

博士論文（要約）

植物パラレトロウイルスの生存戦略

大前 奈月

## 目次

### 1 章 諸論

### 2 章 CaMV ゲノムのメチル化と転写活性

### 3 章 核内 CaMV ゲノムの *de novo* メチル化の機構推定

### 4 章 カブのトランスポゾンメチル化との比較

### 5 章 まとめ

## 謝辞

## 引用文献

# 1 章 諸論

## ウイルスの分類と特徴

ウイルスは、宿主生物の細胞内で複製する遺伝因子であり、遺伝物質であるゲノム核酸と、それを保護する外被タンパク質から成る微小な構造体である。細胞という構造をもたず宿主生物に依拠して生存していることから生物とみなすかについては議論があるが、自己複製し、進化する（すなわち不完全な複製を行い多様な子孫を残す）点は生物学的である。ウイルスは自然界に広く分布しているが、とりわけ、人間あるいは人間の食糧となる家畜・農作物・魚介類等に病気を引き起こすウイルスは人間の生活に関わりが深い。

ウイルスの分類は、国際ウイルス分類委員会（International Committee on Taxonomy of Viruses）（ICTV <https://talk.ictvonline.org/>）によって、ゲノム核酸の種類と構造（DNA か RNA か、二本鎖（double-stranded, ds）か一本鎖（single-stranded, ss）か）および複製様式（逆転写（reverse transcription、RT）を含むか含まないか）によって行われており、dsDNA ウイルス、ssDNA ウイルス、逆転写(RT)ウイルス、dsRNA ウイルス、ssRNA ウイルスが知られている（図 1-1A）。うち、RT ウイルスは、ゲノムとして RNA をもつもの（レトロウイルス）と DNA をもつもの（パラレトロウイルス）を含む。

興味深いことに、これら分類群に属するウイルスの割合は、宿主生物により異なっている。RNA をゲノムとするウイルスは、動物に感染するウイルス（動物ウイルス）でも植物に感染するウイルス（植物ウイルス）でも、20 以上の科が知られている。一方、DNA をゲノムとするウイルスは、動物ウイルスでは 13 科が知られているが、植物ウイルスでは 3 科のみであり、3 科のうち 2 科が ssDNA ウイルス、1 科が RT ウイルスであり、dsDNA ウイルスはまだ報告されていない(図 1-1B)。動物ウイルスに比べて植物ウイルスでは DNA をゲノムとするウイルスが少ない原因については明らかではないが、（1）動物細胞には DNA ウイルスの複製を植物細胞より強くサポートする機構がある、または（2）植物細胞には DNA ウイルスの複製をより強く抑

制する機構がある、という二通りの可能性が考えられる。これまで dsDNA ウイルスが報告されていないため、この疑問に直接答えることはできないが、植物ウイルスで唯一知られるパラレトロウイルスと植物の相互作用形態を検証することは、この理由の検討に一步近くだろう。

## 外来 DNA 抑制機構

細胞生物は、細胞外から侵入する外来性の DNA によって自らの DNA ゲノムの遺伝情報やその発現が攪乱される危険にさらされている。外来の DNA として、接合伝達により侵入するプラスミド (plasmid)、水平移行により侵入するトランスポゾン (transposable element, TE)、DNA ウイルスなどが存在する。細胞生物は、これら外来性の DNA を分解し、あるいは、その発現を抑制するため、多層的な外来 DNA 抑制機構を備えている。とりわけ、TE や DNA ウイルスの遺伝子の発現を抑制する機構としてヒストン修飾とシトシンメチル化がよく知られている (Deniz, Frost, and Branco 2019; Fultz, Choudury, and Slotkin 2015; Rigal and Mathieu 2011)。植物においては、シトシンメチル化関連酵素の変異体において、通常は不活性な多数の TE が再活性化する (Deniz, Frost, and Branco 2019; M. Y. Kim and Zilberman 2014; Lippman et al. 2003; Tsukahara et al. 2009) ことが報告されており、TE の抑制にはシトシンメチル化がとりわけ重要であると考えられている。

## シトシンメチル化

シトシンメチル化は、メチル基転移酵素によってシトシンのピリミジン環の 5 番目の C 原子にメチル基が転移される現象であり (図 1 - 2)、植物と動物の両方で見られる。遺伝子発現の調節において重要なはたらきをし (H. Zhang, Lang, and Zhu 2018; Neiderhuth and Schmitz 2017)、また、上述のように外来 DNA の抑制でも重要な役割をもつ。

動物では、(1) 主に CG 配列の C のみがメチル化の対象となる。また、(2) 遺伝子、TE、遺伝子間領域などを含めたゲノム全体がほぼ均一にメチル化を受け、非メチル化領域はわずか 1 -

2%程度で、主に CG islands (CGIs) 領域に存在する。一方、植物では、(1) CG、CHG、CHH (ただし H=not G) 配列全てのパターンの C がメチル化の対象となる。また、(2) メチル化のパターンは、ゲノムの機能領域ごとに異なり、遺伝子とプロモーターは主に CG のみ、TE は CG、CHG、CHH 配列全てがメチル化を受ける (図 1-3) (Suzuki and Bird 2008; Law and Jacobsen 2010)。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では 90%以上の TE と繰り返し配列がメチル化を受け、発現している遺伝子の約 1/3 が転写領域 (gene body) にメチル化を受け、5%以下がプロモーター領域にメチル化を受けている (Vanyushin and Ashapkin 2011; Lauria and Rossi 2011)。

## 動物と植物のシトシンメチル基転移酵素

シトシンメチル化は、メチル基転移酵素によって担われる。動物では主に DNMT 1 と DNMT3 によってシトシンメチル化が触媒されている。植物 (シロイヌナズナ) では、これらのホモログとして、MET 1 (DNMT1 のホモログ)、DRM 2 (DNMT3 のホモログ) が知られており、さらに、植物特異的なメチル基転移酵素として CMT 3 と CMT2 が知られている (Law and Jacobsen 2010; H. Zhang, Lang, and Zhu 2018) (図 1-4)。

## カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)

先にも述べたが、複製サイクルを通じてウイルスのゲノム情報を DNA 上にのみ保持している ssDNA ウイルスと dsDNA ウイルス、および、RNA 上にのみ保持している ssRNA ウイルスと dsRNA ウイルスに加えて、複製サイクルの途中でゲノム情報を DNA と RNA の両方の状態で保持するウイルスが存在し逆転写 (RT) ウイルスと呼ばれる。RT ウイルスは、DNA ゲノムからほぼ全長の RNA ゲノムを繰り返し転写し、その RNA を DNA に逆転写することで結果的に DNA が複製した形になる。RT ウイルスはさらに、ウイルス粒子中に RNA 状態のゲノムをもつレトロウイルスと、DNA 状態のゲノムをもつパラレトロウイルスとに分けられる。

植物ではパラレトロウイルスとして、カリモウイルス科 (Caulimoviridae) 1 科のみが知られている。カリモウイルス科には、カリモウイルス属 (*Caulimovirus*)、ペチュウウイルス属 (*Petuvirus*)、ソイモウイルス属 (*Soymovirus*)、カベモウイルス属 (*Cavemovirus*)、バドナウイルス属 (*Badnavirus*)、ツングロウイルス属 (*Tungrovirus*) が知られているが、うち、カリモウイルス属が最も研究の蓄積が多い。

本研究では、カリモウイルス属のタイプ種であるカリフラワーモザイクウイルス (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) を用いた。

## CaMV の複製サイクル

CaMV は、上述のとおり、環状 dsDNA をゲノムとし、宿主植物細胞核内での転写と、細胞質での逆転写を介して複製する。主にアブラナ科の植物を宿主とし、篩部を含む植物の全身に感染する。篩部から篩管液を吸汁する半翅目昆虫 (主にアブラムシ) の口針の内側に付着することによって植物間を媒介される (図 1-5)。媒介昆虫の吸汁行動の際に、唾液と共に植物細胞へと運び込まれたウイルス粒子は、細胞質から核に移行するときに外被タンパク質を脱外被し、核内に 2 本鎖環状のウイルスゲノム DNA が放出される。このゲノム DNA は、核内で植物宿主の RNA ポリメラーゼによって転写され、主に 35S RNA、19S RNA の 2 種類の RNA が生成される。それぞれの mRNA は、異なるプロモーター (35S プロモーターと 19S プロモーター) から転写される。転写物は細胞質へと移行し、19S RNA は P6 タンパク質をコードする mRNA としてはたらく、P6 タンパク質のアミノ酸配列情報をもつ。ゲノム DNA のほぼ全長を含む 35S RNA は、P1-P6 までの 6 種類のタンパク質をコードする mRNA としてこれらタンパク質のアミノ酸情報をもつと共に、全長が逆転写されて再びゲノム DNA となる。このように 35S RNA はゲノム DNA の鋳型となることからプレゲノム RNA とも呼ばれる。逆転写は、感染植物細胞の細胞質に存在する viroplasm という P6 タンパク質由来の構造物の中で行われ、そこで引き続き粒子形成が行われる (図 1-6) (Haas et al. 2002)。

## CaMV のゲノム構造と遺伝子発現

CaMV は前述のように約 8 kb の二本鎖環状 DNA をゲノムとし、P1 から P6 まで六つの ORF を一方向にコードする。一番強力な 35S プロモーターと 19S プロモーターの二つのプロモーターはそれぞれ、ゲノムの約 1.1 コピーを含む 35S RNA と P6 のみを含む 19S RNA を転写する (図 1-7) (Haas et al. 2002)。

このように、シトシンメチル化は外来 DNA の抑制で重要な役割を担っており、パラレトロウイルスと植物宿主の相互作用を検証する際に重要な視点となる。CaMV は dsDNA が核内で転写されるため、シトシンメチル化の標的となるが、これまで詳細な解析はなされてこなかった。そこで本論文では、核内 CaMV ゲノムのシトシンメチル化に焦点をあて、CaMV と宿主植物であるカブの相互作用を検証し、生存戦略を考察した。

## 図表

(A)

- ゲノムの形態： RNA or DNA
- 複製方式：逆転写(RT)を含むか否か

ウイルスタイプ

DNA	dsDNA
	ssDNA
	DNA-RT(pararetrovirus)
RNA	dsRNA
	ssRNA(+)
	ssRNA(-)
	RNA-RT(retrovirus)

(B)

各種ウイルスのファミリーの数

ゲノムタイプ	動物ウイルス	植物ウイルス
RNA	>20	>20
DNA	12	3

	植物ウイルス
pararetrovirus	1
dsDNA virus	0
ssDNA virus	2

図 1-1 ウイルスの分類

(A)ウイルスの分類。ウイルスはゲノム核酸の種類が RNA か DNA か、複製サイクルに逆転写を含むか否か、により分類される。(B) 宿主生物ごとのウイルスファミリーの数。植物・動物ウイルスとも、RNA ウイルスは 20 以上のファミリーが知られているが、DNA ウイルスのファミリーは、動物で 12、植物でわずか 3 つである。植物では dsDNA ウイルスはまだ報告がない。



	メチル化対象となるC
動物	CGのみ
植物	CG, CHG, CHH (H=not G)

