NbEXA1a* を接種した植物は、野生型の ALSV 接種植物と比較して表現型に違いは見られなかった(図 2-2-1A)。また、

NbEXA1 の発現量について調べるため、ウイルスを接種した個体から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR に供試した。その結果、ALSV-*NbEXA1a* 接种植物では、対照区と比較して *NbEXA1* の発現量が有意に減少していた(図 2-2-1B)。

次に、*NbEXA1* のウイルス感染における役割について示唆を得るため、作出した *NbEXA1* 発現抑制個体に、感染の可視化のため GFP を導入した 2 種のポテックスウイルス PIAMV-GFP または PVX-GFP を、非接種上葉にアグロインフィルトレーション法により接種した。対照区の個体では、PIAMV-GFP と PVX-GFP の感染を示す明瞭な GFP 蛍光が認められた。一方、*NbEXA1* 発現抑制個体では両ウイルスの GFP 蛍光が弱くなっていた(図 2-2-2)。ウイルス RNA の蓄積量について調べるため、アグロインフィルトレーション法によりウイルスを接種した領域から RNA 抽出を行い、定量 RT-PCR に供試した。その結果、対照区と比較して、*NbEXA1* 発現抑制個体では PIAMV-GFP、PVX-GFP の蓄積量が接種葉においてともに有意に減少していた(図 2-2-3)。また *NbEXA1* の発現抑制により、ウイルスの接種に用いたアグロバクテリウムの感染に影響が出た可能性を考え、次に PIAMV-GFP を機械接種した。その結果、アグロインフィルトレーション法の場合と同様に、対照区と比較して *NbEXA1* 発現抑制個体ではウイルス由来の GFP 蛍光が弱くなっており、また定量 RT-PCR による解析により PIAMV-GFP の RNA 蓄積量も有意に減少していた(図 2-2-4)。従って、*NbEXA1* 発現抑制はアグロバクテリウムの感染には影響を与えず、PIAMV および PVX のウイルス RNA 蓄積に負の影響を与えたと考えられた。以上より、*NbEXA1* は PIAMV と PVX の *N. benthamiana* における効率的な蓄積に必要であることが示された。

これまでの解析により、PIAMV と PVX の効率的な蓄積に対する *NbEXA1* の必要性は示されたが、初期感染細胞における増殖や細胞間移行などウイルス感染のどの過程において

NbEXA1 が機能するのかについては不明であった。既報において、PIAMV の複製酵素 RdRp と 5'末端および 3'末端の非翻訳領域のみを有し、細胞間移行を行わないウイルス複製の最小単位である 53U-RdRp を用いた解析によって、シロイヌナズナの EXA1 ホモログ AtEXA1 は単細胞レベルで PIAMV の RNA 蓄積に影響を与えることが示されている (Hashimoto *et al.*, 2016b)。そこで、NbEXA1 がウイルスの初期感染細胞における増殖に影響を与えるか調べるため、NbEXA1 発現抑制個体においてアグロインフィルトレーション法により 53U-RdRp を一過的に発現させた。その結果、対照区の個体では 53U-RdRp を発現させた領域で壊死が見られたのに対し、NbEXA1 発現抑制個体では壊死がほとんど見られなかった(図 2-2-5A)。この壊死については、*N. benthamiana*において 53U-RdRp を一過的に発現させた場合、RdRp が初めに転写されたもしくは複製後の mRNA から過剰に産生されることに起因する (Komatsu *et al.*, 2011)。これを確かめるべく、53U-RdRp 発現領域から抽出した RNA を供試して定量 RT-PCR を行った結果、対照区と比較して、NbEXA1 発現抑制区では 53U-RdRp の RNA 蓄積量が有意に減少していた(図 2-2-5B)。これらの結果から、AtEXA1 同様、NbEXA1 は PIAMV の初期感染細胞における増殖に関与するということが明らかとなった。

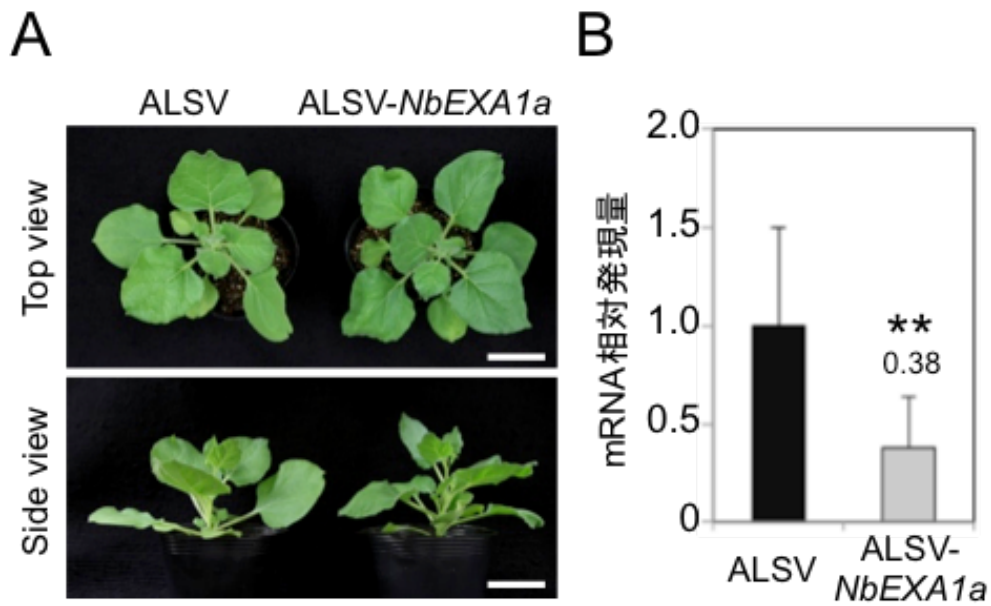


図 2-2-1. ALSV または ALSV-*NbEXA1a* 接種個体の表現型および *NbEXA1* 発現量

(A) 接種 27 日後の植物の様子。上 (Top view) または横 (Side view) から撮影した。バーは 5 cm を表す。

(B) ALSV または ALSV-*NbEXA1a* 接種個体における *NbEXA1* 相対発現量。接種 27 日後の植物より抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR により解析した。ALSV 接種区の平均値を 1 とした時の値を表し、ALSV-*NbEXA1a* 接種区の平均値を棒グラフの上の数値で表した。エラーバーは供試した各 10 サンプルの標準偏差を表す。** $P < 0.01$ (Student's *t*-test)。

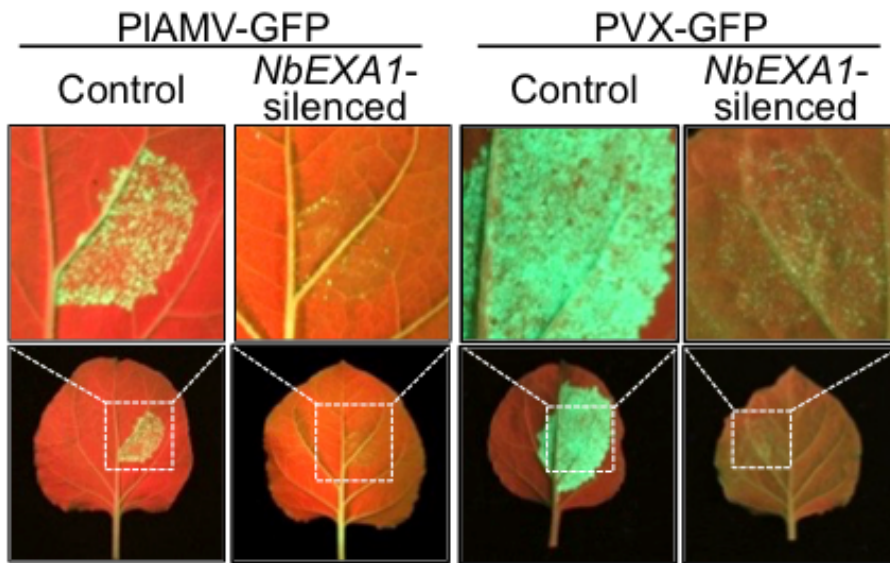


図 2-2-2. コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体におけるウイルス由来の GFP 蛍光
(アグロインフィルトレーション法)

PIAMV-GFP ないしは PVX-GFP を、コントロール(ALSV 接種)または *NbEXA1a* 発現抑制
(ALSV-*NbEXA1a* 接種)個体でアグロインフィルトレーション法により一過的に発現させた。