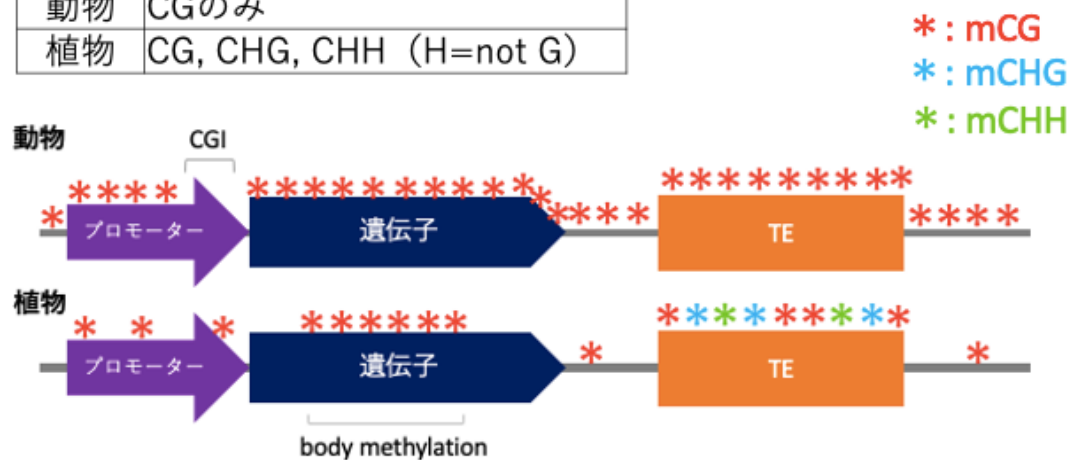


図 1-3 動物と植物のシトシンメチル化パターン比較

メチル化の対象となる C のメチル化パターンの動物・植物間の比較。動物では、シトシンメチル化の対象となるのはほぼ CG のみであり、CG island (CGI) と呼ばれる領域以外、ゲノム全体が高度にメチル化を受ける。一方植物では、CG, CHG, CHH すべてがメチル化の対象となり得、機能領域ごとにメチル化パターンが異なる。プロモーターと遺伝子では主に CG のみ対象となり、遺伝子では 3' と 5' 領域以外の領域がメチル化される body methylation と呼ばれるパターンとなる。トランスポゾン (TE) では、全てのパターンのメチル化が見られる。\* はメチル化されているシトシンを示す。赤が CG メチル化、青が CHG メチル化、緑が CHH メチル化を示す。

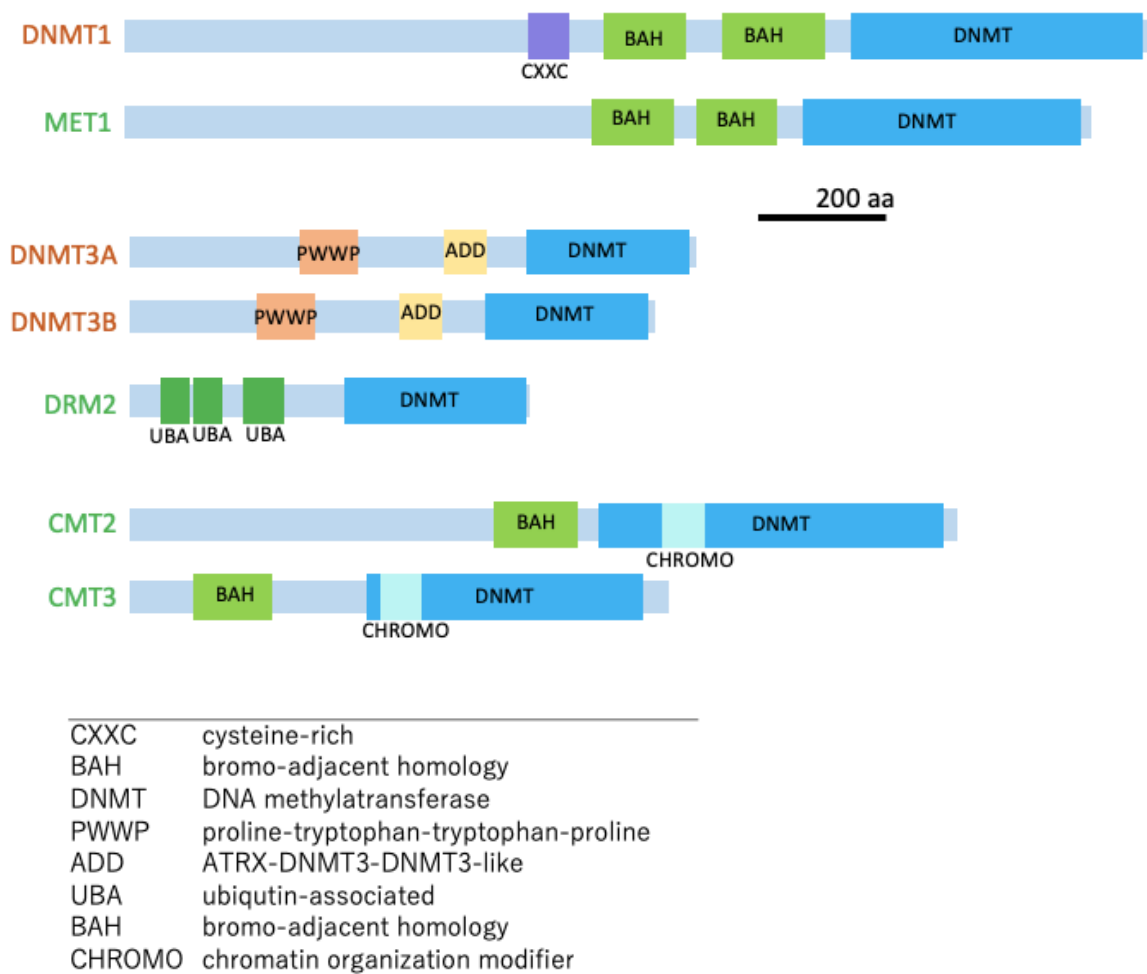
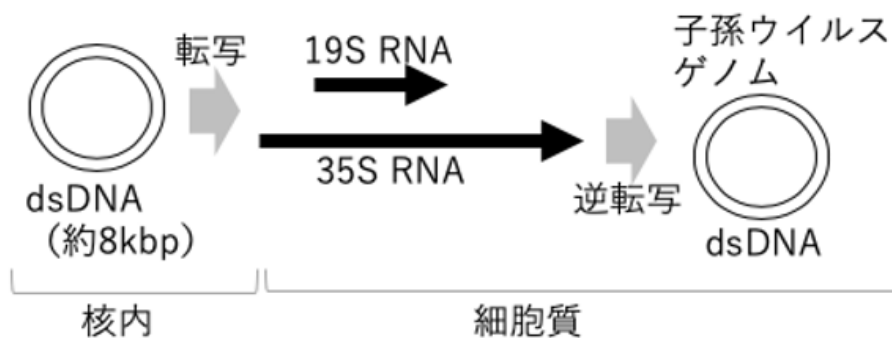


図 1-4 動物と植物の主なメチル基転移酵素のタンパク質構造

動物（赤）と植物（緑）のメチル基転移酵素のタンパク質構造。

CMT2 以外は (Law and Jacobsen 2010) より改変して転載。CMT2 は Genbank アクセッション番号 NP\_193637 の配列から推定された保存ドメインを用いて描画した。

- 分類：
  - 科: *Caulimoviridae* (植物で唯一のパラレトロウイルスの科)
  - 属: *Caulimovirus*
  - 種: *Cauliflower mosaic virus*
- ゲノムと複製方式：
  - 環状のdsDNA (~8 kbp)
  - 細胞質での逆転写を介して複製



- 植物間移行：昆虫（アブラムシ）の吸汁による伝搬
- 宿主植物：アブラナ科など

図 1-5 カリフラワーモザイクウイルス (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) の概要

*Caulimoviridae* は植物で唯一のパラレトロウイルスの科であり、CaMV はそれに属するウイルスのうち最もよく研究が進んでいるウイルスである。

CaMV は約 8 kbp の二本鎖 DNA (dsDNA) のゲノムを持ち、主に 19S と 35S RNA の 2 種類の転写物を転写する。これらは細胞質に移行し、35S RNA は逆転写によって dsDNA の子孫ウイルスゲノムを生成する。

主な宿主はアブラナ科植物であり、植物間伝搬はアブラムシの吸汁による伝搬が主な機構である。

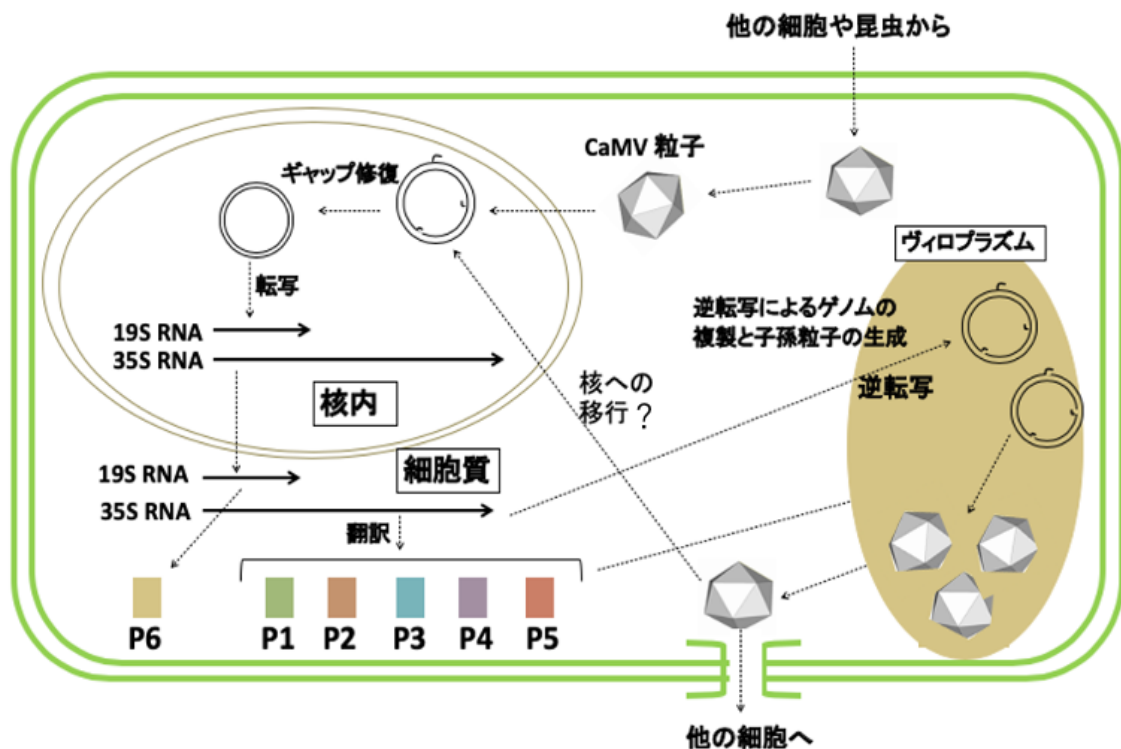
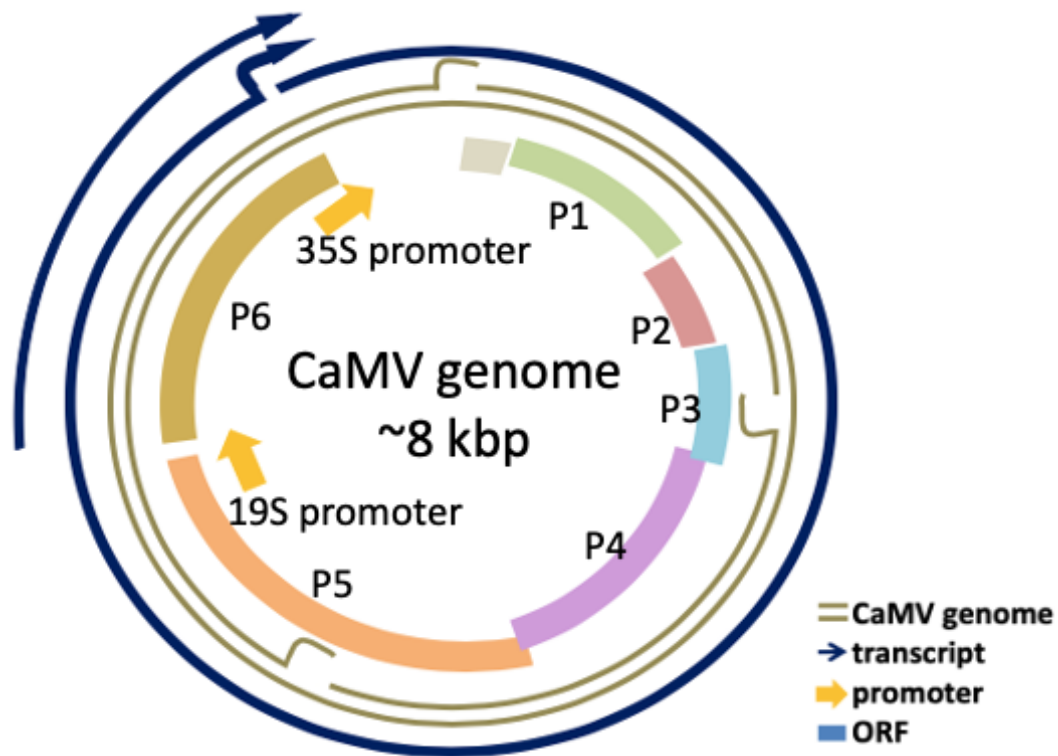