上の各図は下の図の拡大図である。PIAMV-GFP については接種 6 日後、PVX-GFP につい
ては接種 4 日後にそれぞれ紫外光照射下で撮影した。

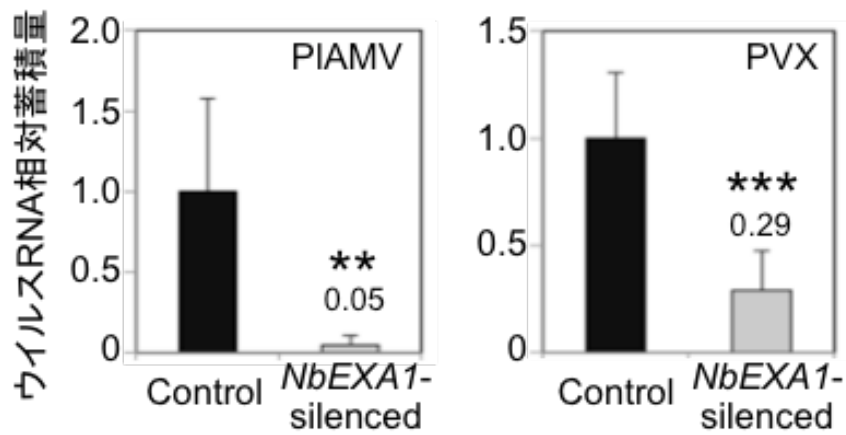


図 2-2-3. コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体におけるウイルス RNA 相対蓄積量

図 2-3-2 における PIAMV-GFP または PVX-GFP のウイルス RNA 相対蓄積量。PIAMV-GFP または PVX-GFP の接種葉より抽出した RNA を供試して定量 RT-PCR により解析した。各ウイルスについて、コントロール区の平均値を 1 とした時の値を表し、*NbEXA1a* 発現抑制区の平均値を棒グラフの上の数値でそれぞれ表した。エラーバーは供試した 6 サンプル (PIAMV-GFP) または 15 サンプル (PVX-GFP) の標準偏差を表す。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)。

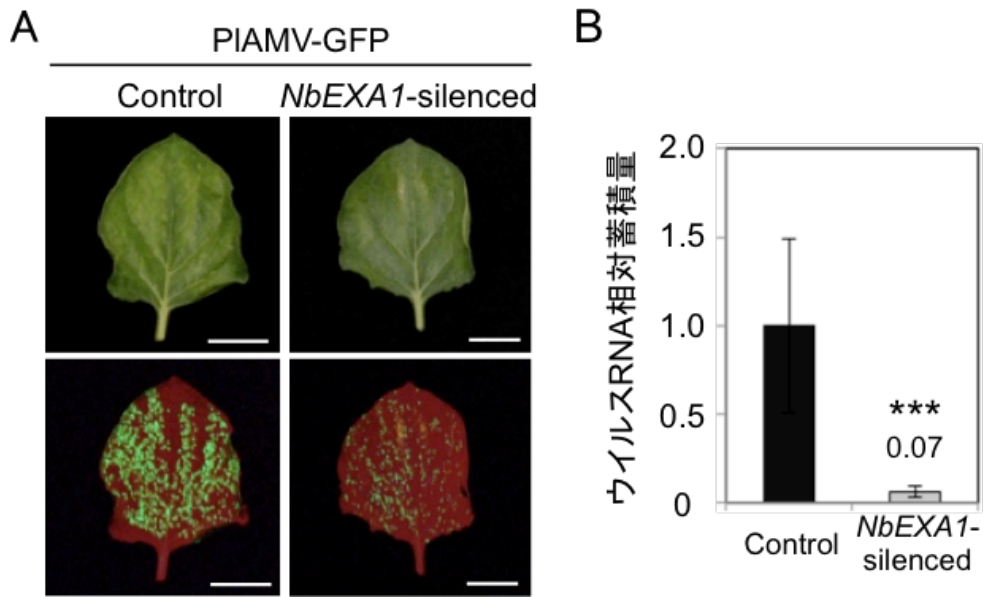


図 2-2-4. コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体におけるウイルス由来の GFP 蛍光 (機械接種) およびウイルス RNA の相対蓄積量

(A) コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体に PIAMV-GFP を機械接種した。ウイルス由来の GFP 蛍光は接種 4 日後に紫外光照射下で撮影した。

(B) コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体における PIAMV-GFP の RNA 蓄積量。(A) の接種葉より抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR により解析した。コントロール区の平均値を 1 とした時の値を表し、*NbEXA1a* 発現抑制区区の平均値を棒グラフの上の数値でそれぞれ表した。エラーバーは供試した 8 サンプルの標準偏差を表す。*** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)。

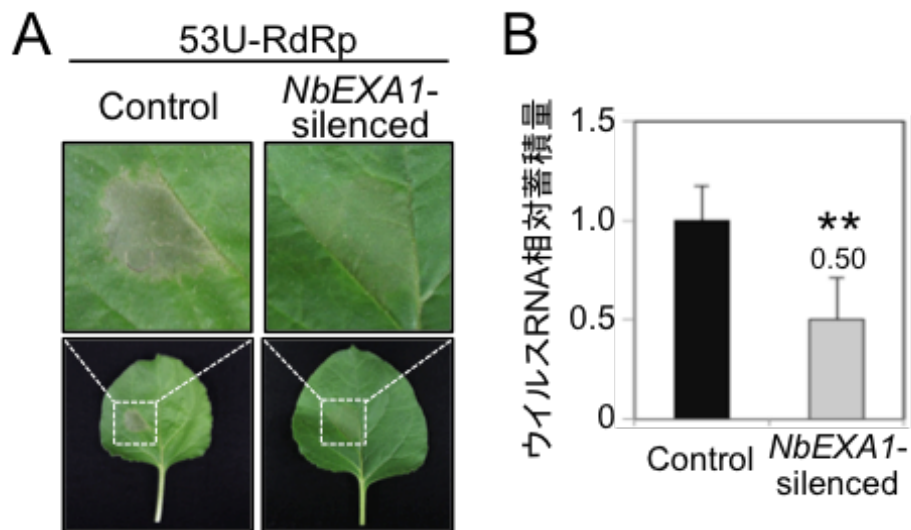


図 2-2-5. 53U-RdRp を発現させた葉の様子と 53U-RdRp の RNA 相対蓄積量

(A)コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体においてアグロインフィルトレーション法により 53U-RdRp を発現させた接種 4 日後の接種葉。

(B)コントロールまたは *NbEXA1a* 発現抑制個体における 53U-RdRp の RNA 相対蓄積量。

(A)の接種葉より抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR により解析した。コントロール区の平均値を 1 とした時の値を表し、*NbEXA1a* 発現抑制区の平均値を棒グラフの上の数値でそれぞれ表した。エラーバーは供試した 4 サンプルの標準偏差を表す。** $P < 0.01$ (Student's *t*-test)。

3.3. NbEXA1 はポテックスウイルス属ウイルスとロラウイルス属ウイルスの感染に必要である

これまでの解析により、NbEXA1 は PIAMV と PVX の 2 種ウイルスの蓄積に必要であることが示されている。そこで、他種ポテックスウイルス属ウイルスや、近縁な他属ウイルスについても NbEXA1 を感染時に利用するかどうか調べた。*N. benthamiana* に感染するウイルスのうち、アルファフレキシウイルス科より、ポテックスウイルス属ウイルスの AltMV、CymMV、HdRSV、PepMV、WCIMV を、ポテックスウイルス属ウイルスに最も近縁なロラウイルス属ウイルスの LoLV、またベータフレキシウイルス科より、カルラウイルス属ウイルスの PVM を対象とした。さらに、これらウイルスとは遠縁なビルガウイルス科トバモウイルス属ウイルス YoMV も含め、計 8 種のウイルスについて解析を行った。すなわち、これらのウイルスを対照区個体および NbEXA1 発現抑制個体に接種し、試験区間で定量 RT-PCR により蓄積量を比較した。その結果、ポテックスウイルス属ウイルスの AltMV、CymMV、HdRSV、PepMV、WCIMV の RNA 蓄積量は、対照区と比較して NbEXA1 発現抑制区において有意に減少していた(図 2-3A)。また、ロラウイルス属ウイルスの LoLV の RNA 蓄積量も、対照区と比較して有意な減少が認められた(図 2-3B)。一方、カルラウイルス属ウイルスの PVM については、対照区と比べて RNA 蓄積量は減少傾向にはあるものの、有意な差は認められなかった(図 2-3C)。さらに、トバモウイルス属ウイルスの YoMV については、両区で RNA 蓄積量にほとんど差が認められなかった(図 2-3D)。このことから、NbEXA1 はポテックスウイルス属ウイルスとロラウイルス属ウイルスの *N. benthamiana* における効率的な蓄積に必要であることが示された。