図 1-6 CaMV の複製機構

(Haas et al. 2002) より改変

媒介昆虫によって、あるいは隣接細胞からの移行によって、細胞内に CaMV 粒子が運ばれ、核に移行する際、外被タンパク質が離れること（脱外被）により 2 本鎖環状のゲノム DNA が核内に放出される。核内で、ゲノムの逆転写の名残である 3 箇所の 1 本鎖ギャップが修復され、植物の転写機構によって主に 19S RNA と 35S RNA が転写される。これらの転写物は細胞質に運ばれ、19S RNA から P6、35S RNA から 5 つのタンパク質（P1-P5）が翻訳される。35S RNA はまた、逆転写されることにより、子孫ゲノム DNA となり、ヴィロプラズムで外被タンパク質と結合して新生粒子が生成される。生成された粒子は原形質連絡を通して隣接する細胞へと移行し、感染を広げる。



6つのORF  
2つのプロモーター  
主に2つの転写物

図 1-7 CaMV ゲノムの構造と転写物

(Haas et al. 2002) より改変

CaMV ゲノムは約 8 kbp であり、逆転写の名残である 3 箇所のギャップ（1 本鎖不連続）を含む。6つの ORF をコードし、6つの ORF を含むポリシストロニックな 35S RNA および P6 のみを含む 19S RNA が、35S および 19S プロモーターからそれぞれ転写される。

## 2 章 CaMV ゲノムのメチル化と転写活性

## 3 章 核内 CaMV ゲノムの *de novo* メチル化の機構推定

## 4 章 カブのトランスポゾンメチル化との比較

2、3、4 章の部分は、今後雑誌投稿する予定の未発表データを含んでいるため、学位授与日から 5 年間インターネットでの公表をすることができません。

## 5 章 まとめ

以上、これまでの研究で、2 本鎖環状 DNA である CaMV ゲノムは、自然宿主であるカブの核内で、プロモーター領域を含めてすべての領域で、CG および non-CG のシトシンが高度にメチル化されていることがわかった。*in vitro* でメチル化したウイルスプロモーターの転写活性を調べる実験から、核内でメチル化されたウイルスプロモーターの転写活性は低いと考えられた。また、細胞質で生成されるウイルス粒子内のゲノムは非メチル化状態であり、転写活性をもつと考えられた。一方、核内の CaMV ゲノムが高度にメチル化されていた時点でも、感染葉での CaMV の転写は継続しており、ウイルスの感染は拡大していた。この現象を説明するモデルとして、細胞質で生成された非メチル化ゲノムが継続的に核内に再供給されることで、転写を継続するというモデルが考えられる。また、核内に運ばれた CaMV ゲノムが速やかに *de novo* メチル化を受ける機構には、CaMV ゲノム全体に弱く発現していて A を 5' 末端に持つ sRNA が関わる可能性が示唆された。

これらを踏まえて CaMV の生存戦略・複製機構全体を広く考察する。まず、一細胞内レベルの機構について述べる。アブラムシの吸汁により、細胞内に入った CaMV 粒子は核に移行し、脱外皮し、CaMV ゲノムが核内に導入される。核内でギャップが修復され、強力なプロモーターである 35S プロモーターと 19S プロモーターから 35S RNA と 19S RNA が主に転写される。これらの RNA は細胞質に移行し、翻訳されるだけでなく、35S RNA からはウイルスタンパク質の構造物であるヴィロプラズム内で逆転写により子孫ゲノムが生成され、子孫粒子が生成される。メチル化されていないゲノムを持つ子孫粒子が再度核に移行、または隣接細胞へと移行することで、植物内での CaMV の継続的な増殖を可能にする機構が想像される(図 9-1)。植物は、CG、CHG、CHH の全てのシトシンがメチル化の対象となり、トランスポゾンを含む外来 DNA の抑制において、メチル化が非常に重要な役割を持っている。そのため、強力なプロモーターからの転写と、細胞質での逆転写によってメチル化されていない子孫ゲノムを生成する上記の機構は、植物システム内での増殖維持を可能にする機構と想像される。

次に、細胞間、組織間、植物間移行の既知の知見まで含めて議論する。CaMV は ORF1 に MP (movement protein) をコードしており、細胞間移行の際に用いる。ウイルスが他の細胞に移行するには、プラズモデスマータ (PD) を通過する必要がある。葉緑体とマイクロフィラメントを連結し、光に応じた葉緑体の移動に関わる CHUP1 を、ウイルス粒子生成場所であるウイルスタンパク質からなるヴィロプラズムにリクルートし、細胞骨格を通してヴィロプラズムを PD に運ぶ。PD のサイズ排除制限の機構のため、このままでは CaMV 粒子は通過することができない。CaMV は PD のデスモチューブルを破壊し、PD に MP で筒状構造を形成し、これを用いて、ヴィロプラズマ内の CaMV 粒子(約 50 nm)が隣接細胞へと移行する(Schoelz et al. 2016; Carluccio, Zicca, and Stavolone 2014)。組織間移行では、CaMV は接種から 5 日程度で師管に入り、師管を通して上葉へと移行し、師管の分布に沿って感染を広げる(S.M. Leisner, R. Turgeon, S.H. Howell 1991)。師管を使った全身感染は、素早く感染領域を広げ、CaMV 粒子を増殖させることができるが、自然宿主であるカブは CaMV に感染して、病徴を発症しつつも枯死はせず、感染状態で生きながらえる。また、アブラムシの吸汁刺激によってヴィロプラズムから粒子が放出され、吸汁時にアブラムシの口針に付着しやすくなる機構が知られている (Martinière, Zancarini, and Drucker 2009)。

これらを考え合わせると、細胞内で非メチル化ゲノムを持つ粒子を迅速に多数生成し、細胞間移行の効率もあげ、師管を通じて植物の全身に広がり、植物と共存したまま植物内でウイルスを増殖させ、アブラムシの吸汁時の植物間移行の可能性も高めるような機構は、CaMV の種の維持に有利に働くと想像される。