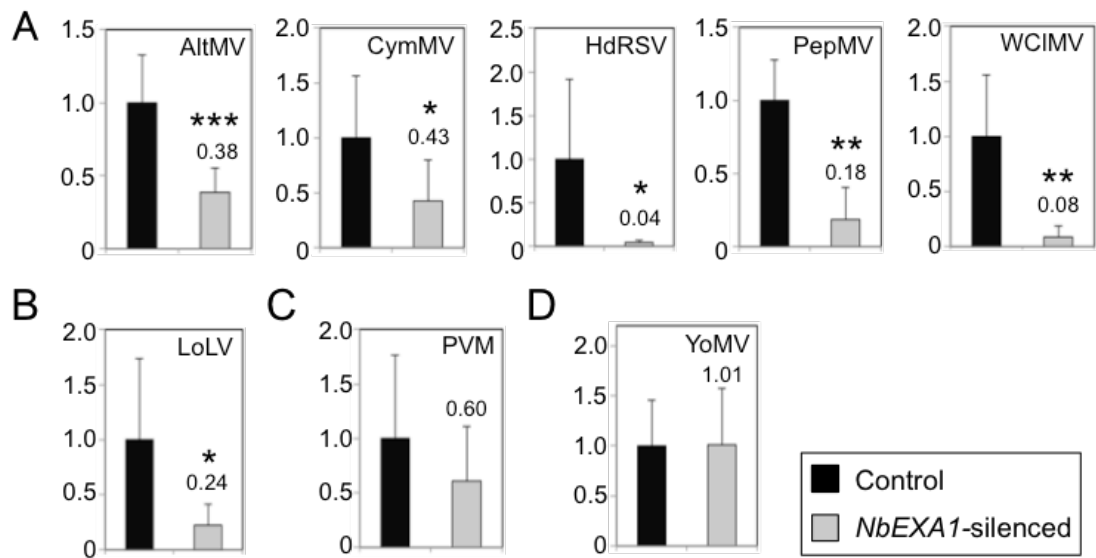


図 2-3. コントロールまたは NbEXA1a 発現抑制個体におけるウイルス RNA の相対蓄積量

(A) Potexvirus 属ウイルス (AltMV、CymMV、HdRSV、PepMV、WCIMV)

(B) Lolavirus 属ウイルス (LoLV)

(C) Carlavirus 属ウイルス (PVM)

(D) Tobamovirus 属ウイルス (YoMV)

各ウイルスを機械接種した葉から抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR により解析した。

AltMV、CymMV、HdRSV、PepMV、YoMV は接種 4 日後、LoLV は接種 5 日後、WCIMV は

接種 8 日後にそれぞれ RNA 抽出に供試した。各図の値はコントロール区の平均値を 1 とし

た時の値を表し、NbEXA1a 発現抑制区の平均値を棒グラフの上の数値でそれぞれ表した。

エラーバーは供試した 8 サンプルの標準偏差を表す。なお、PepMV については 4 サンプルを

供試した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)。

3.4. NbEXA1 のウイルス感染に関する機能はイネとトマトの EXA1 ホモログによって相補される

既報では、EXA1 ホモログ遺伝子が単子葉植物および双子葉植物のゲノムにコードされることが予測されている (Hashimoto *et al.*, 2016b)。そこで、*N. benthamiana* 以外の植物、特に作物がコードする EXA1 ホモログが NbEXA1 の機能を相補可能かどうか検証した。対象とした作物は、単子葉植物および双子葉植物からそれぞれイネ、トマトである。Phytozome database v. 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) におけるゲノム情報から予測される EXA1 ホモログ遺伝子は、イネおよびトマトそれぞれ 1 コピーずつであり、以降それぞれ *OsEXA1*、*SlEXA1* と呼称することとした。*OsEXA1* および *SlEXA1* のアミノ酸配列の相同性は、NbEXA1a に対してそれぞれ 33.8%、79.2%であった (表 2-2)。まず、*OsEXA1* および *SlEXA1* の mRNA がイネ、トマトそれぞれにおいて発現しているか調べるため、各植物から抽出した RNA を供試して、RT-PCR による検出を行った。なお、検出に用いたプライマーの配列は Phytozome database v. 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) より取得した配列情報に基づいて設計した。その結果、*OsEXA1* および *SlEXA1* それぞれについて、予想長の特異的な増幅産物が認められ (図 2-4-1A)、*OsEXA1* および *SlEXA1* 由来の mRNA がイネまたはトマトにおいて転写されていることが示された。

続いて、*OsEXA1* および *SlEXA1* がウイルス感染において NbEXA1 と同様の機能を有するか調べるため、アグロインフィルトレーション法による一過的発現系を用いることで相補性試験を行った。すなわち、NbEXA1 発現抑制個体において *OsEXA1* または *SlEXA1* を、PIAMV-GFP または PVX-GFP と共発現させた。相補性の比較対象として、NbEXA1a をポジティブコントロール、GUS をネガティブコントロールとして用いた。まず一過的発現させた各

EXA1ホモログ遺伝子の mRNA を RT-PCR により確認したところ、すべて特異的な増幅産物が得られたことから(図 2-4-1B)、目的のタンパク質が発現していると考えられた。次に、対照区の *NbEXA1* 非発現抑制個体において、*NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SIEXA1* 発現領域の PIAMV-GFP もしくは PVX-GFP 由来の GFP 蛍光は、GUS 発現領域と比べて強度に差は見られなかった(図 2-4-2)。一方、*NbEXA1* 発現抑制個体において、GUS 発現領域で PIAMV-GFP または PVX-GFP 由来の弱い GFP 蛍光が見られたものの、*NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SIEXA1* 発現領域では強い GFP 蛍光が認められた(図 2-4-2)。さらに、GFP 蛍光強度とウイルス蓄積量の関係について調べるため、*NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SIEXA1*、GUS それぞれを発現させた領域から RNA 抽出を行い、定量 RT-PCR に供試した。その結果、*NbEXA1* 非発現抑制個体においては、GUS 発現区と比べて *NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SIEXA1* 発現区でウイルス RNA 蓄積量に有意な差は認められなかった(図 2-4-3)。他方、*NbEXA1* 発現抑制個体においては、GUS 発現区と比較して *NbEXA1a*、*OsEXA1*、*SIEXA1* 発現区でウイルス RNA 蓄積量が有意に上昇しており、これら 3 区における蓄積量は同程度であった(図 2-4-3)。これらの結果から、*OsEXA1* および *SIEXA1* は、PIAMV および PVX の *N. benthamiana* における効率的な感染のために利用され、*NbEXA1* のウイルス感染における機能を相補可能であることが示唆された。

表 2-2. EXA1 ホモログのアミノ酸配列相同性

	AtEXA1	NbEXA1a	SIEXA1
NbEXA1a	45.1		
SIEXA1	48.9	79.2	
OsEXA1	35.5	33.8	37.5

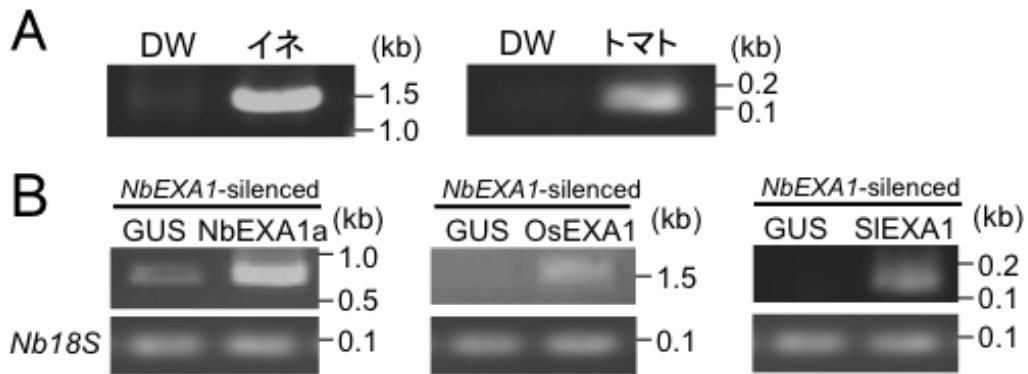


図 2-4-1. 内在性 *EXA1* ホモログ遺伝子の発現解析および一過的発現系における *EXA1* ホモログ遺伝子の mRNA 発現解析

(A) *OsEXA1* (イネ) および *SIEXA1* (トマト) の RT-PCR による発現解析

イネまたはトマトの葉より抽出した RNA を供試した。ネガティブコントロールとして DW を用いた。

(B) *NbEXA1*、*OsEXA1*、*SIEXA1* もしくは *GUS* (ネガティブコントロール) を *NbEXA1* 発現抑制個体においてアグロインフィルトレーション法により一過的に発現させた場合の各 *EXA1* ホモログ遺伝子の RT-PCR による発現解析