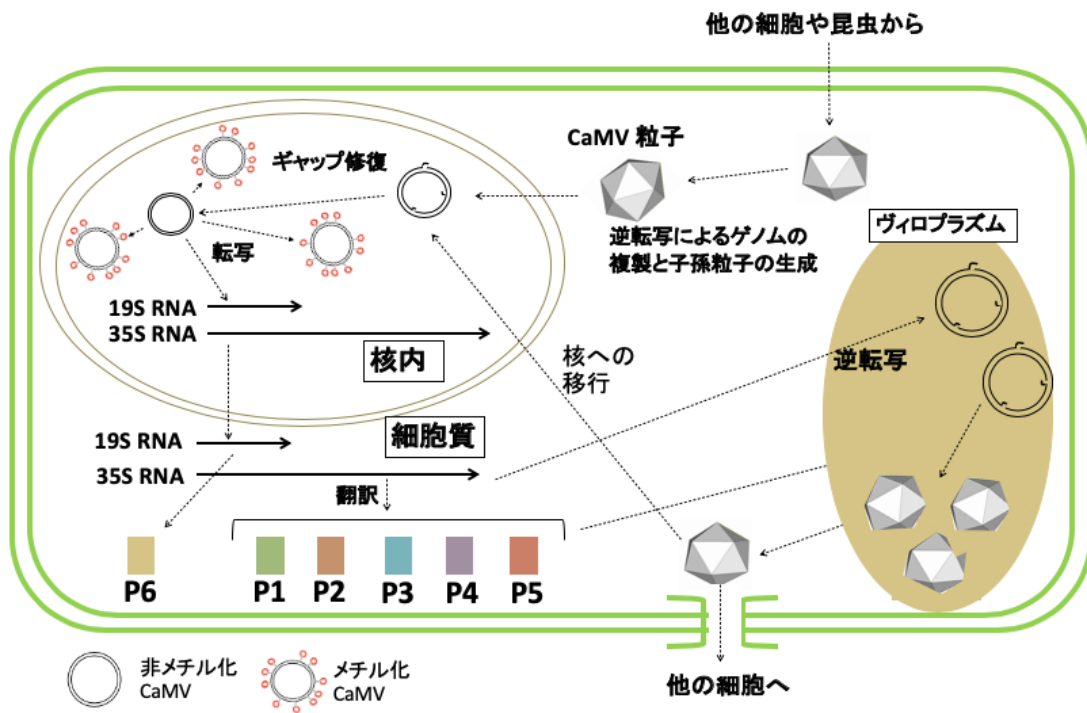


図 5-1 推定される CaMV の生存戦略の統合モデル(一細胞レベル)

表 1

サンプル	用いた制限酵素サイト	解析領域
43 dpi 核内CaMV DNA	Sall/PstI	A, B, F, G
43 dpi 核内CaMV DNA	XhoI/Scal	C, D, E
14 dpi 核内CaMV DNA	Sall/PstI	A, F, G
14 dpi 粒子内CaMV DNA	Sall/PstI	A, F

表 2

primer sequence (5' -> 3')	増幅領域	目的
1TTGGATTATYATAGAYAAGGATGTTGGGYAG	BSCTV genome	非メチル化コントロール分子作製
2ACCACRTRTCATTAAARRTRRTATCCCATATTATATTA	BSCTV genome	
3CACCRTRTCTTTCCAAATARTCTCATRTTC	BSCTV genome	
4TTGGATTATYATAGAYAAGGATGTTGGGYAG	BSCTV genome	バイサルファイト変換効率計測
5AAATGYTAAAGTTTTATYTYAAGTTATGAAAAA	CaMV genome, region A	バイサルファイト変換後PCRの増幅
6RRAACTAAAAACATAACTTCTATTATTACTATTA	CaMV genome, region A	
7GATTAAYTYGATYAAAGAAGGATTAAGAATATTATTG	CaMV genome, region B	
8TRACTATCAATCCRATTCTCTRCCCAATCAT	CaMV genome, region B	
9YYTTGAAGAATTAYATGTGATTATGAGAAGA	CaMV genome, region C	
10TRCARACTTTRCTRATRRTAATTRAACCTCCATC	CaMV genome, region C	
11GGYATTYATATGYTYAAGGYATYATYGAATGGA	CaMV genome, region D	
12TRRTTRTCTCTTTAATATATRTTCAACATCAAAC	CaMV genome, region D	
13GYATYAGAYGAYTAYTGGGGAGGTATGTAAA	CaMV genome, region E	
14TCATCRATATACCCRRCTRTTRACCRTTATACACAA	CaMV genome, region E	
15AGAAAGAATGYTGAYYYAYAGATGGTTAGAGAG	CaMV genome, region F	
16AATTTTATRATARAARTATTTTACAAATACAAATACATA	CaMV genome, region F	
17TAYYTATAYTATAYGYTAAGGGATGYTTGATTTT	CaMV genome, region G	
18CCRCTCCAARATRAACCATRRACATRATCTTTC	CaMV genome, region G	
19TAATACGACTCACTATAGGG	pTOPO4, T7 promoter	バイサルファイト変換後PCRのシーケンス
20AAGCTATTTAGGTGACACT	pMD20	
21AGTTCGACGGAGAAGGTGAC	CaMV genome	RT-PCR
22TTTGTAGGTGCCACCTTCCTTT	CaMV genome	
23TGGAAGCAAAAGACGGAACCATCTCCGTTG	Actin1 of B.rapa (BrACT1)	
24CAGTGACTTCGGCGTGTGCAGTAGGGTCGG	Actin1 of B.rapa (BrACT1)	
25ACGTCAAGATCCGTTGCTCAAAC	Mitochondria of B.rapa	精製CaMV粒子の確認
26GAGAATTCGAAAACCTCCGTTTCC	Mitochondria of B.rapa	
27AGAAGATAGAGCTTCACTGTTTTGTAGACACG	CaMV ORF5	核内再移行実験
28GAACCTCCATCTGCTATTTTGACCAT	CaMV ORF5 (junction primer)	
29CTGGAACACACAAGACAATGGACAATGGTACCA	blocking primer	

## 謝辞

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 宇垣正志教授、ならびに資源生物創成学研究室の皆様、副査として審査会で示唆に富むコメントをくださった松永幸大 教授、青木不学 教授、山次康幸 教授、鈴木匡 准教授に深く感謝申し上げます。カリフラワーモザイクウイルス DNA をご分与くださった東京大学大学院農学生命科学研究科 日比忠明名誉教授に感謝申し上げます。

## 引用文献

- Blevins, Todd, Rajendran Rajeswaran, Michael Aregger, Basanta K. Borah, Mikhail Schepetilnikov, Loïc Baerlocher, Laurent Farinelli, Frederick Meins, Thomas Hohn, and Mikhail M. Pooggin. 2011. "Massive Production of Small RNAs from a Non-Coding Region of Cauliflower Mosaic Virus in Plant Defense and Viral Counter-Defense." *Nucleic Acids Research* 39 (12): 5003–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr119>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. 2014. "Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data." *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Borges, Filipe, and Robert A. Martienssen. 2015. "The Expanding World of Small RNAs in Plants." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (12): 727–41. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>.
- C. Hansen and J. S. Heslop-Harrison. 2004. "Sequences and Phylogenies of Plant Pararetroviruses, Viruses and Transposable Elements." *Advances in Botanical Research* 41: 165–93.
- Carluccio, Anna Vittoria, Stefania Zicca, and Livia Stabolone. 2014. "Hitching a Ride on Vesicles: Cauliflower Mosaic Virus Movement Protein Trafficking in the Endomembrane System." *Plant Physiology* 164 (3): 1261–70. <https://doi.org/10.1104/pp.113.234534>.
- Cao, Jia Yi, You Ping Xu, Wen Li, Shuang Sheng Li, Hafizur Rahman, and Xin Zhong Cai. 2016. "Genome-Wide Identification of Dicer-like, Argonaute, and RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Families in Brassica Species and Functional Analyses of Their Arabidopsis Homologs in Resistance to Sclerotinia Sclerotiorum." *Frontiers in Plant Science* 7 (OCTOBER2016): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01614>.
- Deniz, Özgen, Jennifer M. Frost, and Miguel R. Branco. 2019. "Regulation of Transposable Elements by DNA Modifications." *Nature Reviews Genetics* 20 (7): 417–31. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0106-6>.
- DJ.McCance. 1996. "DNA Viruses- DNA Extraction, Purification and Characterization." In *Virology Methods Manual*, 191–230.
- Ehrlich, Melanie, Xian Yang Zhang, and Nilufar M. Inamdar. 1990. "Spontaneous Deamination of Cytosine and 5-Methylcytosine Residues in DNA and Replacement of 5-Methylcytosine Residues with Cytosine Residues." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 238 (3): 277–86. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90019-8).
- Feng Cheng, Jian Wu, Jianli Liang and Xiaowu Wang. 2015. "Genome Triplication Drove the Diversification of Brassica Plants." *The Brassica Rapa Genome*, no. 1: 115–20. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47901-8>.

- Feng, Suhua, Shawn J. Cokus, Xiaoyu Zhang, Pao Yang Chen, Magnolia Bostick, Mary G. Goll, Jonathan Hetzel, et al. 2010. "Conservation and Divergence of Methylation Patterning in Plants and Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8689–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul. 1992. "A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5): 1827–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>.
- Fujimoto, Ryo, Taku Sasaki, and Takeshi Nishio. 2006. "Characterization of DNA Methyltransferase Genes in Brassica Rapa." *Genes and Genetic Systems* 81 (4): 235–42. <https://doi.org/10.1266/ggs.81.235>.
- Fultz, Dalen, Sarah G. Choudury, and R. Keith Slotkin. 2015. "Silencing of Active Transposable Elements in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 27: 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.027>.
- Gardner, R C, and R J Shepherd. 1980. "A Procedure for Rapid Isolation and Analysis of CaMV DNA." *Virology* 106: 159–61.
- Gehring, Mary, and Steven Henikoff. 2007. "DNA Methylation Dynamics in Plant Genomes." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1769 (5–6): 276–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.01.009>.
- Guilley, Hubert, Roderick K. Dudley, Gérard Jonard, Erwin Balázs, and Kenneth E. Richards. 1982. "Transcription of Cauliflower Mosaic Virus DNA: Detection of Promoter Sequences, and Characterization of Transcripts." *Cell* 30 (3): 763–73. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90281-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90281-1).
- Haas, Muriel, Marina Bureau, Angèle Geldreich, Pierre Yot, and Mario Keller. 2002. "Cauliflower Mosaic Virus: Still in the News." *Molecular Plant Pathology* 3 (6): 419–29. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00136.x>.
- Hall, T.A. 1999. "BIOEDIT: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/ NT." *Nucleic Acids Symposium Series*.
- Hayatsu, Hikoya. 2008. "The Bisulfite Genomic Sequencing Used in the Analysis of Epigenetic States, a Technique in the Emerging Environmental Genotoxicology Research." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 659 (1–2): 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.04.003>.
- Hetzl, Jennifer, Andrea M. Foerster, Günther Raidl, and Ortrun Mittelsten Scheid. 2007. "CyMATE: A New Tool for Methylation Analysis of Plant Genomic DNA after Bisulphite Sequencing." *Plant Journal* 51 (3): 526–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

313X.2007.03152.x.

- James T Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S Lander, Gad Getz & Jill P Mesirov. 2013. "Integrative Genomic Viewer." *Broad Institute* 29 (1): 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt0111-24>.
- Kato, Masaomi, Asuka Miura, Judith Bender, Steven E. Jacobsen, and Tetsuji Kakutani. 2003. "Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in Arabidopsis." *Current Biology* 13 (5): 421–26. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00106-4).
- Kim, Jang-Kyun Seo and Kook-Hyung. 2016. "Long-Distance Movement of Viruses in Plants." *Current Research Topics in Plant Virology*, 153–72. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2>.
- Kim, M. Yvonne, and Daniel Zilberman. 2014. "DNA Methylation as a System of Plant Genomic Immunity." *Trends in Plant Science* 19 (5): 320–26. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.014>.
- Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods* 9 (4): 357–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lauria, Massimiliano, and Vincenzo Rossi. 2011. "Epigenetic Control of Gene Regulation in Plants." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1809 (8): 369–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.03.002>.
- Law, Julie A., and Steven E. Jacobsen. 2010. "Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals." *Nature Reviews Genetics* 11 (3): 204–20. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Lippman, Zachary, Bruce May, Cristy Yordan, Tatjana Singer, and Rob Martienssen. 2003. "Distinct Mechanisms Determine Transposon Inheritance and Methylation via Small Interfering RNA and Histone Modification." *PLoS Biology* 1 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000067>.
- Martinière, Alexandre, Daniel Gargani, Marilyne Uzest, Nicole Lautredou, Stéphane Blanc, and Martin Drucker. 2009. "A Role for Plant Microtubules in the Formation of Transmission-Specific Inclusion Bodies of Cauliflower Mosaic Virus." *Plant Journal* 58 (1): 135–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03768.x>.
- Martinière, Alexandre, Anouk Zancarini, and Martin Drucker. 2009. "Aphid Transmission of Cauliflower Mosaic Virus: The Role of the Host Plant." *Plant Signaling and Behavior* 4 (6): 548–50. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8712>.
- Mattia Pelizzola and Joseph R.Ecker. 2011. "The DNA Methylome." *FEBS Lett.* 585 (13): 1994–2000. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Meyer, Peter. 2011. "DNA Methylation Systems and Targets in Plants." *FEBS Letters* 585 (13): 2008–15. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.017>.