RT-PCR の内在コントロールとして *Nb18S* rRNA 遺伝子を用いた。

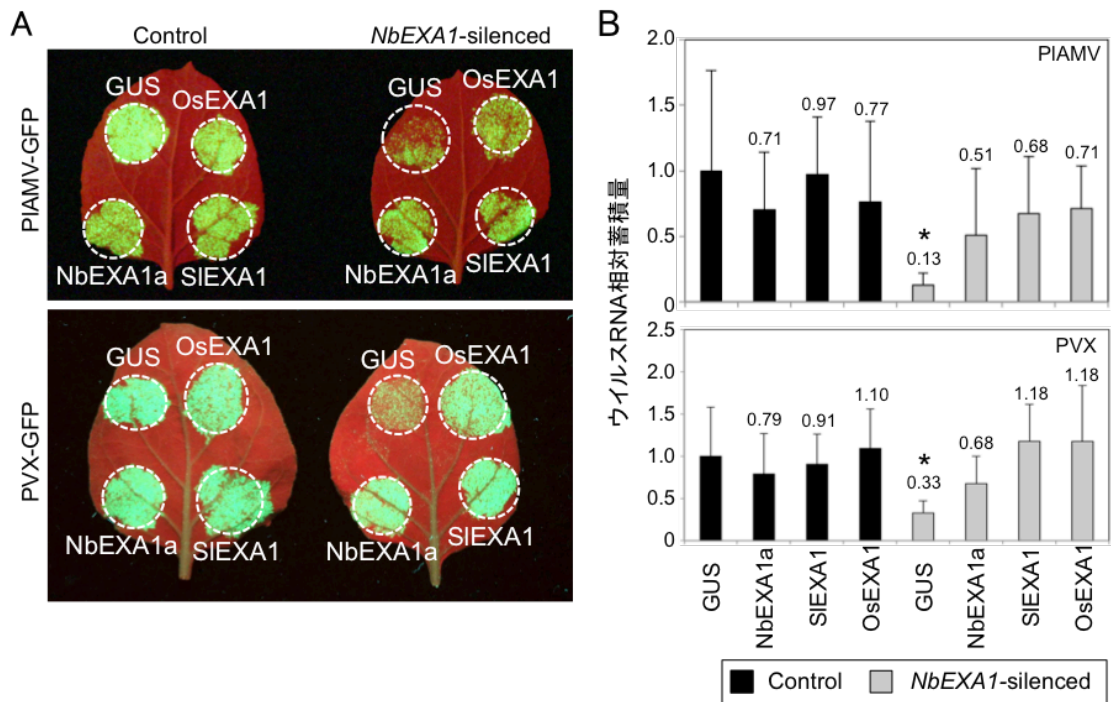


図 2-4-2. アグロインフィルトレーション法による一過的発現系を用いた NbEXA1a、OsEXA1、SIEXA1 の相補性解析

(A) NbEXA1a、OsEXA1、SIEXA1 または GUS を、PIAMV-GFP(上図)または PVX-GFP(下図)と共発現させた時のウイルス由来の GFP 蛍光を示す。両図とも左側がコントロール、右側が NbEXA1 発現抑制個体での結果を表す。接種 4 日後の接種葉を紫外線照射下で撮影した。

(B) (A)における PIAMV-GFP または PVX-GFP の RNA 相対蓄積量。接種 4 日後の接種葉の各タンパク質発現領域から抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR により解析した。各図の値は GUS 発現区の平均値を 1 とした時の値を表し、他区の平均値を棒グラフの上の数値でそれぞれ表した。PIAMV-GFP および PVX-GFP に関するエラーバーは、それぞれ供試した 6 または 3 サンプルの標準偏差を表す。なお、PepMV については 4 サンプルを供試した。有意差検定として、コントロール植物における GUS 発現区のウイルス RNA 相対蓄積量と他区を

比較した Dunnett の多重検定を行った。* $P < 0.05$ 。

3.5. トマトの EXA1 ホモログ発現抑制個体では PepMV の蓄積が阻害される

OsEXA1 および SIEXA1 が *N. benthamiana* において NbEXA1 の機能を相補したことから、EXA1 ホモログは *N. benthamiana* 以外の植物、特に作物におけるポテックスウイルス属ウイルスの感染時に必要な因子なのではないかと考えた。この仮説を検証するため、まずトマトにおいて EXA1 ホモログ遺伝子 SIEXA1 の発現抑制個体を作成することとした。トマトにおける内在遺伝子の発現抑制には、TRV を用いた VIGS 系が用いられている (Jiang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2002)。従って ALSV を用いた場合と同様に、SIEXA1 の部分配列を有する TRV、TRV-SIEXA1 を発現するベクターを作成し、トマトにアグロインフィルトレーション法により接種した。発現抑制を行わない対照区として、野生型の TRV をトマトに同様に接種した。接種 4 週間後において、TRV または TRV-SIEXA1 接種個体は、ウイルスを接種していない健全植物と比べて背丈が低くなり、また葉にモザイク症状を呈していた (図 2-5A)。なお、TRV 接種個体と TRV-SIEXA1 接種個体間では表現型に明瞭な差は認められなかった。また、これらの症状が認められた植物から RNA を抽出し、RT-PCR により TRV 感染の有無を検定したところ、TRV または TRV-SIEXA1 に特異的な増幅産物が認められた (図 2-5B)。次に、各区個体の展開葉に PepMV を機械接種し、PepMV の蓄積量に差が見られるか調べた。接種 5 日後に接種葉から抽出した RNA を供試し、定量 RT-PCR を行ったところ、対照区と比較して、SIEXA1 発現抑制区では PepMV の RNA 蓄積量が有意に減少していた (図 2-5C)。このことから SIEXA1 は、トマトにおける PepMV の感染時に必要な宿主因子であることが示唆された。

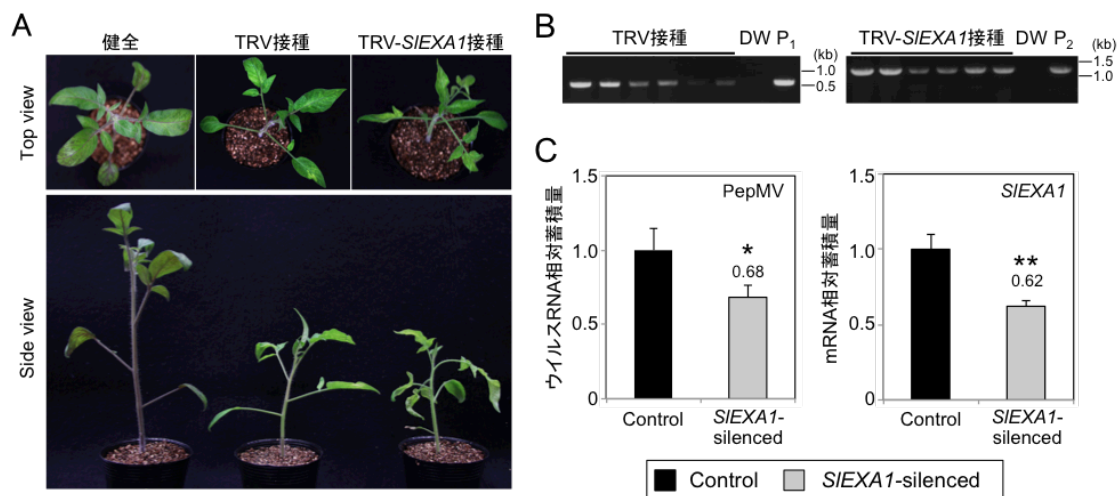


図 2-5. トマトの EXA1 ホモログ遺伝子 *SIEXA1* の発現抑制が PepMV の蓄積に与える影響

(A)アグロインフィルトレーション法により TRV(コントロール)または TRV-*SIEXA1* を接種した
 トマトの表現型

接種 4 週間後の植物体を上 (Top view) もしくは横 (Side view) から撮影した。最左の健全個
 体を観察の比較対象とした。

(B)RT-PCR 解析による TRV もしくは TRV-*SIEXA1* の検出

P₁、P₂ はそれぞれ RT-PCR の増幅のポジティブコントロールを表す (P₁: pTRV2、P₂:
 pTRV2-*SIEXA1*)。

(C)PepMV の RNA および *SIEXA1* の mRNA 蓄積量の定量解析

PepMV 接種 5 日後の TRV または TRV-*SIEXA1* 感染個体の接種葉より抽出した RNA を供
 試し、定量 RT-PCR を行った。エラーバーは供試した 6 サンプルの標準偏差を表す。* P <
 0.05 (Student's *t*-test)。

3.6. *EXA1* ホモログ遺伝子は広範な植物種において保存される

最後に、*EXA1* ホモログ遺伝子がどの植物においてコードされるか調べるため、Phytozome database v. 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)において、NbEXA1a のアミノ酸配列をクエリーとして、コンプリートもしくはドラフトゲノムを対象としたBLAST 検索を行った。その結果、39 植物種から計 51 の *EXA1* ホモログ候補遺伝子を特定した。これらの遺伝子はすべて eIF4E 結合モチーフおよび GYF ドメインを有すると予測された(図 2-6-1)。AtEXA1 のアミノ酸配列をクエリーとして BLAST 検索を行った場合もすべて同じ遺伝子がヒットした。これらの候補遺伝子は、野菜や花卉、果樹など広範な植物種に由来するもので、全体として NbEXA1a と 33.9-78.3%、AtEXA1 と 32.6-92.7%アミノ酸レベルで相同であった。次に、これらの遺伝子の系統学的関係について調べるため、得られた候補遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列をすべて用いて系統樹を作成した(図 2-6-2)。系統樹を見ると、双子葉植物の持つ *EXA1* ホモログは、NbEXA1a および AtEXA1 とともに単系統群を形成した。一方、OsEXA1 を含む単子葉植物の持つ *EXA1* ホモログは、双子葉植物とは独立したクラスターを形成した。このことから、作成した系統樹は、*EXA1* ホモログ遺伝子が単子葉植物と双子葉植物の共通祖先がコードする *EXA1* 様遺伝子に由来するという仮説を支持した。単子葉植物および双子葉植物のコードする *EXA1* ホモログ候補遺伝子は、他の GYF ドメインを有するタンパク質とは独立したクラスターを形成したことから、今回特定した候補遺伝子はすべて *EXA1* ホモログ遺伝子であると考えられた。タンパク質アラインメント解析結果から、eIF4E 結合モチーフや GYF ドメインに加え、ほとんどの *EXA1* ホモログに共通したアミノ酸配列領域が数カ所見られた(図 2-6-3)。これらの領域は、*EXA1* ホモログに共通した未知の機能ドメインもしくはモチーフである可能性がある。また、ほとんどの植物は1コピー