- Mishiba, Kei Ichiro, Masahiro Nishihara, Takashi Nakatsuka, Yoshiko Abe, Hiroshi Hirano, Takahide Yokoi, Akiko Kikuchi, and Saburo Yamamura. 2005. "Consistent Transcriptional Silencing of 35S-Driven Transgenes in Gentian." *Plant Journal* 44 (4): 541–56.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02556.x>.
- Mishiba, Kei ichiro, Satoshi Yamasaki, Takashi Nakatsuka, Yoshiko Abe, Hiroyuki Daimon, Masayuki Oda, and Masahiro Nishihara. 2010. "Strict de Novo Methylation of the 35S Enhancer Sequence in Gentian." *PLoS ONE* 5 (3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009670>.
- Neiderhuth, Chad E., and Robert J. Schmitz. 2017. "Putting DNA Methylation in Context: From Genomes to Gene Expression in Plants." *Biochimica et Biophysica Acta* 15 (1): 34–48.  
<https://doi.org/10.1038/nrg3575.Systems>.
- Okumura, Azusa, Asahi Shimada, Satoshi Yamasaki, Takuya Horino, Yuji Iwata, Nozomu Koizumi, Masahiro Nishihara, and Kei ichiro Mishiba. 2016. "CaMV-35S Promoter Sequence-Specific DNA Methylation in Lettuce." *Plant Cell Reports* 35 (1): 43–51.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-015-1865-y>.
- Piedra-Aguilera, Álvaro, Chen Jiao, Ana P. Luna, Francisco Villanueva, Marc Dabad, Anna Esteve-Codina, Juan A. Díaz-Pendón, Zhangjun Fei, Eduardo R. Bejarano, and Araceli G. Castillo. 2019. "Integrated Single-Base Resolution Maps of Transcriptome, SRNAome and Methylome of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in Tomato." *Scientific Reports* 9 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39239-6>.
- Rigal, Mélanie, and Olivier Mathieu. 2011. "A 'Mille-Feuille' of Silencing: Epigenetic Control of Transposable Elements." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1809 (8): 452–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.04.001>.
- Schoelz, James E., Carlos A. Angel, Richard S. Nelson, and Scott M. Leisner. 2016. "A Model for Intracellular Movement of Cauliflower Mosaic Virus: The Concept of the Mobile Virion Factory." *Journal of Experimental Botany* 67 (7): 2039–48.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv520>.
- Scott M. Leisner, Robert Turgeon, Stephan H. Howell. n.d. "Long Distance Movement of Cauliflower Mosaic Virus in Infected Turnip Plants." MPML.
- Shababi, Monir, June Bourque, Karuppaiah Palanichelvam, Anthony Cole, Dong Xu, Xiu-feng Wan, and James Schoelz. 2006. "The Ribosomal Shunt Translation Strategy of Cauliflower Mosaic Virus Has Evolved from Ancient Long Terminal Repeats." *Society* 80 (8): 3811–22.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3811>.
- Shimada, Asahi, Azusa Okumura, Satoshi Yamasaki, Yuji Iwata, Nozomu Koizumi, Masahiro Nishihara, and Kei ichiro Mishiba. 2017. "A 64-Bp Sequence Containing the GAAGA Motif Is Essential for CaMV-35S Promoter Methylation in Gentian." *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1860 (8): 861–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.06.001>.
- Suzuki, Miho M., and Adrian Bird. 2008. “DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics.” *Nature Reviews Genetics* 9 (6): 465–76.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2341>.
- Tang, Wenjian, and Scott Leisner. 1998. “Methylation of Nonintegrated Multiple Copy DNA in Plants.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245 (2): 403–6.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8435>.
- Tsukahara, Sayuri, Akie Kobayashi, Akira Kawabe, Olivier Mathieu, Asuka Miura, and Tetsuji Kakutani. 2009. “Bursts of Retrotransposition Reproduced in Arabidopsis.” *Nature* 461 (7262): 423–26. <https://doi.org/10.1038/nature08351>.
- Ugaki, Masashi, Takashi Ueda, Marja C.P. Timmermans, Jeffrey Vieira, Keith O. Eiiiston, and Joachim Messing. 1991. “Replication of a Geminivirus Derived Shuttle Vector in Maize Endosperm Cells.” *Nucleic Acids Research* 19 (2): 371–77.  
<https://doi.org/10.1093/nar/19.2.371>.
- Vanyushin, Boris F., and Vasili V. Ashapkin. 2011. “DNA Methylation in Higher Plants: Past, Present and Future.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1809 (8): 360–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.006>.
- Wegener, Marius, and Michaela Müller-McNicoll. 2018. “Nuclear Retention of MRNAs – Quality Control, Gene Regulation and Human Disease.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 79: 131–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.001>.
- Xu, Fang, Shaohua Xu, Marcel Wiermer, Yuelin Zhang, and Xin Li. 2012. “The Cyclin L Homolog MOS12 and the MOS4-Associated Complex Are Required for the Proper Splicing of Plant Resistance Genes.” *Plant Journal* 70 (6): 916–28.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04906.x>.
- Zhang, Huiming, Zhaobo Lang, and Jian Kang Zhu. 2018. “Dynamics and Function of DNA Methylation in Plants.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (8): 489–506.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>.
- Zhang, Lei, Xu Cai, Jian Wu, Min Liu, Stefan Grob, Feng Cheng, Jianli Liang, et al. 2018. “Improved Brassica Rapa Reference Genome by Single-Molecule Sequencing and Chromosome Conformation Capture Technologies.” *Horticulture Research* 5 (1).  
<https://doi.org/10.1038/s41438-018-0071-9>.
- Zhou, Wanding, Gangning Liang, Peter L. Molloy, and Peter A. Jones. 2020. “DNA Methylation Enables Transposable Element-Driven Genome Expansion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (32): 19359–66.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1921719117>.