の *EXA1* ホモログ遺伝子をコードするが、バナナやダイズ、*N. benthamiana* などは 2 つ以上の *EXA1* ホモログ遺伝子をコードすることが明らかとなった。これは、これらの植物が進化上ゲノム倍加を経たことによると推測される (Bombarely *et al.*, 2012; D'Hont *et al.*, 2012; Schmutz *et al.*, 2010)。この複数コピーの *EXA1* ホモログ遺伝子をコードするという現象は、他の異質 4 倍体の植物種にも予想されると考えられる。

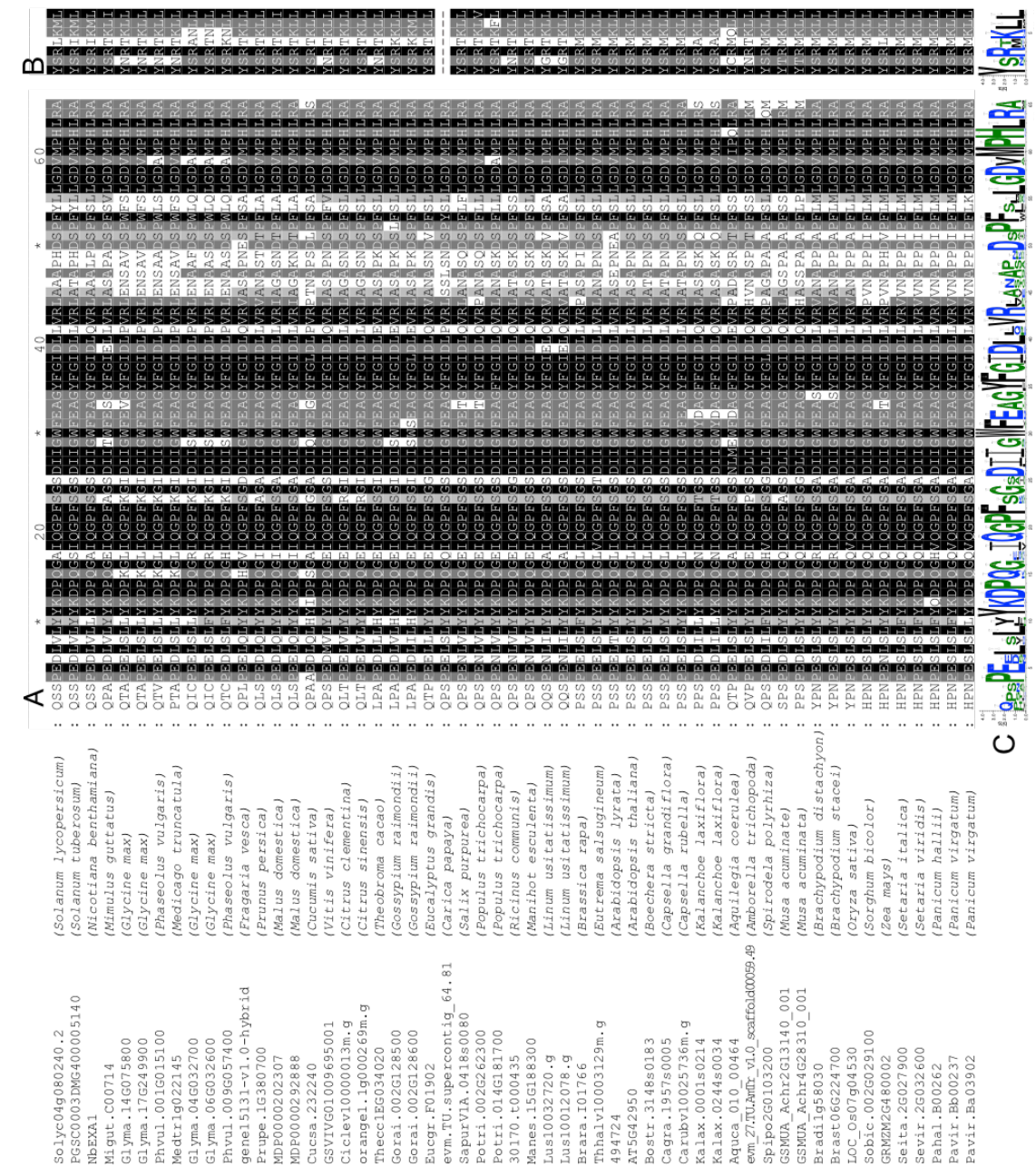


図 2-6-1. EXA1 ホモログの配列解析

(A) GYF ドメインに関する EXA1 ホモログのアミノ酸配列アラインメント解析

(B) eIF4E 結合モチーフに関する EXA1 ホモログのアミノ酸配列アラインメント解析

(C) EXA1 ホモログの GYF ドメインおよび eIF4E 結合モチーフに見出されたコンセンサス配

列

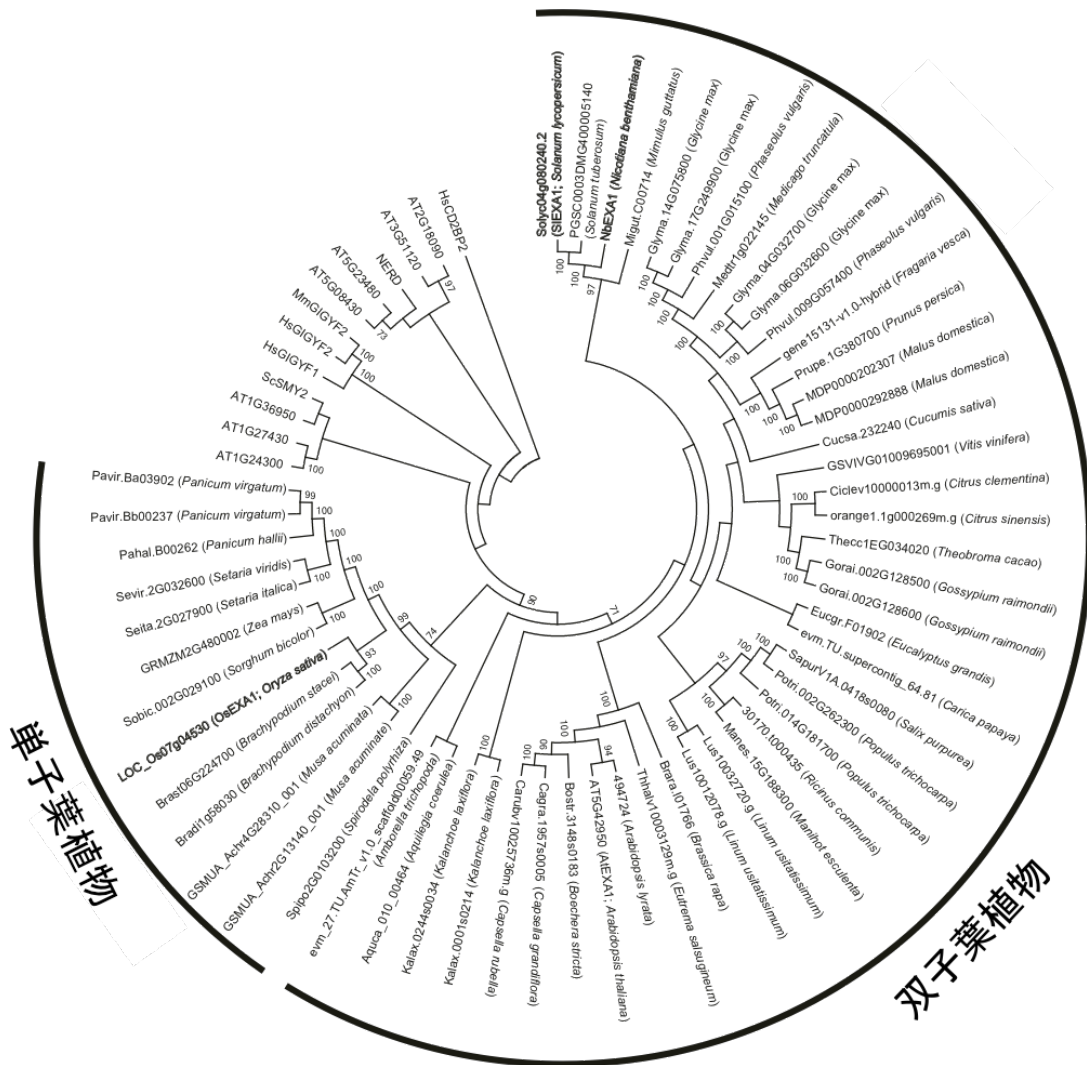


図 2-6-2. 近隣結合法を用いた EXA1 ホモログのアミノ酸配列に基づく系統樹

ヒトの GYF タンパク質 HsCD2BP2 を外群として用いた。分岐点に示したブートストラップ値は 1,000 回の試行のうち 70% 以上のものを表す。太字で示した EXA1 ホモログは、本研究で扱った EXA1 ホモログを表す。



図 2-6-3. EXA1 ホモログの全長タンパク質配列に関するアラインメント解析

Seq1249802.2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
--------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

図 2-6-3. (続き)

Sequence alignment data showing multiple rows of amino acid sequences (e.g., Metat_000774, G1ym_17624900, Pfm01_010201310) and their corresponding positions (e.g., 1222, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400). The sequences are aligned across these positions, with some positions showing gaps (indicated by dashes). The sequences are grouped into several blocks, each starting with a header row containing sequence identifiers and their corresponding positions. The alignment shows high conservation across the sequences, with some variations in the amino acid residues at certain positions.

図 2-6-3. (続き)

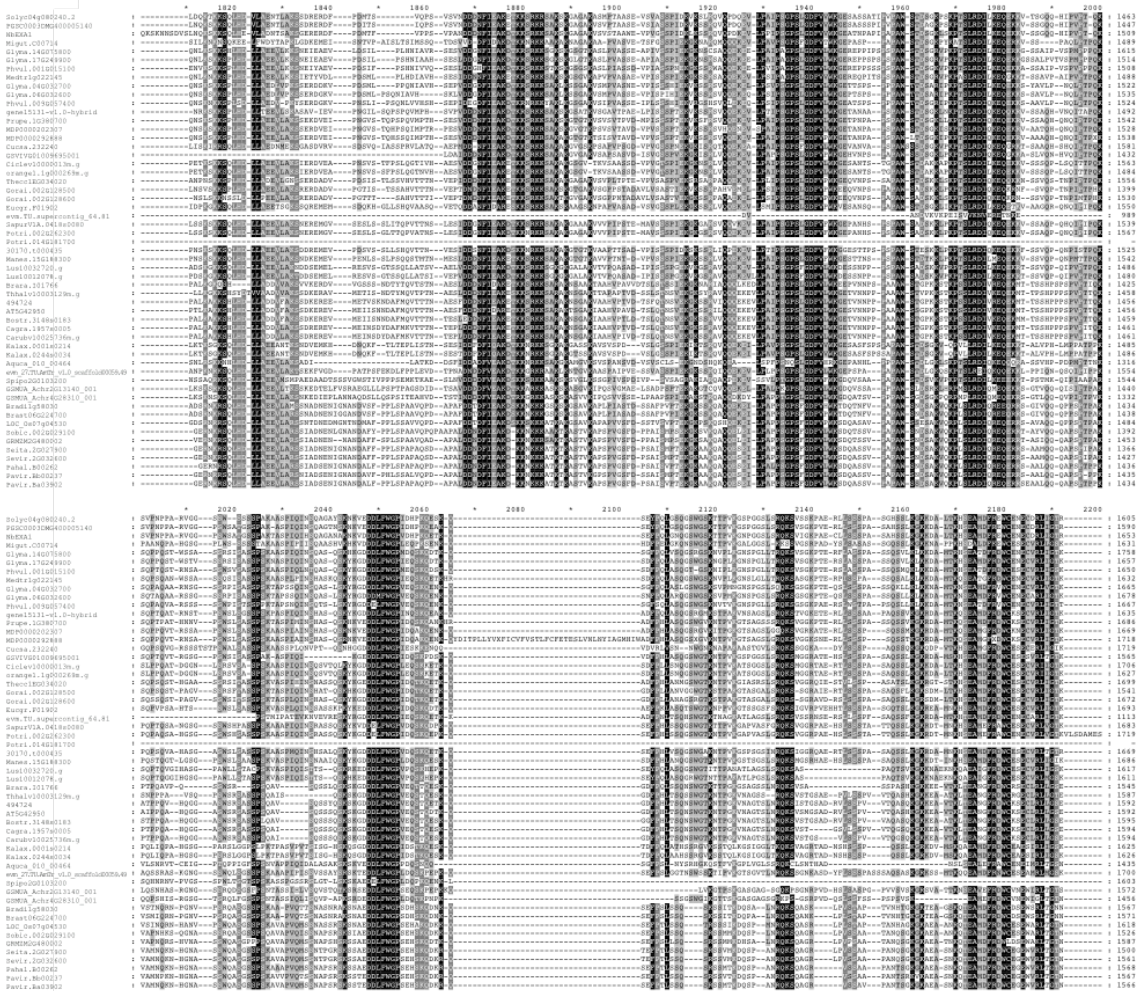


図 2-6-3. (続き)

第4章 考察

4.1. NbEXA1 を感染時に利用するウイルス

本研究では、モデル植物のシロイヌナズナから同定された因子 EXA1 がウイルス抵抗性品種の作出のためのターゲット遺伝子として適しているか調べるため、次の 2 つの問題について提起した。すなわち、どのウイルスが植物への感染を成立させるために EXA1 を必要とするのか、そして EXA1 ホモログの機能は植物種間で保存されているのかという問題である。まず第 1 の問題に対する答えを得るべく、NbEXA1 を発現抑制した *N. benthamiana* において各種ウイルスの蓄積量を解析した。7 種ポテックスウイルス属ウイルスとそれに近縁な 1 種のロラウイルス属ウイルスの蓄積量が NbEXA1 発現抑制個体において有意に減少していたことから(図 2-3A、2-3B)、NbEXA1 はこれらのウイルスが *N. benthamiana* での効率的な蓄積に必要であることが示された。これら計 8 種のウイルスはすべてアルファフレキシウイルス科に属することから、NbEXA1 はこの科に属するウイルスの感染環において共通する宿主因子である可能性が考えられる。対照的に、ビルガウイルス科トバモウイルス属ウイルスの YoMV の蓄積量は NbEXA1 発現抑制の有無に関わらず同程度であった。またシロイヌナズナにおいて、YoMV に加え、トンブスウイルス科カルモウイルス属ウイルスの *Turnip crinkle virus*、ティモウイルス科ティモウイルス属ウイルスの *Turnip yellow mosaic virus* の全身感染性は、野生型と *exa1* 欠損変異体で変化が明らかとなっている(Hashimoto *et al.*, 2016b)。これらのことから、EXA1 はアルファフレキシウイルス科に属さないウイルスの感染には必要ではないことが示唆される。一方、アルファフレキシウイルス科と同じくティモウイルス目に分類されるベータフレキシウイルス科に属する PVM についても解析を行ったが、その蓄積量は対照区と比較して NbEXA1 発現抑制区において、有意差はないものの減少傾向にあった

(図 2-3C)。従って、NbEXA1 はアルファフレキシウイルス科に与えるほどの影響はないにせよ、ベータフレキシウイルス科に属するウイルスの感染にもある程度関わっていると推察される。今後、PVM 以外のアルファフレキシウイルス科に属するウイルスについても同様の解析を行う必要がある。

4.2. EXA1 のウイルス感染における機能

PIAMV の複製の最小単位である 53U-RdRp を用いた既報 (Hashimoto *et al.*, 2016b) および本研究における解析の結果、シロイヌナズナおよび *N. benthamiana* において、EXA1 の欠損により PIAMV の初期感染過程が著しく阻害されることが明らかとなった。その上、アルファフレキシウイルス科に遠縁な数種のウイルスにとっては、EXA1 の欠損が植物への感染に影響を与えなかった。EXA1 のウイルス感染における詳細な機能については不明瞭な部分が多いが、おそらく EXA1 はアルファフレキシウイルス科の感染初期過程において特異的に利用される宿主因子であると考えられる。特筆すべきこととして、2 つの研究グループにより、EXA1 が植物の自然免疫において機能するという報告がなされている (Matsui *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017)。このうち Wu らは、EXA1 が特定の病原体に共通する分子パターンを認識する受容体の翻訳抑制に関与することで、細菌や卵菌に対する抵抗性を負に制御している (Wu *et al.*, 2017)。この主張は、Matsui らの解析結果によって一部ではあるが支持されている。すなわち、EXA1 は mRNA の翻訳抑制や分解、代謝機構に関わる因子が含まれる細胞質内の場である processing body に局在することが示されている (Kervestin and Jacobson, 2012; Matsui *et al.*, 2017)。従って、EXA1 がアルファフレキシウイルス科ウイルスを特異的に認識する未知の受容体の翻訳を負に制御する可能性が挙げられる。この可能

性を検証するためにも、EXA1 のアルファフレキシウイルス科およびベータフレキシウイルス科に属するウイルスの感染における機能についてより詳細な解析を行う必要がある。

4.3. EXA1 ホモログの機能の保存性

先に挙げた 2 つの問題のうち後者について、すなわちウイルス感染における EXA1 ホモログの機能の保存性について解析するため、*NbEXA1* 発現抑制個体において *OsEXA1*、*SlEXA1*、*NbEXA1a* を一過的に発現させることで相補性試験を行った。*NbEXA1* 発現抑制個体において *NbEXA1a* を PIAMV または PVX と共発現させた区では、ウイルス RNA の蓄積量は、*NbEXA1* 非発現抑制個体において GUS もしくは *NbEXA1a* とウイルスを共発現させた区と同程度であった(図 2-4-2B)。このことから、ナス科の *N. benthamiana* における EXA1 ホモログのウイルス感染に関する機能は、シロイヌナズナ同様に保存されていることが示された。同様にして、*NbEXA1* 発現抑制個体において *OsEXA1* または *SlEXA1* をウイルスと共発現させた場合もウイルス RNA の蓄積量が回復したことから(図 2-4-2B)、これら EXA1 ホモログもウイルス感染において同等の機能を有するということが示唆される。加えて、トマトの EXA1 ホモログ遺伝子 *SlEXA1* の発現抑制により、トマトにおける PepMV の蓄積量が低下した(図 2-5C)。これらの結果を総合すると、多くの植物にコードされる EXA1 ホモログはポテックスウイルス属ウイルスの感染時に必要な宿主因子であると言える。実際、系統解析の結果、EXA1 ホモログ遺伝子が広範な植物種において保存されていたことから(図 2-6-2)、EXA1 はポテックスウイルス属ウイルスに抵抗性を示す作物品種の育種において有望な標的遺伝子であると考えられる。

4.4. 植物ゲノムにコードされる EXA1 ホモログ遺伝子のコピー数

多くの植物はゲノム中に1コピーの EXA1 ホモログ遺伝子をコードするが、*N. benthamiana*、ダイズ、バナナなどの植物は複数コピーをコードする。これは、さきに挙げた植物が進化の過程でゲノム倍加もしくは複倍体化が生じたことに起因すると考えられる。本研究では、*N. benthamiana* が2つの EXA1 ホモログ遺伝子 *NbEXA1a*、*NbEXA1b* をコードすること、そしてこれら2つの遺伝子のうち主に *NbEXA1a* より mRNA の転写が生じていることを明らかにした。従って、*NbEXA1b* は偽遺伝子であると考えられる。しかしながら、EXA1 ホモログが冗長的に働く可能性も考えられる。例えば、シロイヌナズナにおいて研究報告例がある劣性抵抗性遺伝子である *eIFiso4G* には、*eIFiso4G1* と *eIFiso4G2* の2コピーが存在する。このうち1コピーに関するそれぞれの1重欠損変異体では、ポティウイルス属ウイルスである *Turnip mosaic virus* (TuMV) の感染は抑制されないものの、2重欠損変異体では TuMV の感染が阻害されることが明らかになっている。このことは、*eIFiso4G1* および *eIFiso4G2* は TuMV 感染において冗長的に働くということを示している。従って、複数コピーの EXA1 ホモログ遺伝子をコードする植物においては、それら遺伝子がウイルス感染において冗長的に働く可能性を考慮すべきである。

4.5. EXA1 を利用したウイルス抵抗性品種の作出に向けた留意点

ウイルス抵抗性品種を作出する上で考慮すべき最も重要な点として、標的遺伝子を RNA サイレンシングや機能喪失変異導入などにより制御することで、植物の生育に予期せぬ悪影響をもたらす可能性が挙げられる。例えば、シロイヌナズナにおける *AtEXA1* の機能喪失変異体である *exa1-1* は、野生型シロイヌナズナと比較して成長が少し遅くなることが明らかとな

っている (Hashimoto *et al.*, 2016b)。よって、他植物においても EXA1 ホモログの機能喪失により成長が遅延する、あるいは収量が低下することが考えられる。さらに、ポテウイルス属ウイルスである *Watermelon mosaic virus* (WMV) に対する劣性抵抗性遺伝子として、シロイヌナズナの Cvi-0 エコタイプより単離された *cPGK2* 遺伝子が存在する。Cvi-0 エコタイプの有する WMV 抵抗性の原因は、この遺伝子に生じた 1 アミノ酸置換によるということが示されている (Ouibrahim *et al.*, 2014)。しかしながら、*cPGK2* 遺伝子の機能喪失変異体は致死となるため、*cPGK2* はシロイヌナズナの生育に必須の因子であることがうかがえる。また Cvi-0 エコタイプで生じた 1 アミノ酸置換部位は、*cPGK2* と WMV との相互作用に重要なアミノ酸残基であることも示されている (Ouibrahim *et al.*, 2014)。ポテックスウイルス属ウイルスの感染には重要だが、変異導入により植物の生育に影響を与えないようなターゲット部位あるいは領域を特定するためにも、EXA1 のウイルス感染における詳細な機能について更なる解析が求められる。さらに、シロイヌナズナにおいて機能喪失変異による致死性を回避した上でウイルスへの抵抗性を付与することに成功した例も報告されている。Bastet らは、通常は致死となる *eIF4E1* と *eIFiso4E* の 2 重欠損変異体に対し、ポテウイルス属ウイルス *Pea seed-borne mosaic virus* に抵抗性を示すエンドウ品種由来の *eIF4E* アリルを導入した。これにより、2 重欠損変異体の致死性を回避して正常な生育を示すことに加え、数種のポテウイルス属ウイルスに対する抵抗性のみならず、*eIF4E* による劣性抵抗性を打破するウイルス分離株に対しても抵抗性を示す植物の作出に至った (Bastet *et al.*, 2018)。EXA1 の詳細な機能が判明した上でのことになるが、EXA1 ホモログ遺伝子がイネやトマトを含む広範な植物にコードされること考えると、このような植物の生育に悪影響を与えず、かつ打破される可能性が低く広域なポテックスウイルス属ウイルスに対する抵抗性を示す植物を、EXA1 を標

的遺伝子とした育種を行うことで様々な主要作物について作出することが主題である。

摘要

植物ウイルスが植物に感染する際、様々な宿主因子を駆使して感染を成立させる。一方、このような宿主因子に変異あるいは欠損が生じた植物はウイルスが感染できず抵抗性となる。宿主因子に変異あるいは欠損した植物は実際、ウイルス抵抗性の作物品種として農業現場で利用されている。近年、シロイヌナズナより単離されたウイルスに対する抵抗性遺伝子 *Essential for potexvirus Accumulation 1 (EXA1)* は 3 種のポテックスウイルス属ウイルスに対して有効であることが明らかとなっている。*EXA1* のホモログ遺伝子はトマトやイネといった作物においても保存されると考えられるが、どのようなウイルスが感染時に *EXA1* を宿主因子として利用するのか、またウイルス感染において *EXA1* がどのような役割を持つのかについての知見は乏しい。これらの問題について明らかにすべく、virus-induced gene silencing 法を用いることによって、2 種のナス科植物 *Nicotiana benthamiana* およびトマトについて *EXA1* ホモログ遺伝子をノックダウンした個体をそれぞれ作成した。*EXA1* ホモログ遺伝子のノックダウンにより、*N. benthamiana* ではポテックスウイルス属ウイルスの蓄積が妨げられたのに加え、ポテックスウイルス属ウイルスに最も近縁なロラウイルス属ウイルスの蓄積も阻害されることが明らかとなった。一方、*N. benthamiana* の *EXA1* ホモログ遺伝子ノックダウン個体において、一過的発現系を用いた手法によって、トマトまたはイネの *EXA1* が機能を相補することも示された。また、トマトにおいてもポテックスウイルス属ウイルスが *EXA1* に依存して感染を行う可能性が示された。これらの結果から、ポテックスウイルス属ウイルスおよびロラウイルス属ウイルスの植物への効率的な蓄積には *EXA1* が必要であること、ウイルス感染における *EXA1* の機能は広範な植物において保存されることが明らかとなった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻植物病理学研究室 難波成任教授には、日頃から親身なご指導ご鞭撻と挑戦的な研究課題を賜りました。忠心より深く感謝申し上げます。また、同研究室の山次康幸准教授、前島健作助教、植物医科学研究室(現 栽培学研究室) 橋本将典助教には、研究者としての姿勢はもとより、実験手法のご教授をいただきました。これらの方々に厚く御礼申し上げます。さらに、研究生生活に彩りを与えて下さった両研究室の先輩方、同輩、後輩に感謝の意を表します。

最後に、私を日々応援し支えてくれた両親、亡祖父、祖母に深く感謝致します。

引用文献

Adams, M., Candresse, T., Hammond, J., Kreuze, J., Martelli, G., Namba, S., Pearson, M., Ryu, K., Vaira, A. 2012. Family *Alphaflexiviridae*, pp 904–919. In King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (ed), *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic, London, UK.

An G. 1995. Binary Ti plasmid vectors. *Methods Mol. Biol.* 44: 47-58.

Bastet, A., Lederer, B., Giovanazzo, N., Arnoux, X., German-Retana, S., Reinbold, C., Brault, V., Garcia, D., Djennane, S., Gersch, S., Lemaire, O., Robaglia, C., Gallois, J. L. 2018. Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants. *Plant Biotech. J.*, 16, 1569–1581.

Bombarely, A. Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. A., Martin, G. B. 2012. A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 25, 1523–1530.

Chandrasekaran, J. Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., Gal-On, A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.*, 17, 1140-1153.

Chen, I.-H., Chiu, M.-H., Cheng, S.-F., Hsu, Y.-H., Tsai, C.-H. 2013. The glutathione transferase of *Nicotiana benthamiana* NbGSTU4 plays a role in regulating the early replication of *Bamboo mosaic virus*. *New Phytol.*, 199, 749–757.

D'Hont, A. Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F.-C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Silva, D. C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lenggellé, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M. R., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E.,

Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V, Kema, G, Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievert, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A.-M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J.-C., Quétier, F., Yahiaoui, N., Wincker, P. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488, 213–217.

Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. S. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.*, 45, 616–629.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2011. EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int/reporting/article-199>.

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, 40, 1178–1186.

Hanssen, I. M., Thomma, B. P. H. J. 2010. Pepino mosaic virus: A successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol. Plant Pathol.*, 11, 179–189.

Hashimoto, M., Neriya, Y., Yamaji, Y., Namba, S. 2016a. Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Front. Microbiol.*, 7, 1695.

Hashimoto, M., Neriya, Y., Keima, T., Iwabuchi, N., Koinuma, H., Hagiwara-Komoda, Y., Ishikawa, K., Himeno, M., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. 2016b. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 88, 120-131.

Himeno, M., Neriya, Y., Yamaji, Y., Namba, S. 2010. Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. *Virology*, 396, 69–75.

- Huang, Y. W., Hu, C. C., Liou, M. R., Chang, B. Y., Tsai, C. H., Meng, M., Lin, N. S., Hsu, Y. H. 2012. Hsp90 interacts specifically with viral RNA and differentially regulates replication initiation of *Bamboo mosaic virus* and associated satellite RNA. *PLoS Pathog.*, 8, e1002726.
- Hyodo, K., Okuno, T. 2014. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *J. Gen. Plant Pathol.*, 80, 123–135.
- Ido, Y., Nakahara, K. S., Uyeda, I. 2012. *White clover mosaic virus*-induced gene silencing in pea. *J. Gen. Plant Pathol.*, 78, 127–132.
- Ishibashi, K., Ishikawa, M. 2016. Replication of tobamovirus RNA. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 54, 55–78.
- Iwabuchi, N., Yoshida, T., Yusa, A., Nishida, S., Tanno, K., Keima, T., Nijo, T., Yamaji, Y., Namba, S. 2016. Complete genome sequence of *Alternanthera mosaic virus*, isolated from *Achyranthes bidentata* in Asia. *Genome Announc.*, 4, e00020–16.
- Jiang, C.-Z., Lu, F., Imsabai, W., Meir S., Reid, M. S. 2008. Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. *J. Exp. Bot.*, 59, 973-979.
- Kang, B.-C., Yeam, I., Jahn, M. M. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 581–621.
- Keima, T. Hagiwara-Komoda, Y., Hashimoto, M., Neriya, Y., Koinuma, H., Iwabuchi, N., Nishida, S., Yamaji Y., Namba, S. 2017. Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant RNA virus that encodes triple gene block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.*, 7, 39678.
- Kervestin, S., Jacobson A. 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13, 700-712.
- Kitazawa, Y., Iwabuchi, N., Himeno, M., Sasano, M., Koinuma, H., Nijo, T., Tomomitsu, T.,

Yoshida, T., Okano, Y., Yoshikawa, N., Maejima, K., Oshima, K., Namba, S. 2017. Phytoplasma-conserved phylogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins. *J. Exp. Bot.*, 68, 2799-2811.

Kofler, M. M., Freund, C. 2006. The GYF domain. *FEBS J.*, 273, 245–256.

Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Shiraishi, T., Neriya, Y., Miura, C., Minato, N., Okano, Y., Sugawara, K., Yamaji, Y., Namba, S. 2011. A necrosis-inducing elicitor domain encoded by both symptomatic and asymptomatic *Plantago asiatica mosaic virus* isolates, whose expression is modulated by virus replication. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 24, 408–420.

Komatsu, K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y., Maejima, K., Senshu, H., Himeno, M., Okano, Y., Kagiwada, S., Namba, S. 2010. Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 23, 283–293.

Kushner, D. B., Lindenbach, B. D., Grdzlishvili, V. Z., Noueiry, A. O., Paul, S. M., Ahlquist, P. 2003. Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 15764–15769.

Lee, C.-C. Lin, T.-L., Lin, J.-W., Han, Y.-T., Huang, Y.-T., Hsu, Y.-H., Meng, M. 2016. Promotion of *Bamboo mosaic virus* accumulation in *Nicotiana benthamiana* by 5'→3' exonuclease NbXRN4. *Front. Microbiol.*, 6, 1–15.

Li, C., Sasaki, N., Isogai, M., Yoshikawa, N. 2004. Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch. Virol.*, 149, 1541–1558.

Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S. P. 2002. Tobacco *Rar1*, *EDS1*, and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.*, 30, 415–429.

Mader, S., Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 γ and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4990–4997.

Maejima, K., Himeno, M., Netsu, O., Ishikawa, K., Yoshida, T., Fujita, N., Hashimoto, M., Komatsu, K., Yamaji, Y., Namba, S. 2014. Development of an on-site plum pox virus detection kit based on immunochromatography. *J. Gen. Plant Pathol.*, 80, 176–183.

Matsui, H., Nomura Y., Egusa, M., Hamada, T., Hyon, G.-S., Kaminaka, H., Watanabe, Y., Ueda, T., Trujillo, M., Shirasu, K., Nakagami, H. 2017. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLoS Genet.*, 13, e1007037.

Minato, N., Komatsu, K., Okano, Y., Maejima, K., Ozeki, J., Senshu, H., Takahashi, S., Yamaji, Y., Namba, S. 2014. Efficient foreign gene expression *in planta* using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch. Virol.*, 159, 885–896.

Nagy, P. D., Pogany, J. 2012. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 137–149.

Nicaise, V., Gallois, J.-L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Gall, O. L., German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 581, 1041–1046.

Obata, T., Yamamoto, Y. 1968. Hydrangea ringspot virus detected from imported Dutch hydrangea. *Res. Bull. Plant Protect. Serv. Jpn.*, 6, 13–18. (In Japanese with English summary.)

Ouibrahim, L., Mazier, M., Estevan, J., Pagny, G., Decroocq, V., Desbiez, C., Moretti, A., Gallois, J.-L., Caranta, C. 2014. Cloning of the *Arabidopsis rwm1* gene for resistance to *Watermelon mosaic virus* points to a new function for natural virus resistance genes. *Plant*

J., 79, 705–716.

Paudel, D. B., Sanfaçon, H. 2018. Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Front. Plant Sci.*, 9, 1575.

Pyott, D. E., Sheehan, E., Molnar, A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol. Plant Pathol.*, 17, 1276-1288.

Reinbold, C., Lacombe, S., Ziegler-Graff, V., Scheidecker, D., Wiss, L., Beuve, M., Caranta, C., Brault, V. 2013. Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 26, 257–265.

Revers, F., Nicaise, V. 2014. Plant resistance to infection by viruses, in eLS. John Wiley & Sons Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0000757.pub3.

Robaglia, C., Caranta, C. 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.*, 11, 40–45.

Sanfaçon, H. 2015. Plant translation factors and virus resistance. *Viruses*, 7, 3392–3419.

Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., Uyeda, I. 2005. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.*, 579, 1167–1171.

Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.-C., Shinozaki, K., Nguyen, H. T., Wing, R. A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R. C., Jackson, S. A. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463, 178–183.

Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S. 2009. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J. Gen. Virol.*, 90, 1014–1024.

Vaira, A. M., Maroon-Lango, C. J., Hammond, J. 2008. Molecular characterization of Lolium latent virus, proposed type member of a new genus in the family *Flexiviridae*. *Arch. Virol.*, 153, 1263–1270.

Wang, A., Krishnaswamy, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.*, 13, 795–803.

Wu, Z., Huang, S., Zhang, X., Wu, D., Xia, S. Li, X. 2017. Regulation of plant immune receptor accumulation through translational repression by a glycine-tyrosine-phenylalanine (GYF) domain protein. *eLife*, 6, e23684.

Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T., Yoshikawa, N. 2011. Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana FT* gene using the *Apple latent spherical virus* vector. *Plant Mol. Biol.*, 75, 193–204.

Yamaji, Y., Kobayashi, T., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T. 2006. In vivo interaction between *Tobacco mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. *Virology*, 347, 100–108.

Yusa, A., Iwabuchi, N., Koinuma, H., Keima, T., Neriya, Y., Hashimoto, M., Maejima, K., Yamaji, Y., Namba, S. 2016. Complete genome sequences of two Hydrangea ringspot virus isolates from Japan. *Genome Announc.*, 4, e00022-16.

Yusa, A., Neriya, Y., Hashimoto, M., Yoshida, T., Fujimoto, Y., Hosoe, N., Keima, T., Tokumaru, K., Maejima, K., Netsu, O., Yamaji, Y., Namba, S. Functional conservation of

EXA1 among diverse plant species for the infection by a broad range of plant viruses. *Sci. Rep.* (under review)

Zettler, F. W., Ko, N.-J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., Wong, S.-M. 1990. Orchids and Their Control. *Plant Dis.*, 74, 621–626.